



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTILÁN

**Identificación morfológica y molecular de distintas
especies del género *Aspergillus* potencialmente
micotoxigénicos en granos de café.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERA EN ALIMENTOS

P R E S E N T A:

CAROL JAZMÍN MARTÍNEZ ROJAS

ASESOR: DR. JOSÉ FRANCISCO MONTIEL SOSA

COASESOR: M. EN C. MARÍA CRISTINA PÉREZ REYES

CUAUTILÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U.N.A.M.
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. EN C. JORGE ALFREDO CUELLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Identificación morfológica y molecular de distintas especies del género Aspergillus potencialmente micotoxigénicos en granos de café

Que presenta la pasante: Carol Jazmín Martínez Rojas
Con número de cuenta: 305312301 para obtener el Título de: Ingeniera en Alimentos

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 14 de marzo de 2014.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. José Francisco Montiel Sosa	
VOCAL	M. en C. Tais Nopal Guerrero	
SECRETARIO	IA. Miriam Álvarez Velasco	
1er. SUPLENTE	Dr. Enrique Martínez Manrique	
2do. SUPLENTE	QFB. Luis Alberto Parra Oaxaca	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

HMI/iac

“Un sueño que sueñas solo es sólo un sueño. Un sueño que sueñas con alguien es una realidad”

(John Lennon)

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por ayudarme a culminar esta etapa tan importante en mi vida, haberme acompañado a lo largo de mi carrera, por ser mi fortaleza en momentos de debilidad y por brindarme una vida llena de aprendizajes.

A mis padres Norma Rojas Retana y Jorge Salvador Martínez Rivas, por ser la mayor inspiración y el mejor ejemplo de mi vida, por estar conmigo en todos los momentos difíciles, y por haberme regalado la valiosa oportunidad de tener una excelente educación en el transcurso de mi vida. Por ser el pilar más importante y demostrarme día a día su cariño e incondicional apoyo.

A mi hermana Jaki, por ser simplemente mi mejor amiga y haber llenado mi vida de alegría y amor cuando más lo necesité, por ser mi cómplice estos 25 años de vida, y por ser el mejor ejemplo de desarrollo profesional a seguir.

A mi hermano Jorge, por ser la personita que más amo en el mundo y haber llenado mi vida de alegría estos 12 años.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por permitirme formar parte de la máxima casa de estudios, brindarme los conocimientos invaluable y valores necesarios para mi formación profesional. Orgullosamente sangre azul y piel dorada.

A todos los profesores que contribuyeron durante toda mi formación profesional como Ingeniera, especialmente a mis asesores el Dr. Francisco Montiel Sosa por brindarme los conocimientos y recursos así como la confianza depositada en mi para la realización de este proyecto; a la M. en C. María Cristina Pérez Reyes por su gran apoyo e invaluable conocimientos transmitidos, a la M. en C. Josefina Moreno Lara por su confianza y apoyo técnico a lo largo de estos años, pero principalmente por su invaluable amistad. A las maestras de la Unidad de Investigación de Granos y Semillas FESC, UNAM, por su gran apoyo. A la M. en C. Karla García por su apoyo e incondicional amistad.

A Elita, Brenn, Fidel, Brenda, Víctor Hugo, Rubén, Edna, Daniel, Iván, Lupis, Sandy y Jhoanly, por ser una pieza clave en mi vida y compartir conmigo una parte de su vida, por estar a mi lado en todos los momentos buenos pero sobre todo en los más difíciles, por haber estado conmigo siempre.

Agradecimientos al proyecto PAPIME-UNAM
N°PE202513 y al PAPIIT 1N211413 por el apoyo
otorgado para la realización de este trabajo.

INDICE

ÍNDICE GENERAL.....	i
INDICE DE FIGURAS.....	iv
ÍNDICE DE TABLAS.....	vi
GLOSARIO DE TÉRMINOS.....	viii
RESUMEN.....	xii
INTRODUCCIÓN.....	xiii

CAPÍTULO 1. MARCO TEÓRICO 1

1.1 Antecedentes del café..... 1

1.1.1 Definición del café.....	1
1.1.2 Historia y origen del café.....	2
1.1.3 Clasificación botánica del café.....	5
1.1.4 Especies y variedades de café cultivadas en México.....	6
1.1.5 Zonas Productoras de café en México.....	7
1.1.6 Oferta y demanda de café en México.....	10
1.1.7 Composición química del café.....	12
1.1.8 Procesado y tecnología del café.....	18

1.2 Hongos en granos y semillas..... 23

1.2.1 Definición.....	23
1.2.2 Clasificación de los hongos que invaden granos y semillas.....	24
1.2.3 Factores determinantes en el desarrollo de hongos.....	26
1.2.3.1 Factores intrínsecos.....	27
1.2.3.2 Factores extrínsecos.....	28

1.3 Género *Aspergillus* 30

1.3.1 Descripción del género <i>Aspergillus</i>	30
1.3.2 Características de algunas especies del género <i>Aspergillus</i>	32
1.3.2.1 <i>Aspergillus flavus</i>	32

1.3.2.2 <i>Aspergillus parasiticus</i>	32
1.3.2.3 <i>Aspergillus clavatus</i>	33
1.3.2.4 <i>Aspergillus candidus</i>	33
1.3.2.5 <i>Aspergillus ochraceus</i>	34
1.3.2.6 <i>Aspergillus oryzae</i>	34
1.3.2.7 <i>Aspergillus pseudotamarii</i>	34
1.3.2.8 <i>Aspergillus chevalieri</i>	35
1.3.2.9 <i>Aspergillus niger</i>	35
1.3.2.10 <i>Aspergillus japonicus</i>	36
1.3.2.11 <i>Aspergillus sojae</i>	36
1.3.2.12 <i>Aspergillus carbonarius</i>	37
1.4 Micotoxinas.....	38
1.4.1 Aflatoxinas	41
1.4.1.1 Características químicas de las Aflatoxinas	42
1.4.1.2 Presencia de aflatoxinas en alimentos	43
1.4.1.3 Normatividad e Ingesta diaria admisible.....	44
1.4.2 Ocratoxinas	44
1.4.2.1 Características de Ocratoxinas	45
1.4.2.2 Presencia de Ocratoxinas en los alimentos.....	45
1.4.2.3 Normatividad e ingesta diaria admisible.....	46
1.5 Técnicas para la determinación de hongos en granos	46
1.5.1 Técnicas basadas en Medios de cultivo	46
1.5.2 Técnicas basadas en ácidos nucleicos.....	50
1.5.2.1 Fundamento de la PCR.....	51
1.5.2.2 Etapas de la Reacción	51
1.5.2.3 Componentes de la reacción.....	54
1.5.2.4 Análisis del producto obtenido de la PCR.....	57
1.5.2.5 Ventajas y desventajas de la PCR	58

CAPITULO 2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	59
2.1 Justificación del trabajo.	59
2.2 Cuadro Metodológico.....	59
2.2.1 Descripción de cuadro metodológico	61
2.3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	63
2.3.1 Procedencia de los granos de café	63
2.3.2 Determinación y cuantificación de la micobiota presente	64
2.3.3 Identificación Morfológica de los hongos a nivel de género y/o especie	64
2.3.4 Caracterización de la macromorfología	65
2.3.5 Caracterización de la micromorfología.....	66
2.3.6 Cultivos axénicos de las cepas puras del género <i>Aspergillus</i>	67
2.3.7 Extracción de DNA por el Método de Sambrook.....	68
2.3.8 Cuantificación de DNA por medición de Absorbancia.	69
2.3.9 Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	70
2.3.10 Programas de PCR.....	71
2.3.11 Electroforesis horizontal en gel de agarosa	72
2.3.12 Análisis de los resultados de electroforesis (Fotodocumentador).....	74
CAPITULO 3. RESULTADOS Y DISCUSION	75
Conclusiones.....	94
Referencias	95
ANEXO A.....	99
ANEXO B.....	102
ANEXO C.....	106
ANEXO D.....	113

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fruto de café (Cortijo, 2008)	3
Figura 2. Estructura del fruto de café (Cortijo, 2008)	3
Figura 3. Estados productores de café en México (CEFP, 2001)	8
Figura 4. Diagrama de proceso del beneficiado Húmedo.....	20
Figura 5. Diagrama de proceso del beneficiado seco.....	21
Figura 6. Fase de crecimiento fúngico y localización de la biosíntesis de las micotoxinas	39
Figura 7. Aflatoxinas del grupo B, M y G. (Duarte, 2005).....	43
Figura 8. Etapas en la Reacción de Cadena de la Polimerasa	52
Figura 9. Ciclos en la reacción en cadena de la polimerasa	53
Figura 10. Cuadro metodológico	59
Figura 11. Cultivo de cepas en cultivos Czapek.....	65
Figura 12. Programa del Termociclador para <i>Aspergillus niger</i>	71
Figura 13. Programa del Termociclador para <i>Aspergillus ochraceus</i>	72
Figura 14. Evaluación electroforética en gel de agarosa al 2% del producto de PCR con primers AspergNi F y AspergNi R. Carril B: blanco, carril 1: cepa identificada como <i>Aspergillus niger</i> Tiegh	90
Figura 15. Evaluación electroforética en gel de agarosa al 2% del producto de PCR con primers AspergOch F y AspergOch R. Carril B: blanco, carril 1 y 2: cepa identificada como <i>Aspergillus ochraceus</i> K. Wilh.	91

Figura 16. Evaluación electroforética en gel de agarosa al 2% del producto de PCR con primers AspergNi F y AspergNi R. Carril B: Blanco, Carril 1: *Aspergillus niger* Tiegh, carril 2: *Aspergillus tamarii* Kita, carril 3: *Aspergillus carbonarius* (Bainier) Thom, carril 4: *Aspergillus sojae* Sakaguchi, carril 5: *Aspergillus flavus* Link, carril 6: Cepa identificada como *Aspergillus ochraceus* K. Wilh, carril 7: *Aspergillus japonicus* Saito.92

Figura 17. Evaluación electroforética en gel de agarosa al 2% del producto de PCR con primers AsperOch F y AsperOch R. Carril B: Blanco, Carril 1: Cepa identificada como *Aspergillus ochraceus* K. Wilh, carril 2: *Aspergillus tamarii* Kita, carril 3: *Aspergillus carbonarius* (Bainier) Thom, carril 4: *Aspergillus sojae* Sakaguchi, carril 5: *Aspergillus flavus* Link, carril 6: *Aspergillus niger* Tiegh, carril 7: *Aspergillus japonicus* Saito.93

Figura 18. Secuencia FASTA del gen productor de aspergillopepsina113

Figura 19. Amplicón de los primers seleccionados para *Aspergillus niger*114

Figura 20. Secuencia FASTA del gen pks en *Aspergillus ochraceus*.....114

Figura 21. Amplicón del gen pks en *Aspergillus ochraceus*.....114

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación Botánica del café (Monroig, 2004)	5
Tabla 2. Oferta y demanda de café verde (1990-2009) (FAO, 2009).....	10
Tabla 3. Consumo de café en México (FAO, 2009)	11
Tabla 4. Composición química del grano verde de café según su especie (Cortijo,2008)	13
Tabla 5. Composición química del grano de café tostado (PROFECO, 2001).....	18
Tabla 6. Subgéneros y secciones del género <i>Aspergillus</i> (Vargas, 2008)	31
Tabla 7. Producción de micotoxinas según la especie (Klich, 2002).....	38
Tabla 8. Principales géneros productores de micotoxinas (Betina, 1984).....	41
Tabla 9. Muestras de café verde	63
Tabla 10. Volúmenes de reactivos para la técnica de electroforesis.....	73
Tabla 11. Micobiota presente en granos de café verde originarias de distintos estados de la República Mexicana	76
Tabla 12. Micobiota presente en granos de café verde en medios de cultivo PDA	81
Tabla 13. Micobiota presente en granos de café verde en medios de cultivo MSA	83
Tabla 14. Concentración de DNA (ng/μL) y relación 260/280 de las cepas del género <i>Aspergillus</i>	86
Tabla 15. Primers específicos para <i>Aspergillus niger</i> Tiegh.....	88
Tabla 16. Primers específicos para <i>Aspergillus ochraceus</i> K. Wilh	89

Tabla 17. Diámetros de colonia (mm) en medios de cultivo para <i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i>	102
Tabla 18. Diámetros de colonia (mm) en medios de cultivo para <i>Aspergillus</i> sección <i>Flavi</i>	102
Tabla 19. Diámetros de colonia (mm) en medios de cultivo para <i>Aspergillus</i> sección <i>Circumdati</i>	103
Tabla 20. Micromorfología para género <i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i>	104
Tabla 21. Micromorfología para género <i>Aspergillus</i> sección <i>Flavi</i>	105
Tabla 22. Micromorfología para género <i>Aspergillus</i> sección <i>Circumdati</i>	106
Tabla 23. Características Macroscópicas y Microscópicas de la cepa FLAVUS1M4.....	106
Tabla 24. Identificación de la cepa FLAVUS1M4.....	106
Tabla 25. Características Macroscópicas y Microscópicas de la cepa FLAVUS2M3.....	107
Tabla 26. Identificación de la cepa FLAVU2M3.....	107
Tabla 27. Características Macroscópicas y Microscópicas de la cepa FLAVUS3M4.....	108
Tabla 28. Identificación de la cepa FLAVUS3M4.....	108
Tabla 29. Características Macroscópicas y Microscópicas de la cepa NIGRI1M2	109
Tabla 30. Identificación de la cepa NIGRI1M2.....	109
Tabla 31. Características Macroscópicas y Microscópicas de la cepa NIGRI2M5	110
Tabla 32. Identificación de la cepa NIGRI2M5.....	110

Tabla 33. Características Macroscópicas y Microscópicas de la cepa NIGRI3M7111

Tabla 34. Identificación de la cepa NIGRI3M7111

Tabla 35. Características Macroscópicas y Microscópicas de la cepa CIRCUMDATI1M2.....112

Tabla 36. Identificación de la cepa CIRCUMDATI1M2112

GLOSARIO DE TÉRMINOS

- Amplicón:** Conjunto de moléculas de DNA idénticas, es el producto de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR)
- Annealing:** "Apareamiento", los cebadores "primer" reaccionan con la hebra sencilla de DNA y se pegan en lugares específicos por complementariedad de bases.
- Aw:** Actividad de agua
- Axénico:** Cultivo libre de contaminación, es decir, que contiene solo una especie y está libre de cualquier otro organismo (Ulloa & Hanlin, 2006).
- BLAST:** "Basic Local Alignment Search Tool". Programa bioinformático de alineamiento de secuencias de tipo local, ya sea de DNA, RNA o de proteínas. El programa es capaz de comparar una secuencia problema contra una gran cantidad de secuencias que se encuentren en una base de datos.
- BrEt:** "Bromuro de Etidio", agente intercalante de DNA, emite fluorescencia cuando se irradia con luz UV.
- Carcinogénicos:** Aquel que actúa sobre los tejidos vivos de tal forma que produce cáncer
- Cepa:** En micología se dice de un hongo aislado de un cultivo puro y caracterizado taxonómicamente, con una o más propiedades morfológicas, fisiológicas o de otra índole, que lo distinguen de otros aislamientos de la misma especie (Ulloa & Hanlin, 2006).

- Enzima:** Moléculas de naturaleza proteica y estructural que catalizan reacciones químicas. Las enzimas actúan sobre unas moléculas denominadas sustratos, las cuales se convierten en moléculas diferentes denominadas productos
- Esclerocios:** Estructura endurecida compuesta de tejido fúngico que resiste condiciones desfavorables del medio, son capaces de germinar y reiniciar un crecimiento vegetativo (Ulloa & Hanlin, 2006).
- Gen:** Elemento del plasma germinal con una función específica en la herencia, que está determinada por una secuencia particular de bases púricas y pirimídicas en el ADN, o a veces en el ARN, y que sirve para controlar la transmisión de un carácter hereditario, que se manifiesta en la estructura específica de una proteína en particular, como una enzima (Ulloa & Hanlin, 2006).
- GenBank:** Es la base de datos de secuencias genéticas del NIH (*Nacional Institute of Health de Estados Unidos*). Colección de secuencias de DNA de carácter público.
- HACCP:** "*Hazard analysis and critical control points*" es un proceso sistemático preventivo para garantizar la inocuidad alimentaria, de forma lógica y objetiva. Es de aplicación en industria alimentaria aunque también se aplica en la industria farmacéutica, cosmética y en todo tipo de industrias que fabriquen materiales en contacto con los alimentos.
- Hongos:** Grupo de organismos Eucariotas portadores de esporas, heterótrofos, de reproducción sexual y asexual, de nutrición absorptiva, no producen clorofila. Presentan estructuras somáticas, ramificadas y filamentosas, que están rodeadas con paredes celulares que contienen quitina. Una clasificación de los seres vivos (Ulloa & Hanlin, 2006).
- Micotoxigénico:** Organismos capaces de producir metabolitos llamados micotoxinas.

Micotoxinas:	Toxina producida por un hongo, especialmente una que afecta a los humanos y animales superiores, en las que pueden causar micotoxicosis. La mayoría son producidas por los géneros <i>Aspergillus</i> , <i>Fusarium</i> y <i>Penicillium</i> (Ulloa & Hanlin, 2006).
Morfología:	Ciencia encargada del estudio de la estructura de un organismo o sistema en un contexto comparativo. Ciencia de la forma (Ulloa & Hanlin, 2006).
Orgánico:	Producto agrícola o agroindustrial que son cultivados siguiendo métodos tradicionales sin sustancias sintéticas ni tóxicas par el ser humano y para el medio ambiente. Estos procedimientos tienen como objetivo principal la obtención de alimentos sin aditivos químicos ni sustancias de origen sintético y una mayor protección del medio ambiente por medio del uso de técnicas no contaminantes.
PCR:	Técnica de la biología molecular para amplificar un segmento de DNA, generando miles de millones de copias de una secuencia particular con ayuda de la Taq polimerasa.
Primers:	Cadena complementaria a la cadena de DNA molde, utilizada por la Taq Polimerasa para seguir la síntesis de nucleótidos.
spp.	Especie (Ulloa & Hanlin, 2006).
Sulcado:	Termino botánico para describir surcos (Ulloa & Hanlin, 2006).
Taxonomía:	Es la ciencia que estudia los principios, métodos y fines de la clasificación. Se aplica en particular en Biología para ordenar la diversidad biológica en taxones anidados unos dentro de otros, ordenados de forma jerárquica, formando un sistema de clasificación (Ulloa & Hanlin, 2006).

- Teratógenicos:** Agente que aumenta la probabilidad de malformaciones congénitas.
- Tm:** Temperatura de alineamiento o hibridación
- Torrefacción:** Operación unitaria en donde son desarrollados bajo el efecto de la temperatura, los principios aromáticos que no existen previamente la semilla del café. Consiste en calentar los granos a una temperatura que provoque modificaciones químicas, físicas y físico-químicas, que influyen definitivamente en la calidad de la infusión, para que las cualidades sean satisfactorias (Monroig, 2004).
- Verrucoso:** En fitopatología, se posee una superficie áspera, ornamentada de prominencias diminutas o microscópicas semejantes a las verrugas (Ulloa & Hanlin, 2006).

RESUMEN

El presente trabajo de tesis tiene por objetivo identificar cepas micotoxigénicas comunes en granos de café verde como: *Aspergillus niger* y *Aspergillus ochraceus* a través de su caracterización morfológica, descritas por Klich en su libro “*Identification of common Aspergillus species*” y por su caracterización molecular. Para la identificación molecular de las distintas especies se empleó la reacción en cadena de la polimerasa, debido a que esta es una técnica de alta sensibilidad lo cual nos garantiza que los resultados serán totalmente confiables.

Se diseñaron *primers* o cebadores con genes específicos para cada una de las especies del género *Aspergillus* correspondientes a la sección *Nigri* (*Aspergillus niger*) y sección *Circumdati* (*Aspergillus ochraceus*), esto con el fin de confirmar que las especies identificadas morfológicamente en las muestras de café, corresponden a la caracterización molecular, encontradas en las muestras de café. Se comprobó experimentalmente la especificidad de los *primers* diseñados para cada una de las cepas obteniendo, especificidad única para cada par de *primer* diseñado. Se obtuvieron amplificados de ambas cepas, confirmando que las especies identificadas por claves especializadas corresponden a las especies identificadas molecularmente.

La importancia de identificar correctamente la especie de un hongo con un método rápido y confiable, se ha vuelto una necesidad para la aceptación de materias primas en la elaboración de productos alimenticios comerciales. Las buenas prácticas de manufactura antes, durante y después de la cosecha han sido un factor esencial para conservar materias primas de alto valor económico en la industria alimentaria.

INTRODUCCIÓN

México es el país líder productor de café orgánico en el mundo y el quinto lugar productor mundial de café inorgánico. Café orgánico se refiere al tipo de café que durante toda su cosecha no fue tratado por agentes químicos (herbicidas, fertilizantes y pesticidas), existen 15,979 productores de café orgánico en México (CEFP, 2001). Esto quiere decir que México es el país que más exporta café orgánico en el mundo, en donde día a día se enfrenta a las normas internacionales que exigen países Europeos, Estados Unidos de Norteamérica y Canadá, para poder exportar productos mexicanos, los cuales tienen que cumplir con la calidad requerida por estos países. Actualmente los parámetros indicadores de una buena o mala calidad en el café son: la acidez, el aroma, el cuerpo y el sabor, estos atributos se evalúan de acuerdo a pruebas sensoriales, llevadas a cabo por catadores internacionales (Cortijo, 2008). Estos parámetros de calidad pueden ser afectados por el desarrollo de hongos durante la recolección y el mal almacenamiento de los granos de café. Los hongos aparecen frecuentemente como contaminantes en productos alimenticios, constituyendo quizá el agente de deterioro más común de todo tipo de alimentos. Así mismo, son capaces de crecer en una gran variedad de cultivos invadiendo raíz, tallo, hojas, flores y frutos, ocasionando pérdidas económicas e incluso la producción de micotoxinas (Betina, 1984).

Sin embargo, la presencia de hongos en los alimentos y productos agrícolas no indica necesariamente una contaminación con micotoxinas, pero si es un factor de riesgo importante para que estas se produzcan. La contaminación de los granos de café, además de causar la pérdida de la calidad del grano, conlleva importantes pérdidas

económicas y es un riesgo sanitario para los consumidores, debido al potencial de algunas especies de hongos para producir micotoxinas como la ocratoxina A, las cuales pueden producir efectos tóxicos renales, causa nefropatía endémica, daños al sistema nervioso, acumulación de glucógeno en el hígados, derrames cerebrales parecidos a los que provoca la deficiencia de vitamina K, efectos teratógenicos (Duarte, 2005).

Particularmente en este trabajo se analizó la calidad biológica de los granos de café verde a través de la caracterización morfológica de cepas micotoxigénicas encontradas en los granos de café verde, empleando el método de placa agar a nivel de género y/o especies, y para el caso de las especies de la sección *Nigri* y *Circumdati*, se utilizaron técnicas de biología molecular.

Lo anterior se realizó a siete muestras de café verde orgánico e inorgánico provenientes de distintos estados de la República Mexicana.



CAPÍTULO 1. MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes del café

1.1.1 Definición del café

Por norma, el café es una infusión preparada mediante la extracción de las sustancias solubles y la suspensión de una porción de las sustancias insolubles del grano de café tostado y molido, utilizando agua caliente (Cortijo, 2008).

La café puede ser orgánico e inorgánico, dependiendo el manejo de la cosecha del cafeto. El café orgánico es el producto obtenido, mediante sistema de producción agrícola, orientado a la producción de café de alta calidad en cantidades suficientes, que interactúa con los sistemas y ciclos naturales; mejora y extiende ciclos biológicos dentro del sistema agrícola incluyendo microorganismos, flora del suelo, fauna y plantas; mantiene y mejora la fertilidad del suelo a largo plazo, promueve el uso apropiado del agua, recursos del agua, en el que el control de malezas, plagas y enfermedades es sin el uso de insumos de síntesis químico industrial. Este café orgánico se produce dentro de un sistema de cultivo en el cual existe una intensiva práctica de actividades culturales, mismas que son vigiladas mediante un proceso de certificación que garantiza al consumidor la adquisición de alimentos de calidad sin residuos químicos, como son fertilizantes y plaguicidas (Colin, 2002). Tomando en cuenta las prácticas tradicionales con que se ha cultivado el café, en donde se proteja el suelo, la planta y el medio ambiente. Por el contrario el café



inorgánico se cultiva mediante técnicas de cultivo donde utilizan fertilizantes y plaguicidas.

1.1.2 Historia y origen del café.

La semilla del cafeto es el producto de un árbol de la familia de las Rubiáceas, originario de Etiopía. El cafeto tiene entre cuatro y seis metros de altura, con hojas opuestas de color verde, flores blancas y frutos en baya roja (Figura 1). La semilla del cafeto, es decir, el café, suele tener cerca de un centímetro de largo, siendo plana por una parte y convexa por la otra, con un surco longitudinal. Su color es amarillento verdoso. Por extensión del término, se conoce como café a la bebida que se elabora mediante la infusión de esta semilla tostada y molida (Escamilla, 2001).

Su origen fue en Etiopia, en el África oriental en la provincia de Kaffa, aproximadamente en el siglo X D.C, de cuyo nombre se deriva el café. En la edad media el arbusto producía unas semillas aromáticas que los marineros africanos llevaron a la península de Arabia, país donde se creó el cultivo. De Arabia lo llevaron a Europa, donde la aceptación del cultivo fue tardía. Hay varios relatos imaginativos pero poco probables, acerca de cómo se descubrieron los atributos del grano tostado de café. Cuenta uno de ellos que, a un pastor de cabras etíope, le asombró el animado comportamiento que tenían las cabras después de haber mascado cerezas rojas de café. Sorprendido por este comportamiento recurrió a un superior religioso que por curiosidad las pusieron a cocinar. Al probar la bebida la encontraron de tan mal sabor, que arrojaron a la hoguera lo que quedaba en el recipiente. Los granos, a medida que se quemaban, despedían un agradable aroma. Fue así como a uno de



los monjes se le ocurrió la idea de preparar la bebida a base de granos tostados (Cortijo, 2008).



Figura 1. Fruto de café (Cortijo, 2008)

El fruto normalmente contiene dos semillas (Endospermo), las que están cubiertas por una fina membrana conocida como “Piel plateada” (endospermo) y a la vez esta película está protegida por una capa dura o endocarpio generalmente conocida como “pergamino”. Adherido firmemente a la parte externa del pergamino tenemos un mesocarpio mucilaginoso “Capa de pectina”, que está cubierto por la piel del fruto (pericarpio) (Figura 2).

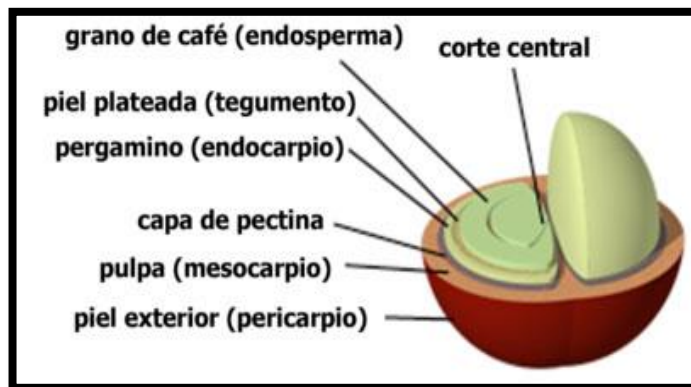


Figura 2. Estructura del fruto de café (Cortijo, 2008)



Parece que las tribus africanas, que sabían del café desde la antigüedad, molían sus granos y elaboraban una pasta utilizada para alimentar a los animales y aumentar las fuerzas de los guerreros. Su cultivo se extendió en primer lugar en la vecina Arabia, llevado probablemente por prisioneros de guerra, donde se popularizó aprovechando la prohibición del alcohol por el Islam. Yemen fue un centro de cultivo importante, desde donde se propagó al resto del mundo árabe. Los granos verdes de café llegan por primera vez a Europa a través de Venecia, se estima que hacia el año 1600, aunque algunas teorías afirman que el consumo de café en Venecia ya se realizaba en el siglo XVI como una bebida medicinal. Sus efectos y gusto exótico difundieron con rapidez el consumo, y es precisamente en Venecia donde se inaugura el primer café en Europa, en 1645. A partir de aquí otras ciudades europeas se irán sumando a esta iniciativa: Londres (1652), Marsella (1659), Ámsterdam (1663), París (1675) y Viena (1683). En Europa, el matiz social del que ya disfrutaba en los países árabes se instala al más alto nivel. A España también llega de la mano de la realeza. Fue en el siglo XVIII con el reinado de los Borbones cuando se inicia la andadura del café en nuestro país. Si bien es cierto que España fue uno de los países europeos más tardíos en su consumo, sin embargo llegó a contar con una de las mejores materias primas gracias a las colonias americanas, que resultaron ser una excelente zona de cultivo (Cortijo, 2008).



1.1.3 Clasificación botánica del café

Las plantas que producen café comercialmente pertenecen al género *Coffea* y por su considerable importancia económica requieren atención especial (Tabla 1). Detalles de la botánica de éstas han sido motivo de inseguridad y controversia entre botánicos. Los representantes de este género crecen en los trópicos y aunque incluye un gran número de especies sólo unas pocas son de importancia económica. Desde el punto de vista agrícola alrededor de 12 especies son de valor e interés. La familia de las *Rubiaceae* posee más 500 géneros y de 6 a 8 mil especies descritas. Del género *Coffea* se han descrito unas sesenta especies. Así mismo, se han señalado como cafetos botánicamente otro grupo de *Rubiaceae*, cuyos frutos se asemejan bastante a los del género *Coffea* pero que están desprovistos de cafeína. Estos se han señalado como los falsos cafetos (Monroig, 2004).

Tabla 1. Clasificación Botánica del café (Monroig, 2004)

Reino	Plantae
Tipo	Espermatofitas
Sub-Tipo	Angiospermas
Clase	Dicotiledóneas
Sub- Clase	Gamopétalas Inferiovariadas
Orden	Rubiales
Familia	<i>Rubiaceae</i>
Género	<i>Coffea</i>
Sub- Género	<i>Eucoffea</i>
Especie	<i>arábica, canephora, liberica.</i>



1.1.4 Especies y variedades de café cultivadas en México

Las especies de café que se cultivan en México son: *Coffea arábica* y *Coffea canephora*. La primera es de mayor importancia por su calidad, valor en el mercado nacional e internacional y por su extensión territorial. Se estima que *Coffea canephora* ocupa solamente una superficie no mayor al 2% de las 761,000 hectáreas cultivadas con café. A las variedades pertenecientes a *Coffea arábica* se les conoce como cafés árabes, mientras que la única variedad producida por *Coffea canephora* se le denomina café Robusta. En México, son diversas las variedades árabes cultivadas actualmente, sin embargo, solo unas pocas manifiestan importancia agronómica. Se les cultiva preferentemente en altitudes superiores a los 900 msnm, donde alcanzan sus mejores niveles de calidad bajo condiciones ecológicas aptas para su explotación (Colín, 2001).

La especie *Coffea arábica*, que constituye el 97% de la producción nacional, representada por las variedades Typica (criollo, nacional o arábica), Bourbon, Caturra, Mundo Novo, Garnica, Catuaí, Pluma Hidalgo y Maragogype, el 3% de la producción corresponde a la especie *Coffea canephora* por la variedad Pierre ex Frohener, conocida como robusta, cultivada en zonas bajas de Veracruz (principalmente en los municipios de Tezonapa y Tepatlaxco), Chiapas (sobresale el municipio de Cacahoatán) y Oaxaca (las regiones de Tuxtepec y Valle Nacional). Sin embargo, otras fuentes estiman treinta millones de kilogramos de la producción de robusta, con un considerable incremento en el estado de Chiapas (León, 1992).



La producción en México se concentra en tres variedades arábicas, Typica cultivada por el 33% de los productores, seguida por Caturra por el 26% y Bourbon por el 17%. Otras variedades menos importantes son Mundo Novo con el 10%, Garnica con 6%, Catuai con 3%, Catimores con el 2% y con menos del 0.5%, los Maragos: Maragogype y Pacamara. Debe entenderse por variedad a un conjunto de individuos similares entre sí que por sus características morfológicas y de comportamiento, se pueden diferenciar de otros grupos de plantas dentro de la misma especie. El origen de la variedad en los cafés árabes se debe principalmente a la ocurrencia de mutaciones o a la hibridación, ya sea entre variedades de la misma especie o entre especies diferentes (Colín, 2001; Rivera 1988).

1.1.5 Zonas Productoras de café en México

La distribución del cultivo del café es diversa, es posible encontrarlo desde los 100 msnm hasta casi los 2000 msnm, sin embargo, la zona óptima para su desarrollo y producción se ubica entre los 700 a 1300 msnm. El 63% de los productores mexicanos se ubica arriba de los 600 msnm, mientras que un 29% de los productores se localiza en altitudes superiores a los 900 msnm. Los tres estados más importantes para la producción de café son: Oaxaca, Veracruz y Chiapas. Las regiones cafetaleras se concentran en cuatro zonas: las vertientes del Golfo de México y del Océano Pacífico, la zona Centro-Norte y la del Soconusco en Chiapas, en el sureste mexicano, las cuatro zonas en conjunto abarcan 398 municipios en los 12 estados productores (Figura 1). El café en México es cultivado en tierras privadas, comunales y ejidales, donde los mayores contrastes en el tamaño de las tierras se encuentran en el sector privado. En Veracruz y Puebla la mayoría de las



plantaciones de café son privadas, mientras que en Chiapas dominan los ejidos, y en Oaxaca las tierras comunales, el 91% de las tierras privadas se concentra en esos cuatro estados, 73% de las tierras comunales y 76% de las tierras ejidales. En el ámbito nacional predominan los ejidatarios con 39% de la tierra, seguidos por los pequeños propietarios con 35%, los comuneros con 21% y los tipos de usufructo, arrendatarios y tenencia indefinida con 4% (CEFP, 2001).

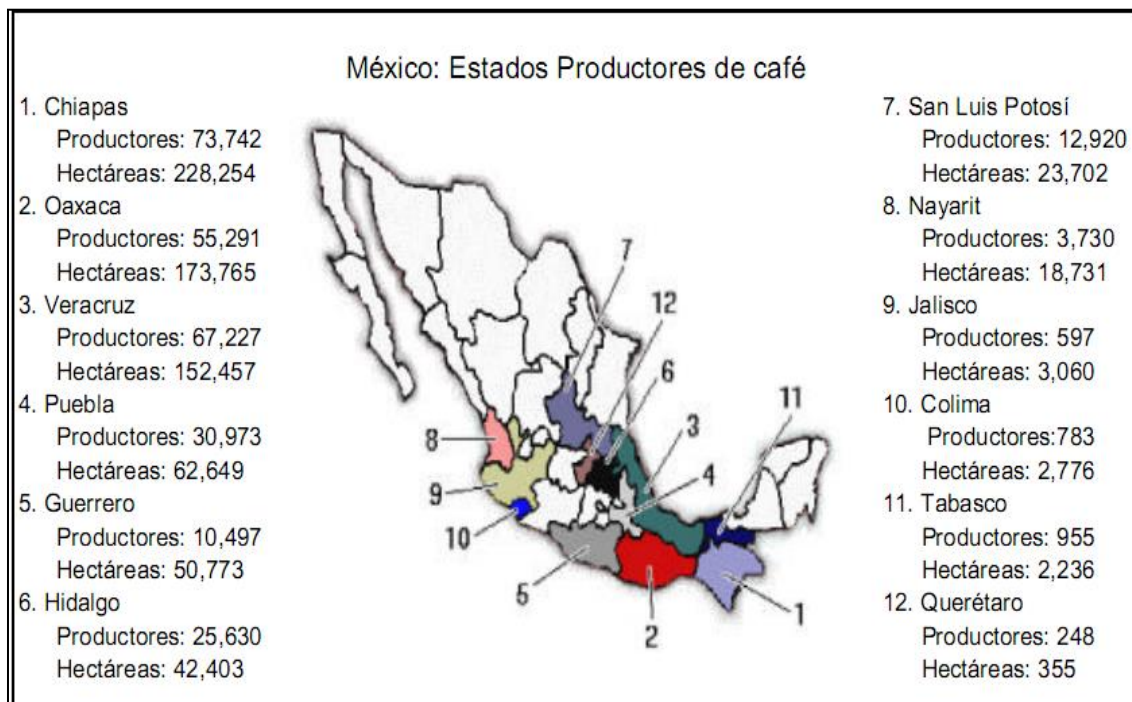


Figura 3. Estados productores de café en México (CEFP, 2001)

En el 2011, el aumento en la producción de café orgánico certificado en Chiapas lo colocó en el primer lugar en el mundo en ese sector, según la Comisión Estatal para el Desarrollo y Fomento del Café en la entidad. En torno al café orgánico, el estado de Chiapas produce 75% del total nacional, aunque todavía es sólo 35 por ciento de



lo que se cultiva en Chiapas, ya que el resto aún no ha sido certificado o está en el proceso para reunir las exigentes características. De las exportaciones de café orgánico el 70% es destinado para Estados Unidos y lo demás a Canadá, Asia y Europa (CEFP, 2001).

La tendencia mundial creciente en favor de los cafés de especialidad se refleja en que actualmente los mercados de cafés diferenciados importan entre 7 y 9 millones de sacos de café verde, que representan del 9 al 12% de las importaciones mundiales. En particular, sobresalen los cafés especiales que incluyen estándares sociales y ambientales, derivados de la mayor preocupación mundial por estos asuntos. Entre los más conocidos están los cafés orgánicos, los amigables con el ambiente y el comercio justo (Giovannucci, 2005). En el 2002, México aportó el 66% del total mundial con una producción de 47, 461 toneladas de café orgánico. Los principales destinos del café orgánico son Estados Unidos, Alemania, Holanda, Suiza, Japón, Italia, Dinamarca, España, Francia, Australia, Inglaterra y Bélgica (CEFP, 2001). El cultivo orgánico en México se ha desarrollado con éxito, impulsado por las propias organizaciones de productores; sin embargo, este dinámico sector enfrenta diversos problemas que requieren apoyo científico y técnico. Las necesidades de investigación y desarrollo del sector cafetalero orgánico son diversas; entre las más importantes están el incremento de los rendimientos y la reducción en los costos de producción.



1.1.6 Oferta y demanda de café en México

El consumo interno de café en el año 2010 fue de un millón 31 mil sacos de 60 kilogramos, equivalente a 640 gramos de consumo per cápita. A pesar de que México es el quinto país productor de café a nivel mundial, el consumo del grano en nuestro país es sumamente bajo (Tabla 2), dicho consumo es bajo si se compara con el de Estados Unidos (3.72 Kg), Francia (5.7 Kg), Alemania (8.5 Kg) o Suecia (11 Kg) promedio por persona anual. En México, de acuerdo con los niveles de consumo el principal competidor del café son los refrescos, que prácticamente se han posesionado del mercado de las bebidas. De su producción total, México exportó alrededor de 84.5% en 1999 con especificaciones sobre la calidad del producto (café verde u oro). El 25.5% restante es consumido por la industria nacional productora de cafeína, de café soluble, tostado y molido.

Tabla 2. Oferta y demanda de café verde (1990-2009) (FAO, 2009)

Producción	Importaciones	Oferta y Demanda	Consumo aparente				Variación de existencias*	Exportaciones
			Total	Desperdicios	Elaboración alimentos	Alimentación		
220,040	1,960	222,000	85,574	7,561	0	78,013	32,000	168,426
262,904	124	263,028	106,210	7,887	0	98,323	0	156,819
251,768	18	251,786	50,639	7,553	-1	43,087	-40,000	161,147
307,948	45	307,993	106,930	9,238	1	97,691	-10,000	191,064
239,870	1	239,871	83,180	7,796	-1	75,385	20,000	176,691
260,197	15	260,212	59,811	8,706	1	51,104	30,000	230,400
374,828	67	374,895	98,590	11,245	-1	87,346	-65,000	211,305
336,180	17	336,197	125,596	10,535	0	115,061	15,000	225,601
423,000	13	423,013	200,949	12,690	0	188,259	-50,000	172,064
343,440	72	343,512	167,870	13,303	0	154,567	100,000	275,642
440,000	845	440,845	177,149	13,222	0	163,927	-50,000	213,696
334,330	3,117	337,447	148,717	11,260	0	137,457	40,000	228,730
359,665	4,990	364,655	146,116	10,855	-1	135,262	-10,000	208,540
335,627	3,386	339,013	148,475	10,670	-1	137,806	20,000	210,539
324,500	12,400	336,900	124,720	9,801	0	114,919	0	212,180
324,526	8,843	333,369	121,839	9,771	0	112,068	0	211,530
374,153	6,817	380,970	94,826	11,247	0	83,579	0	286,144
368,315	17,648	385,963	122,813	11,370	0	111,443	0	263,150
306,440	17,304	323,744	87,026	9,463	0	77,563	0	236,718
311,380	14,148	325,528	61,900	9,584	0	52,316	0	263,628



Así, la planta industrial absorbe un promedio de 1.3 millones de sacos (de 60 Kg) de café verde al año, del que se destinó en la década pasada alrededor de 45% a la fabricación de cafés solubles; 18.3% a la torrefacción y 36.7% se convirtió en café tostado y molido mezclado con azúcar.

Tabla 3. Consumo de café en México (FAO, 2009)

México: Consumo de café (Porcentaje)					
	2004	2005	2006	2007	2008
Café verde utilizado por la industria	99.11	99.71	98.22	97.61	97.61
Nacional					
Elaboración de café tostado y molido	26.99	28.13	26.29	24.21	26.29
Elaboración de soluble	71.43	71.26	71.82	64.70	69.74
Importado	0.69	0.32	0.11	8.71	1.58
Café industrializado importado	0.89	0.29	1.78	2.39	2.39
Tostado y molido	0.89	0.29	0.33	0.41	0.59
Soluble	0.00	0.00	1.45	1.98	1.80
Consumo total nacional	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00

El café molido mezclado con azúcar se compone del remanente del café de exportación y su abasto en el mercado nacional depende de las cotizaciones internacionales: si son elevadas se exporta mayor cantidad, si son bajas hay más café para el mercado nacional (Tabla 3).



Cabe señalar que en la mayoría de esas industrias no se cuida la calidad del grano, pues la exigencia del consumidor mexicano no se refleja en la elaboración de cafés tostados, molidos y solubles. Además, la normatividad legal no establece exigencia alguna, por el contrario, permite la inclusión de adulterantes en la producción. La materia prima principal, el café verde u oro, dirigida a la industria torrefactora, no tiene ninguna norma, por lo tanto es el de peor calidad desde su origen. Se consume "mancha" de cafés naturales, con diferentes grados de daño, pues durante la industrialización son mezclados con cafés buenos y se amortigua el sabor y el cuerpo propios del café dañado (FAO, 2009).

Además, los costos de producción en México son 27.5% superiores a los brasileños y 22.6% mayores a los de El Salvador. En el año 2000 México ocupó el quinto lugar como país productor en el ámbito internacional, participando con 4.6 millones de sacos después de Brasil, que produjo el 32.0 millones, Colombia 12.0, Vietnam 11.6, Indonesia 6.6 e India con 5 millones.

1.1.7 Composición química del café

El café, como todas las plantas, contiene miles de componentes químicos, con diferentes características. Muchos compuestos químicos han sido identificados en los granos de café y estos reaccionan e interactúan en todas las etapas del procesamiento del café para producir un producto final con una gran diversidad y complejidad de estructuras. El café *arábigo* y *canephora*, son especies cualitativa y cuantitativamente diferentes en cuanto a su composición química (Tabla 4).



Tabla 4. Composición química del grano verde de café según su especie (Cortijo,2008)

Especie de café	<i>Coffea arabica</i>	<i>Coffea canephora</i>
Componente	Porcentaje (%)	Porcentaje (%)
Cafeína	0.9-1.2	1.6-2.4
Minerales	3.0-4.2	4.0-4.5
Lípidos	12.0-18.0	9.0-13.0
Trigonelinas	1.0-1.2	0.6-0.75
Proteínas	11.0-13.0	11.0-13.0
Ácidos alifáticos	1.5-2.0	1.5-2.0
Ácidos clorogénicos	5.5-8.0	7.0-10.0
Polisacáridos	50.0-55.0	37.0-47.0
Oligosacáridos	6.0-8.0	5.0-7.0
Aminoácidos libres	2.0	2.0

Todos los constituyentes que están presentes en los granos de café son transformados durante el proceso de tostado y una gran variedad de compuestos pueden ser extraídos y encontrados en las infusiones de café. Algunos constituyentes de los granos de café pueden ser destruidos durante el tostado, originando nuevos compuestos presentes en las infusiones o sustancias volátiles. Ocurren transformaciones químicas y se forman cientos de sustancias volátiles, como los que conforman el aroma, los pigmentos poliméricos, y melanoidinas del café (Cortijo, 2008).



Sustancias minerales

Algunos autores mencionan la importancia de estos minerales en el crecimiento y desarrollo estructural de la planta al igual de la semilla de café. En algunos casos forman parte de estructuras químicas tales como carbohidratos, proteínas y lípidos. En el caso del café tostado se habla de su contribución en el sabor. Los minerales más abundantes en los granos de café son Fósforo, Magnesio, Potasio y Calcio. La presencia de estos minerales es mayor en el café Robusta y aún mucho mayor en el café tostado, esto se debe muy posiblemente a que durante el proceso no existe gran pérdida pues el 90% se extrae en la preparación de café soluble (Cortijo, 2008).

Componentes nitrogenados

Se aplica estrictamente a todos los compuestos que contienen nitrógeno orgánico e inorgánico como son los alcaloides, proteínas y aminoácidos (Gil-Agusti, 2005).

Cafeína

Es el principal alcaloide del grano de café, al cual se le atribuye a la actividad estimulante de la bebida. La variedad Robusta cuenta con un mayor contenido. También están presentes pequeñas cantidades de teobromina (1.5-2.5 ppm) y trazas de teofilina. La trigonelina, una metil betaína de la piridina se halla en mayor concentración en el café arábica (1.0-1.2%) su importancia radica en ser un componente relacionado con la niacina (Uraga, 2002). El proceso del café verde y la descafeinización tienen poco efecto sobre el contenido de trigonelina, pero el tostado causa una destrucción progresiva del 50-80%, los productos de degradación incluyen



la niacina, nicotinamida y una cantidad de compuestos volátiles contribuidores del aroma como la piridina y los pirroles (Cortijo, 2008).

Proteínas y aminoácidos libres

En el caso del café verde las proteínas están unidas a polisacáridos en las paredes celulares, una fracción de proteína es soluble en agua, la cual constituye la mitad del contenido total y una fracción es insoluble. Durante el proceso del tostado, las proteínas se desnaturalizan y se degradan para producir fragmentos de bajo peso molecular. Adicionalmente se dan algunas reacciones con carbohidratos e incluso con compuestos fenólicos, para producir compuestos que contribuyen al aroma y a la coloración del café (Cortijo, 2008).

Enzimas

Durante el proceso del tostado, enzimas como glicosidasas, proteasas y lipasas son desnaturalizadas y degradadas resultando en una pérdida de su actividad. Mientras que durante el procesamiento del grano se pueden producir cambios, como la producción de varias agliconas, aminoácidos libres y ácidos grasos libres que contribuyan a la calidad de la bebida (Cortijo, 2008).

Lípidos

Los lípidos del café verde están compuestos en su mayor parte de aceite principalmente en el endospermo, y una pequeña cantidad de cera presente en las paredes externas del grano, se les considera un importante vehículo para el aroma del café tostado. Entre los lípidos saponificables, los triglicéridos que van de un 70-



80%, algunos ácidos grasos libres están presentes en una concentración de 0.5-3.0% en granos de buena calidad, pero esta cantidad aumenta a 20% en granos de baja calidad debido a los procesos de degradación oxidativa. El proceso del tostado incrementa la concentración de ácidos grasos libres entre un 30-40%, el valor indica un aumento posiblemente en la actividad de la lipasa durante las primeras etapas del tostado. Entre los ácidos grasos encontrados en el grano de café verde están el ácido linoléico, palmítico, oleico, arquídico, así como trazas de ácido mirístico, entre otros. Los lípidos insaponificables se encuentran en el grano en un 7-20% de materia insaponificable, la cual es la responsable del bajo punto de fusión (8°C), entre ellos se encuentran los esteroides, serotonina, e hidrocarburos alifáticos (León, 1992).

Compuestos fenólicos

Los ácidos clorogénicos son el principal grupo de compuestos fenólicos en los granos de café. Estos compuestos son considerados como productos secundarios de la planta ya que no contienen participación directa en las actividades bioquímicas primarias, su contenido revela ser mayor en el grano que en los demás tejidos por lo que su presencia se atribuye a la disuasión de predadores mamíferos como los pájaros (Cortijo, 2008).

Ácidos alifáticos

Los granos de café verde contienen ácidos no volátiles incluyendo al cítrico, oxálico, málico y tartárico, mientras que por el proceso del tostado se forman 34 ácidos alifáticos



los cuales comprenden 15 ácidos volátiles y el resto no volátil (Cortijo, 2008).

Carbohidratos

Son los principales constituyentes de los granos de café verde, participan como precursores del aroma, mejoran la calidad organoléptica de la bebida contribuyendo a su viscosidad, imparten estabilidad en la espuma y participan en la formación de sedimentos en el café soluble, durante el proceso de tostado sufren cambios complejos que contribuyen al sabor de la bebida. Los granos de café verde contienen carbohidratos subdivisibles en polisacáridos y en azúcares de bajo peso molecular entre los que encontramos trisacáridos, disacáridos y monosacáridos. El contenido de ellos en base seca es del 45-60% en grano verde, de 40-50% en el grano tostado y del 30-45% en el café soluble. El principal carbohidrato de bajo peso molecular es la sacarosa mientras que los galactomanos lo son como polisacáridos seguidos por arabinogalactanos, celulosa y pectina (Colín, 2001; Cortijo, 2008).

La composición química de los granos de café se altera por el proceso de tostado, pierde gran cantidad de agua entre el 1-5%, proteínas, ácido clorogénico y carbohidratos. Ocurren transformaciones químicas y se forman cientos de sustancias volátiles, como los gases que forman el aroma, pigmentos poliméricos y melanoidinas (Tabla 5).



Tabla 5. Composición química del grano de café tostado (PROFECO, 2001)

Especie de café	<i>Coffea arabica</i>	<i>Coffea canephora</i>
Componente	Porcentaje (%)	Porcentaje (%)
Cafeína	1.3	2.4
Minerales	4.5	4.7
Lípidos	17	11
Trigonelinas	1	0.7
Proteínas	10	10
Ácidos alifáticos	2.4	2.5
Ácidos clorogénicos	2.7	3.1
Carbohidratos	38	41.5
Aromas volátiles	0.1	0.1
Melanoidinas	23	23

1.1.8 Procesado y tecnología del café

Los granos de café se pueden procesar bajo dos métodos:

a. Beneficiado húmedo

El beneficiado húmedo es un proceso para transformar los frutos del cafeto de su estado uva a café pergamino. Este se desarrolla en dos fases; la primera es la húmeda o despulpe que se debe llevar a cabo las primeras 24 horas, ya que pueden presentarse manchas en el café pergamino debido a la oxidación de los taninos presentes en el mucilago, y la segunda es el secado que termina con la obtención de café pergamino seco (Humedad: 12%) para su almacenamiento. Este método se utiliza principalmente para los granos de mejor calidad (Figura 4).



b. Beneficiado seco

Para el beneficiado seco se utilizan dos métodos de secado, el secado al sol o el secado mecánico por medio de aire caliente; en cuanto al secado al sol los granos húmedos se extienden en una capa delgada y se mezclan ocasionalmente para darles un secado uniforme. Después de 8 o 10 días bajo el sol requieren considerable espacio, tiempo y mano de obra, por lo que muchas fincas ocupan secadores rotatorios en donde se pasa una corriente de aire a 85°C sobre los granos húmedos, el secado se completa en aproximadamente 24 horas. El secado se termina cuando la humedad del grano llega a aproximadamente un 12%, momento en el que se somete a la trilla para preparar la pulpa seca y el pergamino, quedando lo que se denomina café verde. Algunas fincas ocupan los 2 métodos. Después los granos son colocados en sacos limpios, y deberán ser colocados en lugares secos, bien ventilados sobre tarimas de madera (Figura 5) (Prieto, 2002).

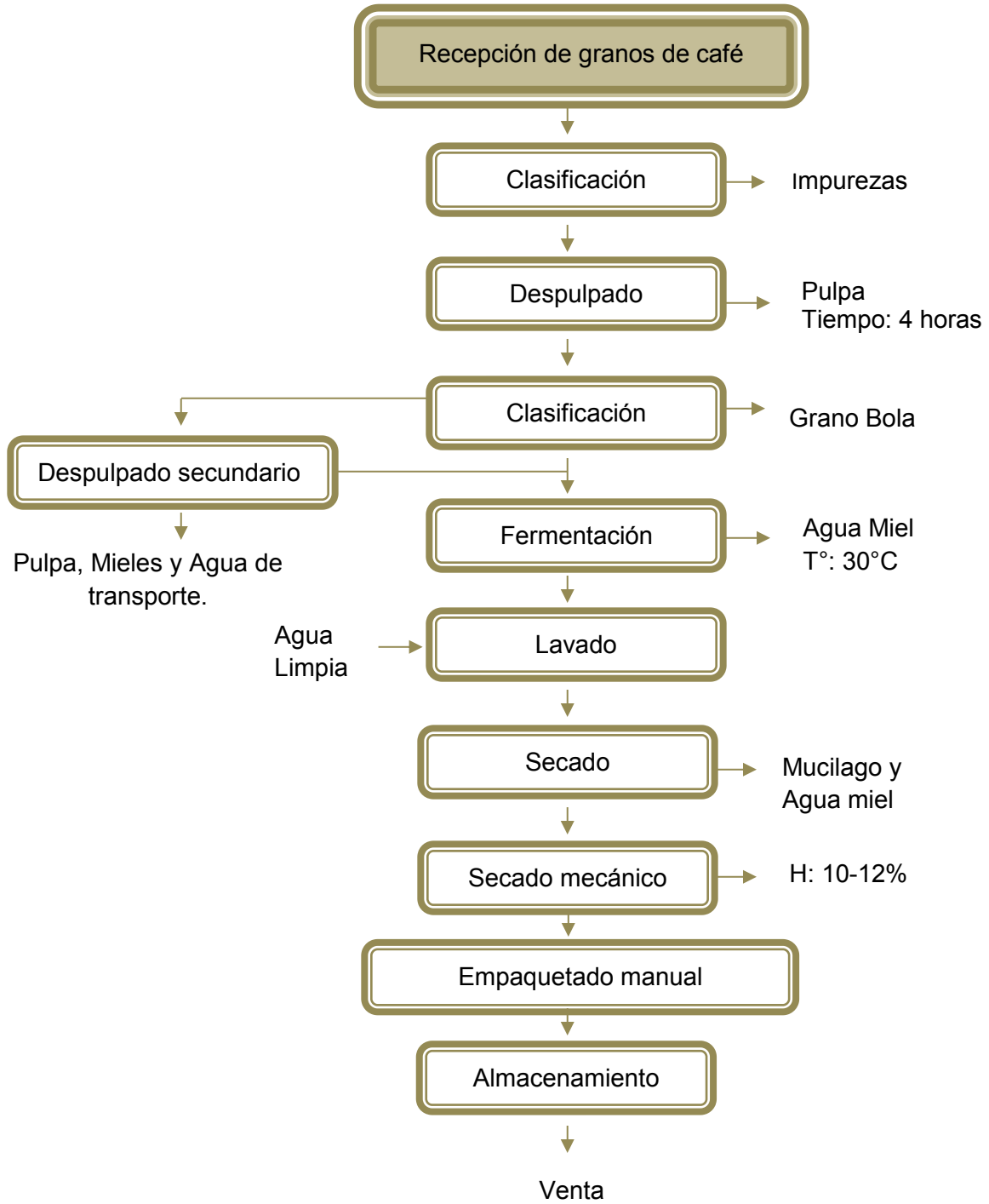


Figura 4. Diagrama de proceso del beneficiado Húmedo.

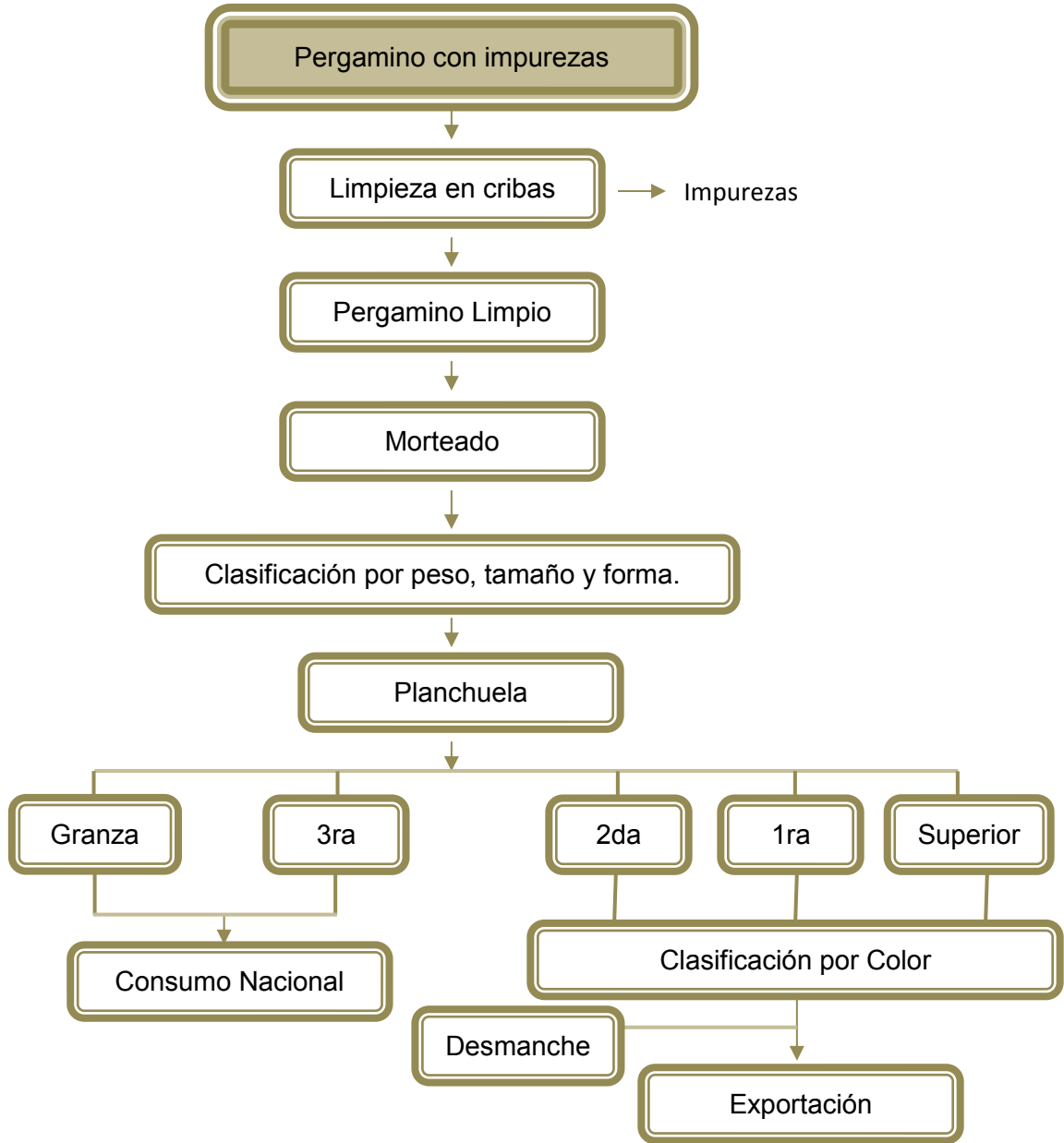


Figura 5. Diagrama de proceso del beneficiado seco.



Proceso de Tostado del café

El tostado es un proceso en el cual existe una transferencia de calor y de masa simultánea, producto del control de 2 variables, como son la temperatura y el tiempo, las cuales le confieren al café verde, el aroma, el sabor, el color y el cuerpo (López, 2003).

Durante el proceso de tostado en el grano:

- a) Pierde peso, alrededor del 15-20%, debido en gran parte a la evaporación de su humedad y en menor parte a la pirólisis de algunos componentes.
- b) El grano aumenta de volumen, entre un 100 y un 130% en el caso del café natural en función del tiempo de tueste y entre el 70-80% para el torrefacto.
- c) Su color amarillo verdoso se transforma en un marrón, más o menos oscuro en función del grado de tueste escogido.
- d) La composición química del grano sufre una importante transformación, tanto a nivel cuantitativo como cualitativo.
- e) Azúcares, grasas, proteínas, sustancias nitrogenadas no proteicas, ácidos, todo sufre una transformación debido a las altas temperaturas a que es sometido el grano.

Alrededor de 50°C se presentan los primeros cambios en las capas superficiales. A los 100°C se puede apreciar que el grano verde pasa a un color amarillento volatilizándose un aroma a pan tostado. Alrededor de los 120°C o 130°C, el color se torna castaño obteniendo poco a poco tonalidades pardas y aumentando su volumen. A los 180°C se empieza a definir el olor, esto debido a la descomposición



de grandes estructuras químicas por efecto del calor, y a la reacciones de Maillard, aparecen productos gaseosos como vapor de agua, CO₂ y CO y compuestos volátiles generados por la descomposición de proteínas, grasas y carbohidratos, al llegar a los 200°C después de la caramelización de los azúcares se alcanza el tostado completo, en donde el contenido de agua disminuye a valores de entre 1.5% y 3.5% en peso (López, 2003). Entre los 185°C y los 240°C se encuentra la zona de torrefacción de los granos de café, en donde la temperatura óptima está entre los 210°C y 230°C (Thiago, 2009).

1.2 Hongos en granos y semillas

1.2.1 Definición

Los hongos son organismos eucariontes heterótrofos, carecen de clorofila, el talo somático de la mayoría está constituido por un conjunto de hifas llamado micelio, sin embargo existen hongos unicelulares como las levaduras. Presentan una pared celular bien definida y se reproducen sexual y asexualmente formando esporas. La respiración es fundamentalmente aerobia, aunque muchos hongos son microaerofílicos o anaerobios facultativos, la alimentación es por absorción (Duarte, 2005). Todos los productos agrícolas son invadidos por diversos microorganismos durante su desarrollo en el campo, siendo los hongos los más abundantes y la principal causa de enfermedades, ocasionando severas pérdidas económicas al reducir el potencial de producción de los cultivos que atacan. En particular los granos y semillas son invadidos por diversos hongos en el campo, entre ellos los géneros como: *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Aspergillus* y muchos otros que causan enfermedades a las plantas y que son transmitidos de un ciclo a otro a través de las



semillas. Por otra parte, también los granos y las semillas son invadidos por hongos cuya hábitat natural no es el campo si no el almacén el silo y las trojes, siendo principalmente especies del género *Aspergillus* y *Penicillium* (Kauffman., 1981).

1.2.2 Clasificación de los hongos que invaden granos y semillas

Los hongos que crecen sobre productos agrícolas, en especial los que invaden granos y semillas durante su desarrollo, cosecha o almacenamiento, han sido clasificados ecológicamente por Christensen y Kauffman (1969) en tres tipos: hongos de campo, hongos de almacén y hongos de deterioro avanzado:

Hongos de campo

Los hongos de campo requieren para su desarrollo una humedad relativa entre el 90 y 100, y un contenido de humedad en las semillas de 22 a 23%, con un amplio rango de temperatura entre 0 y 30°C, aunque algunos pueden desarrollarse a 35°C o más. Los principales géneros y agentes acusados de enfermedades de los cultivos son *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Helminthosporium*, entre otros. Cuando en una muestra de grano se aíslan solamente hongos de campo, se pueden inferir dos situaciones que el grano es recién cosechado o que ha sido bien conservado. Los hongos de campo tienden a desaparecer en periodos de almacenamiento prolongado, pero las micotoxinas que generan no (Moreno, 1988).



Hongos de almacén

Los hongos presentes en los productos almacenados son especies principalmente de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y algunos otros Xerófilos (Christensen & Sauer, 1982). Los factores que influyen en su desarrollo son el contenido de humedad, temperatura, tiempo, el grado de invasión fúngica antes del almacenamiento, así como la cantidad de insectos y ácaros que facilitan la propagación del hongo. Requieren para su desarrollo menor humedad relativa (70 a 90%) y contenido de humedad de los granos (13 a 20%), el rango de temperatura es más alto (0-45°C) y pueden crecer en concentraciones bajas de oxígeno (Klich, 2002). En una muestra de grano si se determina la presencia de una o más especies de hongos de almacén, nos señala las condiciones de humedad a las que se ha almacenado y por la diversidad o abundancia de este tipo de hongos en el grano se puede inferir el cuidado que se le ha tenido después de la cosecha. Así mismo, se ha encontrado que pueden invadir el grano desde el campo, especialmente cuando las condiciones ambientales favorecen su desarrollo (Christensen & Kauffman, 1981). La diferencia entre los hongos de campo y los hongos de almacén son los requerimientos de actividad de agua para crecer (Christensen & Meronuck, 1976).

Hongos de Deterioro avanzado

El tercer grupo de hongos requiere alta humedad relativa, superior al 90% para su desarrollo y en la naturaleza se les encuentra colonizando materia orgánica en proceso de descomposición, lo cual es indicativo de que otros hongos han antecedido en la sucesión microbiana. Los géneros causantes de un deterioro



avanzado son: *Chaetomium*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Absidia* y algunas especies del género *Aspergillus*, entre otros. Si los hongos aislados de granos pertenecen a los hongos de deterioro avanzado, quiere decir que existe una mala calidad de esta materia prima (Moreno, 1988).

Actualmente el combate de estos hongos solo se logra secando los granos a niveles de humedad desfavorables para su desarrollo, a contenidos de humedad de los granos en equilibrio con humedades relativas menores del 75%. Otra manera de retardar el crecimiento de los hongos es almacenarlos a bajas temperaturas, como se hace en los bancos de germoplasma; sin embargo, el factor más importante es el contenido de humedad de los granos y de los productos almacenados, el que está en función directa de la humedad relativa del medio ambiente que los rodea, teniendo ambas, la humedad del grano y del ambiente, para equilibrarse. El contenido de agua de los productos se expresa en porcentaje con base al peso húmedo o seco del producto. En el comercio de los granos se usa el porcentaje de humedad calculado en relación al peso húmedo de la muestra. Los microorganismos que invaden a los granos y sus derivados requieren contenidos de humedad mínimos para su desarrollo y esos requerimientos son iguales en productos con alto contenido de almidón.

1.2.3 Factores determinantes en el desarrollo de hongos.

Los factores que influyen en el desarrollo de los hongos y la síntesis de micotoxinas en alimentos los podemos dividir en factores intrínsecos y factores extrínsecos (Pitt, 1997).



1.2.3.1 Factores intrínsecos

Están relacionados con la composición del sustrato y/o alimento, actividad de agua y pH.

Sustrato: las fuentes de carbono influyen en la síntesis de micotoxinas, en experimentos *in vitro* se ha obtenido una mayor producción de micotoxinas, cuando se añade azúcar fermentable al medio de cultivo como glucosa o sacarosa, que cuando se emplea fructosa, maltosa, manosa, galactosa, xilosa o arabinosa no se obtienen los mismos resultados.

Actividad de agua: es uno de los factores determinantes para el crecimiento fúngico, microbiológicamente la actividad de agua se usa como medida de disponibilidad de agua por parte de los microorganismos para su desarrollo, ya que dicha medida es independiente del sustrato o alimento al que se refiere, contrariamente a lo que ocurre cuando se utiliza la humedad como parámetro. Las aflatoxinas, sin embargo, se producen en intervalos de A_w de 0.95 a 0.99, aunque se ha encontrado un mínimo de 0.71 para *Aspergillus flavus*.

Influencia del pH: Los hongos pueden crecer en el intervalo de pH de 3 a 8, el grado óptimo es cercano a 5, pero el cambio de valor de pH de un sustrato o alimento puede alterar la respuesta fúngica. En las especies de *Aspergillus*, su crecimiento se ve menos afectado a valores de pH alcalinos.



1.2.3.2 Factores extrínsecos

Están relacionados con los factores físico-químicos como la temperatura de almacenamiento, humedad relativa, concentración de oxígeno, *presencia* o ausencia de luz etc. (Pitt, 1997).

Temperatura: Los hongos se desarrollan en un intervalo amplio de temperatura, por la cual las condiciones más apropiadas para el desarrollo de estos microorganismos y la producción de micotoxinas son durante su formación en el campo, el transporte y almacenamiento, pudiendo conducir a la contaminación de las materias primas utilizadas para la industria alimentaria. Al ser almacenada la materia prima en malas condiciones aumenta el riesgo del desarrollo de estos microorganismos y formación de sus toxinas. Para el caso de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* se ha encontrado que crecen desde temperaturas de 10°C, siendo la óptima de 32-33°C. Las aflatoxinas se sintetizaran entre 12 y 40°C (Pitt , 1994).

Oxígeno: la mayoría de los hongos filamentosos son aerobios estrictos. Sin embargo, existen algunos hongos microaerófilicos en donde la concentración mínima de O₂ para permitir su desarrollo puede ser muy baja, cercana al 1% o incluso inferior. El crecimiento de los hongos es bueno en concentraciones de CO₂ al 20% (Tabak & Cooke, 1968). Sin embargo, la producción de aflatoxinas en concentraciones superiores al 10% se inhibe. La máxima producción de aflatoxinas depende no solo de la cepa del hongo sino también de la concentración de O₂ y de



CO₂, en combinación con la actividad de agua, pH y la temperatura de almacenamiento (Bos, 1995).

Luz: los efectos de la luz sobre la esporulación de algunas especies de *Aspergillus* han sido reportados por la formación de conidios y conidióforos, que fueron, más abundantes en los hongos expuestos a la luz. Igualmente observaron que la región azul de la luz blanca fue más efectiva en la fotorrespuesta de los hongos. También encontraron que la fotorrespuesta de los hongos es influenciada por la temperatura, la cual afecta la producción de aflatoxinas. Sin embargo, ellos demostraron que la producción de aflatoxinas es inhibida por la luz (Joffe & Lisker, 1969).

Humedad relativa: la humedad relativa es la cantidad de agua de la que disponen los microorganismos una vez alcanzado el equilibrio entre la humedad libre del producto y el vapor de agua existente en el medio ambiente que lo rodea. La humedad relativa se expresa en porcentaje y varía de unos alimentos a otros conforme su riqueza en carbohidratos o lípidos. Cualquier semilla almacenada en estado de equilibrio con una HR por debajo de 5%, está segura de no ser invadida por hongos (Pitt, 1997).



1.3 Género *Aspergillus*

1.3.1 Descripción del género *Aspergillus*.

Aspergillus es un género que corresponde a la división de *Deuteromycota*, clase *Hyphomycetes*, orden *Moniliales* y familia *Moniliaceae* la cual se reproduce asexualmente por la formación de fialoconidios (Bos & Swart, 1995). Se reconocen alrededor de 180 especies (Kozakiewicz, 1989). Algunas especies se reproducen sexualmente, las cuales corresponden a ocho o más géneros teleomórficos. La taxonomía del género más utilizada y compleja es de Raper y Fenell (1965), aunque algunos conceptos han quedado ya obsoletos, el número de especies ha variado considerablemente. Recientemente, se han producido importantes cambios en la taxonomía de *Aspergillus* spp. y sus teleomorfos. El texto más importante acerca de este género ha sido "*The genus Aspergillus*" de Raper y Fennell publicado en 1965. En este documento describieron 18 grupos de especies dentro del género *Aspergillus* basados principalmente en las características morfológicas y culturales. Estos grupos fueron tratados como secciones pertenecientes a seis subgéneros (Gams, 1985).

Una importante adición a la taxonomía fue iniciado por una publicación sobre la sistemática filogenética monofilia que se requiere para todas las especies, y el análisis de grupo externo se utiliza para determinar la polaridad de cambio de carácter. Basado en el análisis filogenético de la secuencia de datos, se propuso dividir el género *Aspergillus* en ocho subgéneros, actualmente los grupos se han dividido y cada uno de los cuales están subdivididos a su vez en una o más secciones, en total veintidós (Tabla 6) (Stephen, 2008).



Tabla 6. Subgéneros y secciones del género *Aspergillus* (Vargas, 2008)

<i>Subgénero</i>	<i>Sección</i>
<i>Nidulantes</i>	<i>Nidulantes, Sparsi, Ochraceorosei, Usti, Raperi, Silvati, Bispori</i>
<i>Circumdati</i>	<i>Flavi, Nigri, Circumdati, Cremei.</i>
<i>Fumigati</i>	<i>Fumigati, Cervini, Clavati</i>
<i>Terrei</i>	<i>Terrei, Flavipedes</i>
<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus, Restricti</i>
<i>Candidi</i>	<i>Candidi</i>
<i>Ornati</i>	<i>Ornati</i>
<i>Warcupi</i>	<i>Warcupi, Zonati</i>

Las especies más importantes productoras de micotoxinas se encuentran agrupadas en cinco secciones que se pueden distinguir teniendo en cuenta algunas características, de la morfologías de las colonias, como el color de los conidios, diámetro de la colonia, aspecto y color micelial, presencia o ausencia de esclerocios, micromorfología de las colonias, características de los conidios, presencia de células de Hülle, presencia o ausencia de cleistotecios, estructura de la pared cleistotecial, tipo de ascosporas entre algunas otras (Klich, 2002).

El color es la principal característica macroscópica para la identificación de los grupos de *Aspergillus*. Poseen distintos tonos de verde, pardo, amarillo, blanco, gris y negro. Las cabezuelas conidiales presentan bajo el microscopio cuatro formas básicas: globosa, radiada, columnar o claviforme y a simple vista las más grandes suelen parecer diminutas alfileres sobre el substrato. En los *Aspergillus*, los conidios constituyen cadenas que se originan en la célula conidiógena o fiálide. En algunos



Aspergillus hay células adyacentes a las fiálides denominadas métulas o células de soporte. Los *Aspergillus* poseen una o dos series de células sobre la vesícula, o bien presentan simultáneamente cabezas de ambos tipos (Kozakiewicz, 1989).

1.3.2 Características de algunas especies del género *Aspergillus*

1.3.2.1 *Aspergillus flavus*

Los conidios presentan un color verde olivo, algunas veces presentan color amarillo olivo. Forma esclerocios de color café oscuro, y los esclerocios crecen de forma y tamaño variable, la textura de las colonias varía dependiendo la especie. Los conidios presentan forma globosa (Raper, 1986). Es una especie cosmopolita, está distribuida por todo el mundo. Este hongo coloniza la vegetación que se encuentra en deterioro, granos y semillas, antes y después de la cosecha. Es una especie potencialmente micotoxigénica por su capacidad para producir metabolitos carcinogénicos como aflatoxinas. Su distribución se da principalmente en una latitud de los 26 a los 35 grados (Klich, 2002).

1.3.2.2 *Aspergillus parasiticus*

Presenta conidios color olivo oscuro o verde oscuro, el color de sus micelio son blancos y forma ocasionalmente esclerocios color café o negros, el color reverso de la colonia es amarillento. Los conidios presentan forma globosa (Raper, 1986). Es una especie de la cual se tienen pocos aislamientos lo cual se puede atribuir en parte a la falta de investigadores para distinguirlo del *Aspergillus flavus*. Ha sido



encontrado en una gran variedad de suelos y frecuentemente en semillas, plantas e insectos, también es productor de aflatoxinas (Klich, 2002).

1.3.2.3 *Aspergillus clavatus*

Sus conidios son verde opaco, turquesa grisáceo, turquesa obscuro, sus micelio son de color blanco, en la parte reversa de la colonia forma un color amarillo opaco, las colonias son radiales y planas. Los conidios se forman mejor en cultivo MEA, observándose de color verde grisáceo (Raper, 1986). Es un hongo con una distribución muy amplia en suelos especialmente de clima caliente. Sin embargo, también se ha encontrado en zonas desérticas, bosques y suelos cultivados en latitudes entre 25 y 36 grados. Se distribuye en una gran variedad de alimentos como cereales almacenados, frutas (manzanas, melocotones, peras, uvas, etc.) y derivados (zumos de fruta), pero más frecuente en la cebada malteada que constituye un ambiente especialmente apto para su crecimiento y esporulación (Klich, 2002).

1.3.2.4 *Aspergillus candidus*

Se identifica en cultivo CYA25 en color blanco o amarillo pálido, posee micelio blanco, en ocasiones forma esclerocios, inicialmente presenta un color rosado-violeta convirtiéndose al paso del tiempo en color negro, en la parte reversa presenta un color amarillo pálido o amarillo naranja. La colonia crece en forma radial (Raper, 1986). Especie comúnmente predominante en regiones tropicales y subtropicales. Se encuentra en el suelo, granos, semillas, harina, frutas, otros productos alimenticios y estiércol (Klich, 2002).



1.3.2.5 *Aspergillus ochraceus*

Presenta micelio de color blanco, la formación de sus esclerocios es variable y presentan color rosado o purpura, el color reverso de la colonia es amarillo o en ocasiones rojo, las colonias por lo general son pequeñas, planas y radiales. Los conidios son esféricos y llegan a medir entre 2.5- 3.5 μm (Pitt & Hocking, 1997). La mayoría de la información de esta especie es principalmente en áreas tropicales de 0 a 15 grados de latitud, en suelos desérticos, también se han encontrado en semillas almacenadas principalmente en el café. Son productores de Ocratoxinas (Klich, 2002).

1.3.2.6 *Aspergillus oryzae*

Los conidios presentan un color amarillo grisáceo o café olivo, el micelio presenta un color blanco, y en ocasiones forman esclerocios color negro. El color reverso de la colonia en ocasiones es café o amarillo grisáceo. Los conidios presentan una forma globosa ovoide o elíptica (Pitt & Hocking, 1997). Ha sido encontrado en el suelo, plantas, semillas, y en fábricas de algodón. Esta especie es usada en alimentos fermentados y producción de salsa de soya, tofu, sake, miso, y como fuente de enzimas industriales. Se distribuye en suelos tropicales 0-25 grados de latitud (Klich, 2002).

1.3.2.7 *Aspergillus pseudotamarii*

Es una especie que presenta características morfológicas y fisiológicas semejantes a *Aspergillus tamarii*, sin embargo en un trabajo reciente se encontró que una cepa identificada como *Aspergillus tamarii* era productora de aflatoxinas como provocando una revisión de la taxonomía de esta especie en cepas aflatoxigénicas y no



aflatoxigénicas. Demostrándose por estudios de genética y morfología la diferencia en cuanto a la producción de aflatoxinas, que los aislamientos caracterizados como *Aspergillus tamaris* productores de aflatoxina corresponden a la especie *Aspergillus pseudotamaris* (Pitt & Hocking, 1997).

1.3.2.8 *Aspergillus chevalieri*

Se distinguen mejor sus colores en el cultivo CYA25, las áreas conidiales presentan un color café o verde grisáceo, presenta micelio y cleistotecios amarillos. El color reverso de la colonia va de amarillo a café. En cultivo MEA, los conidios crecen en color amarillo olivo, olivo o café olivo, el micelio va de color blanco a un color amarillento, las colonias son de pequeño tamaño (Domsch *et al.*, 1980). Es un hongo xerófilo, se ha aislado comúnmente en zonas tropicales y subtropicales entre 26 y 35 grados de latitud. Se encuentra en semillas de algodón y varias clases de alimentos secos (Klich, 2002).

1.3.2.9 *Aspergillus niger*

Se encuentra en el grupo de los *Aspergillus* negros, el cual se clasifica dentro de la familia *Moniliaceae*, orden *Moniliales*, clase *Hyphomycetes*, *Filum Deuteromycota* (Kwon-Chung & Bennett, 1992). Posee cabezuelas conidiales de tonos negros negro grisáceo, negro-café, negro púrpura o negro carbón, son globosas, radiadas o divididas formando columnas de cadenas de conidios irregulares o bien definidas. Los conidióforos son de color hialino a café, típicamente lisos o en pocas especies ligeramente granulares, de paredes robustas o quebradizas. Vesículas globosas hialinas o de color café claro a oscuro. Los conidios son globosos o subglobosos, elípticos o achatados, generalmente espinosos. Esclerocios globosos o subglobosos,



de coloración crema cuando son jóvenes, tornándose rosada, gris o café (Bos & Swart, 1995).

1.3.2.10 *Aspergillus japonicus*

Se encuentra dentro del subgénero *Circumdati* y la sección *Nigri*. El diámetro de las colonias en incubación de siete días en diferentes medios de cultivo tiene variaciones, desde 20 hasta 70 mm, el diámetro más representativo de sus colonias es de 60-70 mm de diámetro, posee cabezuelas conidiales que presentan un color variable de negro-café a marrón, desarrollan micelio color blanco y en ocasiones desarrollan esclerocios de color crema o purpuras, presenta exudados incoloros. Las características de sus vesículas son globosas y elongadas, uniseriadas. Sus conidios son globosos y ben ocasiones elipsoidales, y presentan textura espinosa. Esta especie es predominante en zonas tropicales (Klich, 2002).

1.3.2.11 *Aspergillus sojae*

Se encuentra dentro del subgénero *Circumdati* y la sección *Flavi*. El diámetro de las colonias en incubación de siete días en diferentes medios de cultivo tiene variaciones de 45-70 mm, el diámetro más representativo de sus colonias es de 60-70 mm de diámetro. Posee conidios de colores que van desde el café olivo hasta café amarillento, desarrolla micelio color blanco, exudados incoloros y en el reverso de la colonia en ocasiones presenta colores que van desde café grisáceo hasta verde olivo. Sus vesículas son globosas, predominan las estructuras uniseriadas, aunque algunas veces se presenta la estructura biseriada (Klich, 2002).



1.3.2.12 *Aspergillus carbonarius*

Se encuentra dentro del subgénero *Circumdati* y la sección *Nigri*. El diámetro de las colonias en incubación de siete días tiene variaciones de 55-70 mm de diámetro. Presenta conidios color negro olivo, desarrollan micelio color blanco, en algunas ocasiones forman exudados color café hialinos y esclerocios color amarillo o rosa. En el reverso de la colonia se presentan colores desde amarillo hasta gris oscuro. Es productor de ocratoxina A presenta vesículas esféricas biseriadas.

Algunas de estas especies además de causar deterioro en diversos granos son productores de diferentes micotoxinas. En la Tabla 7 se mencionan los principales metabolitos tóxicos de género *Aspergillus* para el hombre y animales, producidos algunos de ellos en forma frecuente en los alimentos (Klich, 2002; Betina, 1984).



Tabla 7. Producción de micotoxinas según la especie (Klich, 2002)

Especies	Producción de micotoxinas
<i>Aspergillus ochraceus</i>	Emodina, ácido kójico, ocratoxina A, ácido penicílico, ácido secalónico A, xantorginina, viomelleina, ácido aspergílico, vioxantina.
<i>Aspergillus candidus</i>	Cadidulina, terfenilina, xantosina.
<i>Aspergillus clavatus</i>	Ascladiol, clavatul, ácido kójico, patulina, citocalasina E.
<i>Aspergillus flavus</i>	Aflatoxinas, aflavinina ácido aspergílico, ácido ciclopiazónico, ácido 3- nitropropiónico, paspalinina.
<i>Aspergillus oryzae</i>	ácido 3- nitropropiónico, orizacidina, maltorizina, ácido ciclopiazónico
<i>Aspergillus parasiticus</i>	Aflatoxinas, ácido kójico, ácido aspergílico.
<i>Aspergillus tamarii</i>	Ácido ciclopiazónico, fumigaclavina A.
<i>Aspergillus chevalieri</i>	Xantocilina.

1.4 Micotoxinas

Los hongos utilizan para su crecimiento sustancias químicas denominadas metabolitos primarios: ácidos nucleicos, proteínas, carbohidratos y lípidos, principalmente la producción de estos metabolitos se presenta en la fase de crecimiento exponencial. Los metabolitos secundarios son compuestos que no son esenciales para el crecimiento como son: antibióticos, alcaloides, ácido giberélico, pigmentos y micotoxinas, entre otros (Betina, 1984).



Las micotoxinas son metabolitos fúngicos que están presentes en una gran parte de los suministros alimentarios mundiales y pueden representar una amenaza potencial para la inocuidad de los alimentos (Duarte, 2005). La posible toxicidad crónica de muchas micotoxinas en dosis inferiores suele suscitar mayor preocupación que la toxicidad aguda, dado que algunas de estas sustancias son carcinógenos muy poderosos y la exposición a ellas es muy amplia. Las micotoxinas se sintetizan cuando la fase de crecimiento llega a su fase estacionaria siendo a menudo asociada con la diferenciación y la esporulación (Figura 6). Frecuentemente los hongos toxígenos desaparecen de los granos y productos en los que han crecido, al verse limitados por condiciones favorables para su crecimiento, quedando solamente las micotoxinas, lo que hace particularmente difícil verificar la calidad sanitaria de un determinado producto, sea un grano u otra materia prima; teniendo que recurrir a técnicas químicas y biológicas para conocer su calidad sanitaria.

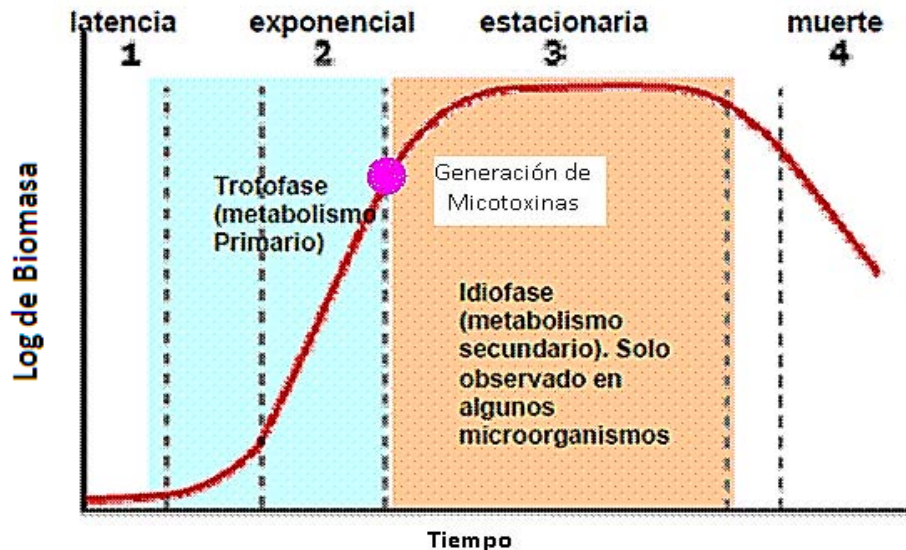


Figura 6. Fase de crecimiento fúngico y localización de la biosíntesis de las micotoxinas



El interés por las micotoxinas se da en 1960 cuando miles de pavos, patos y otros animales domésticos murieron en Inglaterra a causa de una enfermedad, conocida como la enfermedad X de los pavos, que se atribuyó a la presencia de aflatoxinas de *Aspergillus flavus* en harina de cacahuate importada de Sudamérica. Debido a su estabilidad las micotoxinas pueden persistir aun cuando hayan muerto las esporas. La micotoxicosis son las intoxicaciones provocadas por micotoxinas (Duarte, 2005).

Las especies de hongos productores de micotoxinas que son de gran importancia desde el punto de vista agroalimentario y que participan en procesos de micotoxicosis naturales son: *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*, que son los que agrupan un mayor número de especies productoras de micotoxinas (Tabla 8); ya que generan aflatoxinas, citrinina, fumonisinas, ocratoxina A, patulina, tricotecenos y zearaleonona (Vargas, 2008).



Tabla 8. Principales géneros productores de micotoxinas (Betina, 1984).

Género	Número de especies micotoxigénicas
<i>Penicillium</i>	32
<i>Aspergillus</i>	15
<i>Fusarium</i>	12
<i>Byssochlamys</i>	2
<i>Stachybotrys</i>	2
<i>Trichoderma</i>	2
<i>Alternaria</i>	1
<i>Chaetomium</i>	1
<i>Paecilomyces</i>	1
<i>Rhizopus</i>	1

1.4.1 Aflatoxinas

Las aflatoxinas primeramente estudiadas fueron designadas B1, B2, G1 y G2, debido a su fluorescencia azul (del inglés *blue*, para las designadas B) o verde (del inglés *green* para las designadas G), respectivamente en placas de cromatografía de capa fina. Así, *Aspergillus flavus* produce solo aflatoxinas B1 y B2, y ácido ciclopiazónico mientras que el *Aspergillus parasiticus* y *Aspergillus nomius* producen aflatoxinas B1, B2, G1 y G2.

Las aflatoxinas del grupo M (del inglés *milk*) son los 4-hidroxiderivados de las Aflatoxinas B1 y B2. Es una toxina producida por los mohos *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* al desarrollarse sobre alimento o forraje para el ganado. Se ha encontrado que las vacas biotransforman una parte de la aflatoxina B ingerida, en su



derivado hidroxilado y lo elimina a través de la leche. Se ha reportado que en vacas que han ingerido alimento contaminado con aflatoxinas B1 después de 12 a 24 horas se detecta la presencia de aflatoxina M en la leche producida. Sin embargo la aflatoxina desaparece de la leche de la vaca a los dos o cuatro días después de la ingestión de aflatoxina B.

La presencia de cepas aflatoxigénicas dependerá no solo del genotipo sino también de una serie de factores ambientales que van a ejercer su influencia sobre el crecimiento y metabolismo de la misma. Los hongos aflatoxigénicos pueden afectar los cultivos en crecimiento y producir toxinas antes de la cosecha o bien durante la recolección y posterior al almacenamiento (Duarte, 2005).

1.4.1.1 Características químicas de las Aflatoxinas

Las aflatoxinas son sustancias biogénicas y están estructuralmente relacionadas. Químicamente son cumarinas sustituidas, conteniendo anillos de bifurano que le confiere la toxicidad y configuración tipo lactona responsable de la fluorescencia (Figura 7). Sus pesos moleculares oscilan entre 312u y 350u, la mayoría son pocos solubles en agua, pudiéndose extraer con disolventes orgánicos como el cloroformo o el metanol. Las aflatoxinas purificadas en forma cristalina son termoresistentes, estables en un rango de pH entre 3 y 10, y sus puntos de fusión son superiores a los 250°C (Vargas, 2008).

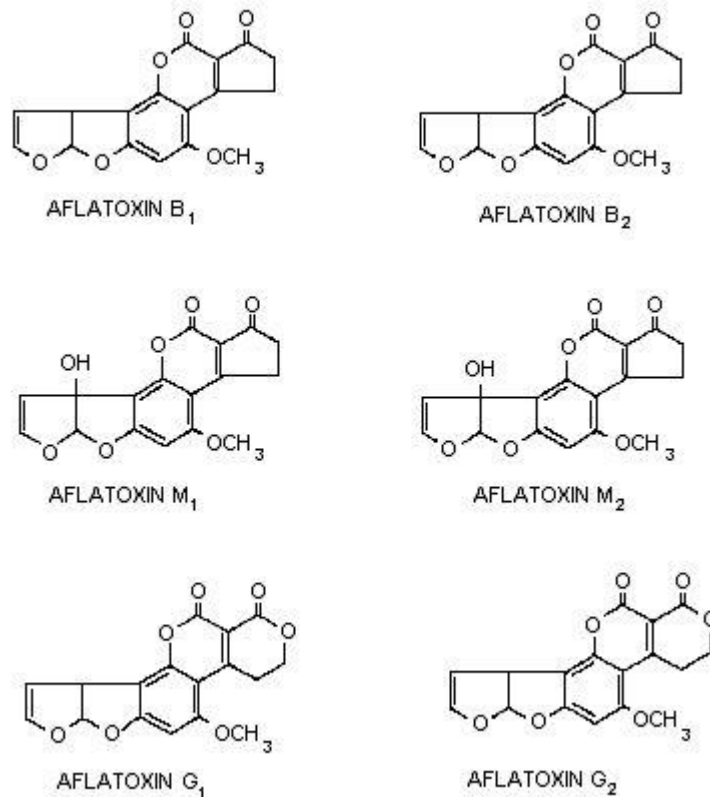


Figura 7. Aflatoxinas del grupo B, M y G. (Duarte, 2005)

1.4.1.2 Presencia de aflatoxinas en alimentos

Las especies productoras de aflatoxinas se aíslan frecuentemente en zonas tropicales y subtropicales y presentan una afinidad especial por las oleaginosas, cultivos de maíz, semillas de algodón, cacahuate, y cereales. En un alimento, la ausencia del productor de micotoxinas no indica que no pueda contener la micotoxina. Los hongos presentes inicialmente en las materias primas pueden haber dejado de ser viables después de un determinado tratamiento tecnológico (calor), pero las micotoxinas formadas debido a su termoresistencia pueden encontrarse. Por otro lado, una cepa potencialmente productora puede estar presente en un alimento,



pero no tiene porqué significar que la micotoxina está presente en el mismo. Esto sucede debido a que las condiciones en las que se ha elaborado o mantenido el alimento no son idóneas para que el hongo produzca la micotoxinas (Duarte, 2005).

1.4.1.3 Normatividad e Ingesta diaria admisible.

Actualmente no es posible eliminar en su totalidad la presencia de aflatoxinas en los productos alimenticios, por lo cual la concentración permitida en la unión europea de AFB1 en alimentos tales como los cereales y ciertos frutos secos, debería ser lo más cercano a riesgo cero. La FDA (Food and Drug Administration) estimó en 1978 que la IDA de AFB1 era en promedio de 2.73 ng/kg por día, con un máximo de 9.03 ng/kg por día (Juan, 2008).

1.4.2 Ocratoxinas

Las ocratoxinas constituyen una familia de toxinas cuya estructura molecular consiste en un núcleo de isocumarina unido a una molécula de L-fenilalanina mediante un enlace amida. Son metabolitos de hongos de las especies *Aspergillus ochraceus*, *A. sulphureus*, *A. melleus*, *A. sclerotiorum*, *A. alliaceus*, *Penicillium cyclopium*, *P. vindicatum*, *P. commune*, *P. variable*, *P. purpurescens* y *P. palitans*, los cuales afectan principalmente las cosechas de maíz, sorgo, cebada, trigo, avena, café, soya y cacao. Al igual que los hongos que producen aflatoxina, estos prefieren temperaturas mayores de 22° C (72° F) y humedad mínima del 16%; por lo tanto, las



ocratoxinas frecuentemente contaminan granos producidos en lugares de climas cálidos (Mewer, 1985).

1.4.2.1 Características de Ocratoxinas

La ocratoxina A (OTA) es una micotoxina producida por hongos micomicetos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* que se encuentra ampliamente distribuida como contaminante natural de cereales, legumbres y otros alimentos que en estudios experimentales ha demostrado una gran diversidad de efectos tóxicos. Debido a sus propiedades fisicoquímicas, la OTA se absorbe fácilmente del tracto gastrointestinal, siendo su biodisponibilidad superior al 50% en todas las especies de mamíferos ensayadas. Presenta una alta afinidad por las proteínas plasmáticas, lo que determina una larga persistencia en el organismo. Los principales metabolitos son el producto de hidrólisis del enlace amida, los derivados hidroxilados 4-OH-OTA y 10-OH-OTA y los productos de conjugación, entre otros. Se elimina por vía renal y hepatobiliar, así como también a través de la secreción láctea (Pitt, 1994).

1.4.2.2 Presencia de Ocratoxinas en los alimentos

La OTA es una micotoxina mayoritariamente presente en las contaminaciones primarias por mohos de muchos productos vegetales y de modo particular en cereales y legumbres de regiones geográficas tanto templadas como frías y húmedas. Puede considerarse como una de las micotoxinas más frecuentes en la contaminación de los granos de cereales, junto a las aflatoxinas y las toxinas del género *Fusarium* y *Alternaria* (Niessen *et al.*, 2005). La ocratoxicosis parece ser un fenómeno mundial, aunque la magnitud de estas contaminaciones puede mostrar variaciones según países y años, porque las condiciones necesarias para que los



micromicetos filamentosos produzcan metabolitos tóxicos, cuando se desarrollan sobre las materias primas alimenticias suelen ser bastante complejas (Mewer, 1985).

1.4.2.3 Normatividad e ingesta diaria admisible

La DL50 oscila entre 0,2 y 58,3 mg/kg peso corporal; perros, cerdos y pollos son especies más sensibles que la rata y el ratón (O`Callaghan, 2005). La ingestión crónica de OTA da lugar a la aparición de un efecto tóxico renal en todas las especies de mamíferos monogástricos probados. Se ha relacionado con la nefropatía porcina, la nefropatía aviar espontánea, y en el hombre con la nefropatía endémica de los Balcanes. La Unión Europea establece un límite máximo de 5 ppb de OTA en el café tostado y molido y de 10 ppb en el instantáneo. La Unión Europea ha considerado que el riesgo de las micotoxinas es tan elevado a largo plazo que es necesaria una regulación específica destinada a reducir su ingestión (Pitt, 1994).

1.5 Técnicas para la determinación de hongos en granos

1.5.1 Técnicas basadas en Medios de cultivo

A través de la experiencia de algunos investigadores, han venido probando diferentes medios y técnicas para aislar e identificar a los hongos que comúnmente invaden a los granos, y que son causa de deterioro físico, químico, y sanitario (Christensen & Meronuck, 1976).

La técnica más común para aislar hongos en granos enteros es tomar una muestra representativa del lote del grano por estudiar, se toman aproximadamente 100 granos que se desinfectan superficialmente agitándolos por 1 o 2 minutos en una



solución de hipoclorito de sodio al 2.0%, enseguida se enjuaga en agua estéril, una vez que se ha quitado por decantación el exceso de agua, se siembran 50 en las cajas Petri que contienen el medio de cultivo que se ha seleccionado para aislar la micobiota presente en los granos. Si son granos grandes como maíz, se siembran 25 por caja Petri, si son pequeños como el sorgo, se pueden sembrar hasta 50 granos por caja. El número de granos por caja depende del tamaño del grano, de la habilidad del laboratorista para contar e identificar rápidamente los hongos, ya que a mayor tiempo de incubación mayor será el crecimiento de las colonias y estas se juntarán dificultando esta tarea. Además, si se ponen pocos granos mayor será el número de cajas Petri y mayor el costo económico por muestra. Se procede a incubar las cajas Petri que contienen los granos en una incubadora a 25°C, hasta que las colonias puedan ser contadas e identificadas, normalmente se requieren 7 días. La desinfección superficial con hipoclorito no siempre es cien por ciento efectiva, ya que en ocasiones los granos presentan daño físico, ocasionando en la cosecha, secado o transporte, y en las fisuras se alojan esporas que no son alcanzadas por la solución de hipoclorito y cuando se enjuagan con agua estéril y esta operación no se hace rápido, las esporas salen de la fisura y el agua las distribuye sobre la superficie de los demás granos. Las concentraciones de hipoclorito de sodio y los tiempos de exposición de los granos con esta solución pueden variar de acuerdo a las propias experiencias del analista, pero hay que tomar en cuenta que se desea eliminar solamente los contaminantes superficiales y no el micelio que se encuentra invadiendo el pericarpio y que puede ser eliminado por un tratamiento de desinfección muy severo. En ocasiones eliminan el enjuagado con agua estéril, asumiendo que el cloro es volátil y que también se diluye el agua en el



medio de cultivo, sin afectar el desarrollo de los hongos que se encuentran en el interior de los granos. La desinfección con alcohol etílico al 70% por un minuto es más severa que la de hipoclorito de sodio al 2.0%. El método arriba descrito es muy útil para conocer la condición del grano en cuanto a su potencial de almacenaje, ya que los granos que están libres de hongos de almacén pueden ser almacenados con más seguridad y el grano parcial o severamente invadido por estos hongos tiene un mayor riesgo de deterioro en el subsecuente almacenaje; todo esto tomado en cuenta las condiciones ambientales en que se va a almacenar el grano, y el tiempo que se desea almacenar. A continuación se describen algunos medios y técnicas de los que se consideran más adecuados para un laboratorio de control de calidad:

Papa dextrosa agar (PDA): El Agar Dextrosa y Papa es un medio utilizado para el cultivo de hongos y levaduras a partir de muestras de alimentos. El Agar Dextrosa y Papa puede ser suplementado con antibióticos o ácidos para inhibir el crecimiento bacteriano. Este medio es recomendado para realizar el recuento colonial. La base del medio es altamente nutritiva y permite la esporulación y la producción de pigmentos en algunos dermatofitos. El Agar es adicionado como agente solidificante (Frank, 1993).

Medio cultivo Czapek: La casa comercial Difco tiene dos presentaciones de este medio, el caldo nutritivo Czapek- dox. Si se usa el caldo se disuelven 35 g del polvo en un litro de agua destilada y se añaden 20 g de agar. Otra forma es preparar el medio con los siguientes compuestos: 3.0 g de NaNO_3 , 1.0 g de K_2HPO_4 , 0.5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g de KCL, 0.01 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 30 g de sacarosa, 15 g de agar y



1000 ml de agua. Para reducir la caramelización de la sacarosa agréguela justo antes de la esterilización. Se esteriliza a 15 libras y 120°C por veinte minutos. El cultivo Czapek fue uno de los medios en los que Raper y Fenell basaron las identificaciones de las especies de *Aspergillus* (Moreno, 1988).

Malta agar (MA): Para un litro de agua se requieren 20 g de extracto de malta y 20 g de agar. La cantidad de agar, en cualquier medio de cultivo puede variar de 15 a 20 g por litro dependiendo de la dureza que se prefiera; en medios muy duros las semillas se resbalan al manejar las cajas de Petri, impidiendo o dificultando la cuantificación de las semillas invadidas por los diferentes hongos, así como la identificación de los mismos (Moreno, 1988).

Malta sal agar (MSA): El medio de cultivo Malta Sal Agar al 4 o 6% de sal, permite aislar prácticamente a la mayoría de los hongos que invaden granos y semillas, principalmente hongos de almacén. La alta presión osmótica de los medios con alto contenido de sal (10 o 15%) inhibe el desarrollo de ciertos hongos (*Rhizopus* y *Mucor*), facilitando el desarrollo de otros como *Aspergillus glaucus* y *Aspergillus restrictus*. el contenido de sal inhibe la germinación de los granos, facilitando la tarea de cuantificación de granos invadidos y la identificación de los hongos (Moreno, 1988).

Jugo de tomate, sal, agar (TSA): Se requieren 25 g de jugo de tomate en polvo marca Difco, 1000 ml de agua, 15 g de agar y 60 g de NaCl (grado técnico). El uso



de este medio o del malta sal agar da resultados similares con variaciones en la velocidad del crecimiento de las especies (Moreno, 1988).

Rosa de bengala agar (RBA): Para un litro se requieren 10 g de glucosa, 5 g de peptona, 1.0 g de K_2HPO_4 , 0.5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.935 g de rosa de bengala, 0.035 g de tetraciclina y 15 g de agar. Este medio de cultivo, por la acción de la rosa de bengala y del antibiótico, no favorece el desarrollo de bacterias ni de hongos de rápido crecimiento, como *Rhizopus*; por lo que permite el aislamiento de hongos de más lento crecimiento (Moreno, 1988).

Pentacloronitrobenceno agar (PCNB): Para un litro se requieren 15 g de peptona, 1.0 g de K_2HPO_4 , 0.5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ y 20.0 g de agar. Esterilice estos ingredientes y cuando se enfríe a una temperatura de 50-70°C añada 0.5 g de oxgall; 50 mg de clorotetraciclina, 100 mg de sulfato de estroptomina y 0.5 g de pentacloronitrobenceno, que es un fungicida comercial, con 75% de ingrediente activo. Este medio fue desarrollado para el aislamiento de *Fusarium* del suelo (Moreno, 1988).

1.5.2 Técnicas basadas en ácidos nucleicos

Reacción en cadena de la polimerasa

El análisis de PCR es un método enzimático que permite copiar de forma experimental una zona concreta de un genoma consiguiendo obtener hasta cien mil copias de ella de manera *in vitro*, después de realizar 30 o más ciclos (Figura 6)



(López *et al.*, 2003). Fue una técnica diseñada por el Dr. Kary Mullis en 1987, para la obtención de un amplificado del gen de la hemoglobina humana (Innis, 2010).

1.5.2.1 Fundamento de la PCR

Esta tecnología utiliza secuencias de oligonucleótidos que inician la síntesis de fragmentos de ADN. Usa, uno o dos oligonucleótidos sintéticos (primer o cebadores) según la técnica, generalmente de entre 10 a 30 pares de bases de longitud y complementarios a la secuencia nucleotídica de los extremos del ADN blanco diseñadas para hibridar en dirección contraria. El método implica la ejecución de una serie repetitiva de ciclos (ciclos térmicos), cada uno de los cuales involucra la desnaturalización del ADN, la unión del cebador a la cadena desnaturalizada y la síntesis, a partir del cebador, de una doble cadena mediante la acción de polimerasa. Lo anterior resulta en una acumulación exponencial de un fragmento específico de ADN. Estos fragmentos se separan posteriormente mediante técnicas electroforéticas, obteniéndose un patrón de bandas específico que nos permite diferenciar individuos, especies animales o vegetales (Innis, 2010).

1.5.2.2 Etapas de la Reacción

Etapa 1: Desnaturalización: Fase en la que el ADN se somete a altas temperaturas (aproximadamente 95°C), de 15 a 40 segundos dependiendo del tamaño del genoma con la finalidad de que se separe y resulte en cadenas sencillas (Erlich, 1992). Consiste en la ruptura de los puentes de hidrogeno del DNA, para así separarlo en dos cadenas y sirva como molde para la amplificación (Surzycki, 2000).



Etapa 2: Hibridación: La mezcla de la reacción se enfría (aproximadamente 60°C), dando lugar al reconocimiento de segmentos específicos de la cadena diana de ADN por los cebadores, un cebador se une a un extremo y el otro a la complementariedad, recordando que los sitios de hibridación se eligen de acuerdo a la región de interés, mientras que la temperatura y el tiempo varían entre cada pareja de cebadores (Erlich, 1992).

Etapa 3: Extensión o elongación: La enzima Taq Polimerasa es la encargada de leer la secuencia complementaria así como de sintetizar los nucleótidos faltantes durante x número de ciclos, para la obtención de gran cantidad de copias del fragmento de ADN deseado. La temperatura es de aproximadamente 70°C, con tiempo de 90 segundos, que en ocasiones puede variar según sea necesario (Erlich, 1992). Al final del proceso de extensión se generan dos nuevas moléculas de DNA de cadena doble idénticas a la secuencia original (Surzycki, 2000).

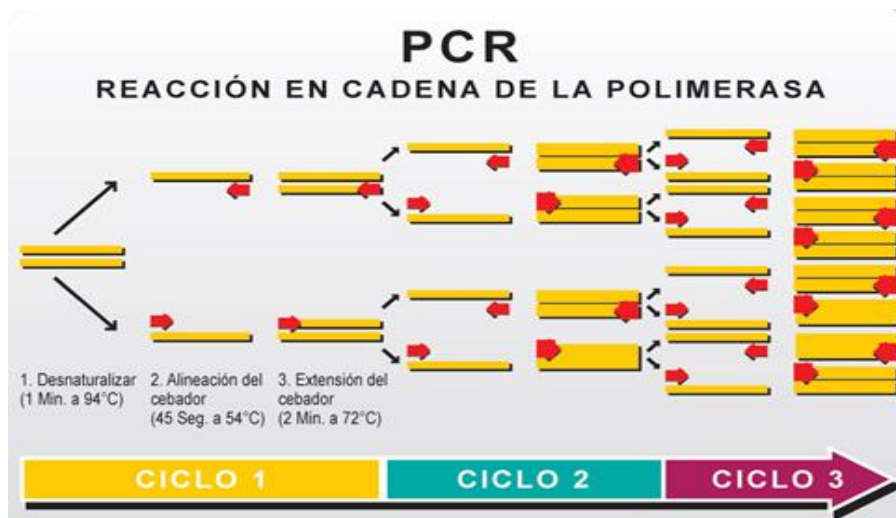


Figura 8. Etapas en la Reacción de Cadena de la Polimerasa



En un ciclo se llevan a cabo las tres etapas anteriormente descritas. El número de ciclos en una PCR estándar varía desde 20 a 45 ciclos resultando en una acumulación del fragmento del DNA, cada ciclo duplica el número de copias de la secuencia amplificada llamada Amplicón o diana. Para obtener 1000 millones de copias es necesario programar una PCR de 30 ciclos, lo cual es suficiente para visualizarse por electroforesis y cuantificado por medio de espectrofotometría. En la actualidad las PCR se encuentran totalmente automatizadas por termocicladores. Para llevar a cabo una PCR es necesario contar con primers u oligonucleótidos. El oligonucleótido *forward* o frontal deberá tener la misma secuencia que se encuentra en una de las cadenas de DNA, mientras que el oligonucleótido reverse o reverso deberá llevar la secuencia complementaria que estará al final del fragmento de DNA que se quiere amplificar. El número de copias conforme actúe la Taq Polimerasa aumentará de forma exponencial. Después de cada ciclo, la cantidad de DNA es dos veces la anterior, así que después de dos ciclos tenemos 2 x 2 veces, después de tres ciclos tenemos 3 x 2 x 2 veces o lo que es igual a 8 (2)³ veces la cantidad inicial, después de cuatro ciclos tenemos 2 x 2 x 2 x 2 veces o 16(2)⁴. Así después de N ciclos tendremos 2^N (Figura 9).

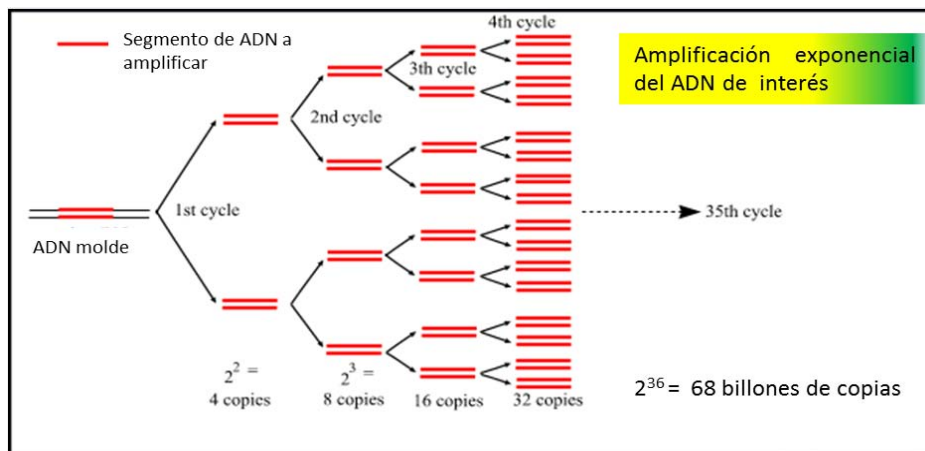


Figura 9. Ciclos en la reacción en cadena de la polimerasa



1.5.2.3 Componentes de la reacción

Para que se produzca la amplificación del fragmento esperado, en la mezcla de la reacción debe encontrarse los siguientes componentes:

- **Fragmentos de DNA** que se desea amplificar. Una de las características más atractivas de la PCR es que la cantidad y la calidad de la muestra de DNA. Una sola célula es adecuada para la amplificación exitosa. El criterio esencial es que la muestra contenga al menos una cadena de DNA intacta que abarque la región que va a ser amplificada y que las impurezas sean suficientemente diluidas como para no inhibir la polimerización (Innis, 2010).
- **Taq Polimerasa** la enzima que se utiliza para llevar a cabo la PCR, es una enzima termoestable aislada de *Thermus aquaticus* (Taq), una bacteria que soporta altas temperaturas. Debido a que las etapas de la reacción involucra temperaturas variables, se requiere de una enzima termoestable que de igual manera soporte temperaturas cercanas a los 100°C. esta característica es la que permite a la enzima actuar durante varios ciclos sin desactivarse (Surzycki, 2000).
- **Amortiguador (BUFFER)** El buffer recomendado para PCR es de 10-50mM de Tris-HCl (pH entre 8.3-8.8). Tris es un buffer iónico bipolar que tiene un pKa de -0.021°C, sin embargo el verdadero pH de un buffer 20mM de Tris (pH 8.3 a 20°C) varía entre 7.8 y 6.8 durante las condiciones típicas del termociclador. Hasta 50 mM de KCl puede ser incluido en la mezcla de reacción para facilitar el alineamiento de los primers. NaCl a 50 mM inhibe o KCl arriba de 50 mM inhibe la actividad de la Taq polimerasa (Innis, 2010).



- **dNTP's (Desoxinucleótidos trifosfatos)** Son nucleótidos sintéticos que no forman ninguna secuencia al inicio de la reacción, es decir, son el sustrato de la enzima DNA polimerasa y serán los componentes de miles de copias del fragmento diana al final de la reacción. Los cuatro desoxinucleótidos son: Desoxi Adenosin Trifosfato (dATP's), Desoxi Tiamisin Trifosfato (dTTP's), Desoxi Guanosin Trifosfato (dGTP's), Desoxi Citosin Trifosfato (dCTP's) (Innis, 2010).
- **Cloruro de Magnesio (MgCl₂)** La concentración del ion magnesio es benéfico para el alineamiento de los primers, la temperatura de disociación de las cadenas tanto del templado como del producto de PCR, la especificidad del producto, la formación de dímeros de primers y la actividad de la enzima Taq Polimerasa.
- **Cebadores o Primers** Los oligonucleótidos iniciadores o cebadores (primers) son fragmentos complementarios que se van a unir a cada una de las cadenas separadas del templado de DNA (López *et al*, 2003). La selección de oligonucleótidos es de suma importancia para llevar a cabo la PCR. Los oligonucleótidos iniciadores o *primers* son fragmentos complementarios que se van a unir a cada una de las dos cadenas separadas por el paso de desnaturalización del DNA que ocurre durante la PCR (Vargas, 2008). Las características que deberán tener los primers son:
 1. **Tamaño:** Tamaño ideal de 20-25 nucleótidos de longitud, generalmente: 18-30 nucleótidos de longitud (Griffiths, 2002).
 2. **Especificidad:** La especificidad de los primers es en parte dependiente de su longitud. Los primers deben ser elegidos de modo que tengan una



secuencia única dentro del DNA que será amplificado. Un primer diseñado con una secuencia altamente repetida dará lugar a productos no deseados (Saiki *et al.*, 1988).

3. **Secuencia de los extremos 3':** Es establecido que la posición terminal 3' en *primers* de PCR es esencial para el control del “*mispriming*”. La inclusión de un residuo de G o de C en el extremo 3' de los *primers* ayuda a asegurar el correcto enlace en el extremo terminal 3' debido al enlace de hidrógeno más fuerte de los residuos G/C (Saiki *et al.*, 1988).
4. **Contenido de G/C:** La composición base de los *primers* debe estar entre el 45% y el 55% de G/C. La secuencia de los *primers* debe ser elegida de tal forma que no haya regiones de poli o de poliG que pueden promover el reconocimiento no específico. Las regiones poliA y poliT deben también ser evitados ya que interfieren con el complejo del primer templado. Esto puede bajar la eficacia de la amplificación (Saiki *et al.*, 1988).
5. **Secuencias Complementarias del primer:** Los *primers* necesitan ser diseñados con menos de 3 pares de bases de homología entre ellos. Si un primer tiene tal región de homología se formarán estructuras parciales de doble cadena que interferirán con el alineamiento. Si la homología ocurre en el extremo 3' de cualquier *primer*, ocurrirá la formación de dímeros de *primer* que, a menudo, prevendrá la formación del producto deseado por competición (Saiki *et al.*, 1988).
6. **Temperatura de Asociación:** La temperatura de asociación de los *primers* es uno de los factores más determinantes de la reacción. Se recomienda que se emplee como temperatura de asociación la



temperatura de fusión (T_m) -5°C , aproximadamente. T_m significa en inglés *melting temperature* y se refiere a la temperatura a la que se hibridan o se pegan los oligonucleótidos en los sitios que son complementarios. Este proceso dependerá principalmente del tipo de uniones (dobles o triples enlaces de hidrógeno) que formaran sus bases, y por eso la secuencia de cada *primer* es la que se toma en cuenta para conocer cuál es la temperatura óptima para su alineamiento. Existen muchas maneras de calcularla, la más simple para *primers* de aproximadamente 20 pb es:

$$T_m = 4(\text{G+C}) + 2(\text{A+T})$$

El método más preciso para estimar la T_m de oligonucleótidos está basado en el análisis termodinámico del proceso de fusión al que consideran los cambios en la entalpía y la entropía de la formación del dúplex y se calculan a partir de parámetros termodinámicos. R es la constante molar de los gases ($1.987 \text{ cal.K}^{-1}\text{mol}^{-1}$), y C es la concentración molar del oligonucleótido (Saiki *et al.*, 1988).

1.5.2.4 Análisis del producto obtenido de la PCR

El hecho de que las moléculas de DNA obtenidas al finalizar la reacción en cadena corresponden efectivamente al fragmento de interés queda asegurado por la intervención de los primers que definen los extremos: frontal y reverso. Así, una vez que la reacción ha finalizado el tamaño del fragmento multiplicado puede determinarse sometiendo los productos de la reacción a una electroforesis en gel de



agarosa o poliacrilamida, es decir, un proceso de separación bajo la acción de un campo eléctrico.

Las muestras son colocadas en un gel y sometidas a la acción de un campo eléctrico (electroforesis) migrando de una manera característica que se puede visualizar por tinción del DNA con bromuro de Etidio, el cual actúa como intercalante y al ser analizado bajo la luz UV, emitiendo una fluorescencia.

1.5.2.5 Ventajas y desventajas de la PCR

Ventajas:

- ✓ A partir de una muestra pequeña de DNA se pueden realizar una gran cantidad de estudios.
- ✓ El producto se puede utilizar para clonar, secuenciar y analizar
- ✓ Se puede amplificar DNA de cualquier organismo, vivo o muerto.
- ✓ Sus aplicaciones son múltiples: medicina forense, diagnóstico, análisis prenatales, identificación de especies y discriminación, etc.
- ✓ Cuenta con alta sensibilidad

Desventajas:

- × Susceptible a la contaminación, dependiendo la concentración y pureza del DNA extraído, así como de aditivos y metabolitos presentes en la muestra.
- × Se necesitan Primers específicos que sean complementarios al fragmento que se desea sintetizar.
- × Puede contaminarse con otro DNA



CAPITULO 2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

2.1 Justificación del trabajo.

La presencia de especies de *Aspergillus* en granos de café y en otros granos, causan el deterioro de la calidad de estos, ya que son especies productoras de micotoxinas que son potencialmente cancerígenas en humanos y neurotóxicas.

Es de gran importancia el control de la calidad de los granos de café, ya que sus productos derivados son ampliamente comercializados y consumidos por casi toda la población. La exigencia de las normas internacionales para poder exportar productos, cada vez son más estricta, por lo tanto, los productores de café deberán buscar técnicas rápidas de identificación de hongos.

El avance de la tecnología en la Biología Molecular, ha permitido crear técnicas moleculares para la identificación de hongos toxigénicos, en granos y semilla, para facilitar el rastreo de la calidad de estos y para la elaboración de productos procesados, por lo tanto el diseño de esta técnica ayudaría a los productores de café para mantener sus cultivos en la más alta calidad que exige el mercado.

2.2 Cuadro Metodológico

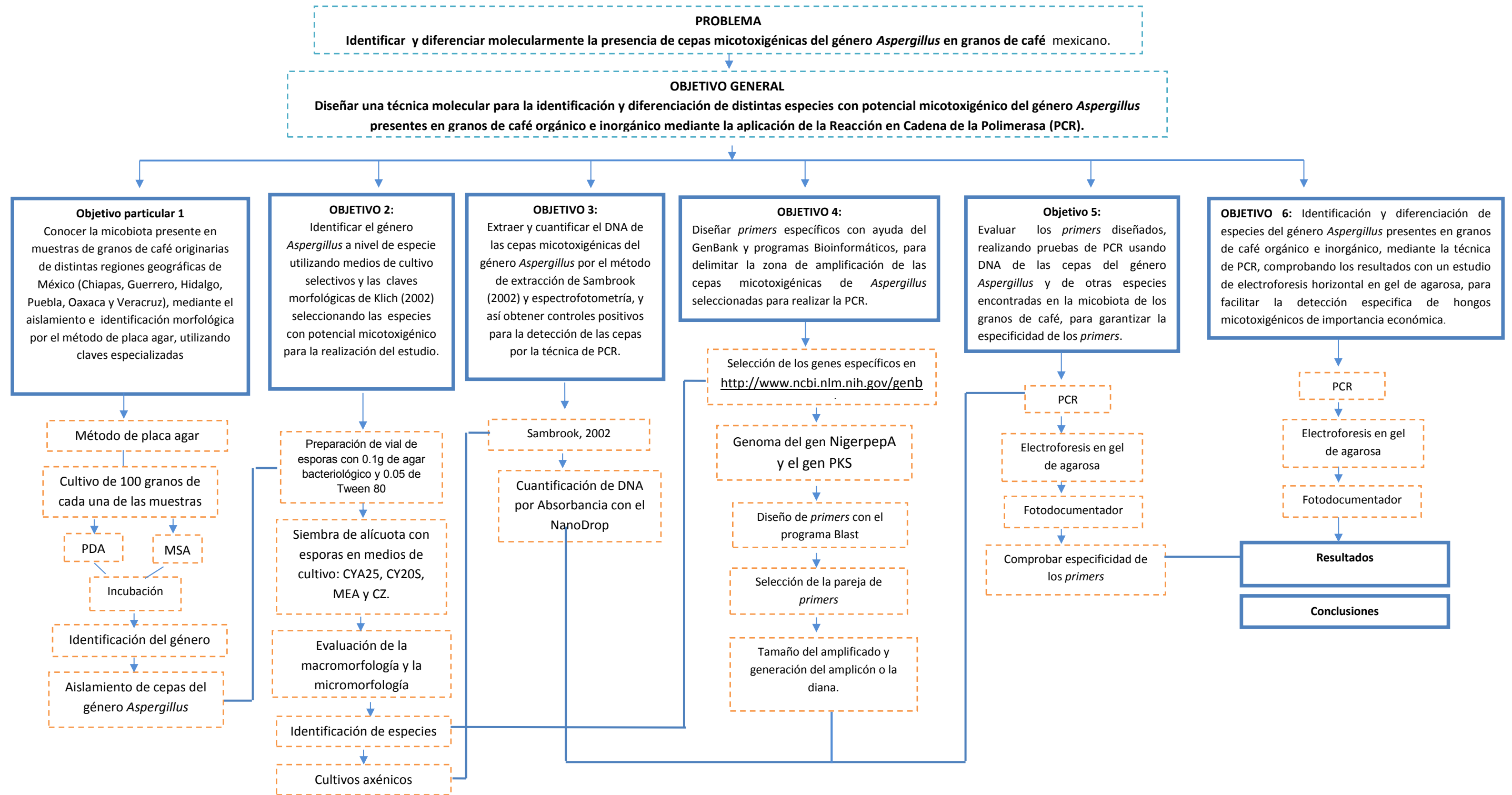


Figura 10. Cuadro metodológico



2.2.1 Descripción de cuadro metodológico

Problema:

Identificar y diferenciar molecularmente la presencia de cepas micotoxigénicas del género *Aspergillus* en granos de café mexicano.

Objetivo general

Diseñar una técnica molecular para la identificación y diferenciación de distintas especies con potencial micotoxigénico del género *Aspergillus* presentes en granos de café orgánico e inorgánico mediante la aplicación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Objetivos particulares

Objetivo particular 1: Conocer la microbiota presente en muestras de granos de café originarias de distintas regiones geográficas de México (Chiapas, Guerrero, Hidalgo, Puebla, Oaxaca y Veracruz), mediante el aislamiento e identificación morfológica por el método de placa agar, utilizando claves especializadas (Barnett & Hunter, 1998).

Objetivo particular 2 Identificar el género *Aspergillus* a nivel de especie utilizando medios de cultivo selectivos y las claves morfológicas de Klich (2002) seleccionando las especies con potencial micotoxigénico para la realización del estudio.



Objetivo particular 3: Extraer y cuantificar el DNA de las cepas micotoxigénicas del género *Aspergillus* por el método de extracción de Sambrook y espectrofotometría, y así obtener controles positivos para la detección de las cepas por la técnica de PCR.

Objetivo Particular 4: Diseñar primers específicos con ayuda del GenBank y programas Bioinformáticos, para delimitar la zona de amplificación de las cepas micotoxigénicas de *Aspergillus* seleccionadas para realizar la PCR.

Objetivo Particular 5: Evaluar los primers diseñados, realizando pruebas de PCR usando DNA de las cepas del género *Aspergillus* y de otras especies encontradas en la microbiota de los granos de café, para garantizar la especificidad de los primers.

Objetivo particular 6. Identificar y diferenciar especies del género *Aspergillus* presentes en granos de café orgánico e inorgánico, mediante la técnica de PCR, comprobando los resultados con un estudio de electroforesis horizontal en gel de agarosa, para facilitar la detección específica de hongos micotoxigénicos de importancia económica.



2.3 MATERIALES Y MÉTODOS

2.3.1 Procedencia de los granos de café

En este trabajo se analizaron un total de siete muestras de granos de café verde procedentes de diferentes estados de la República Mexicana y son mencionados a continuación:

Tabla 9. Muestras de café verde

Número de muestra	Variedad	Tipo de cosecha	Estado de Origen
M1	Arábica	Orgánico	Tapachula ,Chiapas
M2	Arábica	Inorgánico	Tierra colorada, Guerrero
M3	Arábica	Inorgánico	Tuxtla Gutiérrez, Chiapas
M4	Robusta	Inorgánico	Tulancingo, Hidalgo
M5	Robusta	Inorgánico	Puebla, Puebla
M6	Robusta	Inorgánico	Boca del Río, Veracruz
M7	Arábica	Orgánico	Miahuatlán, Oaxaca

A las cuales se les determinó la micobiota a nivel de género y especie, a través del método placa agar y posteriormente con medios selectivos Czapek, para la identificación de hongos a nivel de especie. Cepas de donde se obtuvo el material genético para la realización de este trabajo.



2.3.2 Determinación y cuantificación de la microbiota presente

Para la identificación de *Aspergillus* en los granos de café verde a nivel de género se utilizó la técnica de siembra en placa de agar, se prepararon medios de cultivo de papa dextrosa agar (PDA) (Anexo A) para el aislamiento de hongos de campo, y medio de cultivo malta sal agar (MSA) (Anexo A) para el aislamiento de hongos de almacén. Los granos se desinfectaron superficialmente con hipoclorito de sodio al 3% durante un minuto, procediendo en seguida al secado del grano con toallas de papel previamente esterilizadas, se colocaron 15 granos de café verde en cada una de las cajas Petri, las cajas fueron incubadas a una temperatura de 25°C en obscuridad por un periodo de siete días, después de los cuales se aislaron e identificaron las cepas del género *Aspergillus* presentes en los granos de café para obtener cultivos axénicos. Los aislamientos axénicos obtenidos del género *Aspergillus* se resembraron en medios de cultivo PDA y se incubaron a 25°C, hasta su posterior identificación a especie.

2.3.3 Identificación Morfológica de los hongos a nivel de género y/o especie

La identificación del género *Aspergillus* a nivel de especie siguiendo las claves especializadas de Klich (2002). Para ello se prepararon los siguientes medios de cultivo: cultivo agar Czapek extracto de levadura (CYA), agar Czapek extracto de levadura adicionado con 20% de sacarosa (CY20S), agar extracto de malta (MEA), Czapek dox solución de agar (CZ) (Anexo A). Para la siembra de los cultivos axénicos de las especies de *Aspergillus* se preparó una suspensión de esporas en un vial con 0.1g de agar bacteriológico y 0.05 de Tween 80 (Pitt, 1997).



En condiciones asépticas se tomó una alícuota de 4 μ l de la suspensión de conidios, sembrándolas en tres puntos equidistantes de la caja Petri que contenía el medio de cultivo, se realizaron tres repeticiones para cada una de las cepas en cada uno de los medios de cultivo (Figura 11).

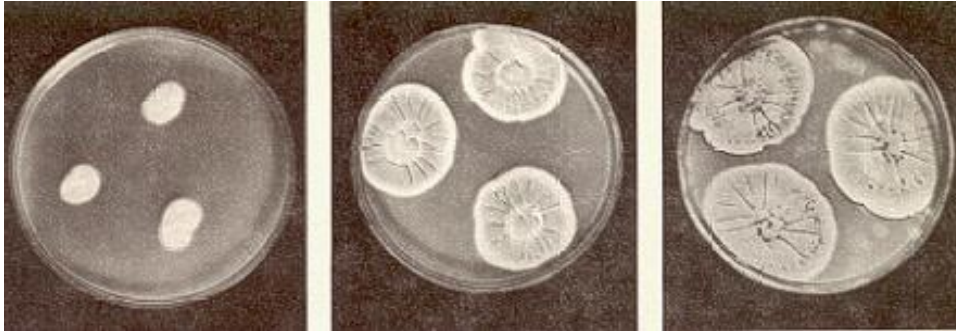


Figura 11. Cultivo de cepas en cultivos Czapek

Todos los medios de cultivo se incubaron a temperatura de 25°C, excepto el CYA que se incubó también a 37°C. El tiempo de incubación fue de siete días.

2.3.4 Caracterización de la macromorfología

Se observaron bajo microscopio estereoscópico, las características macroscópicas de las colonias estudiadas, principalmente el color, basados en el manual de colores de Mathuen (Kornerup & Wanscher, 1981), ya que el color es una característica muy importante para la clasificación de especies, algunas características macroscópicas evaluadas en las colonias fueron:

- a) Color del micelio y aspecto de la colonia
- b) Diámetro de la colonia
- c) Color de los conidios



- d) Presencia o ausencia de exudados en la superficie del micelio
- e) Formación de pigmentos solubles y pigmentos al reverso de la colonia
- f) Presencia o ausencia de esclerocios

El color es la principal característica macroscópica para la identificación de los grupos de *Aspergillus*. Poseen distintos tonos de verde intenso, verde olivo, amarillo grisáceo a amarillo olivo. El reverso de las colonias puede ser incoloro, café opaco o café anaranjado opaco entre otros. Cuando los esclerocios están presentes varían de color café oscuro a negro, variables en forma y tamaño, cuando presentan exudados son incoloros o de diversos colores, el aspecto de la colonia varía de lanoso a flocoso (Klich, 2002).

2.3.5 Caracterización de la micromorfología

Para la evaluación de las características microscópicas de las colonias se midió:

- a) Longitud, el ancho, textura de la superficie de los estípites.
- b) Diámetro y la forma de las vesículas.
- c) Seriación de los conidios (uniseriado/ biseriado)
- d) Longitud, forma y textura de la superficie de los conidios.
- e) Diámetro, forma y color de los esclerocios.

Estas mediciones se realizaron con ayuda del microscopio estereoscópico marca *Olympus* modelo BH-2. Todas estas características macroscópicas y microscópicas, se registraron para los medios de cultivo CYA, MEA, CY20S y CZ.



2.3.6 Cultivos axénicos de las cepas puras del género *Aspergillus*

Para la extracción del DNA de las cepas de *Aspergillus* identificadas a nivel de especie se realizaron cultivos axénicos. Se preparó una suspensión de esporas en tubos de rosca que contenían 10 ml de agua destilada estéril, vertiendo el contenido del tubo en cajas Petri que contenían al medio de cultivo agua agar (AA) y se homogenizó el inóculo, posteriormente se decantó el exceso de la suspensión, después de incubarlas durante 24 h, se procedió a identificar con ayuda de un microscopio estereoscópico *Olympus* Modelo BH-2 los conidios germinados y se transfirió el minúsculo bloque de agar que contiene al conidio germinado a un nuevo medio de cultivo PDA, incubándolos a 25°C hasta inducir abundante micelio y conidios. Con los datos obtenidos de la microbiota de los granos de café se procedió a calcular la frecuencia de aislamiento y la densidad relativa de los géneros presentes, mediante el uso de las formulas empleadas por González *et al.* (1997).

Fórmula para frecuencia de aislamiento

$$\alpha = (\beta / \gamma) (100)$$

Dónde:

α : Frecuencia de aislamiento expresada en porcentaje

γ : Número total de muestras

β : Número de muestras con presencia de género.



Fórmula para densidad relativa

$$\alpha = (\beta / \gamma) (100)$$

Dónde:

α : Densidad relativa expresada en porcentaje

γ : Número total de hongos o géneros aislados

β : Número de aislamientos de un género o especie.

2.3.7 Extracción de DNA por el Método de Sambrook

Para la extracción de DNA de las cepas del género *Aspergillus*, se siguió el método de Sambrook (2002). A continuación se describe el protocolo completo: Se llevó a cabo raspando con una aguja de disección la cepa pura de *Aspergillus* y disolviendo las esporas en un tubo *ependorf* que contenía agua desionizada con pH de 7 y perlas de vidrio, se adicionó 1125 μ l de solución de lisis (tris base 50 mM, pH=8, EDTA 0.1M, SDS 0.5%), agitando con vortex *Genie K-55-Gesto* para la liberación del contenido celular, se adicionaron 7 μ l de enzima proteinasa K previamente concentrada a 20mg/ml. Se incubaron los tubos a 50°C en un calentador para tubos *ependorf* marca *termomixer* por 2 horas y posteriormente se inactivó la enzima a una temperatura de 60°C por 60 minutos. Se adicionó una mezcla de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico en cantidad de 250 μ l para cada tubo. Se mezcló el tubo suavemente de manera manual por un tiempo de 10 minutos y se centrifugó a 10,000rpm por 10 minutos en una microcentrifuga *minispin plus ependorf 1400rpm*, durante 10min a temperatura ambiente. Existió una separación de fases, se recuperó



la fase acuosa superior que contiene el DNA, se trasladó la fase recuperada a un tubo *ependorf* nuevo. Se adicionó 1.5 ml de etanol frío a cada tubo (apreciándose turbidez), lo que hace referencia a la presencia del DNA. Se mezcló suavemente. Se centrifugó a 10,000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente en una microcentrifuga *minispin plus ependorf 1400 rpm*. Se decantó el etanol de cada tubo y se dejó secar la pastilla de DNA en un *termomixer* a 37°C. El DNA debe visualizarse pegado al tubo como una mancha blanca. Una vez que el etanol ha sido eliminado, se adicionó 100 µl de agua libre de nucleasa, para resuspender la pastilla de DNA agitando suavemente el tubo hasta su completa disolución.

2.3.8 Cuantificación de DNA por medición de Absorbancia.

Este método es útil para preparaciones de ácidos nucleicos altamente puras, ya que detecta cualquier compuesto que absorbe luz significativamente a 260nm, como por ejemplo DNA, RNA, EDTA y fenol. La relación de absorbancia a 260nm se utiliza como prueba de contaminación de una preparación de DNA y RNA con proteínas, puesto que los aminoácidos aromáticos absorben luz a 280nm. Para cuantificar la cantidad de DNA, las lecturas se toman a 260 y 280nm. La lectura de 260nm permite conocer la concentración de ácidos nucleicos que contienen la muestra analizada. La relación entre las lecturas a 260 y 280nm proporciona un estimado de la pureza de los ácidos nucleicos. Preparaciones puras de DNA tienen valores de 1.8, mientras que los valores iguales a dos muestran la existencia de preparaciones puras de RNA, si presentaran contaminación con fenol o proteínas, la relación 260/280nm será menor de 1.7, y no se podrá cuantificar el DNA presente en la muestra (Sambrook,



2002). La concentración de DNA así como la relación (260/280) fueron medidas con la ayuda del espectrofotómetro marca *Accesolab* apoyado con el programa de software *NanoDrop ND-1000*. A continuación se describe el método completo:

Se calibró el espectrofotómetro *NanoDrop* marca *Accesolab* colocando 2 μl de agua desionizada en el brazo del equipo. Se abrió el programa *NanoDrop ND-1000* y se seleccionó la opción de ácido nucleicos. Se colocó nuevamente 2 μl de agua desionizada para registrarlo como blanco. Se colocó 2 μl de la muestra de DNA a cuantificar. La concentración de DNA y la relación 260/280 son registradas por el equipo en donde el *Software* arrojará una curva con los valores de interés.

2.3.9 Reacción en Cadena de la Polimerasa

Un Termociclador, también conocido como máquina de PCR es un aparato usado en Biología Molecular que permite realizar los ciclos de temperaturas necesarios para una reacción en cadena de la polimerasa de amplificación de ADN (Saiki, 1988). Para llevar a cabo una reacción de PCR, es fundamental la estandarización de las concentraciones de los componentes principales de la reacción (*primers* y DNA). Los *primers* deben ser solubilizados a una concentración de 250 mM, mientras que el DNA requiere de una baja concentración, puesto que una sola copia de DNA es suficiente para el amplificado. La preparación de las muestras requiere de: 12.5 μl de mezcla de master mix (50 unidades de Taq polimerasa, 400 μM de cada DNTP y 3 mM de MgCl_2), 9.5 μl de agua libre de nucleasa, 1 μl de cada uno de los *primers* o cebadores, 1 μl de la muestra que contiene el DNA a amplificar, colocados en un



tubo *ependorf* de 25 µl para PCR. La reacción se llevó a cabo en un termociclador *Apollo ATC401 CLP*.

2.3.10 Programas de PCR

La programación del termociclador fue diseñado de acuerdo a las especificaciones de los *primers* diseñados para cada una de las especies del género *Aspergillus*. Para *Aspergillus niger* se diseñó el siguiente programa:

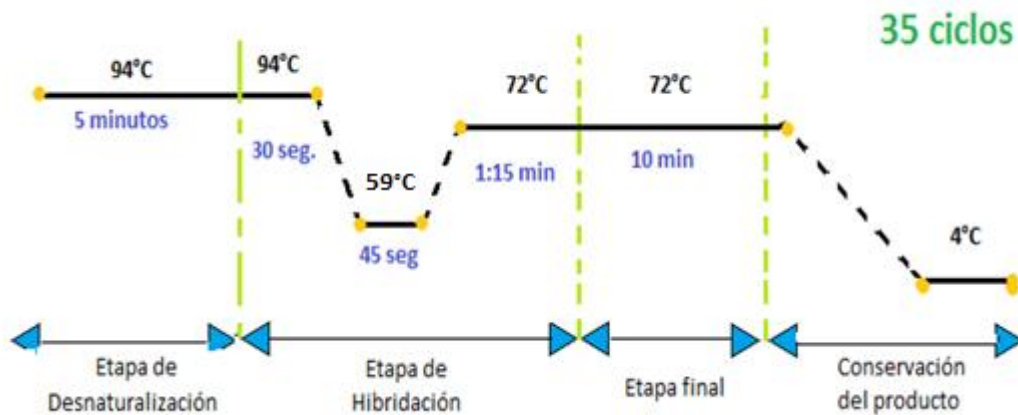


Figura 12. Programa del Termociclador para *Aspergillus niger*



Para *Aspergillus ochraceus* se diseñó el siguiente programa, de acuerdo a las especificaciones de los *primers* diseñados para esta especie:

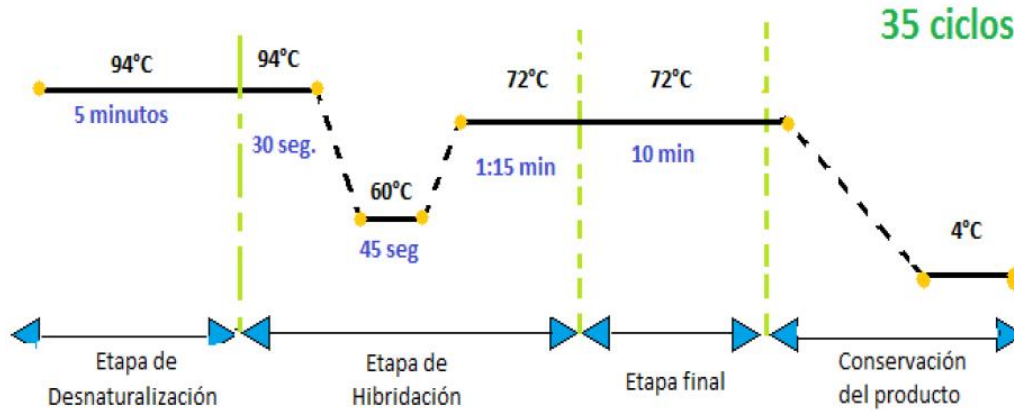


Figura 13. Programa del Termociclador para *Aspergillus ochraceus*

2.3.11 Electroforesis horizontal en gel de agarosa

La electroforesis en gel es un grupo de técnicas empleadas por los científicos para separar moléculas basándose en propiedades como el tamaño, la forma o el punto isoelectrico (García, 2006).

La electroforesis en gel se utiliza generalmente con propósitos analíticos, pero puede ser una técnica preparativa para purificar moléculas parcialmente antes de aplicar espectrometría de masas, PCR, clonación o secuenciación de ADN (Berth, 2007). El gel es sometido al paso de corriente a través de él. Dado que el grupo fosfato de cada nucleótido de DNA posee una carga negativa, los fragmentos de DNA migran hacia el extremo positivo del gel y la movilidad de estos dependerá de su tamaño (Perera, 2002).



Para la preparación del gel de agarosa se pesó en una balanza analítica electrónica, *Cole parmer PR410 Equipar 500mg*, 1.0 g de agarosa *Gibco ERL* de acuerdo a la concentración del gel (2%). Se agregó 50 ml de amortiguador tris acetato y EDTA (TAE) 1X como solución buffer, y se mezclan en un matraz erlenmeyer de 125 ml. La mezcla se calentó en el microondas hasta disolver, y se añadió una gota de BrEt, mezclándose y vertiéndose en un cassette propio de la cámara de electroforesis marca *Apollo 75.710*, colocándose un peine el cual formó los pocillos al gelificar, evitándose corrientes de aire y desniveles, una vez formado el gel se colocó el cassette dentro de la cámara de electroforesis llenándola con TAE 1X de modo que el gel quedó cubierto. La técnica se llevó a cabo con una corriente de 90 volts, generados por una fuente de poder marca *Bio-Rad Power Pac 200*, los pocillos fueron cargados de acuerdo a las siguientes especificaciones para cada muestra:

Tabla 10. Volúmenes de reactivos para la técnica de electroforesis

Componente	Volumen
Colorante <i>blue/orange 6X, Promega Loading dye</i>	3 μ l
Marcador de peso molecular 100 pb	3 μ l
Muestra de PCR	5 μ l
Bromuro de etidio (BrEt)	3 μ l



Para cargar el gel al 2% se tomó un papel parafilm, en donde se depositaron las cantidades indicadas en la Tabla 10, ya mezcladas se cargaron en el primer pocillo. En el primer pocillo se depositó el marcador de peso molecular y en los pocillos restantes se depositaron muestras del producto de la PCR. Se conectó a la fuente de poder *Bio-Rad Power Pac 200* a un voltaje de 90 volts. El DNA tiene carga negativa por lo que este se moverá hacia el lado positivo. La corriente se mantiene hasta que el colorante se visualizó hasta el extremo contrario del gel.

2.3.12 Análisis de los resultados de electroforesis (Fotodocumentador)

La visualización de los resultados de los geles de electroforesis se llevó a cabo en un transluminador de luz UV marca *Claver Scientific LTD*, la captura de estas imágenes visualizadas se logró utilizando un equipo de fotografía para luz UV marca *Kodak digital Science*, estas características son esenciales para la visualización del bromuro de etidio intercalado en los fragmentos de DNA presentes en el gel, esto es debido a que la radiación UV es absorbida a 254nm por el DNA y transmitida al colorante *blue- orange*, el cual absorbe la luz a 302nm y 366nm. En ambos casos, la energía es remitida a 590nm en la región rojo-naranja de espectro visible (Sambrook, 2002).




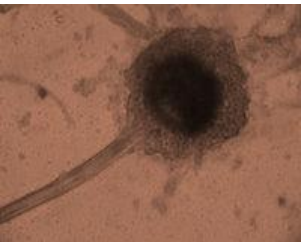

CAPITULO 3. RESULTADOS Y DISCUSION

Identificación morfológica de la microbiota presente en granos de café verde

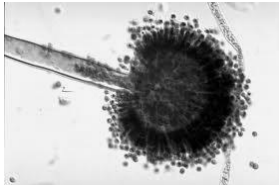
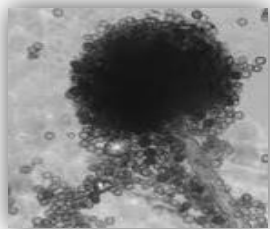

Para la identificación de hongos presentes en las muestras de café verde analizadas en este trabajo, se consideró la macromorfología y micromorfología de las colonias (Anexos B y C), los géneros y especies de cada una de las colonias se identificaron de acuerdo a las claves especializadas de Klich para el género *Aspergillus*, para *Penicillium* y *Rhizopus* las claves especializadas de Barnett y Hunter.

Se presenta la identificación de los géneros y especies aislados , las consecuencias que trae consigo la presencia de estos hongos en el grano de café y las micotoxinas que han sido reportadas para los diferentes hongos identificados (Tabla 11).



Tabla 11. Micobiota presente en granos de café verde originarias de distintos estados de la República Mexicana

Especie y/o género	Consecuencias	Micotoxinas	Características morfológicas
<p><i>Aspergillus sojae</i> 40x</p> 	<p>Calentamiento del grano y pérdida de peso. Disminución de los valores nutricionales.</p>	<p>Es un productor de β-ácido nitropropiónico (Dijksterhuis & Samson, 2007).</p>	<p>Los conidios van de color café olivo a café amarillento, presentan micelio color blanco. Desarrollan un color café grisáceo en el reverso de la colonia. Las vesículas pueden presentar forma piriforme o globosa, y raramente forma clavada. La seriación de sus colonias son generalmente uniseriadas, pero también se presenta la seriación biseriada. Los conidios son comúnmente globosos o elipsoidales (Klich, 2002).</p>
<p><i>Aspergillus tamarii</i> 40x</p> 	<p>Calentamiento del grano y pérdida de peso. Disminución de los valores nutricionales.</p>	<p>Es productor de ácido ciclopiazónico, fumigaclavines (Dijksterhuis & Samson, 2007).</p>	<p>Los conidios van de color café olivo a café amarillento. Presentan micelio color blanco. Desarrollan un color amarillo grisáceo en el reverso de la colonia, las colonias por lo general son pequeñas, radiales y sulcadas. Presentan vesículas globosas o piriformes. Su seriación puede ser uniseriada o biseriada. Los conidios son globosos marcadamente verrucosos (Klich, 2002).</p>
<p><i>Aspergillus flavus</i> 40x</p> 	<p>Calentamiento del grano y pérdida de peso (Moreno, 1988). Disminución de los valores nutricionales.</p>	<p>Productor de aflatoxinas, ácido ciclopiazónico, β-ácido nitropropiónico (Dijksterhuis & Samson, 2007).</p>	<p>Los conidios van de color verde profundo a verde olivo, algunas veces presentan color verde amarillento. Desarrollan micelio color blanco, cuando presentan esclerocios estos son de color café o negro. No presentan pigmento en el reverso de la colonia. Las vesículas son esféricas u algunas alargadas. Presentan seriación uniseriada y biseriada. Los conidios son globosos y en algunas cepas son elipsoidales (Klich, 2002).</p>



Continuación Tabla 11

Especie y/o género	Consecuencias	Micotoxinas	Características morfológicas
<p><i>Aspergillus niger</i> 40x</p> 	<p>Pudrición del grano (Moreno, 1988)</p>	<p>Productor de compuestos para la formación de fumonisinas y productor de ocratoxina A (Dijksterhuis & Samson, 2007).</p>	<p>Los conidios son de color fuertemente negro, presenta esclerocios de color crema, presenta exudados incoloros y generalmente el reverso de la colonia presenta un pigmento amarillo. Las vesículas son esféricas. Presentan una seriación generalmente biseriada, sus conidios presentan áreas irregulares con textura rugosa (Klich, 2002).</p>
<p><i>Aspergillus carbonarius</i> 40x</p> 	<p>Calentamiento, pudrición del grano, y pérdida de peso. Disminución de los valores nutricionales.</p>	<p>Productor de ocratoxina A (Dijksterhuis & Samson, 2007). (Abarca <i>et al.</i>, 1994)</p>	<p>Los conidios van de color negro olivo a negro, desarrollan micelio color blanco. Forman exudados incoloros café-negro; y esclerocios color rosado. En el reverso de la colonia presentan un color amarillo o gris oscuro. Las colonias son radiales, las vesículas esféricas, la seriación es biseriada, los conidios son globosos y extremadamente rugosos (Klich, 2002).</p>
<p><i>Aspergillus japonicus</i> 40x</p> 	<p>Calentamiento, pudrición del grano, y pérdida de peso. Disminución de los valores nutricionales.</p>	<p>Se han presentado informes de producción de OTA, pero aún no se han confirmado (Dijksterhuis & Samson, 2007).</p>	<p>Los conidios presentan un color que van de café oscuro a púrpura oscuro, desarrollan micelio color blanco y esclerocios color crema. Las colonias son planas u ocasionalmente radiales y sulcadas. Las vesículas pueden ser globosas, presentan seriación uniseriada, los conidios son globosos o subglobosos, y ocasionalmente elipsoidales (Klich, 2002).</p>

Continuación Tabla 11

Especie y/o género	Consecuencias	Micotoxinas	Características morfológicas
<p><i>Aspergillus ochraceus</i> 40x</p> 	<p>Calentamiento del grano y pérdida de peso (Moreno, 1988).</p> <p>Disminución de los valores nutricionales.</p>	<p>Productor de ácido penicílico, ocratoxina A, xantomeginina (Dijksterhuis & Samson, 2007). viomelina y vioxantina (Klich, 2002).</p>	<p>Los conidios presentan un color ocre, presenta esclerocios color rosado, desarrolla exudados incoloros u ocasionalmente amarillos o rojos. Las colonias son pequeñas y sulcadas. Las vesículas son globosas, presentan seriación biseriada. Los conidios esféricos o elipsoidales finamente de textura rugosa (Klich, 2002).</p>
<p><i>Rhizopus spp.</i> 40x</p> 	<p>Pudrición del grano, y pérdida de peso.</p> <p>Disminución de los valores nutricionales.</p>	<p>Rizonin A (Barnett & Hunter, 1998)</p>	<p>Los conidios presentan color negro brillante que van de 8-15 µm, presentan estípites de hasta 200 µm de largo, desarrolla exudados hialinos u ocasionalmente amarillos. Las vesículas son globosas. Las colonias presentan un crecimiento rápido (cubren prácticamente toda la superficie de la placa en tres días a 25 °C) de aspecto consistente, con denso micelio aéreo con textura algodonosa, al principio blancas, después gris oscuras (Barnett & Hunter, 1998).</p>

Continuación Tabla 11

Especie y/o género	Consecuencias	Micotoxinas	Características morfológicas
<p>Eurotium spp. 40x</p> 	<p>Pudrición del grano, y pérdida de peso. Disminución de los valores nutricionales.</p>	<p>Ocratoxina A, esterigmaticistina (intermediario en la biosíntesis de aflatoxinas) (Pitt, 1997).</p>	<p>Las especies de Eurotium son los estados sexuales de las especies de Aspergillus. Los conidióforos poseen paredes lisas de color café pálido. Las vesículas son globosas con seriación uniseriada. Los conidios son esféricos o elipsoidales, y de pared áspera, que se caracterizan por su color amarillo brillante.</p>
<p>Penicillium spp. 40x</p> 	<p>Pudrición del grano, y pérdida de peso. Disminución de los valores nutricionales.</p>	<p>Citreoviridina, culmorina, cicloclorotina, islanditoxina, ácido ciclopiazónico, ácido micofenólico, ocratoxina A, patulina, ácido penicílico, penitrem A, fomopsin, roquefortin C, rubratoxina, ácido secalónico D, verrucosidina, verruculogen, fumotremorgin, griseofulvina (Pitt, 1997; Dijksterhuis & Samson, 2007).</p>	<p>Forman conidios en una estructura ramificada semejante a un pincel. Las hifas alcanzan un diámetro de 2-3 µm. pueden tener textura lisa, rugosa o equinulada. La pared de las fiálides siempre es lisa. Los conidios son esféricos o elipsoidales, hialinos que en masa se ven de color verde, verde azulado, verde aceituna o gris. La pared de los conidios es lisa o rugosa según las especies (Barnett & Hunter, 1998).</p>



Microbiota presente en granos de café en medio de cultivo PDA

En la prueba de determinación de hongos presentes en las muestras de granos de café, realizada por medios de cultivo PDA, se encontró que la especie que más predominó para las muestras orgánicas fue *Aspergillus ochraceus* con un frecuencia de aparición de 96% y una densidad relativa del 40%. Otras especies presentes con menor incidencia fueron *Aspergillus sojae*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus tamaritii* y *Aspergillus carbonarius* entre los más abundantes. Para las muestras inorgánicas la especie que más predominó fue de igual manera el *Aspergillus ochraceus* con una frecuencia de aparición de 82% y una densidad relativa de 35%. Otros hongos determinados en la microbiota de los granos de café inorgánicos con frecuencia de aislamiento representativa fueron las especies de *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus japonicus* y el género *Rhizopus* (Tabla 12).



Microbiota presente en granos de café en medio de cultivo MSA

En la determinación de los hongos presentes en granos de café realizada en medios de cultivo MSA, se encontró que de las muestras orgánicas, el género que mayor presencia tuvo fue el *Eurotium sp.* considerado el estado sexual de algunas especies de *Aspergillus*, con una frecuencia de aparición del 98% y una densidad relativa del 32%, el segundo más frecuente fue *Aspergillus ochraceus* con una frecuencia de aparición del 66% y una densidad relativa del 21%. Otras especies con menor frecuencia de aparición fueron *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus sojae*, *Aspergillus tamarii*, *Aspergillus niger*. En el caso de las muestras inorgánicas la especie predominante fue *Aspergillus ochraceus* con una frecuencia de aparición de 96% y una densidad relativa de 54%. Otras especies representativas fueron *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus sojae* y el género *Rhizopus* (Tabla 13).



El análisis realizado a los granos de café verde en ambos medios de cultivo, se encontraron 10 especies representativas de la micobiota de los granos de café algunas reportadas por Perrone (2007) y algunas más por Joosten *et al.* (2001), como especies micotoxigénicas del género *Aspergillus* entre las que se encuentran *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus niger*, son especies potencialmente productoras de micotoxinas en granos de café. La Micobiota encontrada en ambos medios de cultivo, indica que estas muestras estuvieron sometidas a malas condiciones de almacenamiento, posiblemente almacenados a humedades relativas de entre 75-90%, óptimas para el desarrollo de estas especies. Es importante señalar que la presencia de este tipo de hongos reduce la calidad organoléptica y nutrimental de los granos de café, en el caso de *Aspergillus ochraceus* se encuentra dentro de la categoría de hongos de almacén, produce calentamiento interno del grano, es productor de ocratoxina A y ácido penicílico. La presencia de *Aspergillus niger* y del género *Rhizopus* indica el deterioro avanzado de los granos de café, además se ha reportado que *Aspergillus niger* es productor de ocratoxina A (Abarca, 1994). Otras especies y géneros encontrados fueron *Aspergillus flavus*, *Eurotium spp.* y *Penicillium spp.* *Aspergillus flavus* es una especie potencialmente toxigénica por la producción de aflatoxinas, y para el caso de distintas especies de *Penicillium* se han reportado que pueden producir patulina, citrinina, ácido penicílico y islanditoxina verde (Perrone, 2007; González, 1997; Kozakiewicz, 1989; Mewer, 1985).

La mayoría de las especies encontradas en ambos tipos de granos orgánicos e inorgánicos, indican que el almacenamiento de todas las muestras, no ha tenido las



condiciones adecuadas para evitar el desarrollo de hongos que pueden representar un riesgo potencial para la producción de micotoxinas, poniendo en riesgo la salud humana. Las muestras procedentes de Chiapas e Hidalgo, presentaron un deterioro avanzado en cuanto a la calidad del grano. Las muestras que presentaron una carga de micobiota representativa fueron los granos de café verde procedentes de Chiapas, Guerrero y Oaxaca.

Los resultados de este trabajo concuerdan con lo reportado por Abarca (1994) y Joosten (2001) los cuales encontraron la presencia de la especie de *Aspergillus carbonarius* en granos de café verde. Así como, con lo reportado por Kozakiewicz (1989) donde indica la presencia de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus niger* en granos almacenados con una humedad alta. En otro trabajo realizado por Mewer (1985) también encontró una alta presencia de *Aspergillus ochraceus* en granos de café verde y la producción de ocratoxina A.



Extracción, purificación y cuantificación de DNA

Se llevó a cabo la extracción del DNA total de las cepas aisladas por medio de cultivos axénicos, empleando el protocolo de Sambrook adaptado para la extracción en hongos. Posteriormente se cuantificó la concentración de DNA con ayuda del *Nanodrop*, las concentraciones obtenidas se muestran a continuación:

Tabla 14. Concentración de DNA (ng/μL) y relación 260/280 de las cepas del género *Aspergillus*

Especie	Concentración de DNA(ng/μL)	Relación 260/280	DNA utilizado para PCR (Dilución del DNA)	
			Concentración de DNA(ng/μL)	Relación 260/280
<i>Aspergillus sojae</i> Sakaguchi	1956.6	1.86	30.4	1.77
<i>Aspergillus tamaraii</i> Kita	978.7	1.87	34.2	1.76
<i>Aspergillus flavus</i> Link	982.6	1.77	32.4	1.74
<i>Aspergillus carbonarius</i> (Bainier) Thom	103.4	1.62	56.4	1.79
<i>Aspergillus japonicus</i> Saito	911.6	1.86	49.9	1.83
<i>Aspergillus niger</i> Tiegh	756.4	1.88	60.2	1.82
<i>Aspergillus ochraceus</i> K. Wilh	2470.9	1.79	33.2	1.74

La tabla 14 muestra las concentraciones de DNA obtenidas y la relación 260/280 (pureza del DNA), lo cual nos indica que los resultados obtenidos se encuentran dentro del rango aceptable, mayor a 1.7, lo cual nos indica que el DNA extraído cuenta con la pureza necesaria para llevar a cabo la reacción de la PCR.



Diseño de *primers* específicos

Se seleccionaron dos cepas micotoxigénicas a partir del estudio de la Micobiota de los granos de café verde, para la realización del estudio por técnicas moleculares. Se diseñaron primers de *Aspergillus niger* y *Aspergillus ochraceus*, por ser las cepas más representativas en cuanto a la producción de micotoxinas en los granos de café.

Diseño de primers para las especies de *Aspergillus niger*

La selección y el diseño de los primers se basaron en la selección de la secuencia de un gen específico que codifique para una enzima y que diferencie las especies seleccionadas de otras especies del mismo género. Los primers que se utilizaron para llevar a cabo las reacciones en la PCR, fueron diseñados para amplificar un gen específico del DNA nuclear de la especie de *Aspergillus niger* (Tabla 15). Se encontró que el gen productor de aspergillopepsina, hace diferente a la especie de *Aspergillus niger* de otras especies del género *Aspergillus*. Con ayuda de la base de datos del GenBank, se prosiguió a buscar la secuencia FASTA del gen productor de aspergillopepsina A (Logotheti, 2009), dicha proteína está ligada a especies similares a *Aspergillus niger*, pero con las diferencias necesarias para poder ser una característica específica dentro del genoma del *Aspergillus niger*. Con ayuda del programa bioinformático Blast se diseñaron los primers que amplificaran una zona del gen productor de aspergillopepsina A. Se generó la diana con los primers diseñados para comprobar su especificidad dentro de la base de datos de secuencia de nucleótidos (Ver anexo D).



Tabla 15. Primers específicos para *Aspergillus niger* Tiegh

	Secuencia (5'-->3')	Tamaño	Inicia	Para	Tm (°C)	GC%
Primer frontal	GCGCCATTTCTGGTTACATTC	21 pb	126	146	52.51	47.62
Primer Reverso	CAATTGCCAAGACAGAGCCA	20 pb	740	721	52.95	50.00
Producto	615pb					

Diseño de primers para *Aspergillus ochraceus*

El diseño de los primers para la especie de *Aspergillus ochraceus* se basó de igual manera en seleccionar un gen específico que codifique para una proteína que diferencie al *Aspergillus ochraceus* de otras especies del mismo género *Aspergillus*. Con ayuda del GenBank, se encontró que el gen productor de *Poliketida sintasa*, hace diferente a la especie de *Aspergillus ochraceus* de otras especies del reino Fungi (O'Callaghan *et al.*, 2003). El gen PKS se encuentra dentro del DNA nuclear del *Aspergillus ochraceus*, se generó la diana con los primers diseñados para comprobar su especificidad dentro de la base de datos de secuencia de nucleótidos (Ver anexo D). A continuación se presentan los primers específicos diseñados para esta especie (Tabla 16).



Tabla 16. Primers específicos para *Aspergillus ochraceus* K. Wilh

	Secuencia (5'-->3')	Tamaño	Inicia	Para	Tm (°C)	GC%
Primer frontal	CCAGCAGGATCGGATTGGTG	20 pb	51	70	55.03	60
Primer Reverso	TGGCAGCGAAGATTGACGAG	20 pb	301	282	55.04	55
Producto	251 pb					

Los primers fueron sintetizados por la empresa Invitrogen™.



Evaluación experimental de la técnica de PCR

En la figura 14 se muestra el amplificado de 615 pb de los primers AspergNi F y AspergNi R, utilizando DNA perteneciente a la especie de *Aspergillus niger* Tiegh. Las condiciones usadas para esta prueba fueron diseñadas conforme a las especificaciones de los *primers* (Figura 14). Se probaron las condiciones de trabajo con una T_m de 52.7°C especificada por el proveedor Invitrogen TM, con la cual no se obtuvo ningún amplificado, por lo que se calculó la T_m por la fórmula de Wallace y se obtuvo una temperatura promedio de $61^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, la T_m más eficaz para el amplificado fue de 60°C . Los *primers* utilizados fueron diseñados específicamente para este trabajo por lo que no se reportan en la bibliografía. Se muestra la eficiencia de los *primers* en la Figura 14.

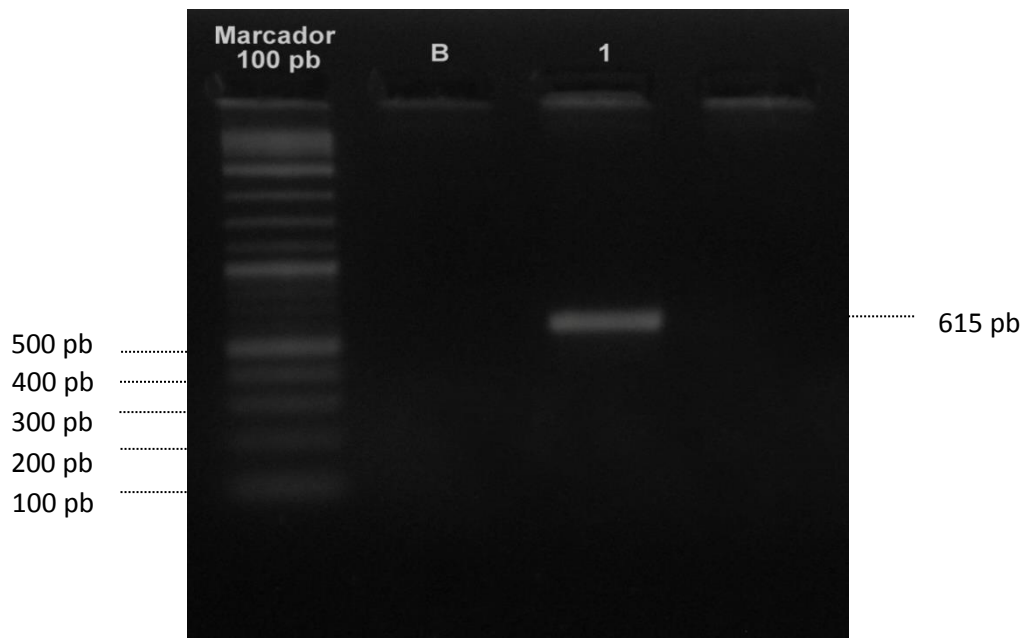


Figura 14. Evaluación electroforética en gel de agarosa al 2% del producto de PCR con primers AspergNi F y AspergNi R. Carril B: blanco, carril 1: cepa identificada como *Aspergillus niger* Tiegh



En la figura 15 se muestra el amplificado de 251 pb de los primers AsperOch F y AsperOch R, utilizando DNA perteneciente a la especie de *Aspergillus ochraceus* K. Wilh. Utilizando el programa diseñado con las especificaciones de los *primers* (Figura 15), la temperatura de hibridación fue indicada por el proveedor de 55.35°C, con lo cual no se obtuvo ningún amplificado, y se calculó la T_m por la regla de Wallace y se obtuvo una T_m de $62^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$, la temperatura óptima para el amplificado fue de 60°C . Los primers fueron diseñados exclusivamente para este trabajo por lo que no se reportan en la bibliografía.

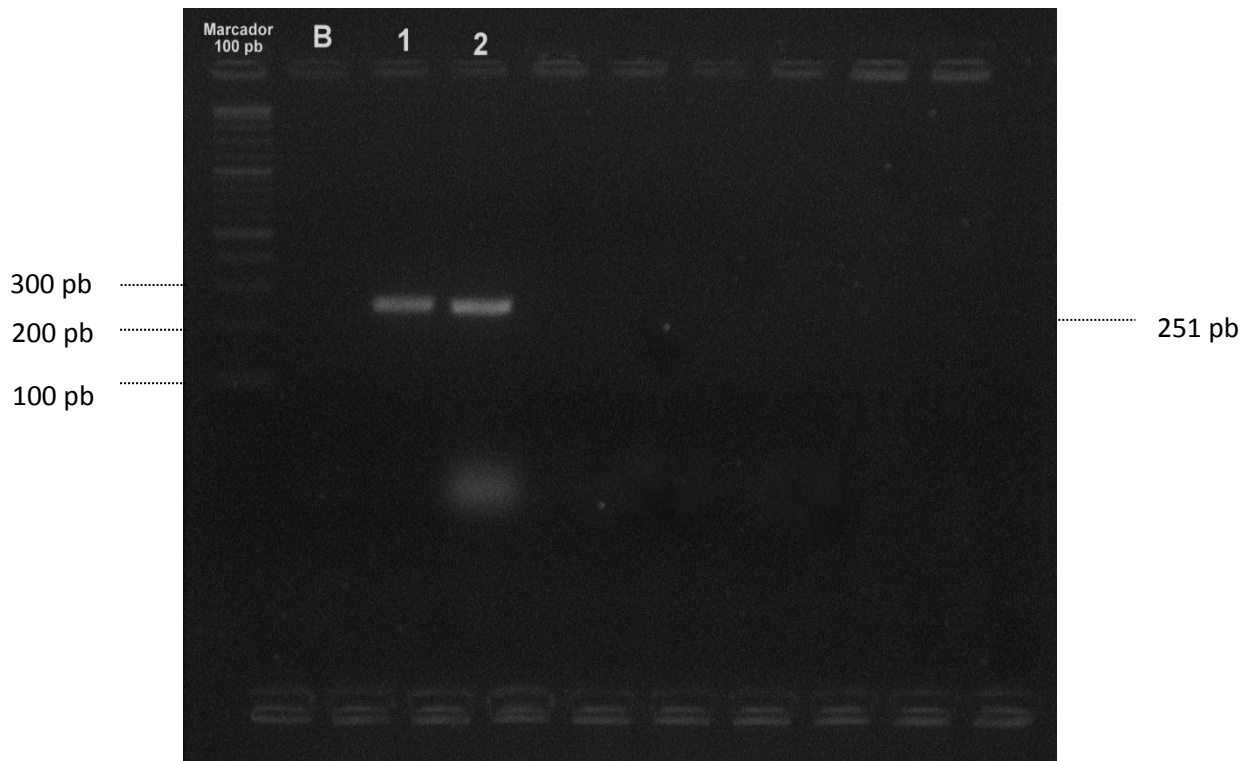


Figura 15. Evaluación electroforética en gel de agarosa al 2% del producto de PCR con primers AspergOch F y AspergOch R. Carril B: blanco, carril 1 y 2: cepa identificada como *Aspergillus ochraceus* K. Wilh.



Especificidad de los primers de *Aspergillus niger*

En la figura 16 se muestra el análisis electroforético donde se evalúan los productos de la PCR, utilizando los primers AspergNi F y AspergNi R. Se puede observar una banda amplificada de 615 pb para el carril 1 que corresponde al carril en donde se utilizó DNA de *Aspergillus niger* Tiegh. En los demás carriles se utilizaron DNA de distintas especies del género *Aspergillus*, en donde no se observa ningún amplificado. Esto se realizó con el fin de comprobar que los primers diseñados específicamente para *Aspergillus niger* no amplifican con otras especies con similitud morfológica y molecular como con las especies pertenecientes a la sección *Nigri*: *Aspergillus japonicus* (carril 7) y *Aspergillus carbonarius* (carril 3).

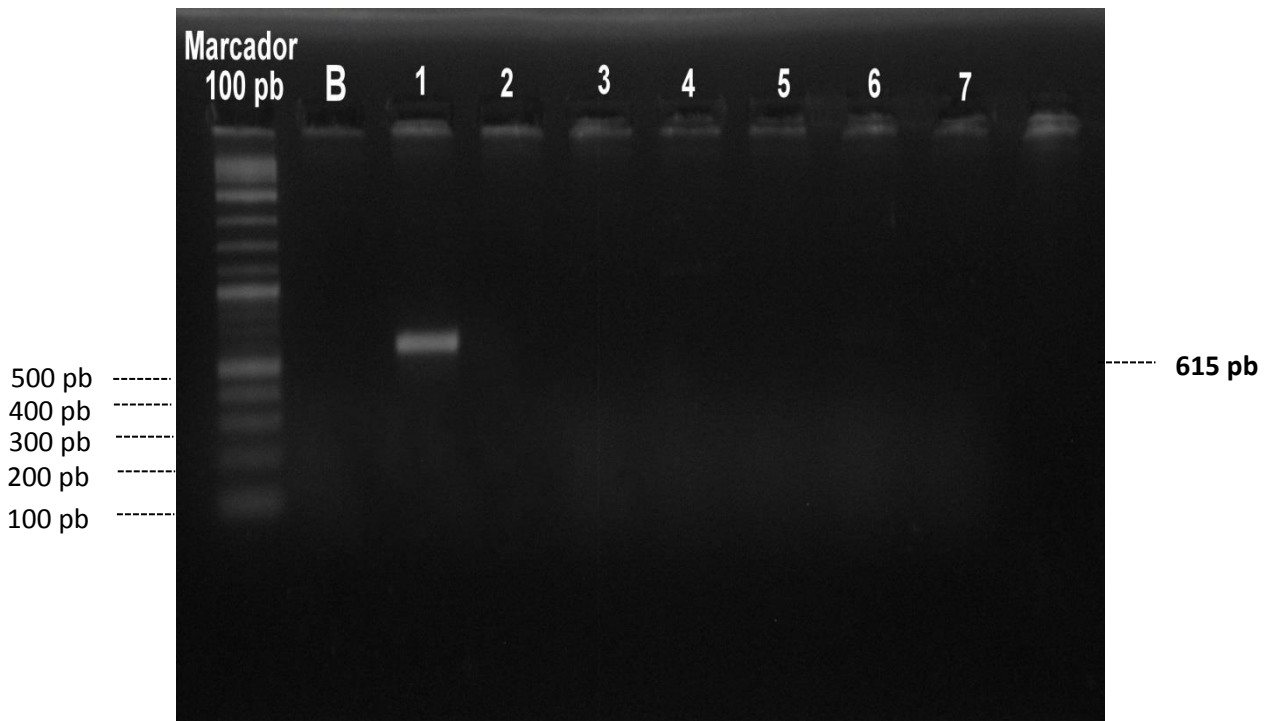


Figura 16. Evaluación electroforética en gel de agarosa al 2% del producto de PCR con primers AspergNi F y AspergNi R. Carril B: Blanco, Carril 1: *Aspergillus niger* Tiegh, carril 2: *Aspergillus tamarii* Kita, carril 3: *Aspergillus carbonarius* (Bainier) Thom, carril 4: *Aspergillus sojae* Sakaguchi, carril 5: *Aspergillus flavus* Link, carril 6: Cepa identificada como *Aspergillus ochraceus* K. Wilh, carril 7: *Aspergillus japonicus* Saito.



Especificidad de los primers de *Aspergillus ochraceus*

En la figura 17 se muestra el análisis electroforético donde se evalúan los productos de la PCR, utilizando los primers AspergOch F y AspergOch R. Se observa que en el carril 1 corresponde al DNA de *Aspergillus ochraceus* K. Wilh, los demás carriles se ocupó de DNA de especies aisladas del género *Aspergillus* de similitud morfológica y molecular para comprobar que los *primers* diseñados específicamente para *Aspergillus ochraceus* no amplifican con otras especies del mismo género.



Figura 17. Evaluación electroforética en gel de agarosa al 2% del producto de PCR con primers AsperOch F y AsperOch R. Carril B: Blanco, Carril 1: Cepa identificada como *Aspergillus ochraceus* K. Wilh, carril 2: *Aspergillus tamaris* Kita, carril 3: *Aspergillus carbonarius* (Bainier) Thom, carril 4: *Aspergillus sojae* Sakaguchi, carril 5: *Aspergillus flavus* Link, carril 6: *Aspergillus niger* Tiegh, carril 7: *Aspergillus japonicus* Saito.



Conclusiones

- Se determinó la microbiota de las siete muestras de los diferentes granos de café verde, obteniendo una carga microbiana muy alta, esto se debe a que a lo largo de la cadena productiva existen operaciones en donde no se aplican sistemas de gestión de calidad para preservar la materia prima en óptimas condiciones para su consumo. Los hongos encontrados como el género *Aspergillus* indica la falta de buenas prácticas de almacenaje en bodegas o almacenes de sacos de café, donde no se controlan los factores fisicoquímicos como la humedad relativa, temperatura, aireación, entre otros.
- Se identificaron morfológicamente los hongos presentes en grano de café verde orgánico e inorgánico siendo *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus sojae*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus tamarii*, *Aspergillus carbonarius* las que presentaron una alta incidencia pudiendo representar un riesgo, debido a que algunas especies encontradas son potencialmente micotoxigénicas.
- Se diseñaron primers específicos para *Aspergillus niger* y *Aspergillus ochraceus*, a través de un software bioinformático, corroborando el producto de la PCR con programas Bioinformáticos. Los primers diseñados fueron efectivos para identificar y diferenciar especies de similitud genética por la técnica de PCR. Se realizó la especificidad de los primers con otras especies del género *Aspergillus* encontradas de igual manera en los granos de café verde.
- La técnica de PCR es un método sensible, reproducible y eficaz, capaz de arrojar resultados confiables a partir de pequeñas cantidades de DNA para la identificación de especies del género *Aspergillus* en grano de café verde.



Referencias

- Abarca, M. L., Bragulat, M. R., Castella, G., & Cabañes, F. J. (1994). *Ochratoxin A production by strains of Aspergillus niger var. niger*. Applied and Environmental Microbiology, Vol.60 (Número 13), 2650-2652.
- AOAC. (1994). *Association of official Analytical Chemists, Internacional*. USA.
- Barnett, H. L. & Hunter, B. B. (1998). *Illustrated genera of imperfect fungi* (4° edición). St, Paul, Minnessota : APS PRESS.
- Berth, M. (2007). *The state of the art in the analysis of two dimensional gel electrophoresis images*. USA: Appl.Microbioly Biotechnoly
- Betina, V. (1984). *Mycotoxins: Productions, isolation, separation and purification. Developments in Food Science* (Vol. 8). Amsterdam, Netherlands: Elsevier.
- Bos, C. J., & Swart, K. (1995). *Genetics of Aspergillus. In: teh mycota II: Genetics and Biotechnology*. Berlin: Springer-Verlag.
- CEFP. (2001). *El Mercado del Café en México*. México, DF: H. Congreso de la Unión.
- Christensen, C. M., & Kaufmann, H. H. (1969). *Grain Storage: The role of fungi in quality loss*. University of Minnesota Press, Minneapolis. 153 pp.
- Christensen, C. M. & Kaufmann, H. H. (1981). *Contaminación por hongos en granos almacenados*. México, DF: Pax- México.
- Christensen, C. M., & Meronuck, R.A. (1976). *Manual of Fungi in feed, food and cereal grains*. Minneapolis, Minnesota, USA.
- Christensen, C. M., & Sauer, D.B. (1982). *Micoflora in storage of cereal grains and their products* (3ª edición). Minnesota: American Association of Cereal Chemist Vol. 3.
- Colín, A. S. (2001). *El Cultivo del cafeto en México* (3ª edición ed.). México: La fuente.
- Cortijo, J. D. (2008). *El mundo del Café*. Cataluña, España.
- Dijksterhuis, J., & Samson, R. (2007). *Food Micology. A Multifaceted approach to fungi anf food*. USA: Taylor & Francis group.
- Domsch, K. H., Gams, W., & Anderson, T.H. (1980). *Compendium of Soil Fungi*. London: Academic Press.
- Duarte, D. (2005). *The Mycotixin Blue Book*. England: Nottingham.



- Erlich, H.A., & Arnheim, N. (1992). *Genetic analysis using Polymerase Chain Reaction*. USA: Ann. Rev. Genet.
- Escamilla. (2001). *Café sustentable: Definición y retos tecnológicos*. Cordoba: FIRA.
- FAO. (2009). *Mercado de café en México*. México.DF: Centro de Estudios de Finanzas Públicas.
- Frank, J. F. (1993). *Tests for group of microorganisms*. USA: Richardson.
- Gams, W. (1985). *Infrageneric taxa of Aspergillus*. New York, USA: Samson & Pitt.
- García, C. A. M. (2006). *Electroforesis en geles de poliacrilamida: Fundamentos, actualidad e importancia (2ª edición ed.)*. México, DF: Laboratorios Betera.
- Gil-Agusti, M. T. (2005). *Two dimensional mapping as a tool for classification of green coffee bean species*. (5 ed.). Italia: Proteomics.
- Giovannucci, D. (2005). *Analisis Prospectivo de Política Cafetalera*. México,DF: SAGARPA, FAO.
- González, H. M., González, H.H.L., Martínez, E.J., & Resnik, S.L. (1997). *Fungi associated with sorghum grain from Argentina*. Buenos Aires, Argentina.
- Griffiths, J. F. (2002). *Genética*. USA: McGraw- Hill Interamericana.
- Innis, M. (2010). *Amplificación de DNA in vitro por PCR*. Puerto Rico.
- Joffe, A. Z., & Lisker, N. (1969). *Effects of light, temperature, and pH value on aflatoxin production in vitro*. Appl. Microbiol.
- Joosten, H.M., Goetz, J., Pittet, A., Schellen, M., & Buchelli., P. (2001). *Production of ochratoxin A by Aspergillus carbonarius on coffee cherries*. International Journal of Food Microbiology.
- Juan, C. G. (2008). *Analisis de aflatoxinas y ocratoxina A en alimentos. Evaluación de la ingesta poblacional*. Tesis doctoral de la Universidad de Valencia , España: Servei.
- Klich, A. (2002). *Identification of common Aspergillus species*. Louisiana, USA: Departamento de Agricultura .
- Kornerup, A., & Wanscher, J.H. (1981). *Methuen Handbook of Colour (3° ed.)*. London: Eyre Methuen.
- Kozakiewicz. (1989). *Aspergillus species on stored products*. USA: CAN International Mycological Institute.



- Kwon-Chung, K.J & Bennett, J. (1992). *Medical Micology*. London: Lea & Febiger.
- León, J. (1992). *Especies y variedades de café* (1º edición ed.). Turrialba, Costa Rica: IICA.
- Logotheti, M. (2009). *Multiplex PCR for the discrimination of Aspergillus fumigatus, Aspergillus flavus, Aspergillus niger y Aspergillus terreus*. *Journal of Microbiological Methods* , 209-211.
- López, C. P. A. (2003). *Mejoramiento del rendimiento en el proceso de Extracción de café de la empresa DECAFE S.A*. Manizales, Colombia: Tesis de Ingeniería Química. Facultad de Química.
- López, C., Mallorquin, P. & Vega, M. (2003). *Tecnologías moleculares de trazabilidad alimentaria*. España: Informe de vigilancia tecnológica.
- Mewer, V. D. (1985). *Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by Aspergillus ochraceus*. USA.
- Monroig, F. (2004). *Ecos del Café*. Puerto Rico: En Línea (<http://academic.uprm.edu/mmonroig/id51.htm>).
- Moreno, M. (1988). *Manual para la identificación de hongos en granos y sus derivados*. Mexico, DF: UNAM.
- Niessen, L., Schmidt, H., E. Muhlencoert, E., Farber, P., Karolewicz, A., & Geisen, R. (2005). *Advances in the molecular diagnosis of ochratoxin A- producing fungi*. USA: Food Additives and contaminants.
- O`Callaghan, J., & Dobson, A. D. (2005). *Molecular caracterizacion of ochratoxin a biosynthesis and producing fungi*. USA: Advances in Applied Microbiology.
- O`Callaghan, J., Caddick, M. X., & Dobson, A.D. (2003). *A polyketide synthase gene required for ochratoxin A biosynthesis in Aspergillus ochraceus*. *US National Library of Medicine National Institutes of Health*, 85-91.
- Perera, J. (2002). *Ingeniería genética, Preparación, análisis, manipulación y clonaje de DNA*. (Vol. 1). Madrid, España.
- Perrone, G. (2007). *Biodiversity of Aspergillus species in some important agricultural products*. Italia: Institute of Sciences of Food Production.
- Pitt, J. I., & Hocking, A.D. (1997). *Fungi and Food Spoilage*. London: Blackie Academic & Professional.



- Pitt, J. I. (1994). *The current role of Aspergillus and Penicillium in human and animal health*. USA: Journal of medical and Veterinary Micology .
- Prieto, D.Y.A. (2002). *Caracterización física del café semitostado*. Bogotá, Colombia: Tesis de Ingeniería Química. Facultad de Ingeniería Química.
- PROFECO. (2001). *Calidad del café tostado, en grano o molido*. Recuperado el 2012, de http://www.profeco.gob.mx/revista/pdf/est_01/Café.pdf
- Raper, K. B., & Fenell, D.I. (1986). *The Genus Aspergillus*. 2ª edición. USA: William & Wilkins.
- Rivera, F.A, Villareal, R.C., & Garcia.O.L. (1988). *Desarrollo experimental del Cultivo de Café, Mejoramiento genético*. . República de El Salvador: Limusa.
- Saiki, R. K., Gelfand, D.H., & Mullis K.B. (1988). *Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*. USA: Science ant Technology.
- Sambrook, J.(2002). *Molecular Cloning. A laboratory Manual*. USA: CSHL Press.
- Sthephen, W. P. (2008). Phylogeny and subgeneric taxonomy of *Aspergillus*. En V. János, *Aspergillus in the genomic era* (pág. 334). Netherlands: Wageningen Academic. 334 pp.
- Surzycki, S. (2000). *Basic Techiques in molecular Biology*. (Vol. 8). Indiana, USA.
- Tabak, H.H., & Cooke, W.B. (1968). *The effects of gaseous environments on the growth and metabolism of fungi*. USA: Botanical Review.
- Thiago, N.C.L. (2009). *Detection of adulteration in processed coffee with cereal and coffee husk using capillary zone electrophoresis*.Sao Paulo, Brasil.: Departamento de Química Fundamental.
- Ulloa, M., & Hanlin R. T. (2006). *Nuevo diccionario ilustrado de micología*. Minnesota, USA: APS Press.
- Uraga, B. C. (2002). *Algunos principios activos del café, del té y del cacao*. Málaga: Grupo QUIMESCA.
- Vargas, J. (2008). *Aspergillus in the genomic era*. Holanda: Wagening Academic .



ANEXO A

Preparación de medios de cultivo

Para preparar los diferentes medios de cultivo (PDA, MSA, CYA, CYA20S, CZ, MEA), se sugieren las formulas señaladas a continuación. Ya homogenizados los medios de cultivo se esterilizaron en la autoclave a 120 ° C, 15 lb de presión por 20 minutos, colocando la cinta testigo. Una vez estériles los medios se dejaron enfriar a temperatura ambiente hasta llegar aproximadamente 40°C, y así vaciarlos en cajas Petri estériles, en la campana de flujo laminar. Posteriormente se conservaron a una temperatura de 5°C hasta su uso.

Formulación de los medios de cultivo

Papa Dextrosa Agar (PDA)

Medio papa dextrosa agar	39.00 g
Agua destilada	1000 ml

Malta Sal Agar (MSA)

Malta	20.00 g
NaCl	60.00 g
Agar Bacteriológico	20.00 g
Agua destilada	1000 ml

Concentrado Czapek

NaNO ₃	30.00 g
KCl	5.00 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	5.00 g
FeSO ₄ . 7H ₂ O	0.1 g



ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0.1 g
CuSO ₄ . 7H ₂ O	0.05 g
Agua destilada	100 ml

Czapek Yeast Extract Agar

K ₂ HPO ₄	1.00 g
Extracto de levadura	5.00 g
Sacarosa	30.00 g
Agar bacteriológico	15.00 g
Agua destilada	1000 ml
Concentra do Czapek	10 ml

Czapek Yeast Extract Agar (CY20S)

K ₂ HPO ₄	1.00 g
Extracto de levadura	5.0 g
Sacarosa	200.00 g
Agar bacteriológico	15.00 g
Agua destilada	1000 ml
Concentrado Czapek	10 ml

Malt Extract Agar (MEA)

Extracto de malta	20.00 g
Peptona	1.00 g
Glucosa	20.00 g
Agar bacteriológico	20.00 g
Agua destilada	1000 ml



Czapek Dox (CZ)

K ₂ HPO ₄	1.00 g
Sacarosa	30.00 g
Agar bacteriológico	17.5 g
Agua destilada	1000 ml
Concentrado Czapek	10 ml



ANEXO B

Morfología de referencia para la identificación a nivel de especie.

Tabla 17. Diámetros de colonia (mm) en medios de cultivo para *Aspergillus* sección *Nigri*

Sección <i>Nigri</i>					
Especie	Diámetro normal de colonia (mm) en cada Medio de cultivo				
	CYA25	MEA	CYA37	CY20S	CZ
<i>Aspergillus awamori</i>	60-70	60-70	65-70	60-70	30-60
<i>Aspergillus carbonarius</i>	65-70	55-70	11232	68-70	35-45
<i>Aspergillus foetidus</i>	45-60	55-65	48-65	55-70	30-40
<i>Aspergillus japonicus</i>	60-70	60-70	20-50	70	30-70
<i>Aspergillus niger</i>	55-70	50-70	50-70	68-70	40-62

Tabla 18. Diámetros de colonia (mm) en medios de cultivo para *Aspergillus* sección *Flavi*

Sección <i>Flavi</i>					
Especie	Diámetro normal de colonia (mm) en cada Medio de cultivo				
	CYA25	MEA	CYA37	CY20S	CZ
<i>Aspergillus alliaceus</i>	68-70	65-70	40-55	65-70	65-70
<i>Aspergillus flavus</i>	65-70	65-70	55-65	65-70	55-65
<i>Aspergillus oryzae</i>	55-70	60-70	50-65	60-70	39-65
<i>Aspergillus parasiticus</i>	60-70	60-70	50-70	60-70	45-65
<i>Aspergillus sojae</i>	60-70	60-70	45-75	60-70	50-60
<i>Aspergillus tamarii</i>	55-70	65-70	40-70	60-70	54-70



Tabla 19. Diámetros de colonia (mm) en medios de cultivo para *Aspergillus* sección *Circumdati*

Sección <i>Circumdati</i>					
Especie	Diámetro normal de colonia (mm) en cada Medio de cultivo				
	CYA25	MEA	CYA37	CY20S	CZ
<i>Aspergillus auricomus</i>	30-50	40-60	45-60	0-25	18-27
<i>Aspergillus melleus</i>	30-50	33-60	58-70	25-35	15-35
<i>Aspergillus ochraceus</i>	39-59	44-55	44-70	0-35	22-42
<i>Aspergillus ostianus</i>	38-50	40-50	50-60	0-15	20-30
<i>Aspergillus sclerotiorum</i>	45-60	45-56	60-70	20-30	32-37

Tabla 20. Micromorfología para género *Aspergillus* sección *Nigri*

Sección Nigri							
Especie	Estípite		Vesículas		Fiálides	Conidios	
	Longitud(μm)	Ancho(μm)	Diámetro(μm)	Forma	Seriación	Forma	Diámetro(μm)
<i>Aspergillus awamori</i>	300-1500	7-17	20-40	Globosa	Biseriada	Globosa	4-5
<i>Aspergillus carbonarius</i>	1000-3500	15-20	65-90	Globosa	Biseriada	Globosa	7-10
<i>Aspergillus foetidus</i>	400-800	7-17	30-50	globosa/elipsoidal	Biseriada	Globosa	4-5
<i>Aspergillus japonicus</i>	300-600	12-17	14-30	globosa/elipsoidal	Uniseriada	globosa/elipsoidal	4-5
<i>Aspergillus niger</i>	400-3000	12-17	30-75	Globosa	Biseriada	Globosa	3.5-4.5

Tabla 21. Micromorfología para género *Aspergillus* sección *Flavi*

Sección Flavi							
Especie	Estipite		Vesículas		Fiálides	Conidios	
	Longitud(μm)	Ancho(μm)	Diámetro(μm)	Forma	Seriación	Forma	Diámetro(μm)
<i>Aspergillus alliaceus</i>	40-2000	5-10	20-50	globosa/piriforme	Uniseriada/biseriada	globosa	3-3.5
<i>Aspergillus flavus</i>	400-800	8-17	20-45	globosa/elipsoidal	Uniseriada/biseriada	globosa/elipsoidal	3-6
<i>Aspergillus oryzae</i>	500-2500	10-25	22-50	piriforme/clavada/globosa	Uniseriada/biseriada	globosa/elipsoidal	4-8.5
<i>Aspergillus parasiticus</i>	250-500	8-17	20-35	globosa/elipsoidal	Uniseriada/biseriada	globosa	3-5.6
<i>Aspergillus sojae</i>	300-900	8-17	17-35	piriforme/clavada/globosa	Uniseriada/biseriada	globosa	5.5-7
<i>Aspergillus tamarii</i>	600-1500	12-20	20-45	globosa/piriforme	Uniseriada/biseriada	globosa	5.5-8

Tabla 22. Micromorfología para género *Aspergillus* sección *Circumdati*

Sección <i>Circumdati</i>							
Especie	Estípite		Vesículas		Fiálides	Conidios	
	Longitud(μm)	Ancho(μm)	Diámetro(μm)	Forma	Seriación	Forma	Diámetro(μm)
<i>Aspergillus auricomus</i>	300-1000	7-18	12-35	globosa/ espatulada	Biseriada	globosa/elipsoidal	2.5-3
<i>Aspergillus melleus</i>	350-700	07-10	20-35	globosa/ espatulada/piriforme	Biseriada	globosa/elipsoidal	3-3.5
<i>Aspergillus ochraceus</i>	300-1700	6-12	25-55	globosa/elipsoidal	Biseriada	globosa/elipsoidal	2.5-3.5
<i>Aspergillus ostianus</i>	400-800	7-12	20-40	globosa/elipsoidal	Biseriada	globosa/elipsoidal/ piriforme	4-5
<i>Aspergillus sclerotiorum</i>	400-1200	7.12	17-35	piriforme/globosa/ elipsoidal	Biseriada	Globosa	2.5-3



ANEXO C

A continuación se presentan las características microscópicas y macroscópicas de las especies del género *Aspergillus* aisladas de las muestras de café verde en los medios de cultivo descritos por Maren Klich en su libro *Identification of common Aspergillus species*, para la identificación de las cepas a nivel de especie:

Tabla 23. Características Macroscópicas y Microscópicas de la cepa FLAVUS1M4

CEPA		Sección: Flavi							
FLAVUS1M4									
Características Macroscópicas									
Característica	CYA25	MEA	CYA37	CY20S	CZ				
Diámetro medio (mm)	60.1	62.3	59.1	66.7	55.1				
Conidio	Verde olivo	Verde olivo	Café	Verde olivo	Verde olivo				
Micelio	Blanco	Amarillo	Hialino	Naranja	Hialino				
Exudado	Hialino	Hialino	-	-	Hialino				
Reverso	Beige sulcado	Amarillo liso	Café sulcado	Amarillo sulcado	Beige sulcado				
Pigmento soluble	-	-	-	-	-				
Esclerocios	-	-	-	-	-				
Características Microscópicas									
Estípite		Vesículas		Fiálides	Conidios		Esclerocios		
Longitud(µm)	Ancho(µm)	Diámetro(µm)	Forma	Seriación	Diámetro(µm)	Forma	Diámetro(µm)	Forma	Color
340.33	9.33	30.66	Globosa	Uniseriada	5.4	Globosa	-	-	-



Tabla 24. Identificación de la cepa FLAVUS1M4

Identificada como:	<i>Aspergillus sojae</i> Sakaguchi & Yamada ex Murak
Subgénero:	<i>Circumdati</i>
Sección:	<i>Flavi</i>
Referencias Taxonómicas:	(Christensen , 1982), (Klich, 2002)



Tabla 25. Características Macroscópicas y Microscópicas de la cepa FLAVUS2M3


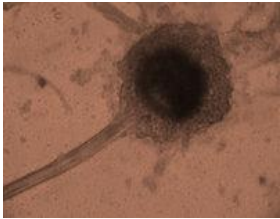
CEPA	Sección: Flavi					 			
FLAVUS2M3									
Características Macroscópicas									
Característica	CYA25	MEA	CYA37	CY20S	CZ				
Diámetro medio (mm)	62.5	52.3	62.1	68.5	48.2				
Conidio	Café	Verde olivo	Verde olivo	Verde olivo	Verde olivo				
Micelio	Hialino	Beige	Amarillo	Blanco	Blanco				
Exudado	Hialino	Hialino	-	-	Hialino				
Reverso	Beige sulcado	Beige liso	Café sulcado	Amarillo liso	Beige sulcado				
Pigmento soluble	-	-	-	-	-				
Esclerocios	-	-	-	-	-				
Características Microscópicas									
Estípites		Vesículas		Fiálides	Conidios		Esclerocios		
Longitud(μm)	Ancho(μm)	Diámetro(μm)	Forma	Seriación	Diámetro(μm)	Forma	Diámetro(μm)	Forma	Color
1234.35	10.92	30.81	Globosa	Biseriada	10.53	Globosa	-	-	-

Tabla 26. Identificación de la cepa FLAVU2M3

Identificada como:	<i>Aspergillus tamaritii</i> Kita
Subgénero:	<i>Circumdati</i>
Sección:	<i>Flavi</i>
Referencias Taxonómicas:	(Raper, 1986), (Christensen, 1982), (Klich, 2002), (Kozakiewicz, 1989).
Micotoxinas que produce:	Ácido ciclopiazónico



Tabla 27. Características Macroscópicas y Microscópicas de la cepa FLAVUS3M4

CEPA	Sección: Flavi												
FLAVUS3M4													
Características Macroscópicas													
Característica	CYA25	MEA	CYA37	CY20S	CZ								
Diámetro medio (mm)	62.3	67.2	56.5	68.4	63.6								
Conidio	Verde olivo	Verde oscuro	Verde olivo	Verde-amarillo	Verde-amarillo								
Micelio	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco								
Exudado	Hialino	Hialino	-	-	Hialino								
Reverso	Incoloro	Incoloro	Incoloro	Incoloro	Incoloro								
Pigmento soluble	-	-	-	-	-								
Esclerocios	Café	-	-	-	-								
Características Microscópicas													
Estípites		Vesículas		Fiálides	Conidios					Esclerocios			
Longitud(μm)	Ancho(μm)	Diámetro(μm)	Forma	Seriación	Diámetro(μm)	Forma	Diámetro(μm)	Forma	Color				
636.43	12.32	32.48	Globosa	Biseriada	5.27	Globosa	268.54	Globosa	Café-verde				

Tabla 28. Identificación de la cepa FLAVUS3M4

Identificada como:	<i>Aspergillus flavus</i> Link
Subgénero:	<i>Circumdati</i>
Sección:	<i>Flavi</i>
Referencias Taxonómicas:	(Raper, 1986), (Christensen, 1982), (Klich, 2002), (Kozakiewicz, 1989), (Pitt J, 1997).
Micotoxinas que produce:	Aflatoxina B ₁ , Acido ciclopiazónico, Acido 3-nitropropiónico



Tabla 29. Características Macroscópicas y Microscópicas de la cepa NIGRI1M2

CEPA		Sección: Nigri							
NIGRI1M2									
Características Macroscópicas									
Característica	CYA25	MEA	CYA37	CY20S	CZ				
Diámetro medio (mm)	60.7	58.5	19.8	69.1	25.9				
Conidio	Negro	Negro	Negro	Negro	Negro				
Micelio	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco				
Exudado	Hialino	Hialino	-	-	Ambar hialino				
Reverso	Amarillo sulcado	Beige	Verde olivo sulcado	Amarillo sulcado	Beige sulcado				
Pigmento soluble	-	-	-	-	-				
Esclerocios	-	-	-	-	-				
Características Microscópicas									
Estípite		Vesículas		Fiálides	Conidios		Esclerocios		
Longitud(μm)	Ancho(μm)	Diámetro(μm)	Forma	Seriación	Diámetro(μm)	Forma	Diámetro(μm)	Forma	Color
2885.87	27.65	85.32	Globosa	Uniseriada	8	Globosa	-	-	-

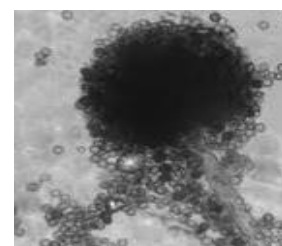
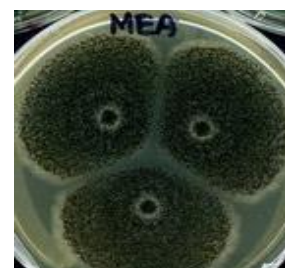


Tabla 30. Identificación de la cepa NIGRI1M2

Identificada como:	<i>Aspergillus carbonarius</i> (Bainier) Thom
Subgénero:	<i>Circumdati</i>
Sección:	<i>Nigri</i>
Referencias Taxonómicas:	(Raper, 1986), (Klich, 2002), (Kozakiewicz, 1989).
Micotoxinas que produce:	Ochratoxin A



Tabla 31. Características Macroscópicas y Microscópicas de la cepa NIGRI2M5



CEPA		Sección: Nigri							
NIGRI2M5									
Características Macroscópicas									
Característica	CYA25	MEA	CYA37	CY20S	CZ				
Díámetro medio (mm)	65.66	59.76	45.4	62.9	55.1				
Conidio	Gris	Gris	Negro	Gris	Gris				
Micelio	Blanco	Beige	Blanco	Blanco	Blanco				
Exudado	-	-	-	-	-				
Reverso	Beige sulcado	Gris liso	Verde sulcado	Amarillo liso	Amarillo liso				
Pigmento soluble	-	-	-	-	-				
Esclerocios	-	-	-	-	-				
Características Microscópicas									
Estípite		Vesículas		Fiálides	Conidios		Esclerocios		
Longitud(μm)	Ancho(μm)	Díámetro(μm)	Forma	Seriación	Díámetro(μm)	Forma	Díámetro(μm)	Forma	Color
443.82	14.04	16	Globosa	Uniseriado	4	Globosa	-	-	-

Tabla 32. Identificación de la cepa NIGRI2M5

Identificada como:	<i>Aspergillus japonicus</i> Saito
Subgénero:	<i>Circumdati</i>
Sección:	<i>Nigri</i>
Referencias Taxonómicas:	(Raper, 1986), (Klich, 2002), (Kozakiewicz, 1989)



Tabla 33. Características Macroscópicas y Microscópicas de la cepa NIGRI3M7

CEPA	Sección: Nigri								
NIGRI3M7									
Características Macroscópicas									
Característica	CYA25	MEA	CYA37	CY20S	CZ				
Diámetro medio (mm)	62.12	56.7	58.42	61.96	54.21				
Conidio	Negro	Negro	Negro	Negro	Negro				
Micelio	Blanco	Blanco	Hialino	Blanco	Blanco				
Exudado	Hialino	No	Hialino	No	Hialino				
Reverso	Negro sulcado	Gris sulcado	Negro sulcado	Negro rugoso	Gris rugoso				
Pigmento soluble	No	No	No	No	No				
Esclerocios	No	No	No	No	Verde olivo				
Características Microscópicas									
Estípite		Vesículas		Fiálides	Conidios		Esclerocios		
Longitud(μm)	Ancho(μm)	Diámetro(μm)	Forma	Seriación	Diámetro(μm)	Forma	Diámetro(μm)	Forma	Color
734.66	13.26	39.52	Globosa	Biseriado	3.6	Globosa	286.52	Globosa	Verde olivo

Tabla 34. Identificación de la cepa NIGRI3M7

Identificada como:	<i>Aspergillus niger</i> Tiegh
Subgénero:	<i>Circumdati</i>
Sección:	<i>Nigri</i>
Referencias Taxonómicas:	(Raper, 1986), (Klich, 2002), (Kozakiewicz, 1989)
Micotoxinas que produce:	Ochratoxin A



Tabla 35. Características Macroscópicas y Microscópicas de la cepa CIRCUMDATI1M2


CEPA	Sección: Circumdati								
CIRCUMDATI1M2									
Características Macroscópicas									
Característica	CYA25	MEA	CYA37	CY20S	CZ				
Diámetro medio (mm)	55.2	39.6	0	47.7	33.25				
Conidio	4-BS Color trigo	4A3 Color crema	-	Amarillo	Café				
Micelio	Blanco	Beige	-	Blanco	Beige				
Exudado	+	-	-	+	-				
Reverso	Amarillo Sulcado	Amarillo liso	-	Café sulcado	Verde sulcado				
Pigmento soluble	-	-	-	-	-				
Esclerocios	Rosa-púrpura	Rosa-púrpura	-	Rosa-púrpura	Rosa-púrpura				
Características Microscópicas									
Estipite		Vesículas		Fiálides	Conidios		Esclerocios		
Longitud(µm)	Ancho(µm)	Diámetro(µm)	Forma	Seriación	Diámetro(µm)	Forma	Diámetro(µm)	Forma	Color
1030.95	18.96	76.63	Globosa	Biseriada	18.96	Globoso	279.66	Globosa	Rosa-púrpura

Tabla 36. Identificación de la cepa CIRCUMDATI1M2

Identificada como:	<i>Aspergillus ochraceus</i> K. Wilh
Subgénero:	<i>Circumdati</i>
Sección:	<i>Circumdati</i>
Referencias Taxonómicas:	(Raper, 1986), (Christensen M. &, 1982), (Klich, 2002), (Kozakiewicz, 1989), (Pitt J. &, 1997).
Micotoxinas que produce:	Ochratoxin A, Acido penicílico, xantomeginina, viomelina, vioxantina.



ANEXO D

Primers específicos para *Aspergillus niger*:

La selección y el diseño de los primers para *Aspergillus niger* se basó igualmente en la selección de la secuencia de un gen específico que codifique para una enzima que diferencie al *Aspergillus niger* de otras especies diferentes, con ayuda del GenBank se encontró que el gen productor de aspergillopepsina, hace diferente a la especie de *Aspergillus niger* de otras especies encontradas en los granos de café, se prosiguió a buscar la secuencia FASTA del gen seleccionado:

>gi|747649|dbj|D49839.1|ASNPEPAB *Aspergillus niger* pepA gene for aspergillopepsin A precursor, complete cds (exon1-4):

```
GAATTCACGCGTAGTTTTTTTTTTTCCCTTTTCTGGATTCTTGCTAGTTCCCTTTCTGTACACTCCGGCTTTTGGCTTGTAAATTT
TAATTGTAAGACATGTATATCCCCGCGGATACCGCCGAGTGCGCCATTTCTGGTTACATTCTCTTTCCCTTTCTGTCTCCATC
GTGAGGAGGAACGCAGGATGAAGACACGGCTTCTCCTTCGTGGCCCCACCAACCAACATGTCCTTGGACGCCAACCCCTCCATC
TGCAAATTTATTGGCCCAATGCAAAGATCCCGTTCGAGCTCAAATGGGTTCGGCCAACCCCGAGCCGTGAGGGGCAGCAGCAGCGAC
GAGCTAAATTAGACCACTGATAAGACGCGATAGCCAAAGTCTGACTGTACATTGTGCCAGCAGATAAGTTGAATCGTGTGACT
GGATGTTGGCTAACCATGGCGTCTCCGGAGTCCCGACGGACCCTGAGCGATCGGCGGTGGAGCGCAATCTATGCCCATCCGCGC
CTAAGATATCTATCCTTCAGCAGTTTAGCCTAGCTTCGACACCTGTTGCACCAGTGTATCGTGATCGGCCCCACGGTCGAA
TGAGCTCTTGCTCTATCCGTAAGACCCTGCCAGTTAATCTGCTATCTACTCCGCGGTAACATCGTGCCTGTCTCCACTAAGGC
AGGGTCCAGGGCTGCATGTCTTACTTTGCACCGAGTCCGGCTCCGGTTCGGCTCTGTCTTGGCAATTGCGAATATCTCCAGGGC
GACGGACGACACGGATTTGGACGGACGTGCGGGGATCTTCGTCCGGCTTATTCTGGAAAGGGACATTTATCTCCTTCCATCATCGC
GGCTGCCATGGCGGGGACTGAGACATTTTGCTCTGAAGAGCATGGTCGACTTGGATGATGGATGAGTTGATCGAGGTCAATGGG
GAGGGTTTGAAGTATAAGAAGAGAGTGCTCGACCAGGAAAATGTCTCTTCTTGTTCATCAACCAAGAGTCTAAGGCTTCTTTG
TCTGGTTCTATCTCTTCTCCGAACCTCTTGTGCTTGACATTCTCGTGGTCAAATGGTCGTCTTCAGCAAAAACCGCTGCCCTCGT
TCTGGGTCTGTCCACCGCCGTCTCTGCGGCACCGGCTCCCACTCGCAAGGGCTTCACCATCAACCAGATTGCCCGGCTGCCAA
CAAGACCCGCACCGTCAACTTGCCGGGTTTGTATGCCCGTTCCTTGCCAAAGTTTGGCGGTACGGTGCCCCAGAGCGTGAAGGA
GGCTGCCAGCAAGGGTAGTGCCGTGACCACGCCCCAGAACAATGACGAGGAGTACCTGACTCCCCTACTGTCCGAAAGTCCAC
CCTTCATCTGGACTTTGACACCGGATCTGCAGATCTGTAAGATTCCCGCGAATGTGCTCGTACGAAACCGTCACTAACCTGAAC
CAGCTGGGGCTTCTCAGACGAGCTCCCTTCTCGGAGCAGACCGGTACGATCTGTACACGCCTAGCTCCAGCGCGACCAAGTT
GAGCGGCTACTCTTGGGACATCTCCTACGGTGACGGCAGCTCGGCCAGCGGAGACGTCTACCGGGATACTGTCACTGTTGGCGG
TGTCACCACCAACAAGCAGGCCGTTGAAGCTGCCAGCAAGATCAGCTCCGAGTTCGTTACAGACACGGCCAATGATGGTCTTCT
GGGTCTGGCCTTACAGTCCATCAACACTGGTGAGTAAAGCCTACATCAGCTGGGTGACTTACCTGTGACCGATATGCAGTCC
AGCCCAAGGCACAGACCACCTTCTTCGACACCGTCAAGTCTCAGCTGGACTCTCCTCTTTTCGCCGTGACGTTGAAGCACGACG
CCCCTGGTGTCTACGACTTTGGCTACATCGATGACTCCAAGTACACCGGTTCCATCACCTACACGGATGCCGATAGCTCCCAGG
GCTACTGGGGCTTACGACCCGCTACAGCATCGGCGAGCGCAGCTCCAGCTCCAGCGGCTTACGCGCCATTGCTGGTGAAGA
GCCCTTTTCAGATTTCTTCTTCTTACTGATTAGTGTATAGACACCGGTACCACCCCTCATCTCCGACGATGAGATC
GTTTTCCGCCACTACGAGCAGGTTTTCCGGCGCCAGGAGACTATGAAGCTGGTGGCTACGTTTTCTTGTCTACTGACCTT
CCTGACTTCACCGTCTGATCGGGACTACAAGGCCGTCGTTCTTGCAAGTACATCAACTACGCTCCCGTTTTCGACCGGCAGC
TCCACCTGCTACGGCGGTATCCAGAGCAACAGCGGTCTCGGACTGTCCATCCTGGGTGATGTGTTCTTGAAGAGCCAGTACGTG
GTCTTCAACTCTGAGGGACCTAAGCTGGGCTTTGCTGCTCAGGCTTAGATCAACACTGAAAAAGTGGGGTATTCGATCTGCTGA
TCGAGCCCTCCTCGGTGGAATACATGTGGACATGTATAGCAAACGATGGTCATGGTGATGATGTTGATATTGATCTTGATGATG
AACCGTACATATTTGATGAAGCTTGATACATATGAAATGTGAATGTATCTACGTGATG
```

Figura 18. Secuencia FASTA del gen productor de aspergillopepsina



```
1321 CTCCCGTCACTGTCGGAAAGTCCACCCTTCATCTGGACTTTGACACCGGATCTGCAGATC
1381 TGTAAGATTCCCCGCGAATGTGCTCGTACGAACCGTCACTAACCTGAACCAGCTGGGGCT
1441 TCTCAGACGAGCTCCCTTCCTCGGAGCAGACCGGTACAGATCTGTACACGCCTAGCTCCA
1501 GCGCGACCAAGTTGAGCGGCTACTCTTGGGACATCTCCTACGGTGACGGCAGCTCGGCCA
1561 GCGGAGACGTCTACCGGGATACTGTCACTGTTGGCGGTGTCACCACCAACAAGCAGGCCG
1621 TTGAAGCTGCCAGCAAGATCAGCTCCGAGTTCGTTTCAGGACACGGCCAATGATGGTCTTC
1681 TGGGTCTGGCCTTCAGCTCCATCAACACTGGTGAGTAAAGCCTACATCAGCTGGGTTGAC
1741 TTACCTGCTGACCGATATGCAGTCCAGCCCAAGGCACAGACCACCTTCTTCGACACCGTC
1801 AAGTCTCAGCTGGACTCTCCTCTTTTTCGCCGTGCAGTTGAAGCACGACGCCCTGGTGTC
1861 TACGACTTTGGCTACATCGATGACTCCAAGTACACCGGTTCCATCACCTACACGGATGCC
1921 GATAGCTCCCAGGGCTACTGGGGCTTCAGCACCGACGGCTACAGCATCGGCGACGGCAGC
1981 TCCAGCTCCAGCGGCTTCAGCGCCATTGCTGGTAAGAGCCCTTTTCAGATTCTCTTGCTT
2041 TCTCTTTACTGATTAGTGTATAGACACCGGTACCACCCTCATCCTCCTCGACGATGAGAT
2101 CGTTTCCGCCCCTACGAGCAGGTTTCCGGCGCCCAGGAGAGCTATGAAGCTGGTGGCTA
2161 CGTTTTCTCTTGCTCTACTGACCTTCCTGACTTCACCGTCGTGATCGGCGACTACAAGGC
2221 CGTCGTTTCTGGCAAGTACATCAACTACGCTCCCCTTTTCGACCGGCAGCTCCACCTGCTA
2281 CGGCGGTATCCAGAGCAACAGCGGTCTCGGACTGTCCATCCTGGGTGATGTGTTCTTGAA
2341 GAGCCAGTACGTGGTCTTCAACTCTGAGGGACCTAAGCTGGGCTTTGCTGCTCAGGCTTA
2401 GATCAACACTGAAAAAGTGGGGTATTCGATCTGCTGATCGAGCCCTCCTCGGTGGAATAC
2461 ATGTGGACATGTATAGCAAACGATGGTCATGGTGATGATGTTGATATTGATCTTGATGAT
2521 GAACCGTACATATTTGATGAAGCTTGATACATATGAAATGTGAATGTATCTACGTGATG
```

Figura 19. Amplicón de los primers seleccionados para *Aspergillus niger*

Ya generado el amplicón, se confirma que los primers seleccionados son correctos, ya que al someterlos a PCR, se tendrá un amplificado de 615 pb.



Primers específicos para *Aspergillus ochraceus*:

La selección y el diseño de los primers para *A. ochraceus* de baso igualmente en la selección de la secuencia de un gen específico que codifique para una enzima que diferencie al *A. ochraceus* de otras especies diferentes, con ayuda del GenBank y del artículo *A polyketide Synthase gene required for Ochratoxin A biosynthesis in Aspergillus ochraceus* publicado en el 2003, por el Departamento de Microbiología de la Universidad de Ireland, se encontró que el gen productor de *Poliketida sintasa*, hace diferente a la especie de *Aspergillus ochraceus* de otras especies encontradas en los granos de café, se prosiguió a buscar la secuencia FASTA del gen seleccionado:

>gi|35395924|gb|AY320069.1| *Aspergillus ochraceus* strain NRRL 3174 putative polyketide synthase (pks) gene, partial cds:

```
TACGAAGCACTCGAAATGGCTGGGCTGGTACCGAACTCAACCCCTACCACCCAGCAGGATCGGATTGGTGTGTTC
TACGGTATGACCAGTGATGACTGGAGGGAGGTGAATAGCGGTCAAACCGTGGATACCTATTTTCATCCCCGGCGGA
AACAGGGCATTTCCTCCGGCAGGATCAGGTGCCACCATTCCCTTGACTTCTTTTGATTCCCTTTATAACCAACT
TTGCGCAGCTACTTCTTTTCGATTTTGTGGGCCAAGCCTGACCATTGATACCGCATGCTCGTCAATCTTCGCTGCC
ATTCTTACAACATATGCGTACCTCTGGCGCGGCGAATGTGACACAGCTCTTGCTGGCGGCGTCTATGTCATGACA
AACCCGGATAATTTTTCGGGCCTCGACAAAGGGCACTTTCTTACCACCAAGGGT
```

Figura 20. Secuencia FASTA del gen pks en *Aspergillus ochraceus*

Ya diseñados los primers se generó el amplicón para corroborar que los primers seleccionados son los adecuados:

```
1 TACGAAGCACTCGAAATGGCTGGGCTGGTACCGAACTCAACCCCTACCACCCAGCAGGAT
>>>>>>>>>>

61 CGGATTGGTGTGTTCTACGGTATGACCAGTGATGACTGGAGGGAGGTGAATAGCGGTCAA
>>>>>>>>>>

121 AACGTGGATACCTATTTTCATCCCCGGCGGAAACAGGGCATTTCCTCCGGCAGGATCAGG

181 TGCCACCATTCCCTTGACTTCTTTTGATTCCCTTTATAACCAACTTTGCGCAGCTACTTC
```

