



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Diseño de una metodología para la extracción del metagenoma del pozol

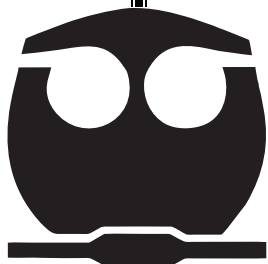
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A

Karina Patricia Rosete Viveros



México, Distrito Federal, 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado

Presidente	Dra. Gloria Díaz Ruiz
Vocal	M. en C. Martha Giles Gómez
Secretario	Dra. Romina María de la Paz Rodríguez Sanoja
1er suplente	M. en C. Norma Angélica Camacho de la Rosa
2do suplente	QFB. Verónica Domínguez Valdez

Sitio donde se desarrolló el tema:

El presente trabajo se realizó bajo la dirección de la **Dra. Romina María de la Paz Rodríguez Sanoja** en el laboratorio C034 del Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México; Circuito Exterior, Ciudad Universitaria México, D.F. 04510, México.

Asesor del tema: _____
Dra. Romina María de la Paz Rodríguez Sanoja

Supervisor Técnico: _____
M. en C. María Catalina Cárdenas Ascención

Sustentante: _____
Karina Patricia Rosete Viveros

Reconocimientos

A la Dra. Gloria Díaz Ruíz y a la Biól. María Teresa Flores Espinosa del laboratorio 324 de la Facultad de Química por el apoyo con material y las cepas utilizadas en este trabajo.

A la Dra. Dora Centurión Hidalgo y la Dra. Judith Espinosa Moreno de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, por su apoyo en la recolección de la muestra.

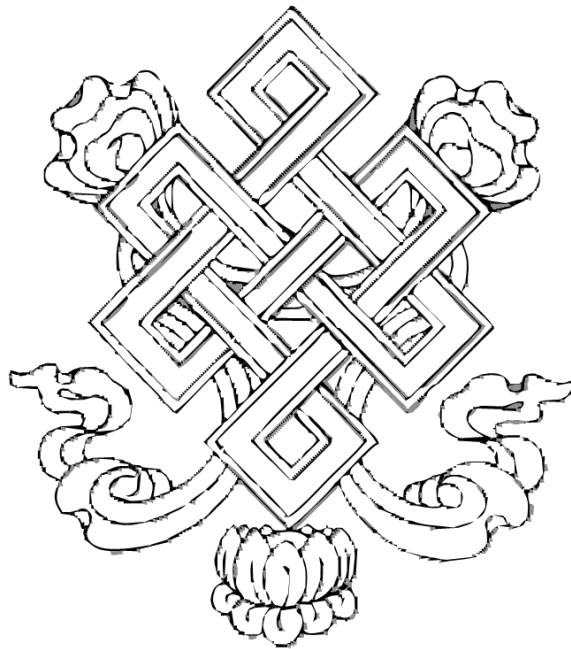
Al Dr. Daniel Alejandro Guillén Santos por el apoyo metodológico y en discusión durante la realización de este trabajo.

Al apoyo recibido para el desarrollo de este trabajo mediante los proyectos **CONACYT 49687-Z** y **DGAPA-UNAM IN218714**.

**A mis padres,
Sin ustedes no tendría estos pulmones para respirar, este corazón para amar
Y esta vida para vivir**

*“Vigilante del habla y bien controlado en mente, que no haga mal con el cuerpo;
que purifique esas tres vías de acción y alcance el sendero mostrado por los Sabios”*

El Dhammapada
-El camino de la rectitud-(20:9)



Índice

	Página
Resumen	1
Introducción	2
Índice de Tablas	3
Índice de Figuras	4
Antecedentes	
Alimentos fermentados tradicionales.....	6
El maíz.....	9
Almidón.....	11
El pozol.....	12
Microbiología del pozol.....	15
Estudios moleculares de fermentaciones complejas.....	16
Justificación	19
Hipótesis	19
Objetivos	
Objetivo general	20
Objetivos particulares	
Materiales y métodos	
Materiales.....	21
Métodos.....	22
Resultados y discusión	
Obtención del ADN genómico.....	31
Amplificación del fragmento correspondiente a las regiones variables V1 a V6 del gen que codifica la subunidad ribosomal 16S de los microorganismos presentes en el pozol.....	36
Secuenciación de los fragmentos correspondientes a las regiones variables V1 a V6 del gen que codifica la subunidad ribosomal 16S a diferentes tiempos de fermentación del pozol.....	38
Amplificación del fragmento que codifica a la o las α -amilasas del género <i>Streptococcus</i>	42
Conclusiones	49
Perspectivas	50
Referencias	51
Anexo I	58
Anexo II	65

Resumen

El pozol es una bebida ácida, no embriagante típica de la región sureste de México, preparada a partir de masa de maíz nixtamalizada y fermentada espontáneamente en hojas de plátano por varios días y a temperatura ambiente. Durante la nixtamalización se pierden los azúcares solubles dejando al almidón como la principal fuente de carbono. A pesar de los esfuerzos que se han hecho por identificar a los microorganismos amilolíticos responsables de la degradación del almidón, sólo ha sido posible identificar bacterias que presentan una actividad amilolítica débil, sospechando que existen muchos organismos que no han sido aislados e identificados. La genómica permite una aproximación a la estructura de la comunidad y sus actividades metabólicas mediante técnicas independientes de cultivo. En este trabajo, se muestra el diseño y optimización de una metodología de obtención del metagenoma del pozol y su eficiencia fue evaluada mediante una amplificación de el gen que codifican la proteína ribosomal 16S en diferentes puntos de la fermentación; demostrando que se obtiene una muestra representativa de genomas íntegros que permiten la identificación de algunos miembros de la comunidad microbiana en diferentes etapas de fermentación a través de técnicas moleculares. Así, la identificación filogenética a nivel molecular permitirá describir la presencia de los posibles microorganismos iniciadores de la fermentación en el pozol teniendo como desafío la composición y características fisicoquímicas de la matriz que la hacen un sustrato difícil.

Introducción

El estudio de la ecología microbiana ha tomado importancia en los últimos años debido al creciente interés de comprender las comunidades en su ambiente. En estas comunidades, la interacción entre los microorganismos y el aumento de su densidad da lugar a procesos físicos, químicos y biológicos que les permite una adaptación a diversas matrices muchas de ellas benéficas para el ser humano, como algunos productos fermentados. Dentro de estas fermentaciones, el pozol representa la cotidianeidad de algunas comunidades de la región sureste de México. Esta bebida ácida no embriagante es preparada a partir de masa de maíz nixtamalizada y fermentada espontáneamente en hojas de plátano, por varios días y a temperatura ambiente, la actividad microbiana presente le confiere su alto valor nutrimental.

Después de la nixtamalización el principal carbohidrato presente es el almidón, los estudios microbiológicos realizados hasta el momento describen e identifican mayoritariamente a bacterias lácticas, algunas amilolíticas, como microbiota predominante debido a su alta tasa de crecimiento; sin embargo, estas bacterias no degradan eficientemente el almidón por lo que no se puede explicar cómo se sostiene en esta fermentación una microbiota tan rica y abundante; es posible que existan muchos microorganismos que metabolicen el almidón generando productos asimilables para la adaptación de la comunidad que simplemente no han sido identificados porque no se pudieron cultivar.

La metagenómica permite el estudio de los microorganismos a través de los datos genómicos obtenidos directamente de una muestra y representa un esfuerzo prometedor al acceso de la información dentro de un vasto número de especies en el ambiente. La incorporación de la biología molecular al campo de la ecología microbiana y el desarrollo de nuevas técnicas moleculares han permitido explorar la extensión de la biodiversidad y avanzar en el conocimiento de los microorganismos en ambientes con sustratos complicados.

El primer acercamiento para estudiar a través de este enfoque al pozol es diseñar y optimizar de una metodología de obtención del metagenoma, tema central de este trabajo, donde se obtuvo una representación de genomas que permitieron la identificación de microorganismos a través de técnicas moleculares. Además, se establecieron las bases para el diseño y análisis de fragmentos que permitan en un futuro identificar a los genes y filogenias de los microorganismos capaces de la degradación del almidón a lo largo de la fermentación.

Índice de Tablas

	Página
Tabla 1 Alimentos mexicanos fermentados tradicionales a base de maíz.....	8-9
Tabla 2 Relación de las bacterias ácido lácticas amilolíticas aisladas del pozol.....	21
Tabla 3 Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de un fragmento correspondiente a las regiones variables V1 a V6 del gen que codifica la subunidad ribosomal 16S.....	27
Tabla 4 Mezcla para la reacción en cadena de la polimerasa para la amplificación del fragmento correspondiente a las regiones variables V1 a V6 del gen que codifica la subunidad ribosomal 16S.....	27
Tabla 5 Oligonucleótidos utilizados para la amplificación del fragmento del gen que codifica la α -amilasa del género <i>Streptococcus</i> desde las regiones proteómicas I a IV.....	29
Tabla 6 Mezcla para la reacción en cadena de la polimerasa para amplificar el fragmento del gen que codifica la α -amilasa del género <i>Streptococcus</i> desde las regiones proteómicas I a IV.....	29
Tabla 7 Cuantificación de ADN (ng ADN/mg pozol) calculado por medio de espectrofotometría (260nm) y la relación 260nm/280nm, 260nm/230nm para las tres soluciones de lisis celular empleadas.....	31
Tabla 8 Análisis de varianza (ANOVA) para las soluciones de lisis celular.....	33
Tabla 9 Cuantificación por medio de espectrofotometría (260nm) y la relación 260nm/280nm, 260nm/230nm para el metagenoma del pozol extraído a distintos tiempos de fermentación.....	35
Tabla 10 Secuencia consenso de los productos de amplificación del fragmento del gen de la subunidad ribosomal 16S a diferentes tiempos de fermentación.....	38
Tabla 11 Identificación de los microorganismos presentes en dos tiempos de fermentación por medio de la secuencia obtenida utilizando el algoritmo BLAST.....	39
Tabla 12 Características de las cepas del género <i>Streptococcus</i> aisladas del pozol.....	42-43
Tabla 13 Nomenclatura universal para bases incompletamente especificadas.....	66

Índice de Figuras

	Página
Figura 1 Estructura fenotípica del grano de maíz.....	10
Figura 2 Diagrama esquemático de la amilosa.....	11
Figura 3 Diagrama esquemático de la amilopectina.....	12
Figura 4 Representación de la actividad y localización microbiana en el pozol.....	18
Figura 5 Condiciones de reacción para la amplificación del gen que codifica la subunidad ribosomal 16S en las regiones variables V1 a V6.....	28
Figura 6 Condiciones de reacción para la amplificación del fragmento del gen que codifica la α -amilasa del género <i>Streptococcus</i> desde las regiones proteómicas I a IV.....	30
Figura 7 Gel de agarosa (0.8%) mostrando metagenoma del pozol extraído con las tres soluciones de lisis celular probadas.....	32
Figura 8 Función de densidad de probabilidad para una distribución F con un valor crítico (α) de 0.05.....	33
Figura 9 Gel de agarosa (0,8%) mostrando el metagenoma del pozol a distintos tiempos de fermentación.....	34
Figura 10 Gel de agarosa (0,8%) de las muestras sometidas a la reacción en cadena de la polimerasa.....	36
Figura 11 Gel de agarosa (0.8%) mostrando amplificado del fragmento ADNr 16S en pozol a distintos tiempos de fermentación.....	37
Figura 12 Gel de agarosa (0.8%) mostrando el genoma de las cepas control.....	44
Figura 13 Alineamiento de las secuencias de proteínas conservadas de la región I y región IV para la α -amilasa de distintas especies del genero <i>Streptococcus</i> .	45
Figura 14 Alineamiento de las secuencias nucleotídicas conservadas para la región I de α -amilasas de las especies del genero <i>Streptococcus</i>	45
Figura 15 Alineamiento de las secuencias nucleotídicas conservadas para la región IV de α -amilasas de las especies del genero <i>Streptococcus</i>	46
Figura 16 Gel de agarosa (1%) mostrando el amplificado del fragmento del gen que codifica a la α -amilasa del género <i>Streptococcus</i>	47

	Página
Figura 17 Gel de agarosa (1%) mostrando el resultado de la reacción de amplificación del fragmento del gen que codifica a la α -amilasa del género <i>Streptococcus</i> en pozol a distintos tiempos de fermentación.....	48
Figura 18 Visualización espectrofotométrica típica para ADN de doble cadena.....	59
Figura 19 Esquematización de la electroforesis de ácidos nucleicos.....	60
Figura 20 Reacción en cadena de la polimerasa. Pasos necesarios para la amplificación en cada ciclo.....	63

Antecedentes

Nijmé

*Nga tjo ts'ien nijmé,
xikoni tsa kjifí nixtjíná,
inimána xi titjó, xi kjamaxcha,
kuí xi nda, kuí xi ñño,
kuí xi ngasandie, kuí xi inimana.*

El maíz

**Cuando brota el embrión del maíz,
siento que se prolongan nuestros días,
es nuestro corazón que germina y crece,
es el pozol, es la tortilla,
es el mundo, es la vida.
(poema mazateco)**

La fermentación de los alimentos es un proceso que implica el crecimiento y la actividad de microorganismos para llevar a cabo transformaciones de la materia orgánica; dicha fermentación puede ser espontánea o través de un inóculo y se piensa que ha existido desde tiempos muy antiguos, cuando el hombre comenzó a utilizar los granos como alimento. Existe una gran variedad de este tipo de alimentos y están presentes en todas las culturas del mundo. Su papel más importante es el de mejorar las propiedades organolépticas de la materia orgánica, presentando ventajas adicionales como la reducción del tiempo de cocción, el aumento de la digestibilidad del sustrato, el incremento en el valor nutricional y el aumento en el tiempo de conservación debido a la inhibición de microorganismos patógenos y sus toxinas. Algunos alimentos fermentados como la cerveza, el vino, el vinagre, el yogurt, los quesos y el pan han sido exitosamente estudiados, logrando aislar a los microorganismos que producen los cambios deseados en el producto. Estos alimentos son producidos de manera comercial, incrementando considerablemente su producción a través de los años (Hammes, *et al.*, 2005; Humblot, *et al.*, 2008; Wachter-Rodarte, 2004).

1. Alimentos fermentados tradicionales.

A pesar de la gran producción comercial de los alimentos fermentados, existen un gran número de productos fermentados que aún se producen y consumen solo en regiones específicas, formando parte esencial de la dieta de grandes núcleos de población en el Lejano Oriente, Asia, India, Medio Oriente, África y América Latina (Cañas, *et al.*, 1993); su elaboración es transmitida y algunas veces mejorada a través del tiempo, contribuyendo a la singularidad y la identidad socio-cultural de sus consumidores (Humblot, *et al.*, 2008). Estos alimentos se producen a nivel casero o a pequeña escala utilizando métodos sencillos y baratos; elaborados a partir de materias primas e instrumentación disponibles. En muchas ocasiones, el producto obtenido presenta malas condiciones higiénicas y de calidad variable (Wachter-Rodarte, 2004).

En México, los alimentos fermentados tradicionales forman parte importante de la dieta de muchos grupos étnicos. México cuenta con cerca de 70 grupos étnicos, muchos de los cuales han consumido alimentos fermentados desde épocas prehispánicas, siendo también utilizados con fines estimulantes, medicinales y religiosos (Cañas, *et al.*, 1993; Wachter-Rodarte, 2004). En 1965, se publicó la primera lista de alimentos tradicionales fermentados, provocando el interés científico para intercambiar conocimientos sobre estos. Más tarde, se propuso la siguiente clasificación de los alimentos fermentados tradicionales de acuerdo con el tipo de microorganismo involucrado en el proceso (Wachter-Rodarte, 2004):

1.1. Alimentos fermentados por bacterias.

Las bacterias predominantes en estos tipos de fermentaciones son las bacterias ácido lácticas (BAL) y en algunos casos organismos de la familia *Enterobacteriaceae*. Algunos ejemplos son las verduras en salmuera, fermentadas por bacterias lácticas; granos fermentados, como el natto y el thua-nao de Japón fermentados por *Bacillus subtilis* y algunos productos lácteos, como la bebida llamada *buttermilk* o mazada, que se obtiene del líquido resultante del batido de la crema madura en la obtención de la mantequilla y fermentado por las bacterias del género *Streptococcus* y *Leuconostoc*.

1.2. Alimentos fermentados por mohos.

Muchos alimentos orientales presentan este tipo de microorganismos en la fermentación. Como ejemplo el tempe, consumido en Indonesia, donde la soya es fermentada por *Rhizopus oligosporus* y el oncom, en el cual mohos del género *Neurospora* fermentan el cacahuete.

1.3. Alimentos fermentados por cultivos mixtos

Este tipo de fermentaciones pueden presentar el crecimiento de bacterias, pero también de levaduras y mohos. El ragi, inóculo utilizado para varias fermentaciones asiáticas hecho a base de harina de arroz, es fermentado por los mohos del género *Rhizopus*, *Mucor* y por *Amylomyces rouxii*; mientras que las levaduras encontradas son del género *Cándida*, *Encomyopsis* y *Saccharomyces*. Otro ejemplo de fermentaciones mixtas, es un inóculo conocido como tane koji; un polvo verde amarillento que consiste de una mezcla de esporas de *Aspergillus oryzae* y *Aspergillus soyae*, y a partir de este, existe una segunda fermentación con mezclas de bacterias y levaduras, de la cual se obtienen la salsa de soya y el miso. Por último, algunos productos lácteos se obtienen por la fermentación de levaduras y bacterias ácido lácticas. Como ejemplos, tenemos el kéfir y el koumiss de origen ruso. En México, el ejemplo más conocido de cultivo mixto es el tepache, elaborado a partir de piña o maíz y fermentada con una asociación microbiana a la que se denomina *tibicos*.

El estudio de estas fermentaciones permite mejorar su elaboración a nivel rural y también producirlas a nivel industrial y pueden ser usadas para mejorar y extender la alimentación mundial desarrollando nuevos productos a costos relativamente bajos.

La mayoría de los alimentos fermentados tradicionales en México provienen del maíz. En la Tabla 1 se muestran algunos de los alimentos mexicanos fermentados tradicionales a base de este cereal.

Tabla 1. Alimentos mexicanos fermentados tradicionales a base de maíz (Wacher-Rodarte, 2004).

Nombre	Descripción	Estados donde se consume
Agua agria	Bebida no embriagante preparada con maíz molido, mezclado con agua y fermentado	San Luis Potosí, Veracruz, Hidalgo, Puebla, Guerrero, Distrito Federal, Tlaxcala, Michoacán, Jalisco, Oaxaca.
Atole	Bebida no embriagante preparada con masa de maíz nixtamalizada o de mazorcas tostadas.	San Luis Potosí, Veracruz, Hidalgo, Puebla, Guerrero, Distrito Federal, Tlaxcala, Michoacán, Jalisco, Oaxaca.
Atole agrio	Bebida no embriagante preparada con maíz de dobla remojado, molido y fermentado durante 4 o 5 días.	San Luis Potosí, Veracruz, Hidalgo, Puebla, Guerrero, Distrito Federal, Tlaxcala, Michoacán, Jalisco, Oaxaca.
Cuaruapa	Bebida embriagante preparada con el zumo de la caña de maíz, puesto en infusión con “palo de timbre” (<i>Acacia angustissima</i>) y panocha	Puebla: Tehuacán.
Charagua	Bebida embriagante a base de pulque rezagado, al cual se le añade almíbar, chile ancho y hojas de maíz tostadas. Se calienta lentamente y se pone a fermentar.	San Luis Potosí, Veracruz, Hidalgo, Puebla, Guerrero, Distrito Federal, Tlaxcala, Michoacán, Jalisco, Oaxaca.
Ostoche	Bebida embriagante obtenida del zumo de caña de maíz, con pulque o panocha, o solamente jugo de caña de maíz, mezclado con agua y fermentado	Distrito Federal, Estado de México.
Pozol	Bebida ácida no embriagante que se prepara disolviendo la masa de maíz nixtamalizado fermentada en agua. La masa se fermenta en forma de bolas, envueltas en hojas de plátano	Tabasco, Chiapas, Yucatán, Oaxaca, Guerrero, Quintana Roo.
Quebranta-huesos	Bebida embriagante hecha con el zumo de caña de maíz verde y maíz tostado machacado, al que se le añaden frutos de pirú. (<i>Schinus molle</i> L.) y se deja fermentar	Guanajuato.

Tabla 1. Alimentos mexicanos fermentados tradicionales a base de maíz (cont.).

Nombre	Descripción	Estados donde se consume
Sendechó	Bebida, especie de cerveza preparada a partir de maíz germinado, secado, molido con “chiles colorados”. La harina se mezcla con agua para formar un atole, que se hierve, se cuele, se enfría, se le añade el fermento y se deja fermentar. El fermento se prepara a partir de un sendechó anterior	Estado de México.
Tepache	Bebida preparada con granos de maíz y piloncillo o panela, dejándose fermentar con cierta cantidad de agua.	Veracruz, Puebla, Guerrero, Oaxaca, Chiapas.
Tesgüino	Bebida semejante a la cerveza, preparada al fermentar un atole de maíz germinado, molido y cocido con “catalizadores”, que son fragmentos de plantas existentes en la región donde se elabora.	Sonora, Chihuahua, Nayarit, Zacatecas, Jalisco.

2. El maíz

El maíz ha sido base de la alimentación de las culturas mesoamericanas desde tiempos prehispánicos. Actualmente es la principal fuente de calorías y proteínas para los habitantes de las zonas rurales que representan los estratos sociales más pobres. Se emplea principalmente para consumo humano y en forma creciente para el sector pecuario y para la producción de almidón y aceite (Paredes, *et al.*, 2006). Una de las principales características del maíz es su enorme variabilidad, ya que, a diferencia de otros cereales cultivados, esta especie no se autopoliniza, sino que las flores de una planta polinizan las de otras; debido a que cada inflorescencia (la cual da origen a una mazorca), está formada por varias flores pequeñas y cada una de ellas puede ser polinizada por las de distintas plantas, la variación que tienen sus granos puede llegar a ser muy grande, dependiendo de las plantas en sus inmediaciones. Esto proporciona al maíz una gran diversidad genética, y por tanto, una riqueza de caracteres que resultan interesantes para este cultivo en ciertas condiciones (Carrillo, 2009).

2.1. Estructura del grano.

El fenotipo común en el grano de maíz maduro o cariósipide está formado de cuatro partes principales mostrados en la Figura 1:

Pericarpio: capa de células fibrosas que comprende el 5% del peso del grano y que está cubierta por una capa impermeable cerosa denominada cutícula, que recubre al grano.

Endospermo: comprende aproximadamente el 83% del peso del grano. Presenta un alto contenido de almidón y es el segundo tejido de reserva; la capa exterior del endospermo o capa de aleurona contiene células con gránulos ricos en proteína y minerales así como pigmentos que hacen que los granos de ciertas variedades presenten un color azul, negro, rojo o púrpura. El endospermo se ha clasificado en vítreo y ceroso y puede presentar una consistencia suave o harinosa; los gránulos de almidón están recubiertos por una matriz proteínica con pequeños cuerpos de la misma naturaleza incrustados en la superficie. En la parte inferior del grano, a los lados del germen, presenta dos zonas ricas en proteínas que contienen además pequeños gránulos de almidón.

Germen: representa el 11% del peso del grano maduro, es considerado el primer tejido de reserva ya que almacena gran cantidad de nutrientes que son utilizados durante la germinación, además de contener la mayoría de los lípidos, originando el tallo o púmula y las raíces o radícula.

Pedicelio: también denominada capa terminal. Es la continuación del pericarpio y permite la unión del grano con el olote, pero ocasionalmente se pierde durante el desgrane (Paredes, et al., 2006).

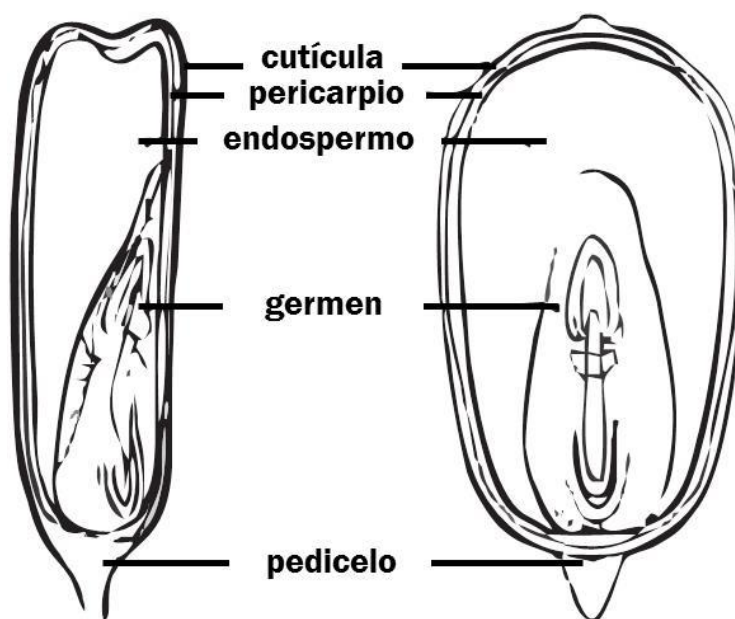


Figura 1. Estructura fenotípica del grano de maíz (Paredes, et al., 2006).

3. Almidón.

En los cereales, los carbohidratos son los componentes principales y representan del 50 al 90% de su masa seca; de estos, el almidón y otros polisacáridos son los principales constituyentes. El endospermo es el sitio principal donde ocurre la síntesis y acumulación del almidón en forma de gránulos dentro de organelos denominados amiloplastos, donde el gránulo de almidón varía en forma, tamaño y composición y su diámetro cambia durante el desarrollo del tejido de reserva.

Aproximadamente 86 a 89% del endospermo del maíz es almidón. El almidón es un polímero biodegradable de reserva en plantas y uno de los carbohidratos más abundantes en la biosfera, por lo que es utilizado como la principal fuente de energía en la alimentación; posee propiedades químicas muy bien definidas que le confiere un gran potencial como una fuente renovable versátil para una gran cantidad de aplicaciones. Químicamente es un polímero de glucosas unidas a través de enlaces α -1,4 y α -1,6 (en los puntos de ramificación) compuesto por dos macromoléculas con diferente estructura: la amilosa y la amilopectina (Agama-Acevedo, *et al.*, 2005; Pérez, *et al.*, 2009).

La amilosa (Figura 2) es un polímero lineal que consiste en unidades α -D-glicopiranosidas unidas mediante un enlace α -1,4, tiene un grado de polimerización de 100 a 1000 unidades de glucosa y presenta una conformación de hélice sencilla o doble, unidas fuertemente por puentes de hidrógeno repartidas azarosamente dentro del gránulo en una composición del 25 al 30%, lo que le confiere una estabilidad mayor para cristalizarse y formar geles (Boyer, *et al.*, 1987; Pérez, *et al.*, 2009; Zobel, 1988).

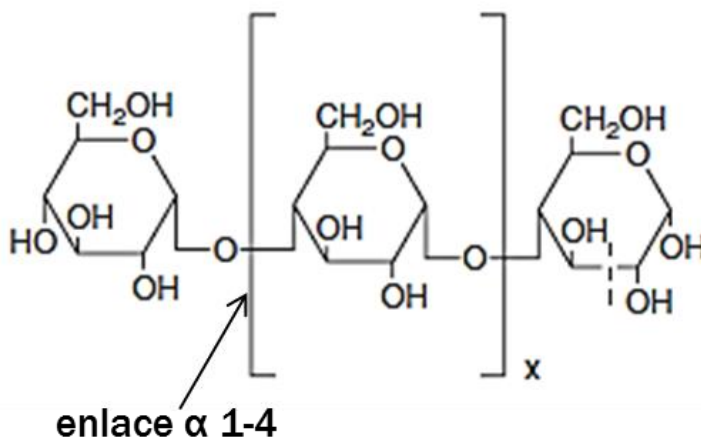


Figura 2. Diagrama esquemático de la amilosa (Pérez, *et al.*, 2009).

La amilopectina (Figura 3) es un polímero en cadenas de unidades α -D-glicopiranosidas unidas mediante enlaces α -1,4 con ramificaciones unidas en su extremo reductor por un enlace α -1,6. Presenta una conformación de discos largos en plano y en una composición del 70 al 75% dentro del gránulo. Los enlaces intermoleculares entre las cadenas son débiles, por lo que no forma geles (Boyer, *et al.*, 1987; Pérez, *et al.*, Zobel, 1988).

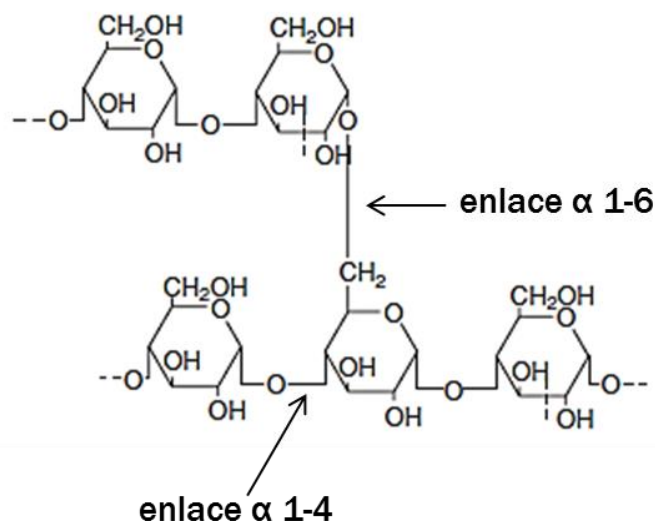


Figura 3. Diagrama esquemático de la amilopectina (Pérez, *et al.*, 2009).

Dentro de los gránulos, el almidón tiene un arreglo semicristalino, y la cristalinidad se debe al ordenamiento y longitud de las cadenas de amilopectina que le confiere insolubilidad; además existen variantes donde el contenido de amilopectina es del 100%, y se conoce como almidón ceroso (Agama-Acevedo, *et al.*, 2005; Zobel, 1988).

4. El pozol.

El pozol es una bebida ácida, no embriagante, de origen maya, preparada mediante una fermentación espontánea a partir de masa de maíz nixtamalizado (Wacher, 1999; Wacher-Rodarte, 2004). La forma de consumo consiste en diluir la masa fermentada en agua (relación 1:2 o 1:3) hasta obtener una suspensión blanquecina tipo papilla (Steinkraus, 1996). El pozol es consumido de forma cotidiana por varios grupos étnicos del sur y sureste de México como los chontales y choles de Tabasco; los mayas de Campeche, Yucatán y Quintana Roo; los lacandones, tzotziles o chamulas, tzeltales, zoques, choles y mames de Chiapas, y los zapotecos de Oaxaca. La palabra pozol deriva del náhuatl *pozolli* que significa espumoso (Ulloa, *et al.*, 1987).

Esta bebida es considerada como alimento básico para muchos de los grupos étnicos mencionados. Debido a su alto grado de conservación, las bolas de pozol son utilizadas como provisiones para sus largas travesías. Además de su uso como alimento, eran utilizadas por los mayas como cataplasma, para prevenir o curar infecciones superficiales y las heridas. Los lacandones utilizan el pozol mezclado con miel para disminuir la fiebre y controlar la diarrea entre

otros padecimientos intestinales. También ha tenido una gran importancia ceremonial, pues se usa como ofrenda en las diversas festividades mayas relacionadas con el cultivo y la cosecha del maíz (Ulloa, *et al.*, 1987).

4.1. Composición nutrimental del pozol.

A pesar de la importancia del pozol en la alimentación de los grupos del sureste de México, existe sólo un informe sobre su composición nutrimental publicado en 1955 por Cravioto, *et al.*, quienes reportan que el contenido de proteínas en el pozol es mayor y de mejor calidad que en el maíz. Asimismo, el contenido de riboflavina y de niacina es mayor en el pozol que en el maíz (Wacher, 1999). Estas modificaciones son producto de la fermentación láctica y la actividad de algunas bacterias fijadoras de nitrógeno (Ulloa, *et al.*, 1987, Rizo, 2015).

4.2. Elaboración del pozol

Este alimento es preparado ya sea en forma doméstica, para el consumo de la misma familia que lo hace, o en escala semicomercial para ser vendida en mercados, de acuerdo con los procedimientos tradicionales que se transmiten de generación en generación (Steinkraus, 1996). Sin embargo, existen variantes entre los diferentes estados productores. La variante más singular es la que se presenta en el estado de Chiapas, diferenciado como pozol mestizo, al cual se añade un paso adicional conocido como reventado o floreado antes del remojo y molienda, lo cual determina la consistencia final del pozol; dando un producto más terso, donde se elimina el sedimento casi en su totalidad; mientras que el pozol tradicional tiene una apariencia seca y con partículas ciertamente grandes (Cañas, *et al.*, 1993; Wacher, *et al.*, 2000; Nuraida, *et al.*, 1995).

4.2.1. Etapas de elaboración.

Limpieza del maíz. El lavado del maíz es empleado para eliminar el material extraño y granos podridos que darían mal aspecto al producto final. Se agrega agua al maíz crudo hasta que lo cubra y se deja reposar unos minutos. Se retiran todas las partículas flotantes, principalmente maíz picado o podrido y cascarillas (Cañas, *et al.*, 1993).

Nixtamalización (de náhuatl *nixtli* cenizas, *tamalli*, masa). Consiste en la cocción del maíz con hidróxido de calcio (cal) hasta que se hinchan los granos y se desprenden las cáscaras. Se inicia con la adición a una porción de maíz de dos partes de una solución de hidróxido de calcio aproximadamente al 1% o dependiendo de las costumbres y experiencias. Esta preparación se cuece de 50 a 120 minutos; y posteriormente el agua de cocción, conocida como nejayote, se retira lavando el maíz dos o tres veces con agua para eliminar el hidróxido de calcio y el hollejo, sin retirar el pericarpio ni el germen de maíz. Se obtiene así el nixtamal, que llega a tener hasta 45% de humedad. El tiempo de cocción depende de las variedades de maíz. El maíz con endospermo vítreo o no harinoso requieren tiempos de cocción mayores que el maíz tipo harinoso.

La cocción alcalina y el remojo provocan la disolución y el hinchamiento de las capas del pericarpio, provocando que las paredes celulares y los componentes de la fibra dietaria de esta parte del grano se vuelvan frágiles, facilitando su remoción. También provoca que las estructuras que unen a las células del endospermo y las paredes celulares se degraden y solubilicen parcialmente. El germen permanece en el grano durante la nixtamalización, por lo cual la calidad de la proteína no se ve afectada, pero si la calidad nutricional, debido a que se altera la estructura y la solubilidad de las proteínas del maíz; aparecen glutelinas de alto peso molecular debido al enlazamiento de proteínas, a la ruptura de su estructura y la digestibilidad de las mismas disminuye. Los aminoácidos liberados pueden producir lisinoalanina que no es biodisponible; sin embargo, incrementa la disponibilidad de la mayoría de los aminoácidos esenciales. Otro aspecto sobresaliente es que la aleurona permanece sobre el grano durante el tratamiento, lo que minimiza la pérdida de nutrientes hacia el nejayote por lixiviación. Por último, la nixtamalización retarda y alcanza un bajo grado de gelatinización del almidón debido a la aparente interacción del calcio con el almidón, especialmente con la amilosa. Posterior al cocimiento, el almidón se retrograda para formar nuevas estructuras, durante el tiempo que el grano permanece en remojo (Paredes, *et al.*, 2008).

Remojo. Después de obtener el maíz nixtamalizado, este se deja remojando regularmente en el agua del último lavado del nixtamal, a temperatura ambiente. Por lo general, el remojo dura toda la noche y su objetivo es aumentar la retención de humedad, para evitar que el maíz se seque durante la molienda (Cañas, *et al.*, 1993).

Molienda. Esta operación se lleva a cabo la mañana siguiente de la nixtamalización. Se emplea un molino de mano, conocido como metate, o un molino de nixtamal comercial, de discos de piedra o de metal; el empleo de los molinos depende de las costumbres y de la cantidad de nixtamal a moler. El proceso de la molienda libera al almidón del endospermo y reduce aún más su cristalinidad (Paredes, *et al.*, 2008). Generalmente, durante la molienda se agrega agua al nixtamal en poca cantidad y con la mano, acción que podría ser origen de contaminación microbiana, además los molinos nunca se desarmen y son limpiados una vez al día raspando en seco la masa que queda adherida en el molino (Cañas, *et al.*, 1993).

Elaboración de la bola. Inmediatamente después de la molienda, se forman las bolas moldeando con las dos manos, o sobre una mesa, que generalmente se enjuaga con agua. La temperatura de las bolas de pozol varía de acuerdo con el tipo de proceso por el cual fueron obtenidas, siendo la temperatura ambiente la más común, que es la misma a la que se mantiene el nixtamal desde su lavado. Así la temperatura interna de las bolas terminadas varía de 20°C a 27°C; y la externa de 20°C a 24°C (Cañas, *et al.*, 1993).

Envoltura. Una vez amasado, el pozol se envuelve tradicionalmente en hojas de plátano ya que retarda la acidificación de la masa; sin embargo, es común encontrarlo en el mercado cubierto con bolsas de plástico (Cañas, *et al.*, 1993).

Fermentación. Dos cambios esenciales son importantes en el proceso de fermentación. Estos son el desarrollo de un sabor ácido y el aroma característico, que le dan a la bebida sus propiedades refrescantes (Steinkraus, 1996). La mayoría de los consumidores prefieren el pozol fresco en la escala comercial, es decir, consumen preferentemente el que se preparó el mismo día. Este pozol, aunque no es muy ácido, ya presenta cierto grado de fermentación ya que el tiempo que transcurre entre su preparación y consumo es suficiente para que las bacterias lácticas responsables de la acidificación alcancen su máximo desarrollo. Para los indígenas, el pozol fermentado por más días es mejor. Las bolas envueltas se dejan fermentar 4 o 5 días y en ocasiones dos semanas o más, cuando ya presenta un notorio crecimiento superficial de los mohos (Cañas, et al., 1993; Wachter- Rodarte, 2004).

4.3. Microbiología del pozol.

El primer estudio microbiológico del pozol fue hecho por Salinas en 1958 y dos especies bacterianas fueron registradas: *Bacillus cereus* y *Paracolobactrum aerogenoides*. A partir de 1970, se iniciaron nuevas investigaciones donde se reportó la presencia de diversas especies de bacterias, levaduras y mohos, algunas de las cuales son conocidas por su capacidad para ocasionar enfermedades en el hombre. Además, se describieron dos fenómenos importantes: la fijación de nitrógeno atmosférico elemental realizado por las bacterias *Agrobacterium azotophilum* y *Aerobacter aerogenes*, fenómeno observado por primera vez en un alimento fermentado, y el antagonismo microbiano que tuvo *in vitro* tanto el pozol como *Agrobacterium azotophilum* sobre varias especies de bacterias, levaduras y mohos, algunas de ellas descritas como patógenas (Ulloa, et al., 1987).

En 1974, se realizó un estudio más controlado acerca de los cambios fisicoquímicos y microbiológicos en el pozol, reportando la sucesión de la microbiota presente en el pozol en cada una de las fases de elaboración y fermentación; y el monitoreo en el cambio de pH, humedad presente y temperatura a lo largo del proceso. En este estudio se observó que la nixtamalización destruía los mohos presentes en el maíz y que la inoculación de la masa se realizaba durante la molienda del nixtamal y la formación de las bolas de pozol, por lo que las fuentes de inoculación eran muy variadas. Se determinó que existen diversas especies de levaduras y mohos que siempre están presentes en las muestras del pozol, como *Geotrichum candidum*, *Trichosporum cutaneum* y varias especies de *Candida*; así como *Cladosporium cladorsporoides*, *Monilia sitophila* y *Mucor rouxianus*, comúnmente encontradas en la superficie de la bola cuando esta va perdiendo humedad y su pH va disminuyendo, sin embargo, en ese momento sólo se describieron algunos mohos que presentaron actividad amilolítica, dando poca importancia a la misma (Steinkraus, 1996; Ulloa, et al., 1987).

Posteriormente, se realizó un estudio para identificar las fuentes de inoculación de microorganismos en el pozol, tomando en cuenta varios factores fundamentales en el proceso de elaboración, principalmente la evaluación microbiológica en las etapas del remojo después de la nixtamalización, la molienda, la elaboración de la bola y la contaminación por el ambiente. Los resultados mostraron que el remojo durante toda la noche después de la nixtamalización permite el

crecimiento de bacterias del ácido láctico, mesófilos aerobios y enterobacterias que constituyen la microflora primaria en el pozol. La molienda en un molino comercial incrementa el número de bacterias del ácido láctico y de los mesófilos aerobios, además de ser la fuente de inoculación de las levaduras. Así, se reafirma que el proceso de molienda constituye una fuente de inóculo importante para lotes frescos de nixtamal. Los procesos siguientes como el manejo de la masa para elaborar las bolas y la exposición al aire de cada región tienen una mínima contribución al número de microorganismos (Wacher, *et al.*, 1993).

Ya teniendo información acerca de las fuentes de inoculación, se estudió la caracterización de la microbiota presente tanto en muestras de pozol mestizo como en muestras de pozol tradicional, observando una diferencia en el pH dentro de la bola y en su superficie durante la fermentación. Las bacterias ácido lácticas presentes fueron en su mayoría *Leuconostoc* spp, lactobacilos homofermentativos, lactobacilos heterofermentativos productores de dextranos, lactococos y algunas especies de bacterias ácido lácticas amilolíticas que crecieron tanto en condiciones aerobias como anaerobias. Con la determinación de patrones de fermentación de azúcares y otras pruebas bioquímicas se identificó a *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus confusus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis* y *Lactococcus raffinolactis*. Las especies encontradas de mohos y levaduras constituyen gran parte de la flora de la superficie. Como la concentración de azúcares simples no es un factor limitante para sustentar el crecimiento microbiano, se intuía que la presencia de actividad amilolítica era necesaria para el crecimiento microbiano y la acidificación de la masa, pero solo se lograron identificar algunas levaduras con este tipo de actividad (Nuraida, *et al.*, 1995; Wacher, *et al.*, 2000).

5. Estudios moleculares de fermentaciones complejas

Debido a que más del 99% de los microorganismos presentes en ciertos ecosistemas no pueden ser cultivados por medio de técnicas tradicionales de cultivo, los métodos independientes de cultivo han sido una alternativa para describir a la mayoría de los microorganismos y se ha incrementado el conocimiento de estas comunidades cambiando la perspectiva de la diversidad microbiana (López, *et al.* 2003; Tyson, *et al.*, 2004; Singh, *et al.*, 2009).

La metagenómica permite el estudio de todos los microorganismos no importando si se pueden cultivar o no a través del análisis de los datos obtenidos directamente de una muestra describiendo las especies presentes, considerando la funcionalidad de las comunidades microbianas en su hábitat natural. Esta rama ha capturado la noción del análisis de una colección de genes similares pero no idénticos, involucrando el aislamiento de ADN de una muestra, clonarla en un vector adecuado, transformar en un hospedero y su análisis integral con la finalidad de describir la ecología microbiana o elucidar nuevas enzimas y biomoléculas a partir de la población (Handelsman, 2004; Schmeisser, *et al.*, 2007; Coughlan, *et al.*, 2015).

El estudio del perfil molecular en alimentos fermentados inició con el uso de la reacción en cadena de la polimerasa para amplificar las regiones ribosomales de la subunidad 16S y la electroforesis en gel de gradiente desnaturante (DGGE, por sus siglas en inglés) aplicada en las comunidades microbianas del pozol y algunos quesos artesanales (Ampe, *et al.*, 1999; Randazzo, *et al.*, 2002). La identificación de los microorganismos por estas técnicas mostró una desviación significativa entre el aislamiento de microorganismos y relación de la abundancia en la comunidad microbiana e incluso su identificación específica. La metagenómica y la metatranscriptómica están comenzando a ser utilizadas en alimentos de fermentación compleja, siendo poderosas herramientas para obtener información sobre la filogenia o taxones identificados, datos cuantitativos que describen cambios en las poblaciones, las condiciones de cultivo considerando factores intrínsecos y extrínsecos, los parámetros de fermentación críticos que afectan la calidad, las interacciones y las cadenas tróficas entre los microorganismos, cofermentaciones, la expresión de los genes y su actividad bioquímica. Algunos ecosistemas de fermentación microbiana estudiados son el pulque, el kimchi, yuca, masas madre, papillas de sorgo, papillas de mijo, fermentados de pescado como el narezushi, mariscos, salchichas, whisky de malta, etcétera (van Hijum, *et al.*, 2013; Humblot, *et al.*, 2014).

El pozol fue uno de los primeros alimentos fermentados tradicionales en los que se implementaron técnicas moleculares como recurso para complementar la información de las comunidades microbianas y conocer su importancia ecofisiológica (Ampe, *et al.*, 1998). El primer estudio no dependiente de cultivo realizado fue la hibridación cuantitativa a partir de extracciones de ARN microbiano. Dicho estudio mostró la abundancia de cada microorganismo expresada como la fracción del ARN ribosomal total de la muestra. Así, utilizando sondas específicas para hibridar ARN de ciertos microorganismos, se comprobó la dominancia de las bacterias ácido lácticas, y que éstas a su vez están diversificadas durante la fermentación (Ampe, *et al.*, 1999). Posteriormente, se realizaron estudios utilizando tanto el aislamiento de microorganismos y la identificación de productos de fermentación, como la identificación cuantitativa mediante sondas que hibridan ARN (northern blot), identificación mediante DGGE de productos de amplificación del gen ribosomal 16S, bibliotecas genómicas y ribotipificación, como se muestra en la Figura 4.

Aproximadamente, el 40% de las bacterias ácido lácticas presentes al inicio de la fermentación son amilolíticas decreciendo en un 5% después de 72 horas, permitiendo el crecimiento de bacterias ácido lácticas no amilolíticas. En el 2003, Díaz-Ruiz aisló cuarenta cepas con capacidad de hidrolizar el almidón y se identificaron las especies *Streptococcus macedonicus*, *Lactococcus lactis*, *Enterococcus sulfureus* y la especie dominante *Streptococcus infantarium*, que se encuentra en todos los estratos de la bola de la masa y a lo largo de toda la fermentación, sugiriendo que las bacterias amilolíticas deben tener un papel fundamental como iniciadoras del crecimiento microbiano; sin embargo, ninguna de estas bacterias muestra una capacidad amilolítica importante en comparación con géneros con alta capacidad de degradación del almidón como el género *Bacillus* y otras bacterias ácido lácticas.

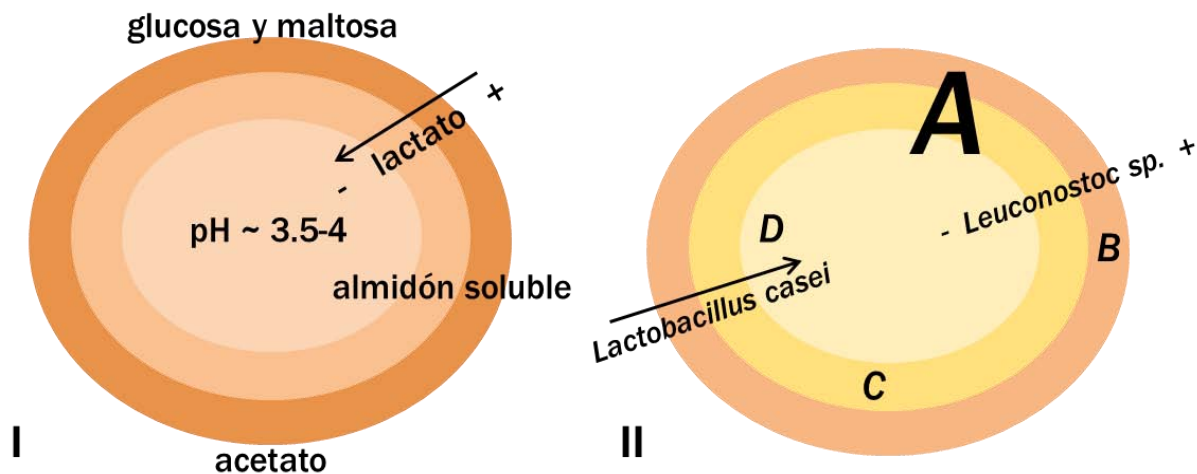


Figura 4. Representación de la actividad y localización microbiana en el pozol.

I Distribución de los compuestos identificados durante la fermentación del pozol

II Distribución bacteriana en una bola de pozol durante la fermentación encontrados mediante técnicas moleculares.

A Bacterias localizadas en todas las regiones de la bola: *S. bovis*, *S. macedonicus*, *S. suis*, *L. plantarum-pentosus*, *E. Saccharolyticus*, *L. alimentarius*, *L. delbruekii*, *Pediococcus sp.*, *L. lactis*, *E. sulfureus* **B** Bacterias localizadas en la periferia de la bola: *Enterobacteriaceae sp*, *A. aceti*, *B. mínimum* **C** Bacterias localizadas en la parte media de la bola: *L. fermentum*, *E. aurantiacum*, *E. acetylicum*, *Oxalophagus sp.* **D** Bacterias encontradas en el centro de la bola: *B. subtilis*, *W. confusa*, *L. fermentum*. *Leuconostoc sp* fue localizado en todas las regiones la bola, pero en diferentes concentraciones. *Lactobacillus casei* se difunde de la periferia hacia el centro de la bola. (Figura elaborada de acuerdo a la información de los siguientes trabajos: Wachter, et al., 1993; Nuraida, et al., 1995; Ampe, et al., 1998; Ampe, et al., 1999; Ampe, et al., 1999; Wachter, et al., 2000; ben Omar, et al., 2000; Escalante, et al., 2001; Díaz-Ruiz, et al., 2003)

Justificación

Trabajos previos han descrito la microbiota en el pozol en base a la combinación de técnicas microbiológicas y moleculares; sin embargo, hasta la fecha no ha sido posible identificar a los microorganismos involucrados en el uso del almidón. Una alternativa para el estudio de la fermentación que permitiría una descripción completa de los genes presentes en el sistema es el uso de la metagenómica, sin embargo no existe un método adecuado para la obtención del ADN de una mezcla tan compleja y rica en almidón por lo que en este trabajo se diseñará un método de extracción que permita, en estudios posteriores, el análisis de la comunidad así como la identificación de los genes relacionados a la utilización de la fuente de carbono o cualquier otro fenómeno metabólico.

Hipótesis

Al optimizar un método de extracción de ADN se obtendrá un metagenoma representativo del pozol a diferentes tiempos de fermentación tal que permita obtener información acerca de la comunidad microbiana y su metabolismo.

Objetivos

Objetivo general

Diseñar una metodología de extracción del metagenoma del pozol que permita obtener una muestra propia en rendimiento e integridad.

Objetivos particulares

Optimizar un método de obtención del metagenoma del pozol.

Determinar si existen inhibidores de la reacción en cadena de la polimerasa en el metagenoma por amplificación del fragmento del gen ribosomal 16S correspondiente a la región V1 a V6.

Identificar la amilasa de *Streptococcus infantarium* o similares en el metagenoma del pozol.

Materiales y métodos

1. Materiales.

1.1. Pozol

Para realizar el estudio preliminar de optimización, se utilizó una muestra de pozol (colaboración Dra. Maria del Carmen Wachter Rodarte, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México) con un tiempo de fermentación de 72 horas manteniéndola a 4 °C; posteriormente se maceró y conservo a -70 °C hasta su uso.

Para realizar la obtención del metagenoma para su uso en técnicas moleculares, se utilizó una muestra de pozol adquirida en un mercado de Villahermosa, Tabasco (colaboración de la Dra. Dora Centurión Hidalgo y la Dra. Judith Espinosa Moreno, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco) la cual se fraccionó en porciones de 100 gramos y se colocó en una cámara húmeda a 37 °C, fermentando durante 12 días. Se tomaron cuatro fracciones para cada tiempo de fermentación: tiempo cero o cuando inicia la fermentación, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 168 horas (7 días) y 288 horas (12 días). El tratamiento después de la colecta de la muestra en cada tiempo fue el siguiente: en condiciones estériles se mezclaron las cuatro porciones y se maceraron en presencia de hielo seco. La mezcla de cada tiempo se colocó en tubos Falcon estériles y se conservaron a -70 °C hasta su uso.

1.2. Cepas control.

Como control se utilizaron las cepas amilolíticas aisladas de pozol mostradas en la Tabla 2 (colaboración de la Dra. Gloria Díaz Ruiz, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México) que se conservaron en glicerol a -70 °C hasta su uso.

Tabla 2. Relación de las bacterias ácido lácticas amilolíticas aisladas del pozol (Díaz, 2003).

Nombre clave	Microorganismo (% identidad)
25124 A12203	<i>Streptococcus infantarius</i> (100%)
15430 A56203 A57103 A57206	<i>Streptococcus infantarius</i> (99%)
A45201	<i>Streptococcus macedonicus</i> (100%)

2. Métodos.

2.1. Optimización de la extracción del metagenoma

2.1.1. Lisis celular

1. Se pesaron 140 mg de pozol previamente macerado y congelado colocándolo en tubos de 1.5 mL.
2. Se adicionaron 600 μ L de de las soluciones de lisis celular a probar (Anexo II):
 - A. Solución SDS 0.5%(Edwards, *et al.*, 1991; Sigma Aldrich)
 - B. Solución SDS 1.5% (Ren, *et al.*, 2006, Sigma Aldrich)
 - C. Solución CTAB 2% (Ren, *et al.*, 2006, Sigma Aldrich)
3. La muestra con la solución SDS 0.5% (Edwards, *et al.*, 1991) se dejó a temperatura ambiente 90 minutos, invirtiendo el tubo ocasionalmente.
4. Las muestras con las soluciones SDS al 1.5% y CTAB al 2% (Ren, *et al.*, 2006), se colocaron en un baño a 65 °C (Thermomixer confort, Eppendorf); 60 minutos, invirtiendo el tubo ocasionalmente.
5. Se centrifugó la muestra a la velocidad mínima (Eppendorf) en rpm por 1 minuto y se recuperó el sobrenadante.

2.1.2. Purificación del metagenoma

1. A la fase acuosa recuperada se agregó un volumen igual de solución fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1, Baker) mezclando por inversión 5 minutos, se centrifugó a 10,000 rpm 5 minutos y se recuperó la fase acuosa en un tubo limpio de 1.5 mL. Este paso se realizó por triplicado.
2. A la fase acuosa recuperada se agregó un volumen igual de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1; Baker), mezclando por inversión 5 minutos, se centrifugó a 10,000 rpm 5 minutos y se recuperó la fase acuosa en un tubo limpio de 1.5 mL. Este paso se realizó por triplicado.
3. Se precipitó el ADN extraído añadiendo la octava parte del volumen de isopropanol (Baker) manteniéndolo a -20°C por una hora. Transcurrido el tiempo se centrifugó a 10,000 rpm por 15 minutos y se descartó el sobrenadante.

4. El botón obtenido se lavó con etanol al 70% (Baker) hasta que se desprendió del tubo y se retiró el sobrenadante.
5. El botón se secó a vacío (Speed Vac System, ThermoSavant) a 5.1 torr por 6 minutos y se resuspendió en 500 μ L de solución TE (Anexo II).
6. A la suspensión del metagenoma en solución TE se adicionó el volumen necesario de una solución de ribonucleasa A (10 mg/mL, Sigma Aldrich) para quedar a una concentración final de 20 μ g/mL. Esta mezcla se incubó a 55 °C por una hora.
7. Se añadió el volumen necesario de proteinasa K (100 mg/mL, Sigma Aldrich) a fin de tener una concentración final de 20 μ g/mL. Esta mezcla se incubó a 55 °C por 30 minutos.
8. Se realizó nuevamente una limpieza repitiendo los pasos 3 al 7 resuspendiendo el botón seco en 250 μ L de agua estéril.
9. La integridad del ADN se verificó en geles de agarosa.

2.2. *Streptococcus* sp amilolíticos aislados del pozol

2.2.1. Reactivación de la cepa

1. Se inocularon 3 mL de medio MRS almidón estéril (Anexo II) al 1% a partir de un glicerol almacenado a -20 °C. Se dejó crecer a 29 °C por 24 horas.
2. A partir del desarrollo obtenido a las 24 horas, se inocularon 5 mL de medio MRS almidón estéril al 1% y se dejó crecer a 29 °C por 18 horas.

2.2.2. Preparación de gliceroles

1. Se colocaron 750 μ L del desarrollo obtenido a las 18 horas y 750 μ L de glicerol estéril al 80%, se invirtieron y se colocaron rápidamente en hielo. Estos tubos se almacenaron a -70 °C hasta su uso.

2.2.3. Extracción del genoma de cepas puras

1. Se transfirieron 2 mL del medio de cultivo fresco en un tubo de 1.5 mL y se centrifugó a 10,000 rpm por 10 minutos, descartando el sobrenadante.
2. El botón celular se lavó con 200 μ L de solución TE y se centrifugó a 10,000 rpm 10 minutos.
3. El botón celular se resuspendió en 180 μ L de solución TS (Anexo II); posteriormente se adicionaron 90 μ L de lisozima (100 mg/mL, Sigma Aldrich).
4. La mezcla se colocó en un baño a 37 °C (Thermomixer confort, Eppendorf) 30 minutos; se centrifugó a 10,000 rpm por 10 minutos y se descartó el sobrenadante.
5. El botón se resuspendió suavemente en 180 μ L de solución TS y se adicionaron 20 μ L de solución TEN (Anexo II) junto con 10 μ L de solución SDS al 20% (Sigma Aldrich) calentado a 65 °C, invirtiendo suavemente.
6. La mezcla se colocó en un baño a 37 °C por 30 minutos.
7. Se adicionaron 50 μ L de NaCl 5 M (Baker), incubando en hielo por 60 minutos; se centrifugó a 10,000 rpm 20 minutos y se recuperó el sobrenadante.
8. A la fase acuosa recuperada se agregó un volumen igual de solución fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1; Baker) mezclando por inversión 5 minutos, se centrifugó a 10,000 rpm 5 minutos y se recuperó la fase acuosa en un tubo limpio de 1.5 mL. Este paso se realizó por triplicado.
9. A la fase acuosa recuperada se agregó un volumen igual de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1, Baker), mezclando por inversión 5 minutos, se centrifugó a 10,000 rpm 5 minutos y se recuperó la fase acuosa en un tubo limpio de 1.5 mL. Este paso se realizó por triplicado.
10. Los ácidos nucleicos se precipitaron añadiendo a la fase acuosa un décimo de su volumen de NaCH₃COO 3M (Baker) y dos veces su volumen de etanol absoluto (Baker), incubando a -20 °C por una hora; transcurrido el tiempo se centrifugó a 10,000 rpm 15 minutos.
11. Se descartó el sobrenadante y se realizó un lavado con una solución de etanol al 70%, hasta despegar el botón del tubo.
12. El botón se secó a vacío (Speed Vac System, ThermoSavant) a 5.1 torr por 6 minutos.
13. El botón se resuspendió en 500 μ L de solución TE.

14. Se agregó el volumen necesario de ribonucleasa A (10 mg/mL, Sigma Aldrich) a fin de tener una concentración final de 20 µg/mL.
15. Se incubó a 55 °C por 30 minutos.
16. Se añadió el volumen necesario de proteinasa K (100 mg/mL, Sigma Aldrich) a fin de tener una concentración final de 20 µg/mL.
17. Se incubó a 55 °C por 30 minutos.
18. Se realizó nuevamente una limpieza repitiendo los pasos 8 al 12, el botón se resuspendió en 100µl de agua estéril.
19. La integridad del ADN se verificó en geles de agarosa.

2.3. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

1. Se preparó una solución de agarosa (Gibco BRL) al 0.8% (p/v) para ADN genómico y al 1% (p/v) para productos de amplificación en solución TAE (Anexo II). La solución se calienta hasta disolver la agarosa.
2. Se coloca la solución anterior en el equipo de electroforesis (Minisub DNA cell, Bio Rad) a fin de formar un gel con pozos suficientes para cargar la muestra, sin que contenga burbujas. Cuando el gel solidifica, muestra una apariencia opaca.
3. Cada muestra de ADN se mezcló con la solución de carga 6X DNA Loading Dye (Thermo Scientific), el cual contiene azul de bromofenol y xilencianol (XCFF por sus siglas en inglés) a fin de monitorear la migración de las moléculas
4. Se cargó en cada gel 0,8 µL del marcador de peso molecular GeneRuler DNA ladder mix (Thermo Scientific) o en su caso GeneRuler1Kb DNA ladder mix (Thermo Scientific).
5. La electroforesis se llevó a cabo a 6 V/cm por 90 minutos o hasta que el azul de bromofenol haya migrado tres cuartas partes del gel.
6. Se sumergió el gel en una solución de bromuro de etidio (5 µg/mL) en TAE 0,5X por 10 minutos.
7. El gel se lavó con agua destilada y se observó en un fotodocumentador (Kodak Gel Logic 2200 Imaging System; Kodak Eastman) o en un transiluminador.

2.4. Cuantificación del genoma y metagenoma por espectrofotometría (Densidad óptica)

La medición se realizó en un espectrofotómetro (BioPhotometer, Eppendorf) dentro del programa medición de ADN de doble cadena. Se utilizó como blanco agua estéril.

1. Se colocaron 60 μ L de ADN disuelto en agua estéril en una celda espectrofotométrica (UVette, Eppendorf).
2. Se realizó la medición en el espectrofotómetro como muestra y se registran los valores de absorbancia a 230, 260, 280 y 320 nm.

2.5. Cuantificación del metagenoma por densitometría

El programa computacional cuantifica la densidad de pixeles en cada carril de un gel de agarosa tomando como referencia un marcador de peso molecular con el que obtiene una curva estándar en base a un algoritmo generando una base de datos.

1. En un gel de agarosa, se colocó 1 μ L de marcador de peso molecular (Gene Ruler 1 Kb, Thermo Scientific).
2. En los carriles subsecuentes del gel de agarosa, se cargaron las muestras a la concentración calculada obtenida por espectrofotometría.
3. El gel fue teñido en una solución de bromuro de etidio (0.5 μ g/mL, BioRad) y observado en un fotodocumentador (Kodak Gel Logic 2200 Imaging System; Kodak Eastman) en luz ultravioleta.
4. La imagen fue analizada mediante el programa computacional (Kodak Molecular Imaging; Kodak Eastman), obteniendo valores en nanogramos.

2.6. Determinación de inhibidores en la reacción en cadena de la polimerasa

2.6.1. Amplificación del fragmento correspondiente a las regiones variables V1 a V6 del gen que codifica la subunidad ribosomal 16S

1. Se utilizaron los oligonucleótidos designados como pA y 16R1093, mostrados en la Tabla 3.

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de un fragmento correspondiente a las regiones variables V1 a V6 del gen que codifica la subunidad ribosomal 16S (Ramírez-Chavarrín, et al., 2010).

Designación	Secuencia 5'-3'	Posición	Orientación	Tm [°C]	%GC
pA	-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-	9-28	Forward	52	50
16R1093	-GTTGCGCTCGTTGCGGGACT-	1109-1090	Reverse	58	65

- Se utilizó la enzima Taq DNA polymerase (Thermo Scientific) y se preparó la mezcla de reacción, de acuerdo Tabla 4.

Tabla 4. Mezcla para la reacción en cadena de la polimerasa para la amplificación del fragmento correspondiente a las regiones variables V1 a V6 del gen que codifica la subunidad ribosomal 16S.

Componente	Volumen para 25µL de reacción	Concentración final
Agua libre de nucleasas	cbp*** 25 µL	---
10X Taq buffer	2.5 µL	1X
dNTP 10 mM	0.5 µL	0.2 mM de cada uno de los nucleótidos
pA	0.5 µL	0.5 pmol/µL
16R1093	0.5 µL	0.5 pmol/µL
Taq DNA polymerase	0.15 µL	1.25U/25µL
MgCl ₂ 25 mM	2.5 µL	2.5 mM
ADN templado*	Variable**	100 ng/25 µL

El ADN templado obtenido se re-suspendió en 20µL de agua estéril. 2 µL se utilizaron para visualizarlos en un gel de agarosa, mientras que 10 µL se utilizaron para realizar la dilución y poder determinar su densidad óptica.

** Calculado dependiendo de la técnica de cuantificación (espectrofotometría a 260 nm o por medio del análisis densitométrico computacional KODAK Molecular Imaging).

***cbp: cuanto baste para.

- La reacción se llevó a cabo en un termociclador (Palm Cycler, Corbett research Co.), de acuerdo a las condiciones de la Figura 5.

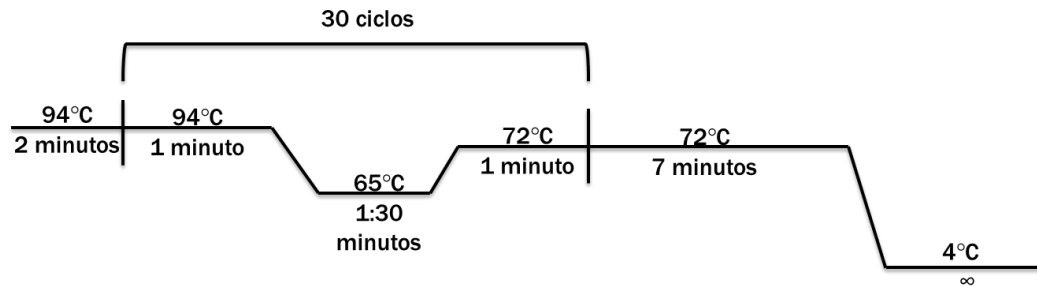


Figura 5. Condiciones de reacción para la amplificación del gen que codifica la subunidad ribosomal 16S en las regiones variables V1 a V6.

4. Los productos de amplificación se observaron en un gel de agarosa.

2.7. Obtención de muestras para secuenciación.

1. En el gel de agarosa, se identificó el producto de amplificación correspondiente al tamaño esperado en un transiluminador y se cortó la sección del gel que la contenía. Ésta se colocó en un tubo de 0.5 mL con fibra de vidrio compactada en su interior y a su vez este tubo se colocó en un tubo de 1.5 mL.
2. Se centrifugó a 5,000 rpm por 5 minutos, recuperando el sobrenadante en cada ciclo. Este paso se realizó por triplicado.
3. Al sobrenadante recuperado se realizó una limpieza con una solución de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), como se describe en el protocolo de optimización de extracción del metagenoma y se envió a secuenciación a Laragen Inc. USA.

2.8. Amplificación del fragmento del gen que codifica la α -amilasa del género *Streptococcus* desde las regiones proteómicas I a IV

1. Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación, designados AMYSTR2011F y AMYSTR2011R se muestran en la Tabla 5. El diseño de los mismos se muestra en resultados.

Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación del fragmento del gen que codifica la α -amilasa del género *Streptococcus* desde las regiones proteómicas I a IV (Anexo II).

Designación	Secuencia 5'-3'	Tm [°C]	%GC*	Orientación
AMYSTR2011F	-GATGTBGTGCTVAAAYCAYAAGGCT-	58.7	47.2	Forward
AMYSTR2011R	-TGGGTRTCSTGRRTTKCHACAAAGG-	68.8	47.3	Reverse

*Según especificaciones de Sigma Genosys

2. Los oligonucleótidos sintetizados se suspendieron en agua a una concentración de 100 μ M en agua libre de nucleasas estéril a -20°C. Para realizar las pruebas de la reacción en cadena de la polimerasa, se prepararon las alícuotas a una concentración de 30 pmol/ μ L.
3. Se utilizó la enzima Taq DNA polymerase (Thermo Scientific) y se preparó la mezcla de reacción, de acuerdo a la Tabla 6.

Tabla 6. Mezcla para la reacción en cadena de la polimerasa para amplificar el fragmento del gen que codifica la α -amilasa del género *Streptococcus* desde las regiones proteómicas I a IV.

Componente	Volumen para 25 μ L de reacción	Concentración final
Agua libre de nucleasas	cbp* 25 μ L	—
10X Taq buffer	2.5 μ L	1X
dNTP 10 mM	0.5 μ L	0.2 mM de cada uno de los nucleótidos
AMYSTR2011F	0.5 μ L	0.5 pmol/ μ L
AMYSTR2011R	0.5 μ L	0.5 pmol/ μ L
Taq DNA polymerase	0.15 μ L	1.25U/25 μ L
MgCl ₂ 25 mM	2.5 μ L	2.5 mM
ADN templado	Variable	100ng/25 μ L

*cbp: cuanto baste para

4. De acuerdo a las propiedades de los oligonucleótidos degenerados, se decidió seguir las condiciones mostradas en la Figura 6, para saber que temperatura de alineamiento era adecuado:

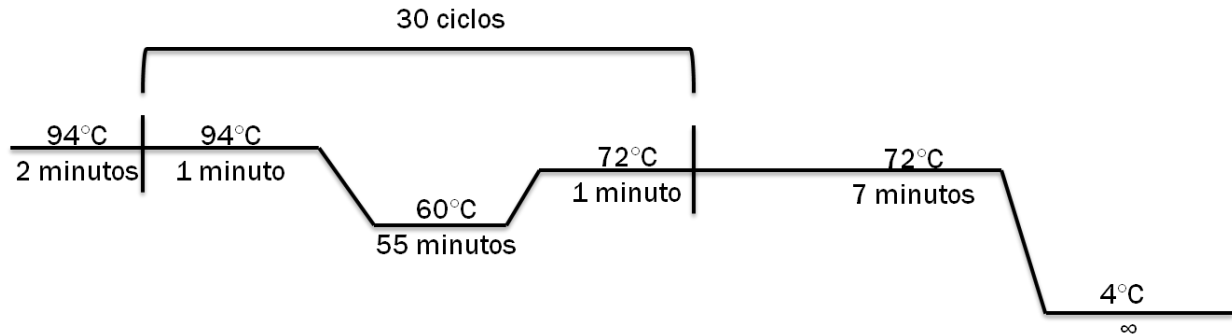


Figura 6. Condiciones de reacción para la amplificación del fragmento del gen que codifica la α -amilasa del género *Streptococcus* desde las regiones proteómicas I a IV.

5. La reacción se llevó a cabo en un termociclador (Palm Cycler, Corbett research co.), el cual tiene la ventaja que se pueden realizar reacciones en gradientes de temperatura.
6. Los productos de amplificación se observaron en un gel de agarosa.

Cómo control positivo se utilizó el ADN genómico de estreptococos amilolíticos aislados del pozol (Tabla2).

Resultados y discusión

1. Obtención del ADN genómico

Se probaron tres soluciones tamponadas para la obtención del genoma, la principal diferencia entre ellas era el tipo y concentración del detergente. La Tabla 7 muestra la cuantificación de ADN obtenido de la extracción de las tres diferentes soluciones de lisis celular, calculado a partir del valor de absorbancia obtenido a 260 nm (Stephenson, 2003), la dilución y la cantidad de masa de pozol en cada extracción.

Tabla 7. Cuantificación de ADN (ng ADN/mg pozol) calculado por medio de espectrofotometría (260nm) y la relación 260nm/280nm, 260nm/230nm para las tres soluciones de lisis celular empleadas.

SDS 1.5% (Ren, et al., 2006)			CTAB 2.0% (Ren, et al., 2006)			SDS 0.5% (Edwards, et al., 1991)		
ng ADN/ mg pozol	Relación		ng ADN/ mg pozol	Relación		ng ADN/ mg pozol	Relación	
169.00	260/280	1.97	123.50	260/280	1.97	91.00	260/280	1.95
	260/230	0.59		260/230	1.43		260/230	1.75
238.79	260/280	1.97	249.93	260/280	2.01	115.35	260/280	2.00
	260/230	1.13		260/230	1.68		260/230	1.60
212.98	260/280	1.97	224.30	260/280	1.99	131.79	260/280	1.97
	260/230	0.97		260/230	1.67		260/230	1.70
275.74	260/280	2.00	180.00	260/280	2.01	134.07	260/280	1.97
	260/230	1.12		260/230	1.56		260/230	1.45
345.00	260/280	2.01	238.34	260/280	2.02	143.01	260/280	1.98
	260/230	1.21		260/230	1.58		260/230	1.47
245.00	260/280	2.00	186.29	260/280	2.02	139.03	260/280	1.98
	260/230	0.99		260/230	1.43		260/230	1.61
Promedio	247.75		200.39			125.71		

*Factor programado en el espectrofotómetro $1A_{260nm}=50\mu\text{g/mL}$

Se puede observar una gran variabilidad en los resultados obtenidos entre las muestras, lo que no permite definir un método como más adecuado. Este fenómeno es probable ya que en todas las muestras probadas el botón obtenido al precipitar los ácidos nucleicos contiene todavía almidón y no puede ser completamente solubilizado, razón por la que los valores de relación 260nm/280nm y 260nm/230nm no fueron apropiados.

Una segunda opción para analizar el ADN obtenido era su visualización y cuantificación en geles de agarosa. La Figura 7 muestra la extracción del metagenoma para cada una de las soluciones de lisis, por triplicado.

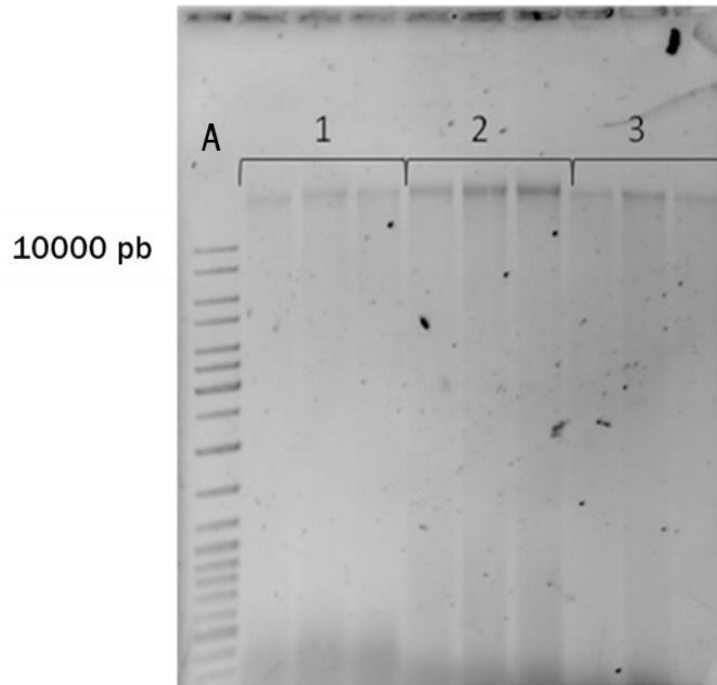


Figura 7. Gel de agarosa (0.8%) mostrando metagenoma del pozol extraído con las tres soluciones de lisis celular probadas. **Carril A:** MPM GeneRuler (Thermo Scientific); **1** Solución de lisis celular 0.5% SDS por triplicado. Densitometría promedio: 17.25 ng, rendimiento: 1.33 ng ADN/mg pozol; **2** Solución de lisis celular 1.5% SDS por triplicado. Densitometría promedio: 36.28 ng, rendimiento: 2.78 ng ADN/mg pozol; **3** Solución de lisis celular 2% CTAB por triplicado. Densitometría promedio: 19.20 ng, rendimiento: 1.46 ng ADN/mg pozol

En este gel de agarosa es posible observar una banda definida por arriba de las 10,000 pares de bases y un pequeño barrido a lo largo de todo el gel, que probablemente indica degradación debido al tratamiento, o que aún estén fragmentos de ARN presentes en la extracción. El tamaño de los genomas de las bacterias varía entre 0.5 y 10 Mpb, dependiendo de la especie, sin embargo el límite de separación de un gel de agarosa no permite hacer ninguna inferencia sobre el tamaño (Anexo I; Voytas, 2000).

De acuerdo a los valores obtenidos en el programa computacional KODAK Molecular Imaging (Kodak Eastman), descritos en el pie de Figura, hay una significativa diferencia entre las soluciones de lisis celular. El análisis por densitometría en gel permite obtener información cualitativa en relación a la presencia o ausencia de ADN cromosomal, o cuantitativa, al utilizar el programa computacional; además, se puede analizar la presencia de contaminación por proteínas y ARN. Una de las desventajas de este tipo de cuantificación es que considera que el bromuro de etidio se une igual a cualquier molécula de ADN sin importar el tamaño o la calidad de la obtención de la imagen (Bautista, *et al.*, app note). A partir de esta consideración, sólo se puede deducir que las soluciones de lisis celular no afectaron particularmente la integridad del metagenoma. Debido a la aparente subestimación de la cantidad de ADN extraído, la decisión para seleccionar la metodología de extracción del metagenoma solo dependió del rendimiento determinado mediante espectrofotometría a 260 nm. La comparación entre las soluciones de lisis celular en base a sus rendimientos se realizó con un análisis de varianza, que se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8. Análisis de varianza (ANOVA) para las soluciones de lisis celular.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F _o	F (α=0.05)	F (α=0.01)
Entre tratamientos	45429.79	2.00	22714.90	11.12	3.68	6.36
Error	30628.30	15.00	2041.89			
Total	76058.09	17.00				

Se desea probar la hipótesis (H) a un nivel del 5% (Figura 8), donde:

H₀: No hay diferencia significativa entre las soluciones de lisis celular

H_a: Hay una diferencia significativa entre las soluciones de lisis celular

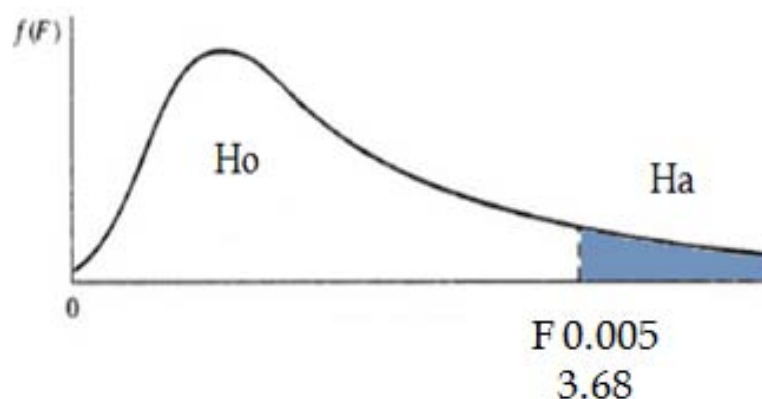


Figura 8. Función de densidad de probabilidad para una distribución F con un valor crítico (α) de 0.05 (Lind, 2005).

Regla de decisión:

Aceptar H₀ si $F \leq 3.68$

Rechazar H₀ si $F > 3.68$

De acuerdo al valor F obtenido (11.12, Tabla 8) y siguiendo la regla de decisión, se debe rechazar la hipótesis nula ya que hay una seguridad del 95% de que la cantidad de ADN determinado por espectrofotometría (densidad óptica) a 260 nm es significativamente diferente entre las soluciones de lisis celular evaluadas; por tanto, se eligió la solución de lisis donde se obtiene una concentración mayor

La solución de lisis celular con SDS al 1.5% elegida para este trabajo es también empleada en matrices con alto contenido de almidón, como el arroz (Ren, *et al.*, 2006), comparada con la matriz de pozol, la cual tiene un 99% de almidón presente. Cabe mencionar que aunque la solución de lisis celular empleada utiliza como componente bisulfito de sodio en concentraciones muy bajas (Anexo II), la ausencia de éste no afecta a la optimización del protocolo de extracción evaluado en la matriz de interés en este trabajo. El bisulfito de sodio ayuda a cambiar las citosinas no metiladas a uracilos que después la reacción de PCR identifica como timinas. Se utiliza en matrices que contienen arroz ya que se sabe que su genoma está menos metilado y es una copia simple, por lo que necesita estabilizantes para que el mismo no presente polimorfismos.

El diseño del protocolo de extracción fue el adecuado para la muestra de pozol a distintos tiempos de fermentación, donde se observa un metagenoma íntegro y el aumento del mismo cualitativamente, visto en un gel de agarosa (Figura 9) y cuantitativamente conforme avanza la fermentación (Tabla 9). Además, conforme aumenta el tiempo de fermentación de la muestra, más fácil es su manipulación al momento de realizar la extracción, ya que el almidón presente va siendo licuado por los microorganismos que van reproduciéndose. La presencia de oligonucleótidos dispersos a la largo del gel indica la presencia de ADN degradado, probablemente fragmentos residuales del genoma del maíz, ya que se sabe que sus ácidos desoxirribonucleicos son muy sensibles a tratamientos alcalinos como el que sufre el maíz durante la nixtamalización (Peano, *et al.*, 2004).

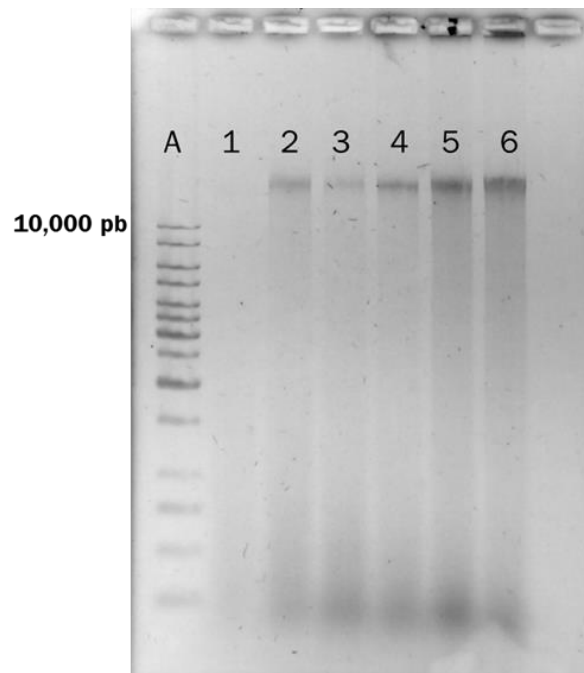


Figura 9. Gel de agarosa (0,8%) mostrando el metagenoma del pozol a distintos tiempos de fermentación. A MPM GeneRuler (Thermo Scientific); 1 t=0; 2 t=24; 3 t=48h; 4 t=72h; 5 t=7d (168 h); 6 t=12d (288 h).

Tabla 9. Cuantificación por medio de densidad óptica (260nm) y la relación 260nm/280nm, 260nm/230nm para el metagenoma del pozol extraído a distintos tiempos de fermentación.

Tiempo	ng ADN /mg pozol		
t=0h	17.24	260/280	1.87
		260/230	0.95
t=24h	23.44	260/280	1.65
		260/230	0.79
t=48h	16.19	260/280	1.89
		260/230	0.57
t=72h	25.17	260/280	1.86
		260/230	1.08
t=7d (168 h)	95.91	260/280	1.85
		260/230	1.12
t=12d (288 h)	116.66	260/280	1.90
		260/230	1.46

Al analizar los datos de pureza de los ácidos nucleicos extraídos se observa una disminución de sales y proteínas conforme avanza la fermentación. Es posible que el factor determinante o de cambio en las muestras sea el almidón presente en la matriz que atrape estos contaminantes; ya que en las primeras etapas de fermentación se observó una capa intermedia entre la fase orgánica y la fase acuosa al realizar la purificación, el cuál se supone que sea almidón gelatinizado. Esta capa va disminuyendo conforme el tiempo de fermentación, probablemente porque la microbiota licúa y consume el almidón conforme avanza el tiempo de fermentación y por tanto su remoción es más sencilla.

Los valores obtenidos por espectrofotometría y lo observado en geles de agarosa, indican que se obtuvo el metagenoma con una integridad aceptable para utilizarse en técnicas moleculares. Estudios previos reportan optimizaciones de obtención de metagenomas donde evalúan protocolos físicos, químicos y enzimáticos así como inhibidores de PCR en la descripción de comunidades microbianas en suelos. Dentro de los resultados que obtienen, se determinó que los tratamientos físicos agresivos, como la ruptura por perlas de vidrio, generan fragmentación del ADN. Por otro lado, se observó que no existe diferencia significativa en el rendimiento si la muestra se trata con métodos químicos (detergentes), enzimáticos o una mezcla de ellos; además, la purificación frecuentemente elegida es un tratamiento con cloroformo o fenol:cloroformo, tratamiento que, a pesar de no asegurar la remoción total de los inhibidores, permite resultados favorables al someter el metagenoma a técnicas moleculares (Krsek, *et al.*, 1999; Miller, *et al.*, 1999; Bürgmann, *et al.*, 2000).

2. Amplificación del fragmento correspondiente a las regiones variables V1 a V6 del gen que codifica la subunidad ribosomal 16S de los microorganismos presentes en el pozol

De manera preliminar, se probó el rendimiento y la integridad del metagenoma extraído por la metodología elegida, realizando los cálculos necesarios para tener una concentración del templado de 100 ng en 25 μ L de la reacción en base a la concentración final de la extracción obtenidas por medio de espectrofotometría y los valores de densitometría en gel obtenidos mediante el programa computacional KODAK Molecular Imaging (KODAK Eastman).

Después de la reacción en las condiciones elegidas (Tabla 4; Figura 5), se realizó una electroforesis en gel de agarosa mostrada en la Figura 10, donde se observó una diferencia entre la presencia o ausencia de productos de amplificación de acuerdo a los cálculos de la concentración del templado realizado por espectrofotometría a 260nm o por densitometría en gel. Como se observa en la figura, solo en el carril 1 se encuentra un producto de amplificación, lo que indica que el cálculo de la concentración de ADN es más preciso mediante espectrofotometría que por densitometría. En consecuencia los cálculos posteriores se realizaron a partir de la absorbancia obtenida a 260nm (Anexo I).

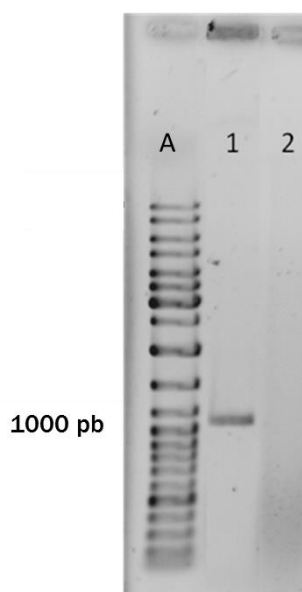


Figura 10. Gel de agarosa (1%) de las muestras sometidas a la reacción en cadena de la polimerasa. A MPM GeneRuler (Thermo Scientific); **1** Amplificado del fragmento correspondiente a las regiones variables V1 a V6 del gen que codifica la subunidad ribosomal 16S donde el cálculo del templado está basado en espectrofotometría a 260 nm, peso molecular aproximado: 1120 pb ; **2** Ausencia del amplificado del fragmento correspondiente a las regiones variables V1 a V6 del gen que codifica la subunidad ribosomal 16S de los microorganismos presentes en el pozol donde el cálculo del templado está basado en la densitometría en geles de agarosa.

El amplificado obtenido en la reacción en cadena de la polimerasa correspondiente a las regiones variables V1 a V6 del gen que codifica la subunidad ribosomal 16S a distintos tiempos de fermentación del pozol se muestra en la Figura 11 y corresponde al tamaño esperado (1000 a 1100pb); sin embargo, se observó un aparente cambio en el tamaño del fragmento, además de obtener fragmentos de amplificados cortos en algunos de los tiempos de fermentación, atribuidos a alineaciones inespecíficas. Lo interesante de la disminución del tamaño del amplificado del gen que codifica la subunidad ribosomal 16S es que es posible analizar que conforme avanza el tiempo de fermentación, la comunidad bacteriana dentro de la matriz varía y, en consecuencia, el tamaño del amplificado de los microorganismos nativos predominantes cambia. Para corroborarlo se realizó la secuenciación de los amplificados de los tiempos 48 horas y 12 días, ya que presentaron un tamaño diferente y el barrido es menor, y donde se esperaba que la probable identificación del microorganismo predominante en estos dos tiempos elegidos correspondieran a géneros distintos

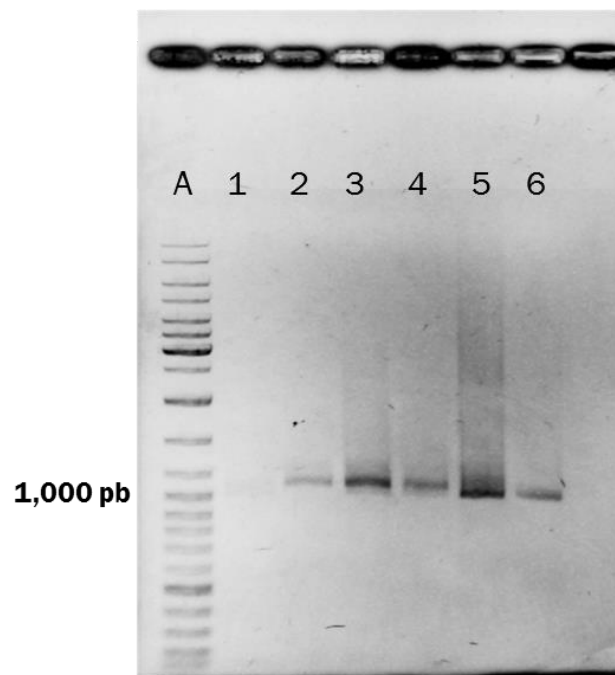


Figura 11. Gel de agarosa (1%) mostrando amplificado del fragmento ADNr 16S en pozol a distintos tiempos de fermentación. A MPM GeneRuler (Thermo Scientific); 1 t=0; 2 t=24h; 3 t=48h; 4 t=72h; 5 t=7 días (168 h); 6 t=12 días (288 h).

3. Secuenciación de los fragmentos correspondientes a las regiones variables V1 a V6 del gen que codifica la subunidad ribosomal 16S a diferentes tiempos de fermentación del pozol

La secuenciación de los amplificadores estuvo a cargo de Laragen Inc., a la cual se enviaron dos muestras de 20 μ L de amplificadores debidamente purificados a una concentración aproximada de 30 μ g/mL en caso del amplificador en t=48h (designado K48H) y de 60 μ g/mL en el caso del amplificador en t=12d (288 horas; designado K12D); de forma adicional, se enviaron 10 μ L de cada oligonucleótido utilizado para la amplificación (designados pA y 16R1093 respectivamente; Tabla 3) a una concentración de 10 μ M.

Las secuencias obtenidas a partir de los oligonucleótidos forward y reverse (Anexo I) de cada una de las muestras, se alinearon dentro del programa en línea ClustalW2 (Larkin, *et al.*, 2007) y se obtuvieron las secuencias consenso para ambos tiempos de fermentación mostradas en la Tabla 10.

Tabla 10. Secuencia consenso de los productos de amplificación del fragmento del gen de la subunidad ribosomal 16S a diferentes tiempos de fermentación.

Muestra	Longitud (pb)	Secuencia
K48H	1003	ACCTCTTATCATGCCACATTTTTGGAAACACACGCGTTTAAACGTTTGAAAATGACAACCTGCATGG TTGTTATTTAAAACATGGTTCTGCTATCACTATGAGATGGTCCCGGGGCGCCTTAGCTATTTGG TAAGGTAATGGCTTACCGAGGCGATGATGCATAGCCGATTTGACAGACTGCTCGGCCCAATG GGACTGAGACAAGGCCAATACTCCTACGGGAGGCAACCCTGACCAATCTCCACACTGGGCG AAAGCCTGATGGAGCATCGCCGCGTGTGTGATGAAGGGTTTCGGCTCGTAGAAAACGGTTAT ATCACAAGATGGCCGTTGCTAGTCACTGATCGATGGCTGACTACATCTCACCAGCCGCGAAAG GATATATGTCCGCAGCCTTCCCGGATTTACTGNGCTTCCAGCGANCATCCGGATTTATTGGG TGTAAGCGAGAGCCGACGGTTTTTAAAGTTTAAAGTAAAGCCCTCAGCTCAACC GCGGAAT TGCTTTGAAAACCTGGATAACTTGAGTCCAGAAGGGGAAAGTGGAACTCCATGTGTAGCGNG AAAGGCGTANATATATGGAAGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACCGACG TTGAGGCTTGAAAAGTGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCCACCGTAAACG ATGAATGCTAGGTGTTAGAGGGTTTCCGCCGTTAAGTCCCGCAGTAACGCATTAAGCATTCC GCCTGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCG GTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCGGCA CAATTCCAGAA-3'
K12D	713	TGCAGTCGCACGAAGGTTTCGGCCTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTAGGAATCTATC CGTGGGTGGGGGATAACTCTGGGAACTGGAGCTAATACCGCATGACACCTGAGGGTCAAAG GCGCAAGTCGCCTGCGGAGGAGCCTGCGTTTGATTAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACC AAGGCGATGATCAATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCC CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGCAACCCTGATCCAGCA ATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTTTTCGGATTGTAAGCACTTTCGGCGGGGACGATGATGAC GGTACCCGCGAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGG CTAGCGTTGCTCGGAATGACTGGGCGTAAAGGCGTGTAGGCGGTTTGTACAGTCAGATGTG AAATCCCCGGGCTTAACCTGGGAGCTGCATTTGAGACGTGCAGACTAGAGTGTGAGAGAGGG TTGTGGAATCCCAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGGGAAGAACACCGGTGGCGAAG GCGGCAACCTGGCTCATTACTGACGCTGAGGCGGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTA TACCCTGGTAGTCCACGCTGTAACGATGTGTGCTGGA-3'

A partir de estas secuencias se hizo un alineamiento de secuencias de nucleótidos con la base de datos existente utilizando el algoritmo nucleotide BLAST (por sus siglas en inglés Basic Local Alignment Search Tool) <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> (Altschul, et al., 1990). Esta herramienta realiza una búsqueda en una base de datos con todas las secuencias similares a la secuencia consenso problema y muestra un listado con la posible identificación taxonómica del microorganismo y su porcentaje de identidad. Para las secuencias consenso K48H y K12D, el listado de las tres probables identificaciones taxonómicas se muestra en la Tabla 11.

Tabla 11. Identificación de los microorganismos presentes en dos tiempos de fermentación por medio de la secuencia obtenida utilizando el algoritmo BLAST*(Altschul, et al., 1990).

Muestra	Longitud (pb)	Identificación	Porcentaje de identidad	Porcentaje de cobertura	Valor E**
K48H	1003	Secuencia parcial del gen que codifica para el fragmento 16S ribosomal de la bacteria no identificada "SIOC1409 N12D3 16S B". GB LN567199.1	87%	97%	0.0
		Secuencia parcial del gen que codifica para el fragmento 16S ribosomal de <i>Weisella confusa</i> PUFSTFMId44	87%	97%	0.0
		Secuencia parcial del gen que codifica para el fragmento 16S ribosomal de <i>Weisella</i> sp. VRE57B1 13 1E	87%	97%	0.0
K12D	713	Secuencia parcial del gen que codifica para el fragmento 16S ribosomal de <i>Acetobacter indonesiensis</i> BCC15762	99%	100%	0.0
		Secuencia parcial del gen que codifica para el fragmento 16S ribosomal de <i>Acetobacter indonesiensis</i> SCMA51	99%	100%	0.0
		Secuencia parcial del gen que codifica para el fragmento 16S ribosomal de <i>Acetobacter indonesiensis</i> SCMA47	99%	100%	0.0

*Fecha de consulta: octubre 2015

** E: valor de expectancia

Debido al poder metodológico que ofrece una reacción en cadena de la polimerasa, la amplificación de pequeñas cantidades de ADN permite la identificación hasta de organismos presentes en números pequeños y el tamaño de la muestra se reduce considerablemente. Sin embargo, cada paso fisicoquímico y biológico involucrado en el análisis molecular es una fuente de sesgo que conlleva a una visión incorrecta de la comunidad microbiana. Las secuencias del amplificado del fragmento correspondiente al gen que codifica la subunidad ribosomal 16S obtenidas a partir del metagenoma del pozol y su alineamiento con una base de datos referenciada indican que la diversidad de la población es amplia. Sin embargo, el método de análisis utilizado no es el adecuado para poder determinar con seguridad la identificación taxonómica de la comunidad. Para el análisis de comunidades tan complejas mediadas por una reacción de amplificación, los fragmentos deben ser separados en prioridad antes de la subsecuente secuenciación y/o hibridación, ya que constituye una mezcla heterogénea de secuencias. Para los objetivos de este trabajo, la secuenciación directa se utilizó únicamente para determinar que el templado tiene la integridad suficiente para generar productos representativos.

El género *Weissella*, del cual la secuencia parcial del gen que codifica la subunidad ribosomal 16S fue identificada con un 87% de identidad en la base de datos de NCBI. Esta bacteria ya fue identificada como una especie predominante en el pozol por métodos microbiológicos y moleculares (Wacher, et al., 2000; Ampe, et al., 1999), por tanto su presencia en tiempos tempranos de fermentación es indiscutible. Sin embargo, su correcta identificación en este trabajo no puede ser asegurada dado que los amplificados nunca fueron separados y se secuenció una mezcla que nos permite únicamente saber que el ADN es amplificable pero no permite realizar un análisis de biodiversidad.

El mismo criterio aplica para la secuencia obtenida del amplificado de los doce días, aún y cuando se haya identificado a *Acetobacter* con un 99% de identidad. Sin embargo sí parece importante precisar que este género se identificó como predominante a los 12 días de fermentación en un estudio proteómico del pozol (Cárdenas, et al., 2014).

El algoritmo BLAST, a pesar de no medir homología, reporta, en el caso de la secuencia relacionada a *Weissella*, que el alineamiento de las dos secuencias consenso es significativo y las secuencias están relacionadas biológicamente, pero el porcentaje de identidad, que se define como una medida en que dos secuencias nucleotídicas tienen los mismos residuos en las mismas posiciones en una alineación, no es significativo. Además del criterio de exclusión mencionado, un argumento a considerar es que la calidad de los resultados por comparación de secuencias depende de la base de datos disponible, ya que de forma regular, los genes obtenidos de muestras ambientales complejas muestran baja semejanza a secuencias conocidas haciendo que su delimitación filogenética se dificulte.

Es importante también considerar otros sesgos en este trabajo y en estudios de diversidad. Primero, la lisis de las células microbianas de los ambientes ha sido señalado como un paso crítico en una aproximación mediada por PCR: una ruptura insuficiente o preferencial de las células puede sesgar la visión de la composición microbiana en ADN que no es retirado de la célula y no contribuirá en el análisis final de la diversidad. Por otro lado, las condiciones rigurosas para la obtención del ADN de bacterias Gram-positivas pueden dar lugar a fragmentaciones que pueden ser parte de artefactos y contribuyen a la formación de productos quiméricos. Segundo, la co-extracción de contaminantes, como el almidón presente al menos en tiempos iniciales de la fermentación son causa de la disminución de la amplificación ya que provocan serpenteos en las cadenas de templado e inhiben la elongación. Y tercero, la amplificación diferencial, donde el resultado de las amplificaciones surgen de una mezcla compleja de moléculas homólogas que sirven como templado y considerando que el muestreo es sesgado en forma espacial y temporal no es posible reflejar una abundancia cuantitativa ya que la eficiencia de la reacción debe ser la misma para todas las especies. Para considerar una eficiencia homogénea de la reacción, se deben hacer varias suposiciones: que todas las moléculas son igualmente accesibles para la hibridación; que esta hibridación se da con la misma eficiencia; que la eficiencia de extensión de la polimerasa es la misma para todos los templados y las limitaciones por el agotamiento del sustrato afectan de manera equivalente la extensión de todos los templados. Además, el tamaño del genoma, el número de copias del gen *rnn*, y la presencia de genes con alto contenido de guanina y citosina de cada especie presente dan como resultado una amplificación preferencial de ciertos templados.

Las condiciones para la amplificación así como los oligonucleótidos han sido reportadas y utilizadas en cepas aisladas de pozol y salchicha, (Ramírez-Chavarín, *et al.*, 2010; Rodríguez, 2011); pero no en los análisis metagenómicos. A pesar de que el uso de estas técnicas en análisis de diversidad está basado en el hecho de que la amplificación de secuencias homólogas pero no idénticas ocurre con eficiencia equitativa, y la representación del ecosistema es dependiente del número de ciclos en la reacción de amplificación, la descripción de la composición y distribución de la comunidad total debe ser optimizada a fin de evitar aún más el sesgo que implica la muestra metagenómica obtenida, sin dejar de mencionar los sesgos implicados en la extracción. El sesgo dependiente de la técnica de amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa puede ser reducido por la disminución del número de ciclos de replicación, para evitar el realineamiento de los productos de forma progresiva que inhibe la formación de los híbridos oligonucleótidos de alta eficiencia-templado, y que finalmente afectan la eficiencia de hibridación y especificidad en presencia de una mezcla de templados.

Lo anterior sustenta que el género *Streptococcus*, dominante a lo largo de toda la fermentación de acuerdo a los estudios de Ampe, *et al.* y Díaz-Ruiz, *et al.*, correspondiera probablemente a los sesgos mencionados y su identificación y/o presencia no pudiera ser reportada, al menos en este estudio preliminar. Este hecho, sin embargo, no necesariamente indica que el protocolo no sea el adecuado para obtener una muestra propia del metagenoma presente en el pozol; si bien es cierto que existe la posibilidad de realizar alternativas de purificación del mismo,

al identificar bacterias previamente descritas en el sistema y consideradas significativas, el método presentado y analizado en este trabajo expone finalmente un acierto en la aproximación de obtener un metagenoma representativo. En seguida, se consideró el diseño de oligonucleótidos degenerados para tratar de identificar los genes de α -amilasas de *Streptococcus*.

4. Amplificación de un fragmento del gen que codifica a la o las α -amilasas del género *Streptococcus*

Los estudios de ecología microbiana realizados en el pozol, muestran al género *Streptococcus* como un candidato de ser el posible generador de azúcares a partir del almidón (Ampe, *et al.*, 1999; ben Omar, *et al.*, 2000; Díaz-Ruiz, *et al.*, 2003). El género *Streptococcus* es un grupo heterogéneo de bacterias Gram-positivas con gran significado para la medicina y la industria, son esenciales en procesos industriales y lácteos y como indicadores de contaminación. Varias especies de este género son importantes ecológicamente como parte de la flora intestinal de animales y humanos (Brooks, *et al.*, 2011).

Antes de realizar la extracción del ADN de las cepas aisladas del pozol que servirían de control (Díaz, 2003), se confirmó su fenotipo, realizando una siembra por agotamiento en medio MRS-almidón observando su actividad amilolítica de forma cualitativa, sublimando cristales de yodo para colorear el almidón en una placa con crecimiento por agotamiento y la actividad se notó como un halo claro alrededor de las colonias aisladas de cada cepa, mostrada en la Tabla 12. (Giraud, *et al.*, 1993).

Tabla 12. Características de las cepas del género *Streptococcus* aisladas del pozol.

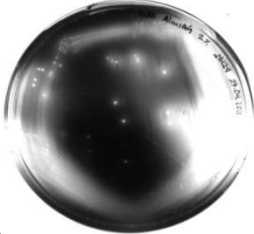

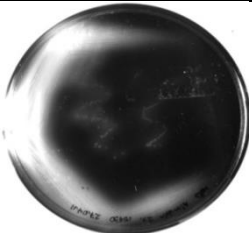


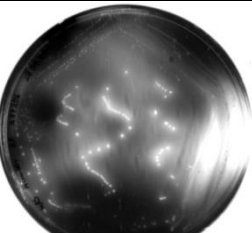
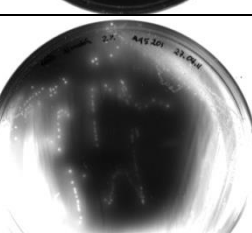
Nombre clave	Microorganismo (% identidad)	Actividad amilolítica	Notas
25124	<i>S. infantarius</i> (100%)		Cepa aislada de pozol con mayor halo de inhibición (Díaz-Ruiz, <i>et al.</i> , 2003)
A12203	<i>S. infantarius</i> (100%)		Presenta un comportamiento diferente en comparación con la cepa 25124

Tabla 12. (cont.)

Nombre clave	Microorganismo (% identidad)	Actividad amilolítica	Notas
15430	<i>S. infantarius</i> (99%)		Ninguna
A56203	<i>S. infantarius</i> (99%)		Ninguna
A57103	<i>S. infantarius</i> (99%)		Ninguna
A57206	<i>S. bovis</i> <i>S. infantarius</i> (99%)		Presenta α -amilasas intracelulares y extracelulares.
A45201	<i>Streptococcus macedonicus</i> (100%)		Ninguna

La funcionalidad de los oligonucleótidos degenerados diseñados se probó en las cepas del género *Streptococcus* aisladas del pozol (Tabla 12), para lo cual primero se obtuvo el genoma mostrado en la Figura 12, el cual muestra un genoma íntegro para cada una de las especies.

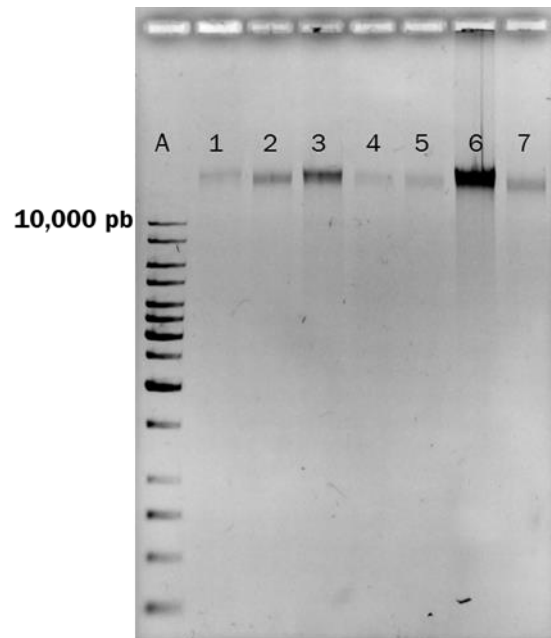


Figura 12. Gel de agarosa (0.8%) mostrando el genoma de las cepas control.
A MPM GeneRuler (Thermo Scientific); **1** *S. infantarius* 25124 (100% ident.) **2** *S. infantarius* 15430 (99% ident.);
3 *S. infantarius* A56203 (99% ident.); **4** *S. infantarius* A57103 (99%ident.);**5** *S. infantarius* A57206 (99%ident.);
6 *S. infantarius* A12203 (100% ident.) **7** *S. macedonicus* A45201 (100% ident.) (Díaz, 2003).

Para el diseño de los oligonucleótidos se realizó una investigación extensiva de secuencias de α -amilasas reportadas para el género *Streptococcus* en GeneBank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (Benson, et al., 2013) y CAZy (Carbohydrate Active Enzymes database, por sus siglas en inglés) <http://www.cazy.org> (Lombard, et al., 2013). Se eligieron las secuencias de aminoácidos de las especies más representativas de *Streptococcus* por similitud y localización, refiriéndose a ser enzimas intracelulares, extracelulares o citoplasmáticas. Se eligieron dos secuencias proteicas conservadas, la primera ubicada en la Región I en la tercera lámina beta y la segunda ubicada en la Región IV en la séptima lámina beta.

Se buscaron los aminoácidos que se han reportado como conservados en GeneBank (Benson, et al., 2013) y se realizó un alineamiento con el algoritmo de ClustalW mostrado en la Figura 13 <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/> (Larkin, et al.,2007), mostrado en la Figura 13 a fin de analizar sus homologías.

<i>Streptococcus</i>	Región I β3	Región IV β7
<i>oralis</i> ATCC 35037	-QGIQPMADVVLNHKAA-----ADH	//RTVVELKPKAVTFVDNHD TQRGQALEST
<i>mitis</i> NCTC 12261	-QGIQPMADVVLNHKAA-----ADH	//RTVVELKPYKTVT FVDNHD TQRGQALEST
<i>equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i>	-ANIKPIADVVLNHNKAN-----GDH	//RQQVASRPDLAVTFVENHD TQRGQALEST
<i>equi</i> subsp. <i>equi</i> 4047	-AKIKPIADVVLNHNKAN-----GDH	//RQQVASRPDLAITFVENHD TQRGQALEST
<i>sp.</i> 2_1_36FAA, c	-NGIEPIADVVLNHKAA-----ADG	//RTTVKNHPESAVTFVENHD TQRGQALEST
<i>thermophilus</i> LMD-9, c	-VGIIPMADVVLNHKAA-----ADK	//RTKVKNHPEHAVTFVENHD TQRGQALEST
<i>equi</i> subsp. <i>zooepidermicus</i> , c	-AKIKPIADVVLNHNKAN-----GDH	//GSLVASRPDLAITFVENHD TQRGQALEST
<i>gordonii</i> , c	-NGIDPIADVVLNHKAA-----ADG	//HTLVKNHPESAVTFVENHD TQRGQALEST

Figura 13. Alineamiento de las secuencias de proteínas conservadas de la región I y región IV para la α -amilasa de distintas especies del género *Streptococcus*. Las especies que presentan una c en su nombre son amilasas citoplasmáticas. En amarillo se muestra la región I conservada y en rosa se muestra la región VI conservada que se emplearon para el diseño de los oligonucleótidos. Entre ambas regiones existen 221 aminoácidos (Figura elaborada de acuerdo a la información obtenida en ClustalW; Larkin, et al., 2007).

Se realizó la búsqueda de sus equivalentes en bases nucleotídicas y el alineamiento de las mismas utilizando el algoritmo Clustal W <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/> (Larkin, et al., 2007) y a partir de estas se obtuvo la secuencia para los oligonucleótidos degenerados mostradas en la Figura 14, para la orientación Forward y en La Figura 15 para la orientación Reverse (Tabla 5).

Para el diseño de los oligonucleótidos se consideraron de forma importante los siguientes parámetros:

- Que el índice de degeneración no fuera más de 144 (Anexo II)
- Que el porcentaje de Guanina-Citosina fuera próximo a un 50%
- Una ΔT_m (diferencia de temperaturas de fusión) no mayor a 5 °C
- Que no ocurrieran interacciones entre oligonucleótidos, para evitar la formación de estructuras secundarias y los dímeros de los mismos

<i>Streptococcus</i>	Región I β3
<i>oralis</i>	CCTATGGCCGATGTGGTGCTCAATCACAAGGCTGCTAGTCAC
<i>mitis</i>	CCTATGGCAGATGTGGTGCTCAATCACAAGGCTGCTTGTAAC
<i>equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i>	CCTATTGCTGATGTTGTGCTGAACCATAAGGCTAATTGTTAC
<i>equi</i> subsp. <i>equi</i> 4047	CCTATTGCTGATGTTGTGCTGAACCATAAGGCTAATTGTTAC
<i>sp.</i> 2_1_36FAA, c	CCAATCGCTGATGTCGTTTTAAATCATAAAGCTGCTTGTGAC
<i>thermophilus</i> LMD-9, c	CCTATGGCCGATGTTGTGCTCAACCACAAGGCAGCCGGTAAC
<i>equi</i> subsp. <i>zooepidermicus</i> , c	CCTATTGCTGATGTTGTGCTGAACCATAAGGCTAATTATTAC
<i>gordonii</i> , c	CCAATTGCTGATGTCGTTTTAAATCATAAAGCTGCATGTGAC
	GATGTBGTGCTVAAYCAYAAGGCT

Figura 14. Alineamiento de las secuencias nucleotídicas conservadas para la región I de α -amilasas de las especies del género *Streptococcus*. En gris se muestran las bases degeneradas. La nomenclatura universal para bases incompletamente especificadas se encuentra en el Anexo II, Tabla 13 (Figura elaborada de acuerdo a la información obtenida en ClustalW; Benson, et al., 2013; Larkin, et al., 2007)

<i>Streptococcus</i>	Región IV B7
<i>oralis</i>	AAAGCAGTCACTTTGTTGACAACCATGATACCCAACGAGGACAA
<i>mitis</i>	AGACTGTAACTTTGTCGACAACACGATACCCAACGTGGTCAG
<i>equi subsp. zooepidemicus</i>	TTGCTGTTA CTTTGTGGAAAACCATGACACCCA AAGAGGACAA
<i>equi subsp. equi 4047</i>	TTGCTATTA CTTTGTGGAAAACCATGACACCCA AAGAGGGCAA
<i>sp. 2_1_36FAA, c</i>	CAGCTGTGACATTTGTAGAAAATCATGATACTCAGCGTGGTCAA
<i>thermophilus LMD-9, c</i>	ATGCGGTAACTTTCGTAGAGAACCATGACACCCAACGTGGACAA
<i>equi subsp. zooepidermicus, c</i>	TTGCTATTA CTTTGTGGAAAACCATGACACCCA AAGAGGGCAA
<i>gordonii, c</i>	CAGCTGTGACATTTGTAGAAAATCATGATACTCAGCGTGGTCAA
	CCTTTGTDGAMAAYCATGAYACCCA
	>REV
	TGGGTRTCATGRITTKTCHACAAAAGG

Figura 15. Alineamiento de las secuencias nucleotídicas conservadas para la región IV de α -amilasas de las especies del género *Streptococcus*. En gris se muestran las bases degeneradas. La nomenclatura universal para bases incompletamente especificadas se encuentra en el Anexo II (Figura elaborada de acuerdo a la información obtenida en ClustalW; Benson, et al., 2013; Larkin, et al., 2007)

Una de las ventajas buscada en el diseño era amplificar una secuencia corta y que estuviera dentro de regiones muy conservadas. Esta secuencia incluye determinantes estructurales y un residuo catalítico dentro de la región B sumando que el tamaño del producto de amplificación disminuye el sesgo. La Figura 16 muestra el producto de amplificación con el tamaño aproximado esperado utilizando como templado el ADN genómico de 6 de las 7 cepas del género *Streptococcus* aisladas del pozol, utilizadas como control positivo. Este resultado es la confirmación de que el diseño de los oligonucleótidos degenerados es adecuado para la amplificación del fragmento β -3/ β -7 de las amilasas del género *Streptococcus*. Además, se puede observar que a pesar de que las reacciones se realizaron en las mismas condiciones, la cuantificación de amplificado por medio de los geles de agarosa es variable, lo cual infiere que la eficiencia de la reacción entre cada especie es variable, como se había descrito en las reacciones empleadas para la descripción de comunidades microbianas. Además, se puede obtener información valiosa a partir de estos productos ya que los fragmentos no están reportados para las cepas amilolíticas aisladas del pozol.

Las cepas identificadas como *S. Infantarius* A12203y *Streptococcus macedonicus* A45201 muestran una alta amplificación, coincidiendo con los resultados de las pruebas cualitativas de actividad amilolítica; sin embargo, no se puede afirmar que sean cepas con alta productividad dentro del pozol, ya que existe una reestructuración metabólica de los microorganismos debido a la adaptación al nicho de fermentación y en cierta forma a la selección de la diversidad en cada lote de fermentación, ya que entre más tradicional es la preparación, más compleja es la comunidad.

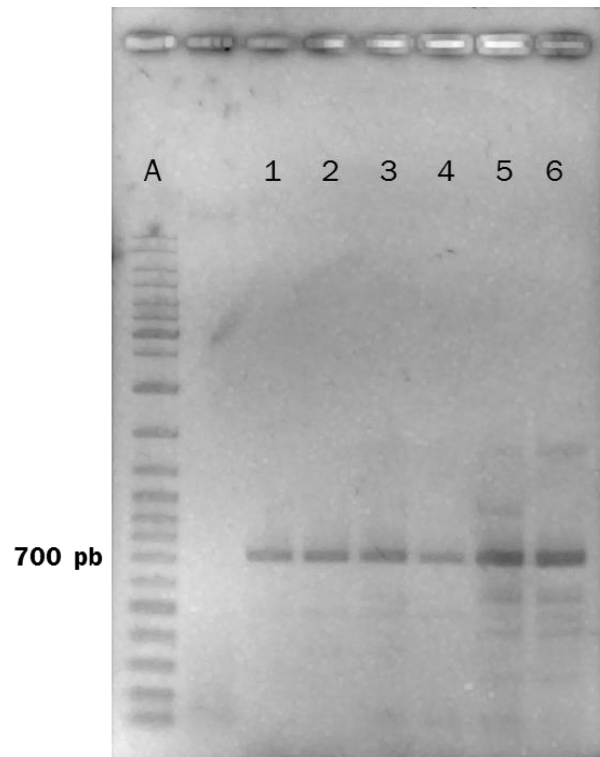


Figura 16. Gel de agarosa (1%) mostrando el amplificado del fragmento del gen que codifica a la α -amilasa del género *Streptococcus*. A MPM GeneRuler (Thermo Scientific); **1** *S. Infantarius* 15430 (99%); **2** *S. infantarius* A56203 (99%); **3** *S. infantarius* A57103(99%); **4** *S. Infantarius* A57206(99%); **5** *S. Infantarius* A12203(100%); **6** *S. macedonicus* A45201 (100%) (Díaz, 2003).

A pesar de que se comprobó que los oligonucleótidos son viables para la amplificación del fragmento del gen que codifica la α -amilasa del género *Streptococcus* desde las regiones proteómicas I a IV, estos fragmentos no pudieron ser amplificados a partir del metagenoma del pozol probablemente debido a su presencia en un muy bajo número de copias en una matriz con una alta diversidad en contenido genómico (Figura 17).

Sin embargo, se ha reportado que *S. infantarius* produce ácido láctico, melobiosa y pululano a partir del almidón debido a la expresión una α -glucosidasa, por lo que es posible pensar que la actividad amilolítica identificada en este microorganismo no sea debida a una alfa-amilasa *sensu stricto* (Sato, *et al.*, 1997; Schlegel, *et al.*, 2000). Este resultado que contrasta con el obtenido recientemente por Rodríguez (2015) quien logró extraer la proteína asociada a membrana con actividad amilolítica de *Streptococcus infantarium* 25124 vista en un gel de actividad que previamente había sido reportada (Díaz-Ruiz, *et al.*, 20003), la cual se tiene previsto purificar y caracterizar.

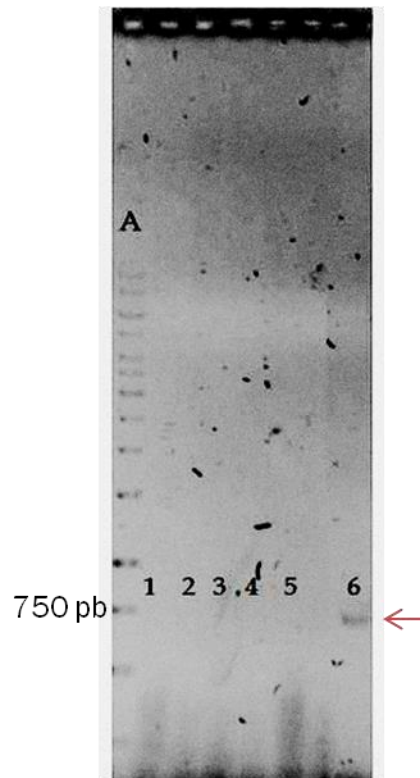


Figura 17. Gel de agarosa (1%) mostrando el resultado de la reacción de amplificación del fragmento del gen que codifica a la α -amilasa del género *Streptococcus* en pozol a distintos tiempos de fermentación.

A MPM GeneRuler 1 Kb (Thermo Scientific); **1** t=0, ausente; **2** t=24h, ausente; **3** t=48h, ausente; **4** t=72h, ausente; **5** t=7 días (168 h), ausente; **6** control: *S. infantarius* 25124 (100% de identidad); amplificado señalado con una flecha.

Turpin, *et al.*, (2012) realizaron un estudio donde buscaron amilasas en los metagenomas de fermentaciones tradicionales de yuca y cebada y donde reportan una gran variabilidad en la presencia de genes relacionados con el metabolismo del almidón; por ejemplo, en todas las muestras se encontraron los genes que codifican para glucógeno-fosforilasa, oligo-1,6-glucosidasa y un α -glucosidasa, pero los genes para α -amilasas, neopululanasa y maltosa-fosforilasa no fueron sistemáticamente encontradas en la fermentación de cebada y nunca en la fermentación a partir de yuca, por lo que se mantiene la suposición que en fermentaciones tradicionales complejas, el metabolismo de un sustrato tan complejo como el almidón no necesariamente se debe a la actividad de una amilasa.

Conclusiones

A pesar de la complejidad de la muestra se diseñó y optimizó una metodología que permite obtener el metagenoma propio del pozol a distintos tiempos de fermentación.

Se obtuvo una probable identificación del género *Weisella* con un 87 % de identidad en el metagenoma del pozol con 48 horas de fermentación.

Se obtuvo una probable identificación del género *Acetobacter* con un 99 % de identidad en el metagenoma del pozol con 12 días (288 horas) de fermentación.

El diseño de los oligonucleótidos degenerados permitió la amplificación del fragmento del gen que codifica de la región I a la IV de la α -amilasa de las especies de *Streptococcus* aisladas del pozol.

Los oligonucleótidos diseñados no permitieron la identificación de las amilasas de *Streptococcus* en el pozol.

Perspectivas

Secuenciar los fragmentos obtenidos del gen que codifica de la región I a la IV de la α -amilasa de las especies de *Streptococcus* aisladas del pozol.

Evaluar el uso de amilasas para disminuir la presencia e interferencia del almidón en la muestra.

Considerar el diseño y amplificación de fragmentos conservados de genes que codifiquen las α -amilasas y otras glucósido-hidrolasas y su complementariedad con otras técnicas moleculares en *Streptococcus* y otros géneros dominantes descritos en el pozol, como *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Enterococcus* a fin de obtener una mejor descripción del sistema amilolítico del pozol.

Referencias

- Abdelgadir W, Nielsen D, Hamad S, Jakobsen M, **2008**. *A Traditional Sudanese Fermented Camel's Milk Product, Gariss, as an habitat of Streptococcus infantarius subsp. Infantarius*, International Journal of Food Microbiology, 215-219
- Agama-Acevedo E, Ottenhof MA, Farhat IA, Paredes-López O, Ortíz-Céceres J, Bello-Pérez LA, **2005**. *Aislamiento y caracterización del almidón en maíces pigmentados*, Agrociencia, 419-429
- Allen G, Flores-Vergara M, Krasnyanski S, Kumar S, Thompson W, **2006**. *A modified protocol for rapid DNA isolation from plant tissues using cetyltrimethylammonium bromide*, Nature, 2320-2325
- Altschul S, Gish W, Miller W, Myers E, Lipman D, **1990**. *Basic local alignment search tool*, Journal of Molecular Biology, 403-410
- Ampe F, ben Omar N, Guyot JP, **1998**. *Recovery of Total Microbial RNA from Lactic Acid Fermented Foods with a High Starch Content*, Letters in Applied Microbiology, 270-274
- Ampe F, ben Omar N, Guyot JP, **1999**. *Culture-Independent Quantification of physiologically-active Microbial Groups in Fermented Foods using rRNA-targeted Oligonucleotide probes: Application to Pozol, a Mexican Lactic Acid Fermented Maize Dough*, Journal of Applied Microbiology, 131-140
- Ampe F, ben Omar N, Moizan C, Wachter C, Guyot JP, **1999**. *Polyphasic Study of the Spatial Distribution of Microorganisms in Mexican pozol, a Fermented Maize Dough, demonstrates the need for cultivation-independent Methods to Investigate Traditional Fermentations*, Applied and Environmental Microbiology, 5464-5473
- ben Omar N, Ampe F, **2000**. *Microbial Community Dynamics during Production of the Mexican Fermented Maize Dough Pozol*, Applied and Environmental Microbiology, 3664-3673
- Bautista D, Yagubi A, Roberts P, Application note 8. *Molecular Weight Markers. DNA cuantification by Gel Densitometry with Norgen DNA Ladders*, Norgen Biotek Corporation, Canada
- Benson D, Cavanaugh M, Clark K, Karsch-Mizrachi, Lipman D, Ostell J, Sayers E, **2013**. *GenBank*, Nucleic Acids Research, D36-D42
- Björkroth K, Schillinger U, Geisen R, Weiss N, Hoste B, Holzapfel W, Korkeala H, Vandamme P, **2002**. *Taxonomic study of Weisella confuse and description of Weisella cibaria sp. Nov., detected in food and clinical samples*, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 141-148
- Boyer CD, Shannon JC, **1987**. *Carbohydrates of the kernel*, En: Corn: Chemistry and Technology, editado por Watson SA y Ramstad PE, American Association of Cereal Chemist, St. Paul, USA

- Brooks G, Carroll K, **2011**. *Bacteriología*, En: *Microbiología Médica*, editado por Brooks G, Carroll K, Butel J, Morse S, Mietzner T, McGraw Hill, México, DF
- Bürgmann H, Pesaro M, Widmer F, Zeyer J, **2000**. *A strategy for optimizing quality and quantity of DNA extracted from soil*, *Journal of Microbiological Methods*, 7-20
- Cañas AO, Bárzana E, Owens JD, Wachter MC, **1993**. *La elaboración del pozol en los altos de Chiapas*, *Ciencia*, 219-229
- Cárdenas C, Barkla B, Wachter C, Delgado-Olivares L, Rodríguez-Sanoja R, **2014**. *Protein extraction method for the proteomic study of a Mexican Traditional Fermented Starchy Food*, *Journal of Proteomics*, 111-139
- Carrillo C, **2009**. *El origen del maíz naturaleza y cultura en Mesoamérica*, *Ciencia*, 4-13
- Cleenwerck I, Vandemeulebroecke K, Janssens D, Swings J, **2002**. *Re-examination of the genus Acetobacter, with descriptions of Acetobacter cerevisiae sp. nov. and Acetobacter malorum sp. nov.*, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1551-1558
- Cortázar A, Silva E, **2004**. *Métodos fisicoquímicos en Biotecnología. PCR*, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos
- Cotta M, Whitehead T, **1993**. *Regulation and cloning of the gene encoding amylase activity of the ruminal bacterium Streptococcus bovis*, *Applied and Environmental Microbiology*, 189-196
- Coughlan L, Cotter P, Hill C, Alvarez-Ordoñez A, **2015**. *Biotechnological applications of functional metagenomics in the food and pharmaceutical industries*, *Frontiers in Microbiology*, 672
- De Vuyst L, Camu N, De Winter T, Vandemeulebroecke K, Van de Perre V, Vancanneyt M, De Vos P, Cleenwerck I, **2008**. *Validation of the (GTG)₅-rep-PCR fingerprinting technique for rapid classification and identifications of Acetic Acid Bacteria, with a focus on isolates from Ghanaian fermented cocoa beans*, *International Journal of Food Microbiology*, 79-90
- Díaz G, **2003**. *Fermentación del almidón por bacterias lácticas amilolíticas aisladas del pozol*, Tesis de doctorado, Universidad Nacional Autónoma de México, México, DF
- Díaz G, Wachter C, **2003**. *Métodos para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados*, *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 30-40
- Díaz-Ruiz G, Guyot JP, Ruiz-Terán F, Morlon-Guyot J, Wachter C, **2003**. *Microbial and Physiological Characterization of Weakly Amylolytic but Fast-Growing Lactic Acid Bacteria: a Functional Role in Supporting Microbial Diversity in Pozol, a Mexican Fermented Maize Beverage*, *Applied and Environmental Microbiology*, 4367-4374

- Doulgeraki A, Paramithiosis D, Kagkli D, Nychas G, **2010**. *Lactic Acid Bacteria population dynamics during minced beef storage under aerobic or modified atmosphere packaging conditions*, Food Microbiology, 2010
- Edwards K, Johnstone C, Thompson C, **1991**. *A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis*, Nucleic Acid Research, 1349
- Escalante A, Wacher C, Farrés A, **2001**. *Lactic Acid Bacterial Diversity in the Traditional Mexican Fermented Dough Pozol as Determined by 16SrDNA Sequence Analysis*, International Journal of Food microbiology, 21-31
- do Espirito-Santo A, Mouquet-Rivier C, Humblot C, Cazevieille , Icard-Verniere C, Soccol C, Guyot J, **2014**. *Influence of cofermentation by amylolytic Lactobacillus strains and probiotic bacteria on the fermentation process, viscosity and microstructure of gruels made of rice, soy milk and passion fruit fiber*, Food Research International, 104-113
- Ghali M, Scott P, Al Jassim R, **2004**. *Characterization of Streptococcus bovis from the rumen of the dromedary camel and Rusa deer*, Letters in Applied Microbiology, 341-346
- Girud E, Grosselin L, Marin B, Parada J, Raimbault M, **1993**. *Purification and characterization of an extracellular mylase from Lactobacillus plantarum strain A6*, Journal of Applied Biotechnology, 276-282
- Hammes WP, Brandt MJ, Francis KL, Rosenheim J, Seitter MFH, Vogelmann SA, **2005**. *Microbial ecology of cereal fermentations*, Trends in Food Science and Technology, 16:4-11
- Handelsman J, **2004**. *Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms*, Microbiology and Molecular Biology Reviews, 669-685
- Hansen M Tolker-Nielsen T, Givskov M, Molin S, **1998**. *Biased 16S rDNA PCR amplification caused by interference from DNA flanking the template region*, FEMS Microbiology Ecology, 141-149
- Hardie J, Whiley R, **1995**. *The genus Streptococcus*, En The genera of Lactic Acid Bacteria, editado por Wood B, Holzapfel W, Blackie Academic and Professional, Glasgow, United Kingdom
- Humblot C, Guyot JP, **2008**. *Other fermentations*, En: Molecular Techniques in the Microbial Ecology of Fermented Foods, editado por Cocolin L y Ercolini D, Springer, New York, NY, 208-224
- Humblot C, Turpin W, Chevalier F, Picq C, Rochette I, Guyot JP, **2014**. *Determination of expression and activity of genes involved in starch metabolism in Lactobacillus plantarum A6 during fermentation of a cereal-based gruel*, International Journal of Food Microbiology, 103-111
- Jans C, Follador R, Lacroix C, Meile L, Stevens M, **2012**. *Complete genome sequence of the African dairy isolate Streptococcus infantarius subsp. Infantarius strain CJ18*, Journal of Bacteriology, 2105-2106

- Klug W, Cummings M, Spencer C, **2006**. *Estructura y análisis del DNA*, En: Conceptos de genética, editado por Cummings M, Klug W, Spencer C, Pearson educación, Madrid, España
- Krsek M, Wellington EMH, **1999**. *Comparison of different methods for the isolation and purification of total community DNA from soil*, Journal of Microbiological Methods, 1-16
- Lan W, Chen Y, Yanagida F, **2009**. *Isolation and characterization of Lactic Acid Bacteria from Yan-dong-gua (fermented wax gourd), a Traditional fermented food in Taiwan*, Journal of Bioscience and Bioengineering, 484-487
- Larkin M, Blackshields G, Brown N., Chenna R, McGettigan P, McWilliam H, Valentin F, Wallace I, Wilm A, Lopez R, Thompson J, Gibson T, Higgins D, **2007**. *Clustal W and Clustal X version 2.0*, Bioinformatics, 2947-2948
- Lethbak A, Christensen C, Stenderup A, **1970**. *Bacterial Genome Sizes Determined by DNA Renaturation Studies*, Journal of General Microbiology, 377-380
- Lind D, Marchal W, Wathen S, **2005**. *Análisis de la varianza*, En: Estadística aplicada a los negocios y la economía, McGraw-Hill Interamericana, México
- Lisdiyanti P, Kawasaki T, Seki T, Yamada Y, Uchimura T, Komagata K, **2000**. *Systematic study of the genus Acetobacter with descriptions of Acetobacter indonesiensis sp. nov., Acetobacter tropicalis sp. nov., Acetobacter orleanensis (Henneberg 1906) comb. nov., Acetobacter lovaniensis (Frateur 1950) comb. nov. and Acetobacter estunensis (Carr 1958) comb. nov.*, Journal of General and Applied Microbiology, 147-165
- Lisdiyanti P, Kawasaki H, Seki T, Yamada Y, Uchimura T, Komagata K, **2001**. *Identification of Acetobacter strains isolated from Indonesian sources, and proposals of Acetobacter syzygii sp. nov., Acetobacter cibiongensis sp. nov. and Acetobacter orientalis sp. nov.*, Journal of General and Applied Microbiology, 119-131
- Lombard V, Golaconda H, Drula E, Coutinho P, Henrissat B, **2013**. *The carbohydrate-active enzymes database (CAZy)*, Nucleic Acids Research, D490-D495
- López A, **2003**. *La biotecnología en nuestras vidas*, En: La revolución genómica, editado por UAM Xochimilco, México, DF, 11-24
- Meroth C, Walter J, Hertel C, Brandt M, Hammes W, **2003**. *Monitoring in bacterial population dynamics in sourdough fermentation processes by using PCR-denaturing gradient gel electrophoresis*, Applied and Environmental Microbiology, 475-482
- Miller DN, Bryant JE, Madsen EL, Ghiorse WC, **1999**. *Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples*, Applied and Environmental Microbiology, 4715-4724

- Muyanja C, Narvhus J, Treimo J, Langsrud T, **2003**. *Isolation, characterization and identification of Lactic Acid Bacteria form Bushera: a Ugandan traditional fermented beverage*, International Journal of Food Microbiology, 201-210
- De Necochea R, Canul J, **2004**. *Métodos fisicoquímicos en Biotecnología. Secuenciación de ácidos nucleicos*, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos
- Nuraida L, Wachter MC, Owens JD, **1995**. *Microbiology of pozol, a Mexican Fermented Maize Dough*, World Journal of Microbiology and Biotechnology, 567-571
- Olympia M, Fuduka H, Ono H, Kaneko Y, Takano M, **1995**. *Characterization of starch- hydrolizing Lactic Acid Bacteria isolated from a fermented fish and rice food "Burong Isda", and its amyloplitic enzyme*, Journal of Fermentation and Bioengineering, 124-130
- Paredes O, Guevara F, Bello LA, **2006**. *Los alimentos mágicos de las culturas mesoamericanas*, Colección La ciencia para todos, Fondo de Cultura Economica, México, DF.
- Paredes O, Guevara F, Bello LA, **2008**. *La nixtamalización y el valor nutritivo del maíz*, Ciencia, 60-70
- Peano S, Baldwin M, Gallant D, **2009**. *Qualitative and quantitative evaluation of the genomic DNA extracted from GMO and non-GMO foodstuffs with four different extraction methods*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 6962-6968
- Pérez S, Baldwin PM, Gallant DJ, **2009**. *Structural features of Starch Granules I*, En: Starch: Chemistry and Technology, editado por BeMiller J y Whistler R, Elsevier, Burlington, NC, 149-192
- Polz M, Cavanaugh C, **1998**. *Bias in template-to-products ratios in multitemplate PCR*, Applied and Environmental Microbiology, 3724-3730
- Ramírez-Chavarín N, Wachter-Rodarte C, Pérez-Chabela M, **2010**. *Characterization and identification of Thermotolerant Lactic Acid Bacteria isolated from cooked sausages as bioprotective cultures*, Journal of Muscle Foods, 585-596
- Randazzo C, Torriani S, Akkermans A, de Vos W, Vaughan E, **2002**. *Diversity, dynamics and Activity of Bacterial Communities during Production of artesanal Sicilian cheese as evaluated by 16S rRNA analysis*, Applied and Environmental Microbiology, 1882-1892
- Ray B, Bhunia A, **2008**. En: Fundamental Food Microbiology, editado por Ray B, Bhunia A, CRC Press, Boca Ratón, Florida
- Ren X, Zhu R, Warndorff M, Bucheli P, Shu Q, **2006**. *DNA extraction and fingerprinting of commercial rice cereal products*, Food Research International, 433-439

- Rizo J, **2015**, *Estudio proteómico de las hidrolasas del pozol*, Tesis de maestría, Universidad Nacional Autónoma de México, México, DF
- Rodicio M, Mendoza M, **2004**. *Identificación bacteriana mediante la secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica*, Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 238-245
- Rodríguez C, **2011**. *Estudios sobre las interacciones negativas de bacterias lácticas del pozol*, Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México, México, DF
- Rodríguez C, Rodríguez R, Wachter M del C, Díaz G, **2015**. *Método de liberación de la amilasa anclada a célula de Streptococcus infantarius 25124 aislada del pozol*, XVI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Guadalajara, México
- Satoh E, Nimura Y, Uchimura T, Kozaki M, Komagata K, **1993**. *Molecular cloning and expression of two alpha-amylase genes from Streptococcus bovis 148 in Escherichia coli*, Applied and Environmental Microbiology, 3669-3673
- Satoh E, Uchimura T, Kudo T, Komagata K, **1997**. *Purification, characterization and nucleotide sequence of an intracellular maltotriose producing alpha-amylase from Streptococcus bovis 148*, Applied and Environmental Microbiology, 4941-4944
- Schlegel L, Grimont F, Collins M., Régnault B, Grimont P, Bouvet A, **2000**. *Streptococcus infantarius sp. nov., Streptococcus infantarius subsp. nov. And Streptococcus infantarius subsp. coli. Subsp. nov. Isolated from humans and food*, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 1425-1434
- Schmeisser C, Steele H, Streit W, **2007**. *Metagenomics, biotechnology with non-culturable microbes*
- Serna L, Valencia L, Campos R, **2010**. *Cinética de fermentación y acción antimicrobiana de Weisella confusa contra Staphylococcus aureus y Streptococcus agalactiae*, Revista de la Facultad de Ingeniería, 55-65
- Singh J, Behal A, Singla N, Joshi A, Birbian N, Singh S, Bali V, Batra N, **2009**. *Metagenomics: Concepts, methodology, ecological inference and recent advances*, Biotechnology Journal, 480-494
- Steinkraus KH, **1996**. *Handbook of Indigenous Fermented Foods*, Marcel Dekker, New York, NY
- Stephenson F, **2003**. *Quantitation of Nucleic Acids*, En: Calculations in Molecular Biology and Biotechnology, Elsevier Science, San Diego, Ca.
- Turpin W, Humblot C, Guyot J, **2011**. *Genetic screening of functional properties of Lactic Acid Bacteria in a Fermented pearl millet slurry and in the metagenome of fermented starchy foods*, Applied and Environmental Microbiology, 8722-8734

Tyson G, Chapman J, Hugenholtz P, Allen E, Ram R, Richardson P, Solovyev V, Rubin E, Rokhsar D, Banfield J, **2004**. *Community Structure and Metabolism through Reconstruction of Microbial Genomes from the Environment*, Nature, 37-43

Ulloa M, Herrera T, Lappe P, **1987**. *Fermentaciones Tradicionales Indígenas de México*, Instituto Nacional Indigenista, México, DF

van Hijum S, Vaughan E, Vogel R, **2013**. *Application of the state-of-art sequencing Technologies to Indigenous Food Fermentations*, Current Opinion in Microbiology, 178-186

Voytas D, **2000**. *Resolution and recovery of large DNA fragments*, Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 51, John Wiley & Sons, Inc

Wacher C, Cañas A, Cook PE, Bárzana E, Owens, JD, **1993**. *Sources of Microorganisms in Pozol, a Traditional Mexican fermented Maize Dough*, 9: 269-274

Wacher C, **1999**. *El pozol*, Cuadernos de nutrición, 125-127.

Wacher C, Cañas A, Bárzana E, Lappe P, Ulloa M, Owens JD, **2000**. *Microbiology of Indian and Mestizo Pozol Fermentation*, Food Microbiology, 252-256

Wacher-Rodarte C, **2004**. *Alimentos y bebidas fermentados tradicionales*, En: Biotecnología Alimentaria, editado por García Garibay M, Quintero Ramírez R y López-Munguía Canales A, Limusa, México, DF, 313-349

Wintzingerode F, Gobel U, Stackerbrandt E, **1997**. *Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfall of PCR-based rRNA analysis*, FEMS Microbiology Reviews, 213-229

Zobel HF, **1988**. *Molecules to Granules: A Comprehensive Starch Review*, Starch, 44-50

Anexo I

1. Extracción de ácidos desoxirribonucleicos.

Este procedimiento se considera rápido, accesible, obteniendo ADN de alta calidad, ya que la habilidad para extraerlo es crucial para estudiar la genética molecular de un organismo.

El paso inicial en el aislamiento es la ruptura de la pared. Hay diferentes formas de romper la pared celular de los organismos; la más común es congelar el tejido y romperlo mediante fuerzas mecánicas. A pesar del método de ruptura, es importante que el tejido sólo se descongele en presencia de la solución de lisis para prevenir una posible degradación del ADN. Una vez que el ADN esté solubilizado en la solución de lisis con una temperatura alta, el ADN es purificado mediante una serie de centrifugaciones y extracciones con solventes orgánicos y finalmente precipitando en presencia de alcohol (Allen, *et al.*, 2006).

2. Cuantificación de ADN por espectrofotometría

Cualquier experimento que requiera la manipulación de los ácidos nucleicos también requiere de la cuantificación apropiada para asegurar resultados reproducibles. Las bases nitrogenadas absorben la luz ultravioleta a una longitud de onda de 260 nm y es proporcional a la concentración de los ácidos nucleicos. La relación entre la absorción y la concentración de ADN es lineal en 1_{A260} por cada 2 ácidos nucleicos $_{A230}$ (Figura 18) (Stephenson, 2003).

Absorbancia a 230 nm: Indica sales en la muestra

Absorbancia a 260 nm: Detecta específicamente los ácidos nucleicos que componen una solución.

Absorbancia a 280 nm: Detecta la presencia de proteína (los residuos de triptófano absorben a esta longitud de onda).

Absorbancia a 320 nm: Detecta cualquier componente insoluble disperso en la solución.

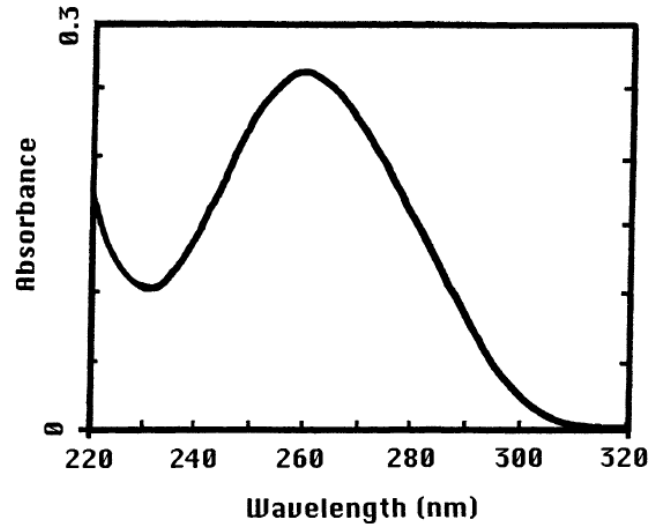


Figura 18. Visualización espectrofotométrica típica para ADN de doble cadena (Stephenson, 2003).

3. Electroforesis de ácidos nucleicos.

Ésta técnica permite separar fragmentos de ADN y cadenas de ARN de distinto tamaño. En general, la electroforesis separa moléculas de una mezcla haciéndolas migrar bajo la influencia de un campo eléctrico. Se coloca la muestra en un gel que a su vez se coloca en una solución conductora de electricidad. Si dos moléculas tienen aproximadamente la misma forma y masa, la que tenga mayor carga neta migrará más rápidamente hacia el electrodo de polaridad opuesta.

A medida que se desarrolló esta técnica, se descubrió que al usar geles de distinto tamaño de poro, la resolución mejoraba de manera significativa, utilizado especialmente para separar moléculas con una relación carga:masa similar, pero de tamaños diferentes. Así, el uso de medios porosos como los geles de poliácridamida o geles de agarosa, proporciona la base para la separación de las moléculas, donde, las moléculas más pequeñas migran a través del gel a una mayor velocidad que las más grandes. La clave de la separación está en la matriz del gel, que restringe más la migración de las moléculas grandes que la migración de las moléculas pequeñas. El poder de resolución es tan grande que pueden separarse con claridad polinucleótidos que se diferencian por un solo nucleótido de longitud. Cuando finaliza la electroforesis, las bandas de las moléculas de distinto tamaño se identifican por autorradiografía o mediante colorantes fluorescentes que se unen a los ácidos nucleicos. El bromuro de etidio (BrEt) es un agente intercalante usado comúnmente como marcador de ácidos nucleicos en laboratorios de biología molecular para procesos como la electroforesis en gel de agarosa. Cuando se expone esta sustancia a luz ultravioleta, emite una luz roja-anaranjada, que se intensifica unas 20 veces después de haberse unido a una cadena de ADN. Este efecto es debido al aumento de la hidrofobicidad del medio, y no a la rigidificación del anillo bencénico, no estando éste entre pares de bases del ADN (Figura 19) (Klug, *et al.*, 2006).

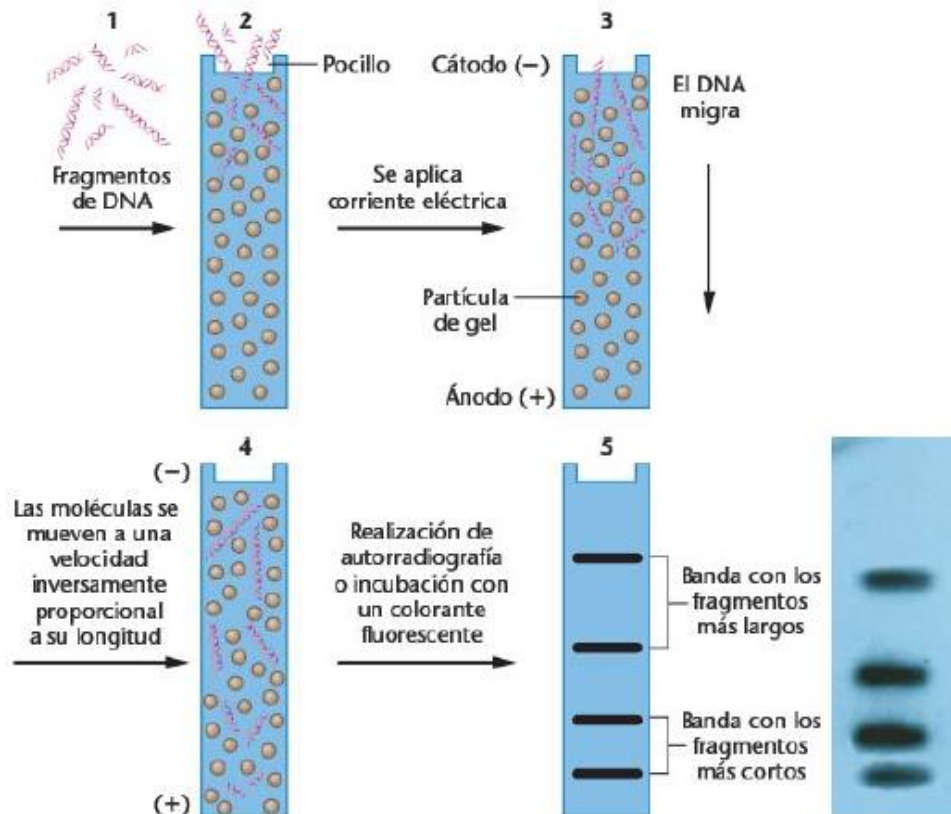


Figura 19. Esquematación de la electroforesis de ácidos nucleicos (Klug, et al., 2006).

4. Fragmento correspondiente a las regiones variables V1 a V6 del gen que codifica la subunidad ribosomal 16S

Los ácidos nucleicos y las proteínas presentes en los seres vivos cambian con el tiempo, y por ello pueden considerarse como cronómetros moleculares. La mayor parte de las bacterias conocidas pueden identificarse mediante técnicas microbiológicas convencionales, que requieren el aislado previo del microorganismo y se basan en características fenotípicas. Sin embargo, existen situaciones en las cuales la identificación con esta metodología no es factible. El ARN ribosómico 16S es la macromolécula más ampliamente utilizada en estudios de filogenia y taxonomía bacteriana; consiste en una cadena polirribonucleótida de aproximadamente 1,500 nucleótidos, codificados por el gen *rrn*, también denominado ADN ribosomal 16S. Presenta una estructura secundaria debido al plegamiento característico de cualquier cadena sencilla.

El análisis de esta molécula ha revelado la presencia de una o más secuencias cortas específicas denominadas oligonucleótidos firma. Estas aparecen en la mayor parte de los miembros de un determinado grupo filogenético, y ocasionalmente están presentes en otros grupos. Por ello se utilizan para ubicar a cada bacteria dentro de su propio grupo.

Aunque existen cronómetros moleculares alternativos al ARNr 16S, hasta el momento ninguno ha conseguido desplazarle. Woese, en 1970, dio a conocer ciertas características para ser considerado como cronómetro molecular definitivo:

1. Se trata de una molécula muy antigua, presente en todas las bacterias actuales, siendo así, un blanco universal para su identificación.
2. Su estructura y función han permanecido constantes durante un tiempo muy prolongado, de modo que las alteraciones en la secuencia reflejan probablemente cambios aleatorios.
3. Los cambios ocurren de manera suficientemente lenta como para aportar información acerca de todos los procariontes.
4. El tamaño relativamente largo de los ARNr 16S minimiza las fluctuaciones estadísticas.
5. La conservación en estructura secundaria puede servir de ayuda en las comparaciones, aportando una base para el alineamiento preciso.
6. Es relativamente fácil secuenciar los ADN 16S, existe una base de datos amplia, en continuo crecimiento.

El método molecular de identificación bacteriana mediante secuenciación del ADNr 16S, incluye tres etapas: amplificación del gen a partir de la muestra apropiada, determinación de la secuencia de nucleótidos del amplicón y el análisis de la secuencia (Rodicio, *et al.*, 2004).

5. Amplificación de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés Polymerase Chain Reaction), es una técnica que copia secuencias específicas de ADN mediante una serie de reacciones *in vitro*, y puede amplificar secuencias templado presentes en cantidades infinitesimales entre una población de otras moléculas de ADN. Inventada por Kary Mullis a mediados de la década de los 80s, las aplicaciones de la PCR y de sus numerosas variantes son prácticamente ilimitadas:

- Permite muchos estudios de expresión genética
- Secuenciación directa de secuencias amplificadas
- Detección de mutaciones
- Seguimiento de la efectividad de tratamiento de enfermedades
- Diagnósticos de enfermedades genéticas e infecciosas
- En ciencia forense: identificación de restos biológicos, determinación de paternidad,
- Pruebas periciales en criminalística

Para realizar una reacción de PCR es necesario preparar una mezcla que contiene los siguientes componentes:

1. ADN templado: en el que se encuentra la región que se va a amplificar.
2. dNTPs (desoxirribonucleósidos trifosfato): dATP, dCTP, dGTP, dTTP.

3. Oligonucleótidos: a partir de los cuales la polimerasa sintetiza las nuevas cadenas, uno para el extremo 5' y otro para el extremo 3' de la secuencia que se quiere amplificar
4. ADN polimerasa: enzima que lleva a cabo la síntesis de las nuevas cadenas.
5. Concentración de magnesio. La optimización de la concentración del ión magnesio tiene grandes ventajas, ya que afecta el alineamiento de los oligonucleótidos, la temperatura de disociación de las cadenas, tanto del templado como del producto, la especificidad del producto, la formación de dímeros de oligonucleótidos y la actividad y fidelidad de la enzima.
6. Otros componentes. Una solución que contenga iones bipolares, KCl para facilitar el alineamiento de los oligonucleótidos, gelatina o albumina bovina y detergentes no iónicos como el tween 20 o laureth 12 son incluidos para ayudar a estabilizar la enzima

En la práctica, la reacción en cadena de la polimerasa implica tres pasos por cada ciclo, donde la cantidad de ADN amplificado que se produce solo está limitada por el número de veces que se repiten estos pasos (Figura 20):

1. El ADN a amplificar se desnaturaliza en cadenas sencillas. Este puede provenir de muchas fuentes, incluyendo ADN genómico, restos fósiles, forenses, etc. El ADN de doble cadena se desnaturaliza en un intervalo de temperatura de 90°C a 95 °C, normalmente 5 minutos
2. Los oligonucleótidos se hibridan al ADN desnaturalizado a una temperatura de 50°C hasta 70°C que sirven como punto de iniciación para la síntesis de nuevas cadenas de ADN complementario al templado
3. A la mezcla se le agrega una polimerasa resistente al calor extendiendo los oligonucleótidos por adición de en dirección 5'-3', haciendo una copia de doble cadena. Este paso se realiza de 70°C a 75°C

Los pasos de desnaturalización, emparejamiento y síntesis se repiten sucesivamente, rindiendo un producto que corresponde a un segmento de ADN de doble cadena cuyos extremos 5' están flanqueados por los oligonucleótidos y cuya longitud viene definida por la distancia entre ellos. El proceso es automático y se lleva a cabo en un termociclador, que puede programarse para realizar un número predeterminado de ciclos, produciendo grandes cantidades de segmentos de ADN amplificado en poco tiempo (Klug, *et al.*, 2006; Cortázar, *et al.*, 2004).

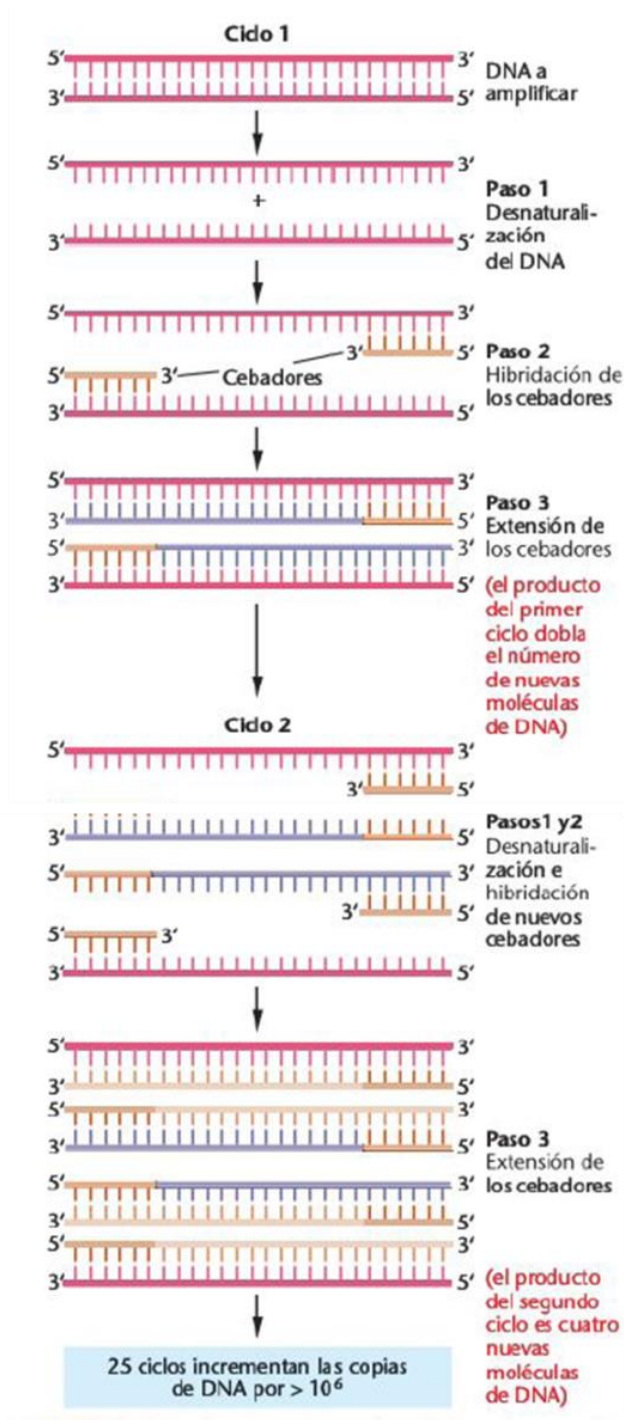


Figura 20. Reacción en cadena de la polimerasa. Pasos necesarios para la amplificación en cada ciclo (Klug, et al., 2006)

5. Secuenciación de ácidos nucleicos

Inicialmente, se pensaba que la secuenciación de los ácidos nucleicos era mucho más difícil que la secuenciación de proteínas, debido a la falta de sustratos puros del tamaño adecuado con los cuales desarrollar los métodos y en parte, a la composición de los ácidos nucleicos.

Después de 1975, se realizó un progreso dramático en la tecnología de la secuenciación de los ácidos nucleicos. Tres avances hicieron esto posible:

1. El descubrimiento de las endonucleasas de restricción, enzimas que cortan ADN de cadena doble en secuencias específicas.
2. El desarrollo de mejores técnicas de secuenciación de ADN.
3. El desarrollo de técnicas de clonación que permitieron la adquisición de un segmento de ADN en las cantidades necesarias para secuenciarlo.

El método de Sanger se basa en el uso de la ADN polimerasa para sintetizar cadenas de con una terminación específica. Con este método se generan fragmentos de todos los tamaños posibles que se puedan distinguir entre sí, por el tipo de marcaje que llevan o por la incorporación de un terminador específico. Entre los componentes de la reacción se incluyen nucleótidos que no tienen un grupo hidroxilo en su extremo 3'(ddNTP), para poder obtener una terminación específica en las cadenas. Una vez que el ddNTP se incorpora como el residuo terminal, evita que la cadena de ADN sintetizada continúe extendiéndose. La incorporación de los ddNTPs es al azar, de tal forma que se obtienen fragmentos de todos los tamaños posibles que terminan en un residuo específico. En el método de Sanger (1977), la estrategia es hacer cuatro reacciones diferentes de síntesis de ADN, utilizando un ddNTP distinto en cada tubo. Con la mezcla del nucleótido normal (dNTP) y el terminador (ddNTP), se pueden generar fragmentos complementarios de diferentes tamaños que terminan en el mismo nucleótido. Después, estos fragmentos se pueden separar en un gel de electroforesis con cuatro carriles distintos, para determinar la secuencia del templado.

Los hallazgos de la década de los 80s (mejores polimerasas, PCR, marcas fluorescentes) contribuyeron al desarrollo de máquinas automatizadas capaces de determinar miles de bases de secuencia por día. Las primeras máquinas de secuenciación salieron a finales de los 80s, basadas en la terminación específica con cuatro diferentes fluoróforos. La mezcla de síntesis se cargaba en un solo carril de gel, en tubo, y se usaba un detector óptico para determinar la absorción de cada banda, casi al final del tubo. Posteriormente, se experimentó con el uso de una máquina que tenía un detector óptico capaz de leer la información de cuatro carriles. En este caso, se reportó que era posible obtener información precisa de más de 400 pb, usando solo un marcador fluorescente y separando las cuatro reacciones. En 1988 se reportó el primer protocolo que usaba marcadores fluorescentes en lugar de isótopos radioactivos, utilizando un marcador que no interfería con la degradación de la molécula de ADN y lograron secuenciar 50 oligonucleótidos de 20 bases cada uno, en un solo gel. En 1994, se reportó el uso de la polimerasa termoestable que es capaz de sintetizar fragmentos grandes con terminación específica. Esto permitió determinar hasta 1000 bases de una secuencia por reacción. Esto fue un gran hallazgo, porque a pesar de los avances en la automatización de la secuenciación la información que se obtenía después de unas 400 bases de secuencia era difícil de interpretar y susceptible a error (de Necochea, *et al.*, 2004).

Anexo II

Soluciones de lisis celular

- Solución SDS 0.5% (Edwards, *et al.*, 1991)

200 mM Tris-HCl pH 7.5

250 mM NaCl

25 mM EDTA

0.5% SDS

- Solución SDS 1.5% (Ren, *et al.*, 2006)

100 mM Tris HCl pH8

50 mM EDTA pH 8

500 mM NaCl

1.5% SDS

0.38% Na_2HSO_3

- Solución CTAB 2% (Ren, *et al.*, 2006)

100 mM Tris HCl pH 8

20 mM EDTA pH 8

1.4 M NaCl

2% CTAB

0.4% β -mercaptoetanol.

1. Soluciones de uso cotidiano

- Solución TE

10 mM Tris-HCl pH 8

1 mM EDTA

- Solución TEN

0.1M NaCl

10mM Tris HCl pH8

1mM EDTA pH8

- Solución TAE 50X

245 g Tris base

57.1 mL ácido acético glacial

100 mL EDTA 0.5M (pH8)

- Solución TS
50mM Tris HCl pH 7.5
25% peso/vol sacarosa

- Medio de cultivo MRS-Almidón (Man, Rogosa y Sharpe)
10 g/L peptona
5 g/L extracto de carne
5 g/L extracto de levadura
20 g/L almidón
2.17 g/L citrato de amonio
5 g/L acetato de sodio trihidratado
0.207 g/L sulfato de magnesio heptahidratado
0.056 g/L sulfato de manganeso hidratado
2.62 g/L fosfato de potasio dibásico

2. Cálculo del índice de degeneración en un oligonucleótido.

Establecidos por la International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) en 1970, la nomenclatura universal para bases degeneradas se ha mantenido para no confundirlas con las bases canónicas (A,T,G,C); son usadas para codificar una secuencia consenso de una población de secuencias alineadas utilizadas en análisis bioinformáticos. Ésta notación está representada en la Tabla 12.

El índice de degeneración en un oligonucleótido representa todas las combinaciones posibles que puede haber del oligonucleótido diseñado.

Tabla 13. Nomenclatura universal para bases incompletamente especificadas.

Código	Nucleótidos representados	Código	Nucleótidos representados
R	A/G	H	A/C/T
Y	T/C	B	C/G/T
W	A/T	V	G/A/C
S	C/G	D	G/A/T
M	A/C	N	A/G/T/C
K	G/T		

Para el fin de este trabajo, es necesario saber cuántas bases están representadas por cada una de las letras de la nomenclatura, ya así, dependiendo de cuántas bases representa cada letra dentro de la nomenclatura en el oligonucleótido degenerado, se puede saber el índice de degeneración.

Ejemplo: El oligonucleótido degenerado contiene las siguientes letras de la nomenclatura en su secuencia:

H,B,W,R,M;

el índice de degeneración es calculado:

$$\begin{aligned} \text{Producto de degeneración} &= [\text{H}(3;\text{representa tres bases})][\text{B}(3;\text{representa tres bases})] \\ &\quad [\text{W}(2;\text{representa dos bases})][\text{R}(2;\text{representa dos bases})] \\ &\quad [\text{M}(2;\text{representados bases})] \\ &= [3][3][2][2][2] = 72. \end{aligned}$$

El índice de degeneración es 72; es decir, el oligonucleótido tendrá 72 secuencias distintas en la mezcla de reacción y solamente 1 de los 72 oligonucleótidos hibridará exactamente con el templado