



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

CARRERA DE BIOLOGÍA

**LEVADURAS Y HONGOS FILAMENTOSOS
AMIOLÍTICOS PRESENTES EN EL POZOL**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

TERESA ELIZABETH MARTÍNEZ OROPEZA

**DIRECTORA DE TESIS : DRA. ROMINA MA. DE
LA PAZ RODRÍGUEZ SANOJA**

**ASESORES INTERNOS :
DR. RODRIGO ANÍBAL MATEOS NAVA
DRA. LUCILA ÁLVAREZ BARRERA**



CIUDAD DE MÉXICO

2021



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: BIÓL. MARCO ANTONIO HERNÁNDEZ MUÑOZ

VOCAL: DRA. ROMINA MA. DE LA PAZ RODRÍGUEZ SANOJA

SECRETARIO: DRA. LUCILA ÁLVAREZ BARRERA

**1er.
SUPLENTE: DR. RODRIGO ANIBAL MATEOS NAVA**

**2DO
SUPLENTE: DRA. CLAUDIA JANETTE DE LA ROSA MERA**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA. ROMINA MA. DE LA PAZ RODRÍGUEZ SANOJA EN EL LABORATORIO C-034 DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA, EN EL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO; CIRCUITO EXTERIOR, CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX. 04510, MÉXICO.

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

Este proyecto fue financiado por la UNAM, proyecto DGAPA IN 223917

A la Universidad Nacional Autónoma de México por ser mi alma máter. En especial a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza y a la carrera de Biología por todo lo aprendido.

Agradezco a la Dra. Romina Ma. de la Paz Rodríguez Sanoja por su apoyo técnico, académico y logístico para la realización de este proyecto, por dirigirlo y permitirme colaborar en su laboratorio.

Agradezco al Dr. Daniel Alejandro Guillén Santos por el apoyo técnico y logístico que hizo posible el desarrollo de este proyecto.

Agradezco a la Dra. Beatriz Ruiz Villafán por su contribución para el enriquecimiento y desarrollo de este proyecto.

Agradezco a la M. en C. Jocelin Marari Rizo Villagrana por el apoyo técnico y sus continuas revisiones para la realización de la presente tesis.

Agradezco al E. en B. Marco Antonio Ortiz Jiménez por su apoyo logístico y técnico para el presente proyecto.

Agradezco a los sinodales del presente proyecto por enviarme revisiones y contribuir en el mismo: Biól. Marco Antonio Hernández Muñoz por las correcciones en el área de micología, al Dr. Rodrigo Aníbal Mateos Nava por ayudarme con la parte de redacción, a la Dra. Lucila Álvarez Barrera y a la Dra. Claudia Janette de la Rosa Mera por sus comentarios.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mis abuelas y abuelos, por haberme cuidado, quererme y apoyarme tanto en todo momento hasta terminar una carrera profesional.

A mi mamá por enseñarme que nada ni nadie deben detenerme.

A mi papá por recordarme que éste era el camino correcto.

A mis hermanos por inspirarme para ser mejor cada día.

A mi compañero de vida, L, por el apoyo, el amor y los 23.

A toda mi familia por apoyarme en este sueño que es la Biología para mí. Gracias a todas mis tías y primos.

A los que partieron, pero vivirán siempre con nosotros.

A todos mis amigos del laboratorio C-034 del Instituto de Investigaciones Biomédicas: a la Dra. Romina por enseñarme tanto y por la confianza, Joce, muchas gracias por tu apoyo incondicional, todas las enseñanzas y la paciencia, al Dr. Daniel por el apoyo en las técnicas y aclarar mis dudas, a Carlos por el apoyo y la música, a Alma por estar ahí, a Cat, a Nath, Ale, la Dra. Andrea Moreno por sus comentarios y su apoyo, gracias a todos por recibirme y mostrarme un lugar increíble para aprender.

A todos los amigos de la carrera que me ayudaron a través del tiempo, a los que siguen estando aquí y a los que siempre les agradeceré, aunque ya no nos frecuentemos.

A todos, muchas gracias.

“Tener acceso a la ciencia es rejuvenecer espiritualmente, es aceptar una mutación brusca que ha de contradecir a un pasado”

GASTON BACHELARD

La formación del espíritu científico (1948)

ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS

RESUMEN

CONTENIDO

I.	INTRODUCCIÓN	11
II.	ANTECEDENTES	13
	2.2 <i>El Pozol</i>	16
	2.2.3 <i>Elaboración del Pozol</i>	17
	2.3 <i>Maíz y nixtamalización</i>	18
	2.4 <i>El almidón</i>	20
	2.5 <i>Amilasas</i>	21
	2.5.1 <i>Amilasas fúngicas</i>	22
	2.6 <i>Microorganismos del pozol</i>	22
	2.6. 1 <i>Microorganismos amilolíticos en el pozol</i>	25
III.	JUSTIFICACIÓN	27
IV.	OBJETIVOS	28
	<i>General</i>	28

<i>Particulares</i>	28
V. MATERIALES Y MÉTODOS	29
5.1 <i>Descripción de la muestra</i>	30
5.2 <i>Identificación de actividad amilolítica</i>	30
5.3 <i>Caracterización macroscópica de cepas positivas</i>	31
5.4 <i>Caracterización microscópica de cepas positivas</i>	31
5.5 <i>Extracción de DNA genómico</i>	31
5.6 <i>Amplificación de ITS mediante PCR</i>	33
5.8 <i>Identificación taxonómica de los hongos</i>	36
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
a) <i>Identificación de actividad amilolítica</i>	38
b) <i>Caracterización macroscópica</i>	40
c) <i>Caracterización microscópica</i>	43
d) <i>Extracción de DNA genómico</i>	53
e) <i>Pureza de DNA</i>	54
f) <i>Amplificación de regiones espaciadoras transcritas internas (ITS)</i>	54

<i>g) Análisis de las secuencias de los aislados amilolíticos.....</i>	<i>57</i>
<i>h) Construcción de árbol filogenético</i>	<i>64</i>
VII. CONCLUSIONES	68
VIII. PROSPECTIVAS.....	69
ANEXO I.....	77
<i>a) Medio para hongos (Okeke et al., 2015)</i>	<i>77</i>
<i>b) Soluciones para extracción de DNA genómico</i>	<i>77</i>

ABREVIATURAS

D	Diámetro
DGGE	Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante
Fw	Forward
g	Gramo
h	Horas
ITS	Regiones espaciadoras transcritas internas
Kg	Kilogramo
L	Litro
min	Minutos
ng	Nanogramos
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
rpm	Revoluciones por minuto
Rv	Reverse
S	Unidad Svedberg
UFC	Unidades formadoras de colonia

RESUMEN

El pozol es una bebida tradicional de maíz fermentado, originaria del sureste de México y Centroamérica. Es utilizado principalmente como bebida refrescante, pero también para tratar algunas enfermedades, especialmente gastrointestinales. Uno de los pasos que involucra la elaboración del pozol es la nixtamalización, proceso en el cual la sacarosa y los demás azúcares libres se reducen dejando al almidón como el principal sustrato disponible para el crecimiento de diversos microorganismos, lo que hace suponer que en este sustrato deben existir muchos microorganismos amilolíticos o cuando menos unos pocos muy amilolíticos, capaces de hidrolizar el almidón a maltooligosacáridos utilizables por la microbiota no amilolítica.

En el pozol se desarrolla una microbiota abundante y diversa, que incluye bacterias y hongos. Hasta el momento, la mayoría de los estudios realizados se enfocaron en la descripción y caracterización de las bacterias ácido lácticas presentes. Se reportó al género *Streptococcus* como el más abundante en la fermentación y probablemente como el encargado de hidrolizar al almidón. Sin embargo, se ha comprobado que estas bacterias son pobremente amilolíticas, y en consecuencia parece poco probable que sean las responsables de poner a disposición los azúcares solubles. Siendo los hongos, especialmente los filamentosos, reconocidos por su capacidad de producir grandes cantidades de amilasas, el objetivo de este trabajo fue identificar a los hongos amilolíticos presentes en la masa de pozol a diferentes tiempos de fermentación.

Los resultados muestran a una levadura en todas las horas de fermentación: *Candida tropicalis*, mientras que *Trichosporon asahii* y *Pichia kudriavzevii* aparecen únicamente entre las 24 y 48 h respectivamente. Otro género encontrado en todas las horas de fermentación perteneciente a los hongos filamentosos es *Cladosporium*. Aunque se realizó la búsqueda en bases de datos sobre enzimas amilolíticas que estuvieran reportadas para estas especies, no se encontraron, lo cual puede explicarse por los pocos genomas que se tienen de estos microorganismos.

I. INTRODUCCIÓN

El pozol es una bebida de origen maya elaborada con masa de maíz fermentado. Actualmente se consume en el sureste de México, principalmente en Tabasco y Chiapas donde forma parte de la alimentación diaria y es utilizada también en la medicina tradicional para tratar diarreas y como cataplasma en heridas superficiales (Ulloa et al.,1987).

El pozol (del náhuatl *pozolli*; espumoso) se prepara con masa de maíz nixtamalizado (ya sea blanco, amarillo o negro) que se deja fermentar por tiempos que varían considerablemente en función del gusto del consumidor, desde horas hasta días (3 a 7 días), pero puede incluso llegar a ser de hasta un mes. Las bolas de maíz fermentado se toman disueltas en agua durante la comida, el trabajo o a cualquier hora del día como una bebida refrescante (Wacher, 2014).

El almidón es el principal carbohidato en la masa de maíz nixtamalizado, ya que este proceso elimina prácticamente todos los azúcares solubles presentes en el grano. Estudios previos en el pozol han demostrado que esta fermentación cuenta con una microbiota compleja, la cual incluye hongos filamentosos, levaduras y bacterias de diferentes tipos, especialmente bacterias ácido lácticas sobre las que se han centrado la mayoría de los estudios (Wacher *et al.*, 2000). De acuerdo con Díaz-Ruíz *et al.*, (2003), las bacterias ácido lácticas predominantes en la fermentación del pozol corresponden al género *Streptococcus*, sin embargo, su capacidad de hidrolizar el almidón es baja, por lo cual es poco probable que liberen azúcares solubles que puedan ser utilizados por la microbiota no amilolítica del sistema.

Otro grupo importante en la fermentación es el de los hongos, pero prácticamente no se sabe nada de ellos. Aunque hay estudios que mencionan la presencia de estos microorganismos y su capacidad para crecer en medios con almidón (Nuraida *et al*, 1995; Ben y Ampe, 2000), no se identificó si los aislados corresponden a una o varias especies ya que no se realizó una caracterización fenotípica o genotípica de estos, tampoco se investigó si los hongos aislados eran realmente capaces de

hidrolizar el almidón, por lo cual el objetivo de este trabajo es realizar la caracterización morfológica e identificación molecular de los hongos aislados a diferentes tiempos de fermentación para contribuir al conocimiento de las especies que interactúan en este alimento.

II. ANTECEDENTES

2.1 Alimentos fermentados

Los alimentos y bebidas fermentadas son el resultado de la transformación de un sustrato, que mediante la actividad metabólica de diversos microorganismos conduce a la obtención de un producto apto para el consumo humano (Steinkraus, 1983).

Al final de la fermentación, los metabolitos antimicrobianos, la producción de bacteriocinas y la síntesis de ácidos orgánicos inhiben los patógenos transmitidos por los alimentos y mejoran las características organolépticas de los alimentos, lo que aumenta sus beneficios para la salud y su vida útil. Básicamente, la comida fermentada es una parte integral de la dieta diaria de los humanos en todo el mundo y juega un papel importante en varias prácticas tradicionales (Sankaranarayanan *et al.*, 2020).

Las fermentaciones que se producen de forma tradicional se obtienen espontáneamente, es decir, no se añade inóculo, sino que actúan los microorganismos naturalmente presentes en el alimento y el medio. Al ser el maíz base de la dieta del mexicano desde la época prehispánica, se ha desarrollado una variedad importante de alimentos fermentados con esta planta como sustrato. En el cuadro 1 se muestran algunos ejemplos de estos alimentos.

Cuadro 1. Alimentos fermentados de maíz consumidos actualmente en México. (Wacher, 1995; Cruz y Ulloa, 1973. Modificado de Caporal, 2014; Martínez 2019)

Nombre	Descripción
Atole agrio	Del náhuatl " <i>xocoatolli</i> ", atole agrio. Es preparado con masa agria mezclada con maíz blando y molido. La masa agria, que actúa como fermento, es preparada con masa de maíz negro fermentado durante 4 ó 5 días. Consumido en San Luis Potosí, Veracruz, Hidalgo, Puebla, Guerrero, D. F., Tlaxcala Michoacán, Jalisco y Oaxaca.
Chilote	Bebida alcohólica, los granos de maíz se muelen con miel y caña de azúcar, la mezcla se cuece y se fermenta.
Charagua	Bebida alcohólica a base de pulque rezagado, al cual se le añade almíbar, chile ancho y hojas de maíz tostadas. Se calienta lentamente y se deja fermentar. Se consume en San Luis Potosí, Veracruz, Puebla, Guerrero, Ciudad de México.
Mejenje	Bebida alcohólica, los granos se mezclan con hojas de maíz, piloncillo, agua y pulque. Se añaden rebanadas de plátano y piña con canela. Se fermenta tres días.
Tepache	Bebida preparada con granos de maíz y piloncillo, dejándose fermentar con cierta cantidad de agua. Es ingerida por los indígenas de los estados de Oaxaca y Guerrero, tales como los mixtecos, amuzgos, zapotecos, chinantecos, y en el estado de Sonora la toman los pápagos.
Tokere	Bebida alcohólica de los purépechas de Michoacán. Los elotes macizos se cuecen con sal, se orea, se muele en metate, se filtra, se hierve y se deja en reposo 15-20 días.
Pozol	Bebida no alcohólica del sureste. El maíz se nixtamaliza, se fermenta durante horas o días y después se consume disolviendo las bolas de masa en agua.

Nombre	Descripción
Cuaruapa	Es una bebida preparada con el zumo de caña de maíz puesto en infusión con "palo de timbre" (<i>Acacia angustissima</i> Mill.) y panocha; fue muy popular durante la época colonial en Tehuacán, Puebla.
Ostoché u Ostochi	(del náhuatl " <i>cuatl</i> ", caña de maíz y " <i>octli</i> ", vino). Es una bebida fermentada del jugo de caña de maíz con pulque o panocha, preparada por los indígenas de la parte central de México
Sendeché	La preparación actual del sendechó consiste en poner una cierta cantidad de maíz generalmente rojizo, en un hoyo en la tierra, fuera de la vivienda cubriendo previamente las paredes con hojas de "ocote" (ocóshale). El maíz es regado con agua tibia y cubierto nuevamente con "ocóshale" y tierra, permaneciendo así durante 4 o 5 días hasta que germine; después es secado al sol durante 3 o 4 días y molido en metate para obtener un polvo que es batido con agua en una olla de barro; se le agrega chile "pasilla" molido y una vez mezclado es hervido y puesto a fermentar, añadiendo una sustancia que ayuda a esta finalidad y que es denominada "pie" (el pie puede ser pulque altamente fermentado). Una vez fermentado durante 4 o 5 días, puede ser bebido; su color es ligeramente rojizo y su sabor ácido.
Tesgüino o Tejuino	Del náhuatl " <i>tecuin</i> ", palpitar el corazón. Es una bebida embriagante propia de los indios tarahumares, siendo consumida también por los indígenas del norte y noroeste del país como yaquis, tarahumares, pimas, tepehuanos y huicholes (Pennington, 1963). Aparentemente, el nombre más correcto dado por los tarahumares para denominar al tesgüino es "sugiki", aunque también es usado el de "batari". El uso de los términos "paciki" y "batari" se explica fácilmente ya que son los ingredientes de la bebida. Paciki es el elote de maíz y el nombre del tesgüino preparado con el zumo de los tallos de maíz. Batari es el nombre

que le dan a la corteza de ciertas especies de rubiáceas y que son usadas como catalizadores. Para preparar una jarra grande de sugiki con maíz suave, son puestos cerca de 10 kilos de maíz en canastos pequeños y colocados en un rincón oscuro de la vivienda del indio. El maíz duro es remojado durante varios días y colocado en un cesto o también en un hoyo en la tierra hasta que germine. La característica principal en el proceso es proteger al maíz de la luz; el maíz germinado en el sol produce brotes verdes y amargos. Una vez germinado el maíz es molido y después hervido hasta que la mezcla sea de color amarillo, usualmente después de 8 horas de hervido. Este líquido es llevado a otro recipiente y se le adiciona uno o más catalizadores: *Randia echinocarpa* Moc. y Sessé, *Randia watsoni* Robinson y *R. laegivata* Standl. y "kaya" (*Coutarea pterosperma* S. Wats. Standl.), las cuales son cortadas, molidas, humedecidas y puestas a calentar por muchas horas en una olla antes de ser añadidas al tescüino.

2.2 El Pozol

El pozol es una bebida de maíz que se consume en el sureste de México y en algunos países de Centroamérica. Se puede consumir recién elaborado o con varios días de fermentación. Tradicionalmente se consume solo (pozol blanco), aunque es común agregarle cacao o coco (Jiménez Vera *et al.*, 2010).

Se ha utilizado desde la época prehispánica como ofrenda en diversas ceremonias las cuales están estrechamente relacionadas con la cosecha, principalmente con la del maíz, pero también su uso se ha vinculado con fines medicinales para controlar diarreas, adicionado con miel de abejas se usa para reducir la fiebre, y los mayas preparan cataplasmas de pozol enmohecido para curar infecciones superficiales (Ulloa *et al.*, 1987).

2.2.1 Elaboración del Pozol

1) Limpieza del maíz: Tiene como finalidad eliminar el material extraño y granos dañados. Para ello, comúnmente se agrega agua al maíz crudo, se deja reposar unos minutos y se elimina todo lo que flota, que es maíz picado y cascarillas.

2) Nixtamalización: Del náhuatl *nextli* (“cenizas de cal”) y *tamalli* (masa de maíz cocido), consiste en mezclar una parte de maíz con dos a tres partes de agua hirviendo con Ca(OH)_2 (hidróxido de calcio) de 1 al 2%, con base en el peso del grano, esta mezcla se cuece de 40 a 120 min y se drena el agua de cocción o “nejayote” (Serna-Saldívar, Gómez, Rooney, 1990).

3) Lavado y molienda: El maíz nixtamalizado es lavado a mano con agua con el fin de eliminar la cal y la cascarilla; los granos se dejan en remojo toda la noche para aumentar la retención de humedad y evitar que el maíz se seque durante la molienda. Los granos son molidos en un molino manual para obtener la masa, la cual se moldea en forma de bolas que pueden pesar desde 15 g hasta un 1 kg.

El proceso de la molienda libera al almidón del endospermo y reduce su cristalinidad. Durante el enfriamiento de la masa, el almidón se reasocia formando también complejos amilosa-lípidos (Paredes-López *et al.*, 2009).

4) Fermentación. La masa se cubre con una tela y se deja fermentar algunas horas o hasta semanas en función del gusto del consumidor. Una vez que la masa se ha fermentado se suspende en agua y se obtiene la bebida, a la cual se le puede adicionar sal, azúcar, canela, miel, cacao o chiles secos. Cuando el pozol se trasladaba para servir como alimento en el campo, durante las jornadas de trabajo, las bolas eran envueltas en hojas de plátano para evitar la desecación de la masa (Wacher *et al.*, 2000; Cañas *et al.*, 1993).

2.3 Maíz y nixtamalización

a) El maíz

El maíz, cuyo nombre científico es *Zea mays*, perteneciente a la familia *Poaceae*, es un pasto alto anual, de tallo único aproximadamente de 1.1 m de alto, las hojas miden aproximadamente 50-10 cm de largo y 3-7 cm de ancho. El fruto del maíz es la cariósida. El pericarpio y testa se fusionan para formar la pared del grano. El grano está compuesto de tres partes: germen, endospermo y pericarpio (figura 1). Cada mazorca contiene alrededor de 200-400 granos los cuales pueden variar de color negro, gris azulado, morado, verde, rojo, blanco y amarillo (Lim, 2013).

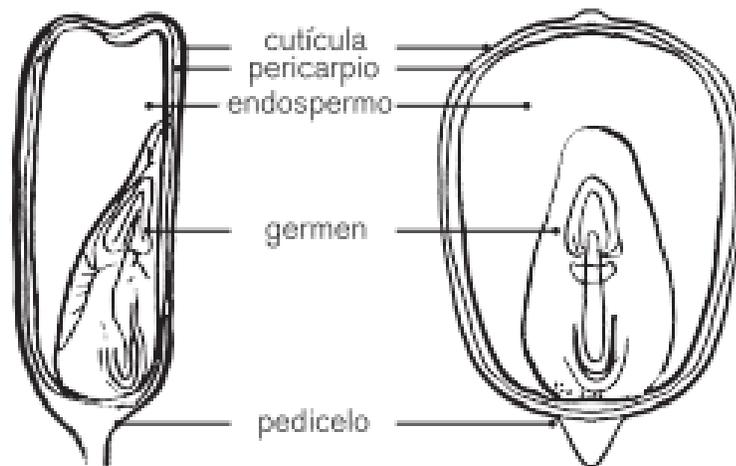


Figura 1. Componentes del grano del maíz. Tomado de Paredes-López *et al.*, 2009.

El pericarpio es la capa más externa y se compone principalmente de fibra hemicelulosa (67-70%), celulosa (23%) y lignina (0.1%); entre los componentes secundarios se encuentran el almidón (7%), proteínas (1.4%), lípidos (1%) y azúcares (0.5%) (Caporal Flores, 2014; Lim, 2013)

El endospermo está compuesto por células que contienen gránulos de almidón embebidos en una capa continua de proteínas. La pared de las células consiste de β -glucanos, arabinosilanos, proteínas y ácidos fenólicos, también de pigmentos llamados antocianinas que confieren colores característicos a los granos de ciertas variedades como azul, rojo o púrpura.

Las proteínas del endospermo están divididas en prolaminas llamadas zeínas, glutelinas, albúminas y globulinas (Caporal Flores, 2014; Lim, 2013). La mayor parte de los lípidos están contenidos en el germen que tiene además un alto grado proteico (Paliwal, 2001). En el cuadro 2 se muestran el peso y la composición de las distintas partes del grano de maíz.

Cuadro 2. Peso y composición de las distintas partes del grano de maíz, modificado de FAO, 2001.

Peso y composición de las distintas partes del grano de maíz				
Composición %	Endospermo	Embrión	Pericarpio	Escutelo
Almidón	87.6	8.3	7.3	5.3
Grasas	0.8	33.2	1.0	3.8
Proteínas	8.0	18.4	3.7	9.1
Cenizas	0.3	10.5	0.8	1.6
Azúcares	0.6	10.8	0.3	1.6
Resto	2.7	18.8	86.9	78.6

b) Nixtamalización

Cuando el maíz nixtamalizado se muele pierde su estructura debido a que los componentes del grano fueron acondicionados por la cocción y el remojo. La masa resultante de la molienda consiste en fragmentos de germen, residuos del pericarpio y endospermo unidos por el almidón parcialmente gelatinizado, y por las proteínas y los lípidos emulsificados (Paredes-López *et al.*, 2009).

En cuanto a los cambios que el almidón sufre durante la nixtamalización, ésta retarda la gelatinización del mismo debido a la aparente interacción de la amilosa con el calcio. El almidón de maíz alcanza un bajo grado de gelatinización por efecto de la nixtamalización, lo que contrasta con la creencia anterior de que se gelatinizaba completamente por efecto de la cocción alcalina que se lleva a cabo en dicho proceso. Posterior al cocimiento, el almidón se retrograda, es decir, se

recristaliza o re asocia para formar nuevas estructuras, durante el tiempo en el que el grano permanece en remojo (Paredes -López *et al.*, 2009).

En la elaboración del pozol después de la nixtamalización, la concentración de mono y disacáridos se reduce considerablemente, quedando a una concentración de 0.1 a 0.7 g /100 g de masa seca, lo que provoca que este sistema quede conformado por el almidón como única fuente de carbono para llevar a cabo la fermentación.

2.4 El almidón

El almidón se encuentra ampliamente distribuido en los diversos órganos de las plantas como carbohidrato de reserva. Es también componente de una gran cantidad de alimentos, la fuente más importante de carbohidratos de la alimentación humana. Además, los almidones y sus derivados tienen gran importancia en diferentes ramas de la industria, incluyendo la alimentaria, textil y papelera (Belitz y Grosch, 1997).

Estructuralmente es un polímero de glucosas unidas entre sí mediante un enlace glucosídico. Hay dos polímeros de glucosa presentes en el almidón: amilosa y amilopectina. Estas tienen diferentes estructuras y propiedades. La amilosa es un polímero lineal que consta de hasta 6000 unidades de glucosa con enlaces glucosídicos α - 1,4. La amilopectina consiste en cadenas lineales de 10-60 unidades de glucosa unidas por enlaces α - 1,4 unidos en α - 1,6 a cadenas laterales con 15-45 unidades de glucosa (figura 2) (Amaya-Pinos, 2019; Souza Monteiro y Maghales, 2010).

Los gránulos de almidón se sintetizan en los amiloplastos, son sencillos o complejos, están formados por capas concéntricas o excéntricas de distinto espesor y tienen tamaño (2-150 μ m), distribución de tamaños y formas variables. El 70% aproximado de la masa de un gránulo se considera almidón amorfo y el 30% cristalino (Belitz y Grosch, 1997).

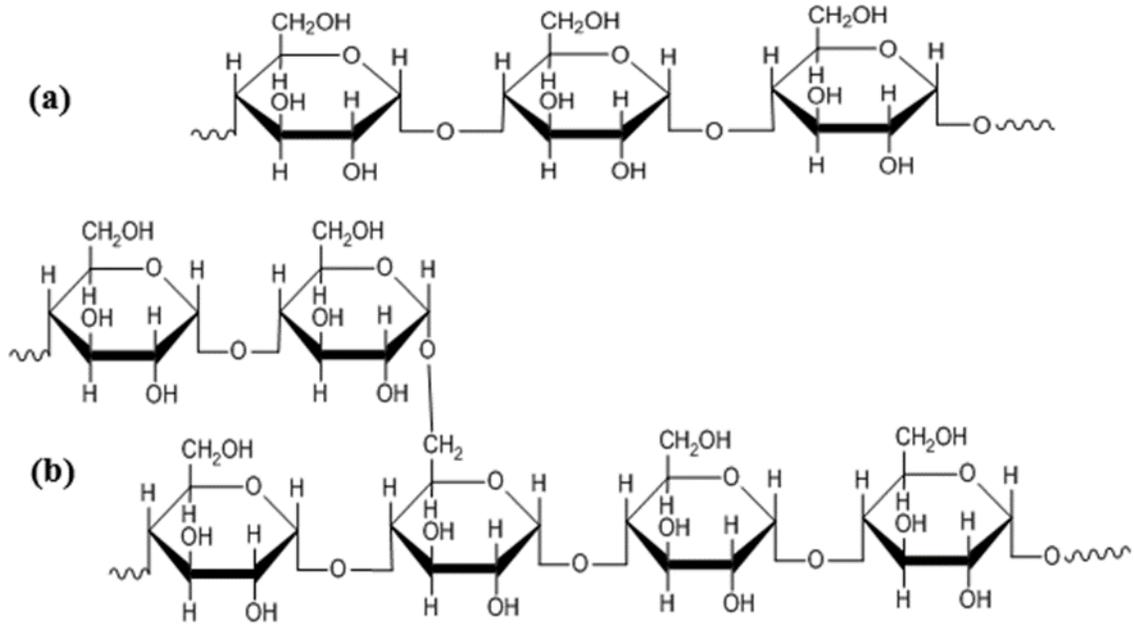


Figura 2. Amilosa (A) y amilopectina (B), las dos estructuras que conforman al almidón. Tomada de Amaya-Pinos (2019).

2.5. Amilasas

Las amilasas son enzimas que hidrolizan moléculas de almidón para obtener diversos productos que incluyen dextrinas y polímeros progresivamente más pequeños compuestos por unidades de glucosa; están ampliamente distribuidas en los microorganismos, las plantas y los animales. Estas enzimas pueden dividirse en dos categorías: endoamilasas y exoamilasas. Las endoamilasas catalizan la hidrólisis de forma aleatoria en el interior de la molécula de almidón. Esta acción provoca la formación de oligosacáridos lineales y ramificados de varias longitudes de cadena. Las exoamilasas hidrolizan desde el extremo no reductor, dando como resultado productos cortos. Hoy en día se conocen un gran número de enzimas que hidrolizan la molécula de almidón en diferentes productos y se requiere la acción combinada de varias enzimas para hidrolizar el almidón por completo. (Gupta *et al.*, 2003; Aiyer, 2005).

2.5.1 Amilasas fúngicas

Los hongos generalmente producen tres tipos de enzimas amilolíticas: α -amilasas, glucoamilasas y α -glucosidasas. Las α -amilasas actúan sobre los enlaces α -1,4 glucosídicos con la endohidrólisis de las largas cadenas de polisacáridos transformándolas en maltooligosacáridos más cortos y dextrinas. Las aplicaciones comerciales de las α -amilasas fúngicas de cepas representativas como *Aspergillus niger* y *Aspergillus oryzae* son numerosas y se considera que el mayor volumen se utiliza para hidrolizar el almidón en el proceso de licuefacción en las industrias azucarera, alcohólica y cervecera (Chen *et al.*, 2012). Estas son unas de las enzimas más importantes, cuyo espectro de aplicaciones se ha ampliado en muchos sectores, por ejemplo, la industria alimentaria, panadera, elaboración de cerveza, detergentes, papel y destilación (Saranraj y Stella, 2013).

Las glucoamilasas, también conocidas como γ -amilasas, catalizan la hidrólisis de los enlaces glucosídicos α -1,4 y α -1,6 para liberar β -D-glucosa desde los extremos no reductores del almidón, los poli y oligosacáridos relacionados. Industrialmente, las glucoamilasas se producen a partir de hongos filamentosos, *Aspergillus* spp y *Rhizopus* spp., cuya principal aplicación comercial es hidrolizar el almidón para producir glucosa (sacarificación de almidón) para su uso en las industrias de alimentos y fermentación (Chen *et al.*, 2012).

Por otro lado, las α -glucosidasas hidrolizan los enlaces α -1,4 y/o α -1,6 de los sacáridos para liberar α -D-glucosa del extremo no reductor. Las α -glucosidasas empleadas para fines comerciales son producidas por *Aspergillus* spp., y *Mucor* spp. (Papagianni, 2004).

2.6 Microorganismos del pozol

Para entender la presencia y el crecimiento de los microorganismos en los alimentos se reconoce en la actualidad la importancia de su estudio con un enfoque ecológico. Los conceptos ecológicos constituyen las bases tanto para el control de microorganismos indeseables como para el uso racional de microorganismos en la producción de alimentos y bebidas fermentadas y para su uso como probióticos (Díaz-Ruíz; Wachter, 2003).

Aunque la inoculación de la masa no está controlada, sorprendentemente, los consumidores de pozol parecen obtener un producto similar con respecto a la apariencia y el sabor cada vez que lo preparan. Esto indicaría que el proceso de fermentación debe ser llevado a cabo por ciertos tipos de microorganismos que son favorecidos por la composición química del sustrato y los factores ambientales involucrados en dicho proceso (Ulloa, 1974).

En el pozol se desarrolla una gran diversidad de microorganismos: bacterias, hongos filamentosos y levaduras en alta abundancia. En la mayoría de los alimentos en los que ocurre una fermentación láctica natural tienden a predominar las bacterias ácido lácticas (BAL); sin embargo, es común encontrar otro tipo de bacterias como las enterobacterias. Éstas en general no son capaces de sobrevivir a valores bajos de pH. También se encuentran mohos y levaduras, que en general pueden desarrollarse a valores bajos de pH (González Pillado, 2018).

Actualmente se sabe que el uso de los métodos convencionales para la identificación de cada uno de sus miembros resulta insuficiente, ya que no todos los microorganismos son cultivables en condiciones de laboratorio, por lo que una alternativa útil es la extracción de ácidos nucleicos directamente del alimento (Díaz-Ruiz *et al.*, 2003).

Mediante técnicas tradicionales de cultivo y de métodos independientes de cultivo como secuenciación de RNA 16 S y DGGE se ha reportado que las bacterias lácticas son el grupo predominante que conforma la microbiota del pozol y entre ellas, los géneros más abundantes son: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Weisella* (Wacher *et al.*, 1993; Nuraida *et al.*, 1995; Ampe *et al.*, 1999; Ben Omar., 2000; Escalante *et al.*, 2001; Díaz-Ruiz., 2003) Los microorganismos que alguna vez han sido reportados en el pozol se muestran en el cuadro 3.

Cuadro 3. Microorganismos aislados del pozol.

Hongos y levaduras	Bacterias no ácido lácticas	Bacterias ácido lácticas
<i>Alternaria tenuis</i>	<i>Acetobacter spp.</i>	<i>Enterococcus sacharolyticus</i>
<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Acinetobacter spp.</i>	<i>Enterococcus sulfureus</i>
<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Aerobacter aerogenes</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
<i>Candida guilliermondi</i>	<i>Agrobacterium azotophilum</i>	<i>Lactobacillus Alimentarius</i>
<i>Candida krusei</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Lactobacillus brevis</i>
<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Bacillus lentus</i>	<i>Lactobacillus casei</i>
<i>Candida tropicalis</i>	<i>Bacillus minimum</i>	<i>Lactobacillus coprophilus</i>
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	<i>Bacillus mycoides</i>	<i>Lactobacillus crispatus</i>
<i>Epicoccum sp.</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Lactobacillus curvatus</i>
<i>Fusarium moniliforme</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
<i>Geotrichum candidum</i>	<i>Clostridium spp.</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>
<i>Hansenula fabianii</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Lactobacillus pentosus</i>
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
<i>Monilia sitophila</i>	<i>Enterobacter agglomerans</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
<i>Mucor rouxianus</i>	<i>Escherichia fergusonii</i>	<i>Lactococcus raffinolactis</i>
<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	<i>Exiguobacterium aurantiacum</i>	<i>Leuconostoc argentum</i>
<i>Penicillium claviforme</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Leuconostoc citreum</i>
<i>Penicillium cyclopium</i>	<i>Paracolobacterium aerogenoides</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
<i>Penicillium expansum</i>	<i>Pseudomonas mexicana</i>	<i>Streptococcus infantarium</i>
<i>Penicillium italicum</i>	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Weisella confusa</i>
<i>Penicillium lanosoviride</i>	<i>Sphingomonas spp.</i>	<i>Weisella paramesenteroides</i>
<i>Phialophora richardsiae</i>	<i>Xantomonas spp.</i>	
<i>Rhizopus nigricans</i>		
<i>Sacharomyces cerevisiae</i>		
<i>Trichoderma viride</i>		
<i>Trichosporum cutaneum</i>		

Tomado de Leiva, 2018 (Recopilado de: Díaz et al. 2003, Escalante et al. 2001, Ben Omar y Ampe 2000, Ampe et al. 1999, Nuraida et al. 1995, Miguel Ulloa et al. 1987, Miguel Ulloa y Kurtzman 1975).

Existen varias especies de levaduras y mohos que están casi siempre presentes en muestras de pozol, lo que podría estar relacionado con el tipo de sustrato y con las condiciones ambientales que prevalecen en los lugares donde se prepara este alimento. Así, *Geotrichum candidum*, *Trichosporon cutaneom* y varias especies de *Candida* están con frecuencia asociados al pozol de pocas horas de fermentación, mientras que algunos mohos, como *Cladosporium cladosporioides* o *Cladosporium herbarum*, *Monilia sitophila* y *Mucor rouxianus* aparecen en el pozol cuando su superficie se va secando y su pH va disminuyendo (Ulloa *et al.*, 1987).

En un estudio reciente del grupo de trabajo, Martínez (2019) encontró que durante las primeras etapas de la fermentación del pozol, los hongos y levaduras presentan cuentas bajas (4.3×10^4 UFC/g de masa), sin embargo, se observa un rápido crecimiento después de las 9 h de fermentación, siendo a las 48 h en donde se detecta la cuenta más alta (7.7×10^7 UFC/g de masa); esto concuerda con un estudio de Ben Omar y Ampe (2000) en el cual se encontró que el número de levaduras y hongos aumentó con el tiempo de fermentación. Las levaduras alcanzaron su concentración máxima (10^8 UFC/g) en la periferia a las 24 h, pero la concentración continuó aumentando en el centro después de 4 días de incubación. Los hongos alcanzaron su concentración máxima (10^8 UFC/g) a las 48 h en la periferia, pero no se detectaron antes de las 72 h en el centro.

2.6. 1 Microorganismos amilolíticos en el pozol

La presencia de microorganismos amilolíticos en el pozol es muy importante ya que, siendo el almidón el principal sustrato para que se lleve a cabo la fermentación, son ellos los responsables de hidrolizarlo y de liberar azúcares solubles que serían entonces utilizados por los microorganismos no amilolíticos como sustratos para su crecimiento (Rizo, 2012).

Se ha reportado que el 40% de las bacterias ácido lácticas presentes en la masa inicial son amilolíticas, siendo predominantes las bacterias del género *Streptococcus*, entre estas la más amilolítica fue identificada como *Streptococcus bovis*, actualmente *Streptococcus infantarius ssp infantarius* (Díaz-Ruiz, *et al.*, 2003). La cepa se caracterizó por tener un bajo rendimiento de amilasa relativo a la

biomasa [$139 \text{ U (g células secas)}^{-1} \text{ h}^{-1}$], una alta velocidad específica de crecimiento (0.94 h^{-1}) y una conversión eficiente de sustrato en biomasa [$0.31 \text{ g biomasa (g sustrato)}^{-1}$]. Estos datos, comparados con los de otras bacterias lácticas amilolíticas como *Lactobacillus* indican que, a pesar de ser el más amilolítico en la masa, *Streptococcus infantarius* es pobremente amilolítico. Del mismo modo, la mitad de las levaduras aisladas del pozol muestran actividad amilolítica, que se reporta en el artículo como baja, pero nunca se cuantifica, ni se identifica a las levaduras, de manera que no se puede estimar el número de especies amilolíticas (Nuraida *et al.*, 1995). En cuanto a los hongos filamentosos no hay reportes en la literatura.

En el grupo de trabajo se aislaron microorganismos presentes en el pozol a distintos tiempos de fermentación (0, 9, 24 y 48 h). Se formó un banco con los microorganismos aislados en función de la fuente de carbono que utilizan: almidón, celulosa y/o xilano. Mientras que las bacterias están siendo identificadas, los hongos no han sido todavía trabajados (Martínez, 2019).

III. JUSTIFICACIÓN

El pozol es una bebida fermentada de maíz que se consume en el sureste de México desde la época precolombina y hasta nuestros días. Forma parte de la alimentación diaria, además de ser utilizada en la medicina tradicional para tratar diarreas y como cataplasma en heridas superficiales. Los estudios realizados en esta fermentación alimentaria tradicional se han centrado en las bacterias acidolácticas, pobremente amilolíticas, por lo que básicamente no existe ninguna información referente a los otros grupos microbianos presentes que pudieran poner en disponibilidad el sustrato amiláceo para el desarrollo de microbiota no amilolítica.

Recientemente se aislaron levaduras y hongos filamentosos capaces de hidrolizar almidón, cuya importancia en el proceso de fermentación del pozol no ha sido descrita, por lo que como una primera aproximación se realizará la identificación de estos microorganismos.

IV. OBJETIVOS

General

Identificar molecularmente a los hongos amilolíticos presentes en diferentes tiempos de la fermentación de la masa de pozol.

Particulares

Corroborar la actividad amilolítica en los hongos previamente aislados a diferentes tiempos de la fermentación de la masa de pozol (0, 9, 24, 48 h).

Agrupar a los microorganismos por sus características coloniales y microscópicas.

Identificar a los hongos seleccionados a partir de la secuenciación de las regiones ITS1-5.8S-ITS2.

Construir un árbol filogenético con las especies identificadas en el pozol.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

En la figura 3 se muestra el diagrama de flujo con la metodología empleada para este trabajo.

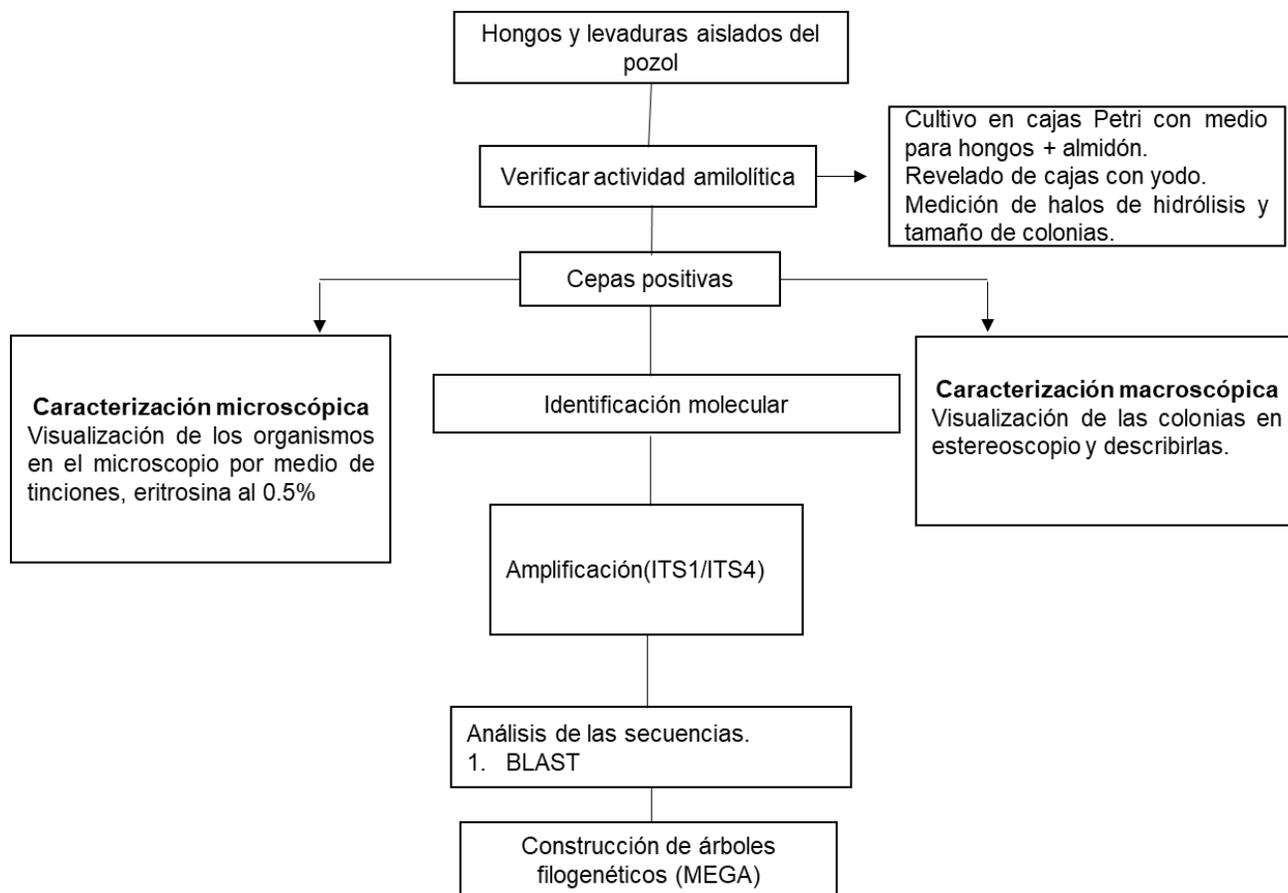


Figura 3. Diagrama de flujo con la metodología utilizada para identificación de hongos amilolíticos en el pozol.

5.1 Descripción de la muestra

La masa de maíz nixtamalizada usada para la elaboración del pozol se adquirió en dos locales distintos del Mercado Pino Suárez en Villahermosa, Tabasco. De cada local se adquirieron 12 bolas de masa de 150 g, las cuales se mezclaron y homogenizaron, formando bolas de 300 g. Las bolas de masa se envolvieron en hojas de plátano sanitizadas y se dejaron fermentar a 37 °C en el laboratorio por 9, 24 y 48 h de manera independiente y por triplicado.

Con la finalidad de detener la fermentación en el tiempo cero, la masa recién molida se enfrió inmediatamente en hielo. La manipulación de la muestra se realizó en todo momento con guantes para evitar la inoculación de microorganismos procedentes del manipulador.

La nomenclatura empleada para identificar a los aislados del pozol fue la siguiente: (Martínez, 2019)

L: Levadura, H: Hongo filamentoso

Tipo de medio utilizado. 1: Medio mínimo, 2: Medio MRS

Tipo de fuente de carbono. 1: Almidón, 2: Xilano 3: Carboximetilcelulosa

Ejemplo: L.5.9.1; Donde:

L: levadura, 5: número de colonia, 9: horas de fermentación, 1: almidón.

5.2 Identificación de actividad amilolítica

Los hongos crecieron en medio para hongos (Okeke *et al.*, 2015) (Anexo 1) con 0.5% de almidón de papa soluble (PanReac AppliChem IWT Reagents). La actividad se reveló con yodo de acuerdo con la metodología descrita por Fogarty (1983), la cual tiene como fundamento que las unidades de glucosa en la cadena de amilosa están dispuestas en forma helicoidal; estas dimensiones internas de la espiral son tales que se permite la interacción del yodo con la amilosa el cual produce un

complejo de inclusión helicoidal en el que la molécula del halógeno ocupa el centro de la cavidad de la estructura dando un color azul. La actividad se observó como un halo alrededor de la colonia del microorganismo.

5.3 Caracterización macroscópica de cepas positivas

En esta caracterización se empleó el microscopio estereoscópico para observar morfología colonial de los microorganismos. Se capturaron una serie de fotografías para cada colonia y se describieron.

5.4 Caracterización microscópica de cepas positivas

Una vez que se confirmó la actividad amilolítica en los microorganismos, se realizaron tinciones para observarlos en el microscopio. En ambos grupos (filamentosos y levaduras) se modificó el método de López-Jácome *et al* (2014) empleando eritrosina al 0.5% en lugar de azul de lactofenol. Las estructuras observadas se describieron y posteriormente se tomaron fotos de cada microorganismo.

5.5 Extracción de DNA genómico

La extracción consiste en el aislamiento y purificación de moléculas de DNA y se basa en las características fisicoquímicas de la molécula. El DNA está constituido por dos cadenas de nucleótidos unidas entre sí formando una doble hélice. Los nucleótidos están integrados por un azúcar (desoxirribosa), un grupo fosfato y una base nitrogenada (adenina, guanina, timina o citosina). La unión de los nucleótidos ocurre entre el grupo fosfato y el azúcar, mediante enlaces fosfodiéster, dando lugar al esqueleto de la molécula. Las bases de cadenas opuestas se unen mediante puentes de hidrogeno y mantienen estable la estructura helicoidal (Alejos Velázquez *et al.*, 2014)

Los grupos fosfato están cargados negativamente y son polares, lo que le confiere al DNA una carga neta negativa y lo hace altamente polar, características que son aprovechadas para su extracción. Los grupos fosfato tienen una fuerte tendencia a repelerse, debido a su carga negativa, lo que permite disolver al DNA en soluciones acuosas y formar una capa hidratante alrededor de la molécula. Pero, en presencia

de etanol, se rompe la capa hidratante y quedan expuestos los grupos fosfato. Bajo estas condiciones se favorece la unión con cationes como Na^+ que reducen las fuerzas repulsivas entre las cadenas de nucleótidos y permiten que el DNA precipite (Sambrook y Green, 2012). La metodología empleada para la extracción de DNA genómico en este trabajo fue modificada de Van Burik *et al* (1998); en el anexo 1 se muestran los componentes del buffer de extracción.

a) Extracción de DNA genómico.

1. Se recolecta con el asa bacteriológica una muestra de un cultivo del hongo crecido en medio Saboraud o medio hongos.
2. Se agregan 400 μL de buffer extracción + 400 μL fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) y perlas de vidrio.
3. Agitar 30 min en el vórtex a máxima velocidad dentro de la campana de extracción.
4. Centrifugar a 8500 rpm, 20 min a 4°C.
5. Se recupera la fase acuosa recuperada y se extrae con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) y cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), centrifugando 5 min a 10,000 rpm después de cada extracción.
6. El ADN se precipita con 1/10 del volumen de acetato de sodio 3M y 2.2 partes de etanol absoluto, mantener a -20°C 24 horas.
7. Centrifugar a 10000 rpm 8 min a 4°C
8. Decantar el etOH y hacer un lavado con alcohol etílico 70% para eliminar las sales.
9. Centrifugar a 10000 rpm por 10 min.
10. Dejar secar el pellet y resuspender en 10 μL de TE.
11. Se prepara un stock de 50ng/ μL para PCR.
12. Si desea guardarse el DNA por tiempos prolongados se recomienda mantenerlo precipitado con 1/10 de acetato de sodio 3 M y 2.2 partes de etanol absoluto, mantener a -20° C.

b) Integridad de DNA genómico.

Para verificar la integridad del DNA extraído se corrió un gel de agarosa 0.8% con solución amortiguadora TAE 1 X. En el gel se cargaron 3 μ L de muestra junto con el buffer de carga y las muestras se dejaron correr a 10 V/cm.

Al terminar la corrida el gel se reveló con una solución de bromuro de etidio (0.5 μ g/ml) y se observó en un transiluminador de luz UV.

c) Pureza de DNA.

Una vez obtenido el material genético, es importante determinar el rendimiento mediante espectrofotometría. La ley de Beer-Lambert indica que la concentración de una molécula en solución depende de la cantidad de luz absorbida de las moléculas disueltas. Una característica del DNA es que absorbe la luz ultravioleta (UV) a 260 nm y permite estimar su concentración mediante espectrofotometría (Alejos Velázquez *et al.*, 2014). Idealmente la concentración de cada nucleótido debería ser especificada para tener una cuantificación exacta. Sin embargo, para muchas aplicaciones en Biología Molecular el contenido de G+C no es necesario considerarlo a menos que sea muy extremo. Se acepta en general que una solución de dsDNA con una concentración de 50 μ g /ml debe tener una A260 igual a 1.0.

Por otro lado, el índice de absorción 260/280 se utiliza para valorar la pureza de los ácidos nucleicos con respecto a la contaminación con proteínas. Cuando éste se encuentra entre 1.8 - 2.0, se considera óptimo. El índice 260/230 se espera en el rango de 2.0 - 2.2; muestras con un índice menor indican la presencia de contaminantes que absorben a 230 nm, como EDTA, carbohidratos y fenol (Salazar-Montes, *et al.*, 2013).

5.6 Amplificación de ITS mediante PCR

Generalmente, la PCR inicia con la desnaturalización o separación de la doble hélice de DNA mediante el calentamiento de la muestra a una temperatura entre 94 y 96° para romper los puentes de hidrógeno que mantienen la hélice, de esta

manera cada cadena queda como molde para la síntesis de una nueva cadena complementaria de DNA.

Una vez separadas las cadenas de DNA, se alinean los oligonucleótidos iniciadores o primers en sitios específicos complementarios de las cadenas sencillas de la región que se va a amplificar, para que esto suceda se baja la temperatura 5°C por debajo del punto de fusión de los primers, (normalmente entre 55 y 70°C) lo que permite la unión (alineamiento) de los iniciadores (Serrato Díaz *et al.*, 2014).

Finalmente, se sintetiza una nueva cadena en sentido 5' a 3' para lo cual se incrementa la temperatura, por lo general a 72°C, porque es la temperatura óptima a la cual el ADN polimerasa se une a los iniciadores y comienza la replicación. Estas tres etapas: 1) desnaturalización, 2) alineamiento y 3) extensión del DNA se repiten sucesivamente, en cada nuevo ciclo se amplifica simultáneamente la región de interés de las dos cadenas complementarias. Los productos generados aumentan su concentración de forma exponencial porque cada nueva copia sirve de molde en los ciclos subsecuentes, dando origen a millones de copias del fragmento seleccionado (Espinosa , 2007).

Los iniciadores empleados en la identificación de hongos hibridan en las regiones intergénicas (ITS por sus siglas en inglés, internal transcribed spacer) ubicadas entre los genes que codifican el ARNr 18 S, 5.8 S y 28 S ya que diversos estudios indican el mayor éxito en la identificación taxonómica (Schoch *et al.*, 2012; Raja *et al.*, 2017). Sin embargo, existen algunos reportes que indican que ciertos géneros como *Cladosporium*, *Penicillium* y *Fusarium* requieren además, dianas genéticas alternativas como los dominios D1 y D2 de la subunidad rRNA 28 S (Petti, 2007).

a) Condiciones para amplificación de regiones ITS

Los primers empleados en la amplificación fueron ITS 1 Fw (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS4 Rv (TCCTCCGCTTATTGATATGC) (Raja *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2010); en la figura 4 se muestran las regiones que abarcan estos cebadores.

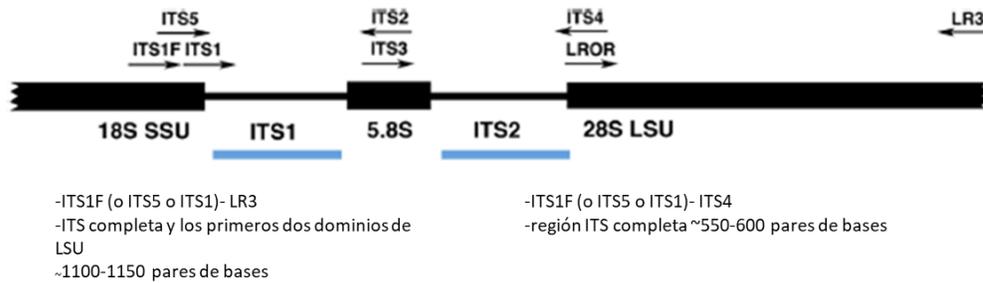


Figura 4. Representación de los primers para la región ITS. Tomado de Raja *et al.*, 2017.

Para realizar la amplificación se utilizaron 50 ng del DNA extraído previamente; las condiciones (cuadro 4) y el ciclo de amplificación se muestran a continuación:

Cuadro 4. Componentes para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Modificado de Zhang *et al.*, 2010

Componentes	Concentración inicial	Concentración final	Volumen por reacción (µL)
Buffer taq	10 x	1 x	2.5
DNTPs	10µM	0.2µM	0.5
Primer ITS 1 Fw	10µM	4µM	1
Primer ITS 4 Rv	10µM	4µM	1
Taq DNA pol	5 U/µL	1 U	0.2
MgCl ₂	25mM	1.5mM	1.5
DNA	-	50 ng	1
H ₂ O	-	-	16.8
		Volumen final:	25

Ciclo de amplificación:

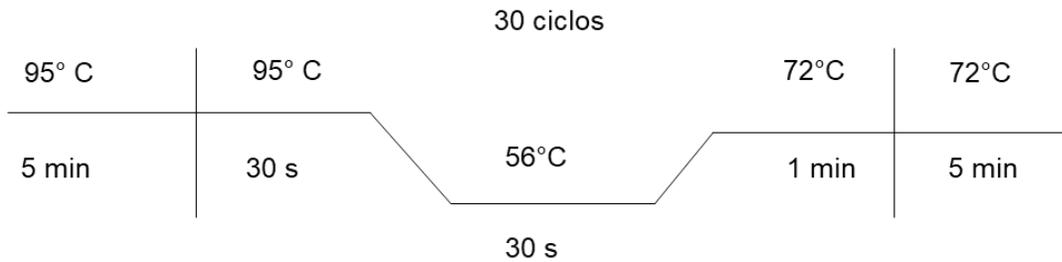


Figura 5. Condiciones para amplificar la región ITS de los hongos amilolíticos aislados. Modificado de Zhang *et al.*, 2010

Al término de la amplificación, las muestras se cargaron en un gel de agarosa al 0.8% y se dejaron correr a 75 V durante 01:40 h. Posteriormente el gel fue teñido con una solución de bromuro de etidio y colocado en un transiluminador UV para verificar que las bandas estuvieran en el peso correspondiente.

Después de observar las muestras en el gel y corroborar la amplificación, éstas se enviaron a los laboratorios del Instituto de Fisiología Celular y de Secuenciación Genómica de la Biodiversidad y de la Salud, de la UNAM para su secuenciación.

5.8 Identificación taxonómica de los hongos

Las secuencias obtenidas se alinearon con sus similares utilizando el algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), esta herramienta informática encuentra regiones de similitud entre secuencias biológicas. El programa compara secuencias de nucleótidos o proteínas con secuencias de bases de datos y calcula la significancia estadística, después se realizaron los árboles filogenéticos con el programa MEGA, (Molecular Evolutionary Genetics Analysis).

En la figura 6 se muestra un diagrama de flujo con los métodos empleados para el análisis de las secuencias.

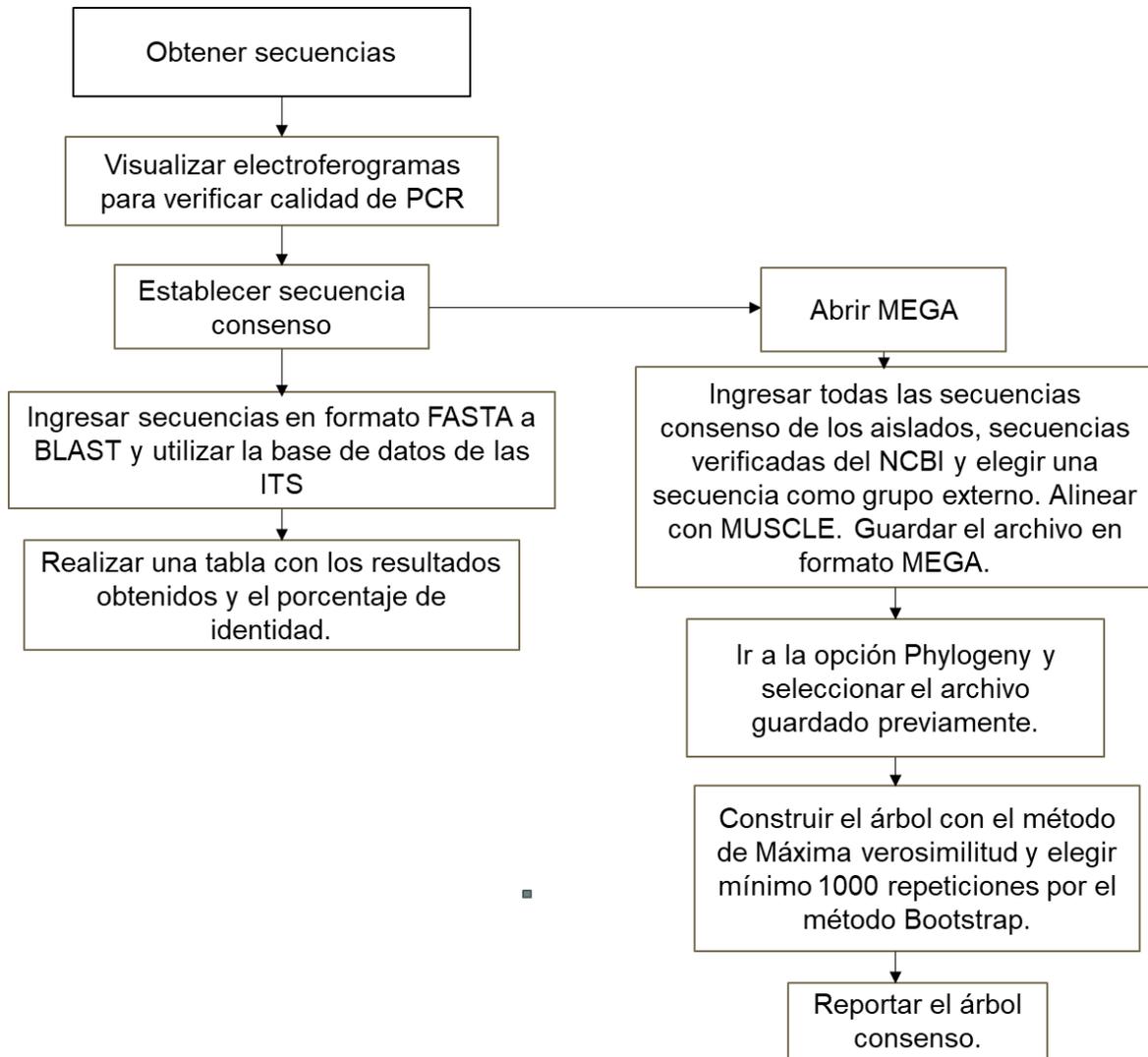


Figura 6. Diagrama de flujo para análisis de secuencias y construcción de árboles filogenéticos.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el 2019, Martínez aisló una colección de hongos amilolíticos de pozol proveniente del estado de Tabasco con diferentes tiempos de fermentación: 0, 9, 24 y 48 horas. Estos aislados se analizaron en la presente tesis y se les realizaron diferentes pruebas microbiológicas y moleculares.

a) Identificación de actividad amilolítica

Para corroborar la actividad amilolítica antes descrita, los aislados fueron crecidos en medio hongos y la actividad se reveló directamente en las placas con yodo. La hidrólisis del almidón se observa como un halo claro sobre un fondo oscuro, el cual se mide para estimar el índice de potencial enzimático, el cual se expresa como: $IP = D \text{ halo} / D \text{ colonia}$, donde D= diámetro (figura 7). De un total de 34 hongos aislados, 7 hongos filamentosos tuvieron actividad; en cuanto a los levaduriformes 19 presentaron actividad, mientras otros 8 la perdieron. Los hongos con actividad amilolítica en la masa se enlistan en el cuadro 5.

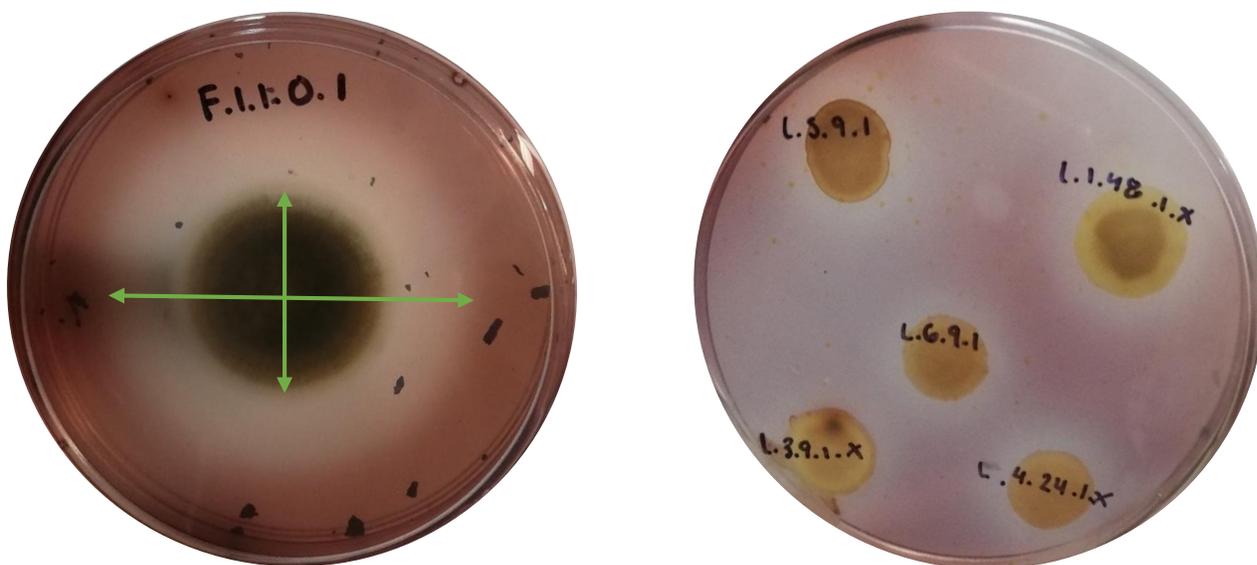


Figura 7. Hongos aislados revelados con yodo e índice de potencial enzimático.

Cuadro 5. Hongos con actividad amilolítica en el pozol y su índice de potencial enzimático.

muestra	Filamentoso/ levaduriforme	diámetro colonia (cm)	diámetro halo (cm)	índice de potencial enzimático
F.2.0.1	filamentoso	2.9	3.1	1.07
F.1.1	filamentoso	2.6	2.8	1.08
F.11.0.1	filamentoso	2.5	3.1	1.24
F.2.1	filamentoso	2.5	2.7	1.08
F.5.48.3	filamentoso	1.8	2.5	1.39
F.1.0.1	filamentoso	2.6	2.8	1.08
F.2.1.0.3	filamentoso	2.9	3	1.03
L.5.9.1	levaduriforme	1	1.5	1.50*
L.1.48.1.X	levaduriforme	1.5	2	1.33
L.6.9.1	levaduriforme	1.2	1.3	1.08
L.3.9.1.X	levaduriforme	1.3	1.6	1.23
L.4.24.1.X	levaduriforme	1.2	1.5	1.25
L.6.9.1.X	levaduriforme	1.3	1.7	1.31
L.2.48.1.X	levaduriforme	1.3	1.5	1.15
L.7.24.1.X	levaduriforme	1.3	1.6	1.23
L.2.24.1.X	levaduriforme	2.3	2.7	1.17
L.12.0.1.X	levaduriforme	1.4	1.5	1.07
L.3.9.1.	levaduriforme	1.5	2	1.33
L.10.0.1.X	levaduriforme	1.6	1.7	1.06
L.3A.24.1	levaduriforme	2.2	2.7	1.23
L.1.0.1	levaduriforme	1.2	1.4	1.17
L.5.9.1.X	levaduriforme	0.9	1.3	1.44
L.2.9.1	levaduriforme	1	1.3	1.30
L.2.9.1.X	levaduriforme	1	1.3	1.30
L.6.24.1.X	levaduriforme	0.8	1.2	1.50*
L.3.0.1.X	levaduriforme	0.5	1	2.00*

* Hongos que presentaron un índice de potencial enzimático más alto.

Se realizaron numerosas resiembras utilizando almidón como única fuente de carbono en diferentes medios en el afán de recuperar la actividad amilolítica de todos los hongos, pero no se logró observar dicha actividad en todos los aislados. Establecer la razón de la pérdida es difícil, puesto que el propio sistema de conservación pudo afectar la expresión o estabilidad de los genes involucrados. A la fecha, se han realizado pocos estudios sobre la estabilidad genética de hongos crioconservados y todos estos informes se han basado en *fingerprints*, una técnica que no es adecuada para la detección de cambios diminutos pero importantes en el genoma, como mutaciones puntuales. Se requieren enfoques de secuenciación para detectar con éxito estas posibles mutaciones (Homolka, 2013).

b) Caracterización macroscópica

Ambos grupos se inocularon en cajas Petri con medio para hongos (anexo 1) y cloranfenicol para evitar contaminación con bacterias, se observó la morfología colonial (figura 8) y se agruparon en el siguiente cuadro:

Cuadro 6. Agrupación por caracterización macroscópica de levaduras del Pozol

Color	Hifa o pseudohifa visible	Muestras que coinciden
crema	sí	L.5.9.1, L.3.9.1.X, L.6.9.1, L.4.24.1.X, L.10.0.1.X, L.1.0.1, L.4A.24.1, L.3.48.1.Y, L.2.9.1, L.6.24.1.X
crema amarillento	sí	L.2.24.1.X
crema/blanco	sí	L.3A.24.1, L.7.48.1.Y
crema	no	L.9.48.1.Y, L.2.9.1.X, L.6.48.1.Y, L.5.0.1, L.3.0.1.X, L.6.9.1.X, L.2.48.1.X, L.7.24.1.X, L.12.0.1.X, L.3.9.1, L.5.48.1.Y, L.3.9.1
crema amarillento	no	L.10.48.1.Y

Algunas especies de levaduras como *Candida albicans* y *Candida dubliniensis*, pueden producir un tipo de crecimiento filamentosos, como hifas verdaderas o más frecuentemente, pseudohifas. La distinción entre estas estructuras está relacionada con la manera en que se forman. Las pseudohifas se forman a partir de células de

las mismas levaduras o hifas por brotación, mientras que el desarrollo de las hifas verdaderas se inicia mediante la proyección del tubo germinal, que se alarga y ramifica para dividir a las hifas en unidades fúngicas separadas (Silva *et al.*, 2012).

Los hongos filamentosos tienen como estructura somática básica la hifa. Esta es una estructura tubular que se ramifica a medida que el hongo crece en forma apical. El conjunto de hifas que produce un hongo se conoce como micelio. Este posee características microscópicas y macroscópicas (cuando forman colonias creciendo en un medio de cultivo o en la naturaleza) que son útiles para su identificación. Algunas de las características microscópicas del micelio y los propágulos dan origen al color de una colonia (Cepero de García *et al.*, 2012). En el cuadro 7 se muestra la descripción colonial de los hongos filamentosos aislados del pozol.

Cuadro 7. Caracterización de colonias de hongos filamentosos presentes en el pozol a diferentes horas de fermentación.

Color	Textura	Muestras que coinciden
Borde color crema y colores verde grisáceos al centro	Esponjosa	F.2.0.1, F.1.1, F.1.1.0.1, F.2.1, F.5.48.3, F.1.0.1, F.2.1.0.3

Al revisar la tabla de caracterización macroscópica de los hongos filamentosos se pueden colocar en un solo grupo, lo cual podría indicar que pertenecen a un mismo género, esto se complementa a su vez con la caracterización microscópica de estos microorganismos.

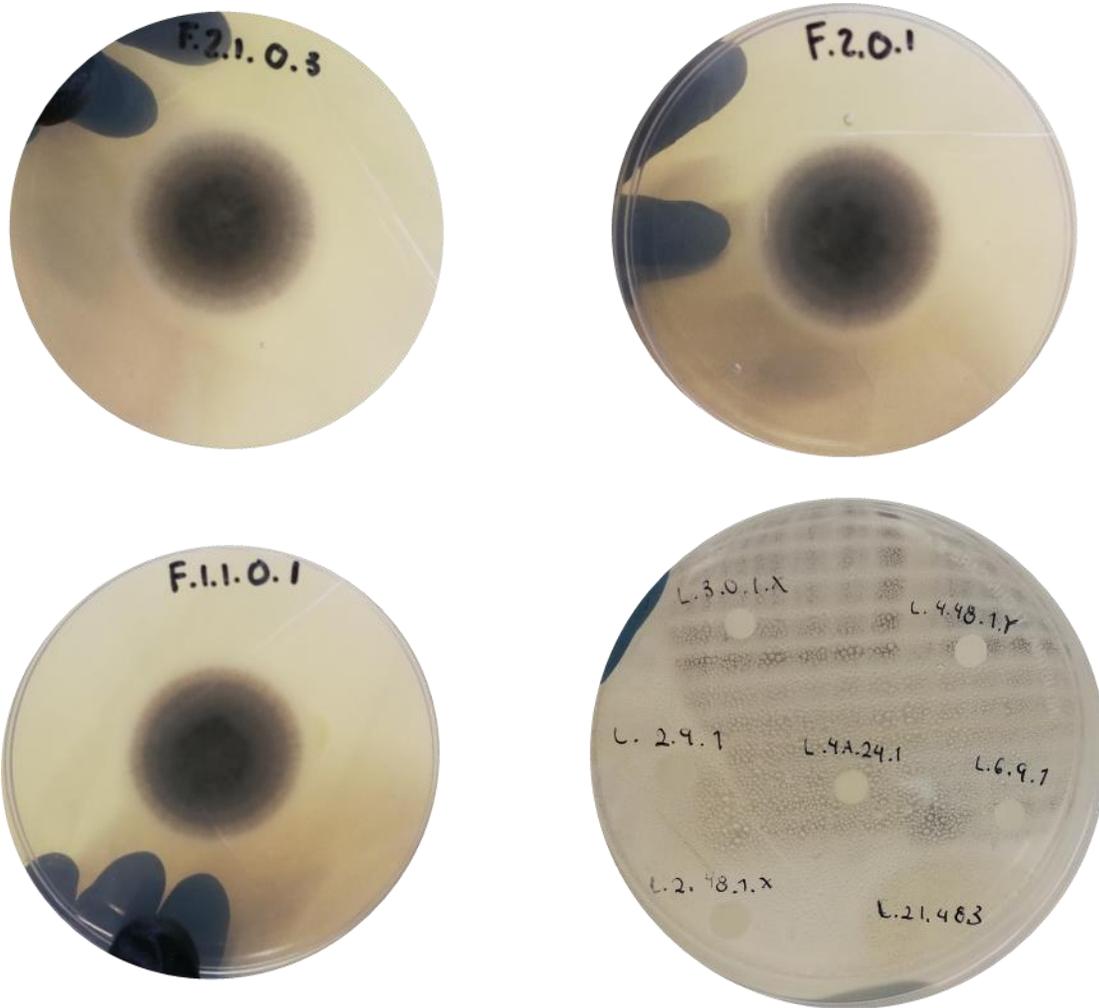


Figura 8. Morfología colonial de hongos del pozol. Se observa el micelio de los hongos filamentosos y la coloración crema de las levaduras.

c) Caracterización microscópica

Los hongos son organismos complejos que presentan una gran variedad de estructuras microscópicas que pueden ser somáticas o de reproducción. Algunas de las estructuras pueden ser observadas con microscopía de luz o contraste de fases. Las características microscópicas de los hongos filamentosos incluyen el color, diámetro y la presencia o no de septos en las hifas (Cepero de García *et al.*, 2012) En el presente trabajo, los hongos filamentosos aislados presentaron características similares al ser color verde oliva y presentar septos en las hifas. Para facilitar la visualización de las estructuras se realizó una tinción con eritrosina al 0.5% (figura 9) (Anexo 1).

En todos los aislados de hongos filamentosos se observaron hifas septadas, las cuales son estructuras somáticas y estructuras de reproducción asexual como conidióforos y conidias.

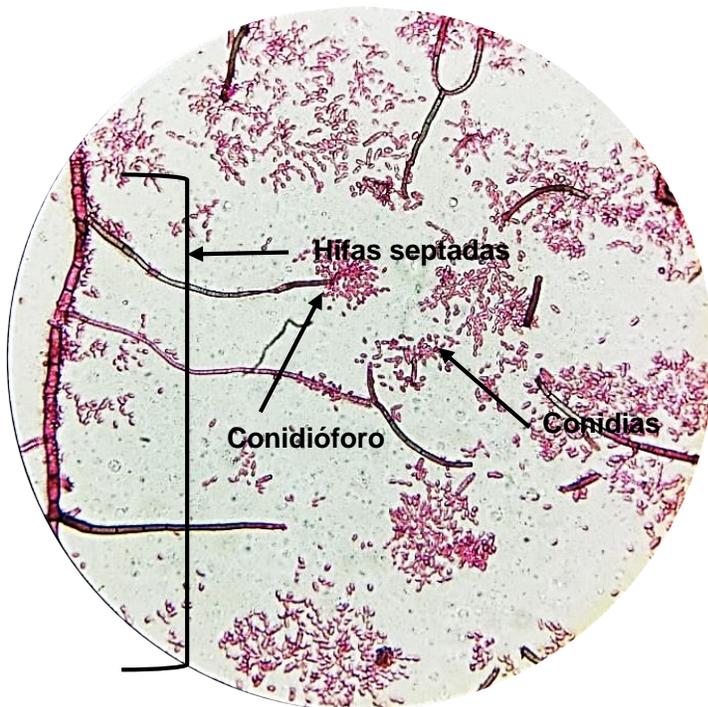
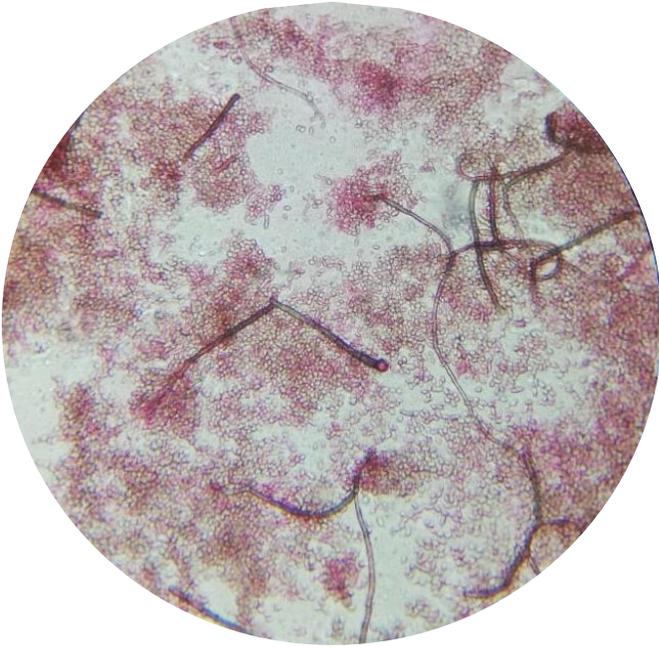


Figura 9. Micrografía de un hongo filamentosos a 40 x (F.1.1), tinción de eritrosina 0.5%.



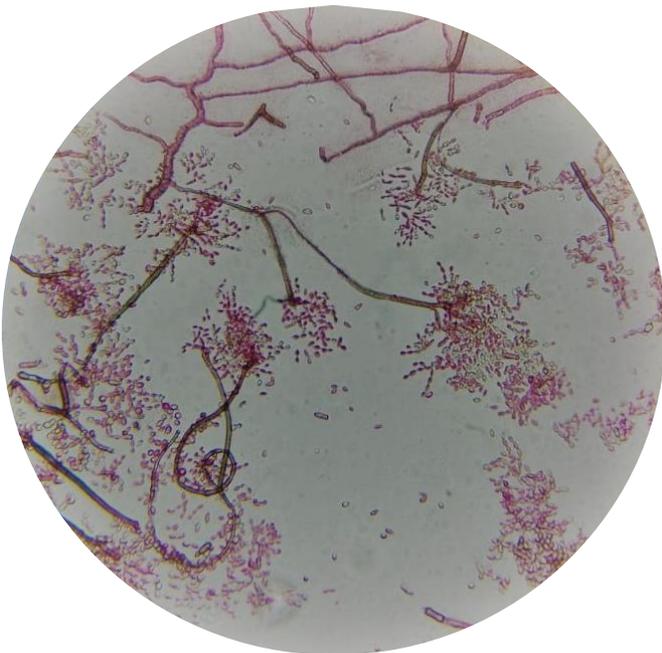
Cladosporium welwitschiicola
(Aislado F.1.0.1). Aumento a 40x,
tinción de eritrosina al 0.5%. Se
observan estructuras somáticas y
reproductivas.



Cladosporium welwitschiicola
(Aislado F.1.1). Aumento a 40x,
tinción de eritrosina al 0.5%. Se
observan estructuras somáticas y
reproductivas.



Cladosporium welwitschiicola (Aislado F.2.1.0.3). Aumento a 40x, tinción de eritrosina al 0.5%. Se observan estructuras somáticas y reproductivas.



Cladosporium oxysporum. (Aislado F.11.0.1). Aumento a 40x, tinción de eritrosina al 0.5%. Se observan estructuras somáticas y reproductivas.

En el caso de las levaduras, éstas presentaron estructuras reproductivas. Aunque se puede afirmar la presencia de estas estructuras, no se diferenció entre hifas verdaderas o pseudohifas ya que se necesita un microscopio con resolución mayor y no era un objetivo de este estudio.

Para realizar la descripción de levaduras, se realizó una tinción con eritrosina al 0.5% (Figura 10) y para la descripción de estructuras se emplearon las bases de datos de Mycobank (<http://www.mycobank.org/>) y Dr Fungus (<https://drfungus.org/>)

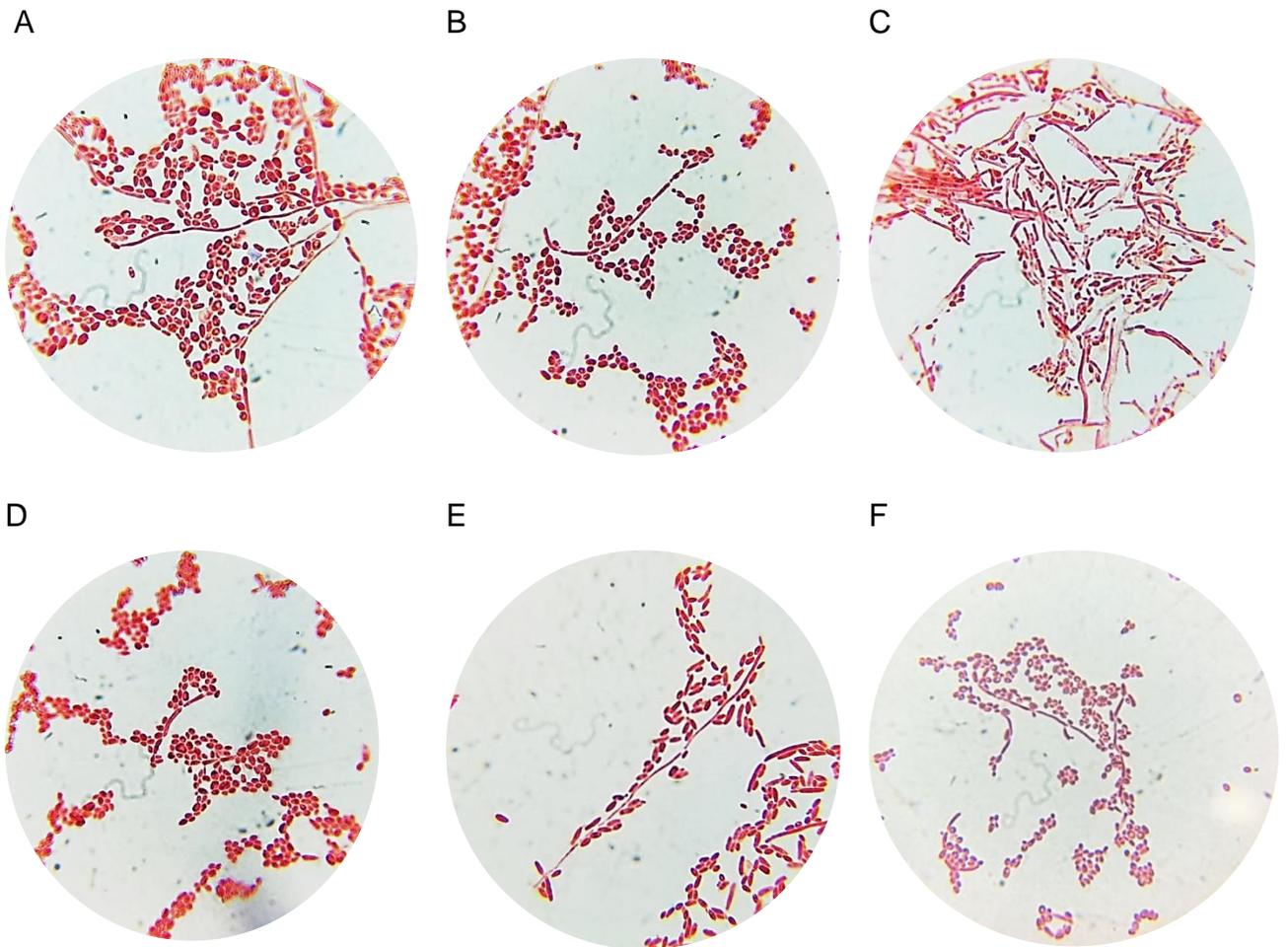
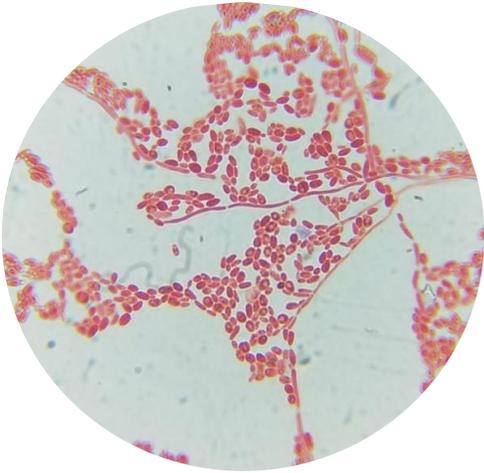
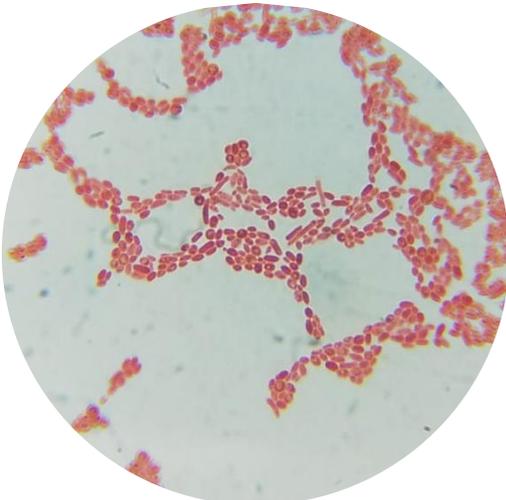


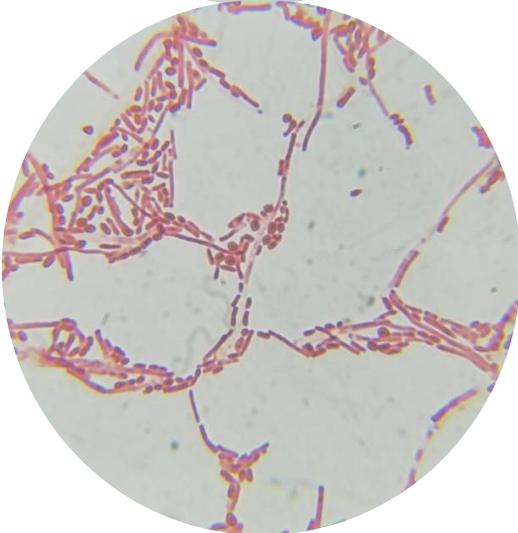
Figura 10. Levaduras aisladas de pozol. Aumento a 100 x. Las imágenes A y D corresponden a aislados con 0 horas de fermentación, C y F a 24 horas de fermentación, mientras que B y E a 9 y 48 horas respectivamente.



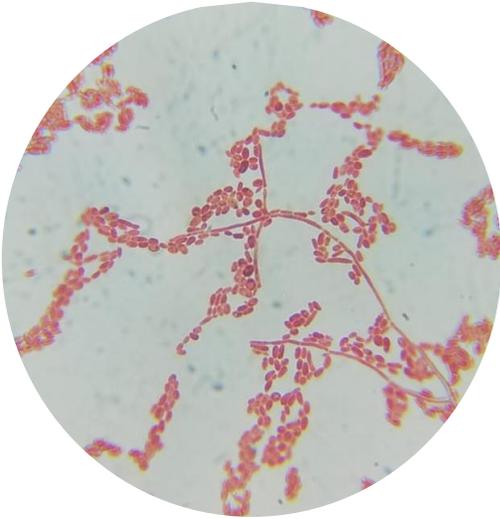
Candida tropicalis (Aislado L.1.0.1). En esta especie es característica la presencia de pseudohifas y las hifas septadas están usualmente presentes.



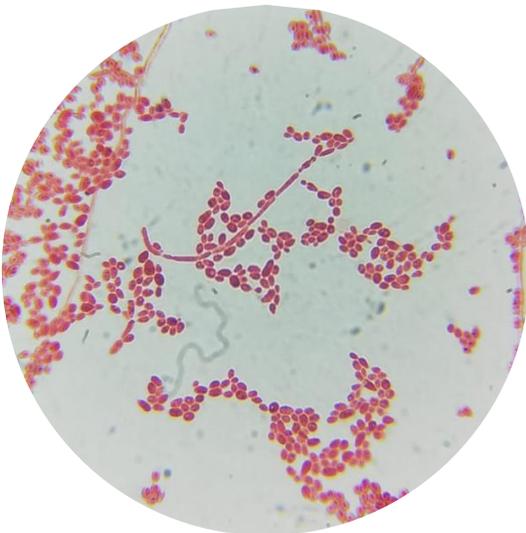
Pichia kudriavzevii (Aislado L.1.48.1.X). Se observan esporas ovoides y presencia de pseudohifas.



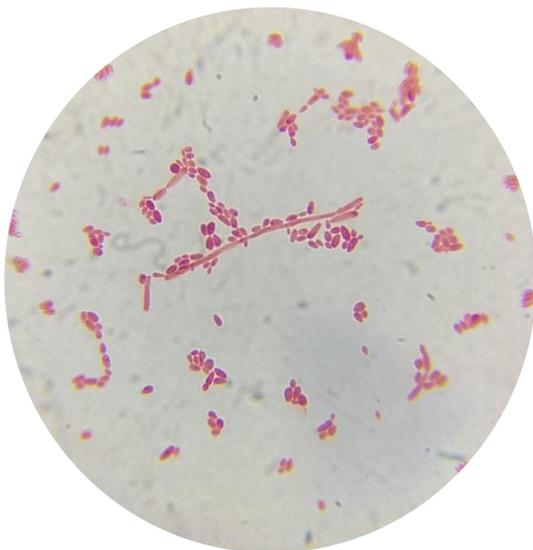
Trichosporon asahii. (Aislado L.2.24.1.X). Se observan pseudohifas abundantes y arthroconidias, un tipo de espora elongada que es característica en esta especie.



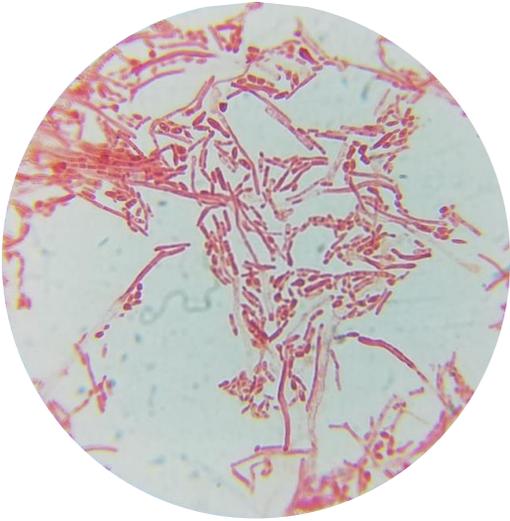
Pichia kudriavzevii. (Aislado L.2.48.1.X).
Se observan esporas ovoides y pseudohifas.



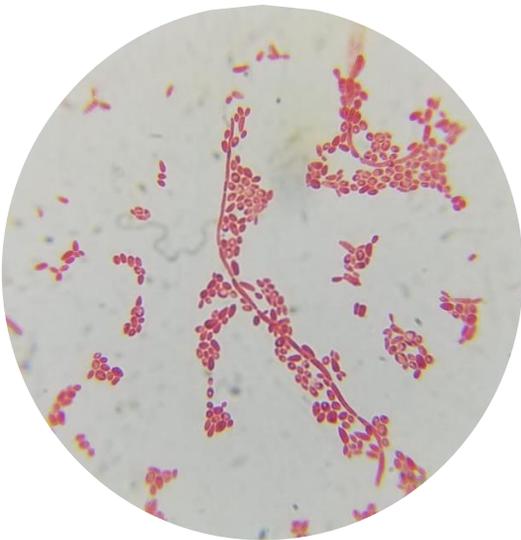
Candida tropicalis. (Aislado L.3.9.1). Se observan esporas ovoides y pseudohifas.



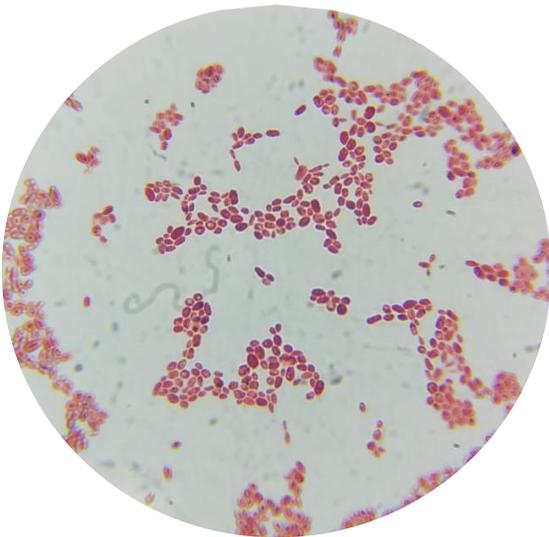
Candida tropicalis. (Aislado L.3.9.1.X).
Se observan esporas ovoides y pseudohifas.



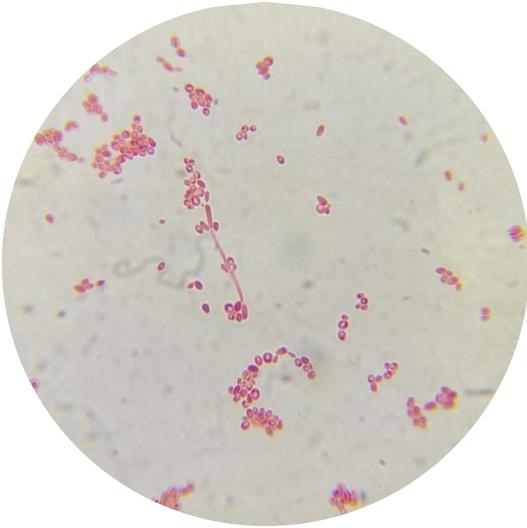
Trichosporon sp. (Aislado L.3 A .24.1).
Se observan pseudohifas abundantes y arthroconidias.



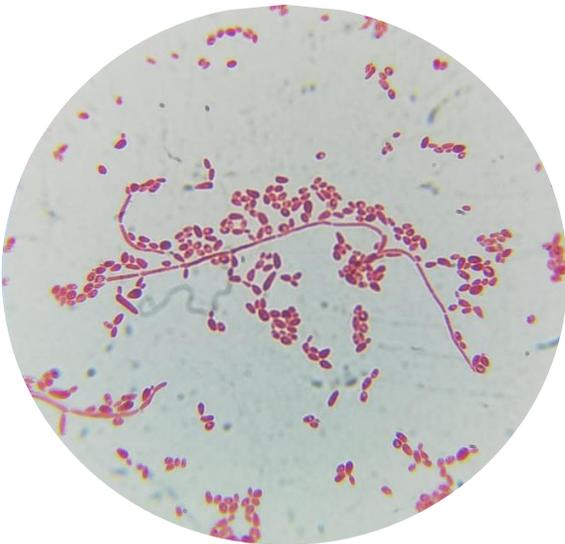
Candida tropicalis. (Aislado L.4.24.1.X).
Se observan esporas ovoides y pseudohifas.



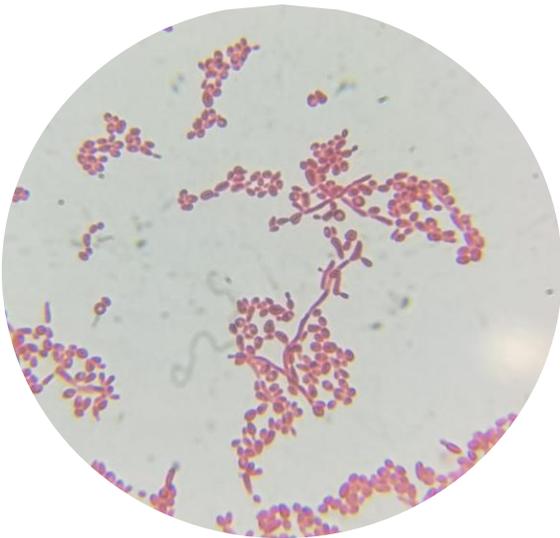
Candida tropicalis. (Aislado L.5.9.1). Se observan esporas redondas y ovoides.



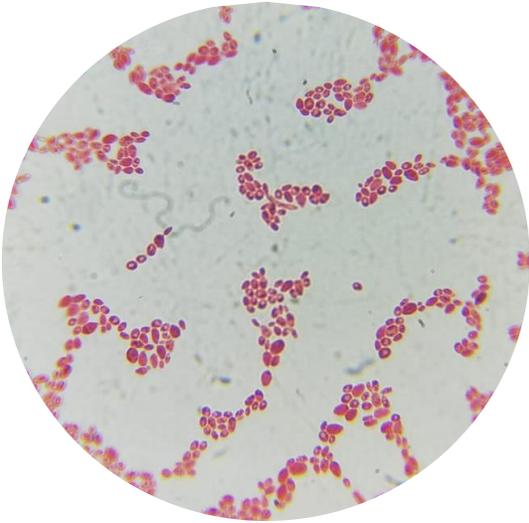
Candida tropicalis. (Aislado L.6.9.1). Se observan esporas ovoides y pseudohifa.



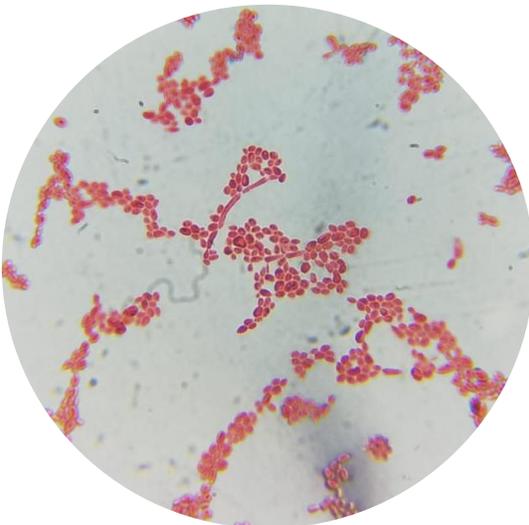
Candida tropicalis. (Aislado L.6.9.1.X). Se observan esporas ovoides y pseudohifas.



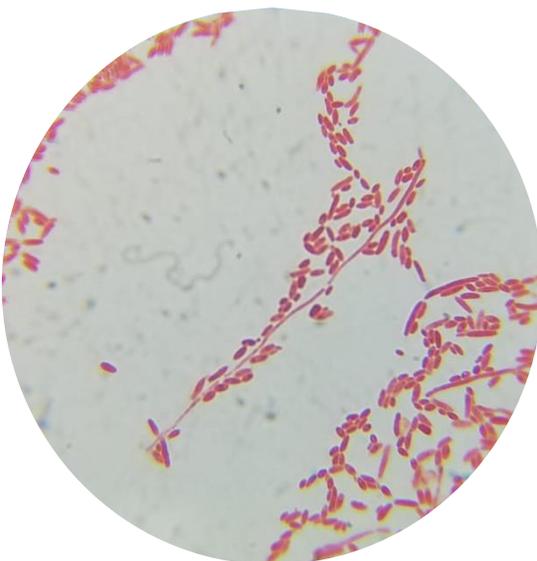
Candida tropicalis. (Aislado L.7.24.1.X). Se observan esporas ovoides y pseudohifas.



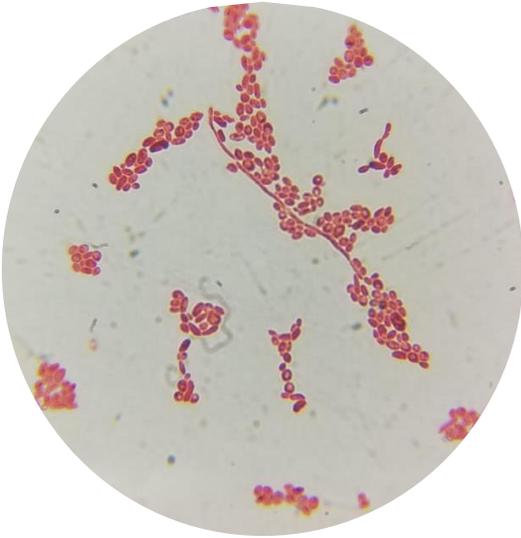
Candida tropicalis. (Aislado L.9.48.1.Y).
Se observan esporas ovoides.



Candida tropicalis. (Aislado L.10.0.1.X).
Se observan esporas ovoides y pseudohifas.



Pichia kudriavzevii. (Aislado L.10.48.1.Y).
Se observan esporas ovoides y pseudohifas.



Candida tropicalis. (Aislado L.12.0.1.X).
Se observan esporas ovoides y pseudohifa.

Los estudios de diversidad fúngica tradicionalmente se basaban en características morfológicas y otras características fenotípicas. Sin embargo, debido a la inestabilidad de los rasgos morfológicos, la existencia de formas intermedias (caracteres anamórficos y teleomórficos) y la superposición fenotípica entre diferentes taxones, estos métodos por sí solos no permiten una identificación confiable de hongos (Cuadros-Orellana *et al.*, 2013)

Las técnicas moleculares han resuelto parcialmente este problema, permitiendo una mejor clasificación de especies fúngicas, aunque algunos investigadores creen que la secuencia de DNA ribosomal (rDNA) por sí sola no es inherentemente superior a la taxonomía morfológica. Por lo tanto, el uso de enfoques híbridos ha sido la elección metodológica en muchos estudios (Cuadros-Orellana *et al.*, 2013).

Cabe aclarar que en el presente trabajo la caracterización microscópica y macroscópica sólo otorgan una idea de qué tan parecidos o diferentes son morfológicamente los hongos aislados entre sí, no se utilizaron claves taxonómicas para su identificación porque ésta se realizó por medio de técnicas moleculares. Las imágenes de los microorganismos ofrecen un panorama más amplio y sirven para corroborar su identificación de acuerdo con los resultados moleculares.

Las observaciones en el microscopio también se realizaron para verificar la pureza de los aislados previo a la extracción de DNA genómico, asegurando de este modo resultados confiables para las muestras moleculares.

d) Extracción de DNA genómico

Para llevar a cabo técnicas moleculares (como PCR o RAPD) exitosas, el primer paso es obtener DNA de los microorganismos íntegro y puro.

Todos los hongos aislados previamente fueron crecidos en medio para hongos y almidón al 0.5% como fuente de carbono. Al finalizar la extracción de DNA genómico de todos los aislados las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 0.8%, este paso es fundamental para visualizar la integridad del material genético y también corroborar su pureza.

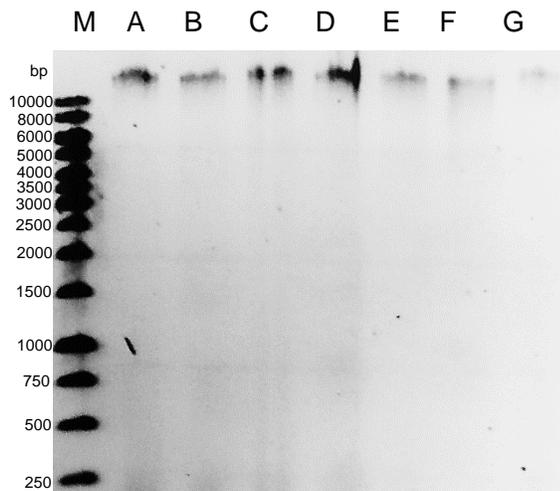


Figura 11. Electroforesis de DNA genómico.

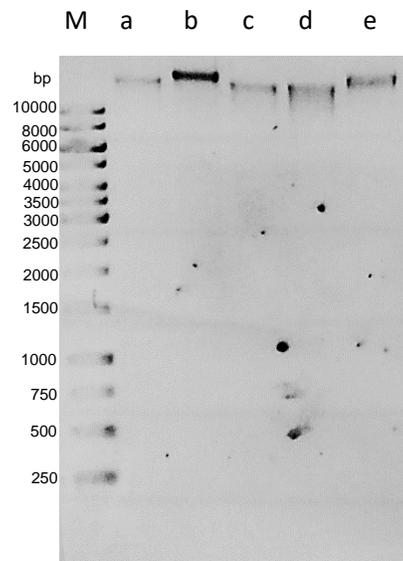
Gel de agarosa al 0.8%, se muestra el material genético extraído de los hongos filamentosos amilolíticos.

- A: F.2.0.1 D: F.2.1 G: F.2.0.1.3
- B: F.1.1 E: F.5.48.3
- C: F.1.1.0.1 F: F.1.0.1

Figura 11 (b). Electroforesis de DNA genómico.

Gel de agarosa al 0.8%, se muestra el material genético extraído de algunos aislados de levaduras amilolíticas.

- a : L.3 A.24.1 d : L.5.48.1.X
- b : L.10.0.1.X e : L.5.9.1.X
- c : L.4 A.24.1.X



La aplicación básica de la técnica de electroforesis en gel de agarosa es la separación de fragmentos de DNA y su visualización para comprobar aspectos como tamaño de los fragmentos, concentración e integridad (Fierro-Fierro, 2014). En los geles de agarosa presentados (figuras 11: a y b) se pueden apreciar bandas definidas por arriba de 10 kb, lo cual indica la presencia del DNA genómico. Aunque se logró la extracción de DNA en todos los hongos, estas figuras son representativas debido a la claridad de las bandas. La integridad es aceptable ya que las bandas se encuentran cercanas al pozo donde fue cargada la muestra y no se notan barridos a lo largo del carril lo que indica que el DNA no está fragmentado.

e) Pureza de DNA

Después de corroborar la integridad del DNA en un gel, se cuantificó en un espectrofotómetro para conocer su pureza. Los resultados de la relación 260/280 fueron óptimos, pues éstos se encontraron en promedio entre 1.8 y 2.

La relación 260/230 mostró un nivel de pureza aceptable, ya que las extracciones se encontraron en el rango de 1.6 a 2.27.

Aparte de ser una herramienta útil para conocer la pureza del material genético, la absorbancia sirve para conocer la concentración del DNA. Con base en estos resultados se hicieron diluciones para obtener la concentración de 50ng/μL en cada muestra y así realizar el protocolo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) requerido en este proyecto.

f) Amplificación de regiones espaciadoras transcritas internas (ITS)

La mayoría de la taxonomía micológica ahora tiene una dimensión molecular, y los sistemas de identificación basados en secuencias de DNA se están desarrollando y adaptando a un ritmo creciente (Seifert, 2009).

Realizar la amplificación de las ITS por medio de la técnica de PCR fue un punto clave para la identificación molecular de los aislados. Aunque se realizó la caracterización microscópica y macroscópica de los aislados y éstas representan

una fuente valiosa e integral de información, depender únicamente de caracteres morfológicos en el proceso de identificación puede ser problemático, esto se debe principalmente a la escasez y plasticidad de caracteres morfológicos discriminatorios presentes en muchos hongos (Begerow *et al.*, 2010).

En los hongos toda la región ITS tiene aproximadamente 600 pb de largo (Figura 3) y contiene dos regiones intergénicas: ITS 1 e ITS 2, separadas por el gen 5.8 S rRNA, el cual está altamente conservado (White *et al.*, 1990). La región ITS está flanqueada por el gen 18S rRNA en el extremo 5' y por el gen 28S rRNA en el extremo 3'. Esta región es la más utilizada por los micólogos en el mundo para clasificación molecular y otra de sus grandes ventajas como código de barras es que cada genoma haploide generalmente contiene múltiples copias repetidas en tándem del grupo de genes de rRNA (incluida la ITS), lo que permite amplificar este gen a partir de pequeñas cantidades de materiales biológicos (Xu, 2016).

Los primers empleados para esta técnica fueron ITS 1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS 4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'), los cuales abarcan toda la región ITS, por lo cual los productos esperados fueron de 550 a 600 pb. Después de amplificar esta región en todos los aislados, se corrió un gel de agarosa al 0.8% (figuras 12 y 13).

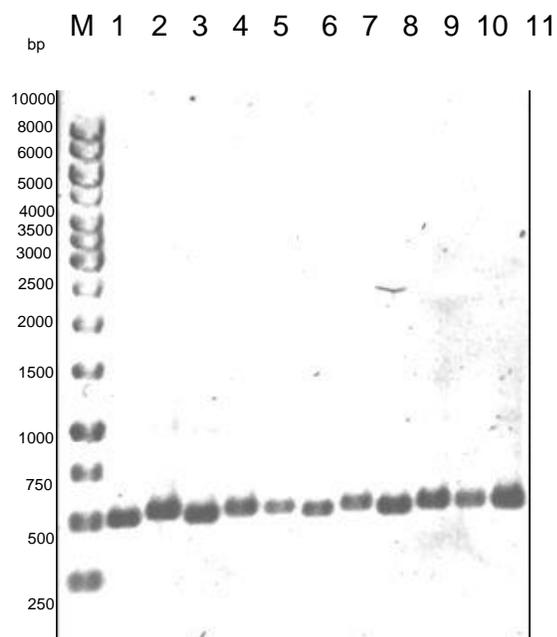


Figura 12. Productos de reacción de PCR de los aislados con actividad amilolítica. Donde:

M: marcador molecular 1 kb.

- | | | |
|----------------|---------------|----------------|
| 1: L.1.48.1.X | 5: L.1.0.1 | 9: L.2.9.1 |
| 2: L.4.24.1.X | 6: L.3.48.1.Y | 10: L.9.48.1.Y |
| 3: L.10.48.1.Y | 7: L.6.48.1.Y | 11: L.3.0.1.X |
| 4: L.6.9.1.X | 8: L.7.48.1.Y | |

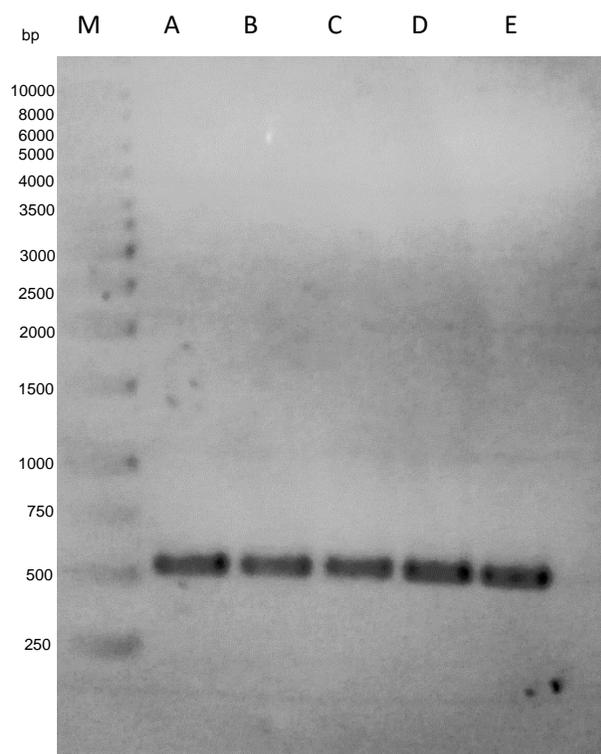


Figura 13. Productos de PCR de los aislados con actividad amilolítica. Donde:

M: marcador de peso molecular 1 kb;

- A: L.6.9.1; B: L.7.24.1.X; C: L.2.24.1.X; D: L.12.0.1.X; E: L.3.9.1

Como se observa en los gels, los productos fueron del tamaño esperado. Las figuras 12 y 13 son representativas debido a la claridad de las bandas y aunque no están exhibidas en foto todas las muestras, se logró la amplificación en las 34.

Posteriormente éstas se cuantificaron, mostrando concentraciones de DNA por arriba de los 100 ng, pero relaciones 260/230 bajas, lo que indicó contaminación con sales u otros compuestos, por lo que se purificaron con el kit SpinPrep™ PCR Clean up de Merck y se obtuvieron relaciones 260/280 y 260/230 óptimas. Al terminar la purificación, las muestras se enviaron a los laboratorios del Instituto de Fisiología Celular y de Secuenciación Genómica de la Biodiversidad y de la Salud, de la UNAM para su secuenciación.

g) Análisis de las secuencias de los aislados amilolíticos

Al obtener las secuencias, éstas se revisaron con el programa informático Chromas, en el que se visualizaron los electroferogramas de cada muestra; es importante revisarlos antes de continuar con los análisis de las muestras debido a que nos dan mucha información, incluyendo la calidad de la PCR y por ende la confiabilidad de los datos obtenidos (Márquez Valdelamar *et al.*, 2014). En las figuras 14 y 15 se muestran algunos electroferogramas obtenidos de los aislados amilolíticos del pozol.

Aunque el tamaño esperado de la región ITS es de 600 pb, muchos aislados presentaban menos pares de bases en sus secuencias, esto puede explicarse porque para algunos grupos taxonómicos, la longitud media del ITS es menor que los 500 pb. Especialmente en géneros de hongos filamentosos como *Cladosporium*, *Penicillium* y *Fusarium*, esto provoca que las ITS tengan una variación insuficiente para identificar especies inequívocamente. Para estos géneros, un segundo gen de código de barras es necesario para lograr una identificación a nivel de especie exitosa (Seifert, 2009).

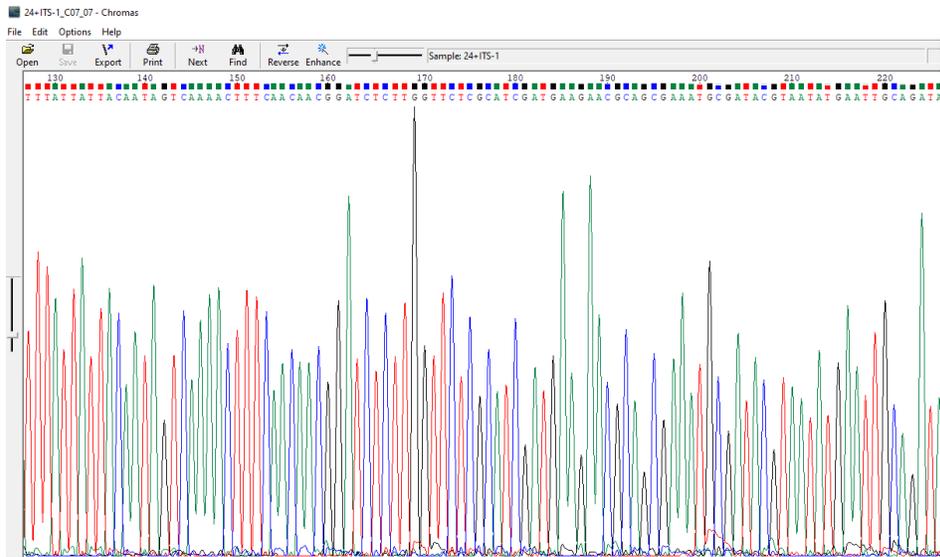


Figura 14. Electroferograma de un producto de PCR correspondiente al aislado L.2.9.1.X de pozol.

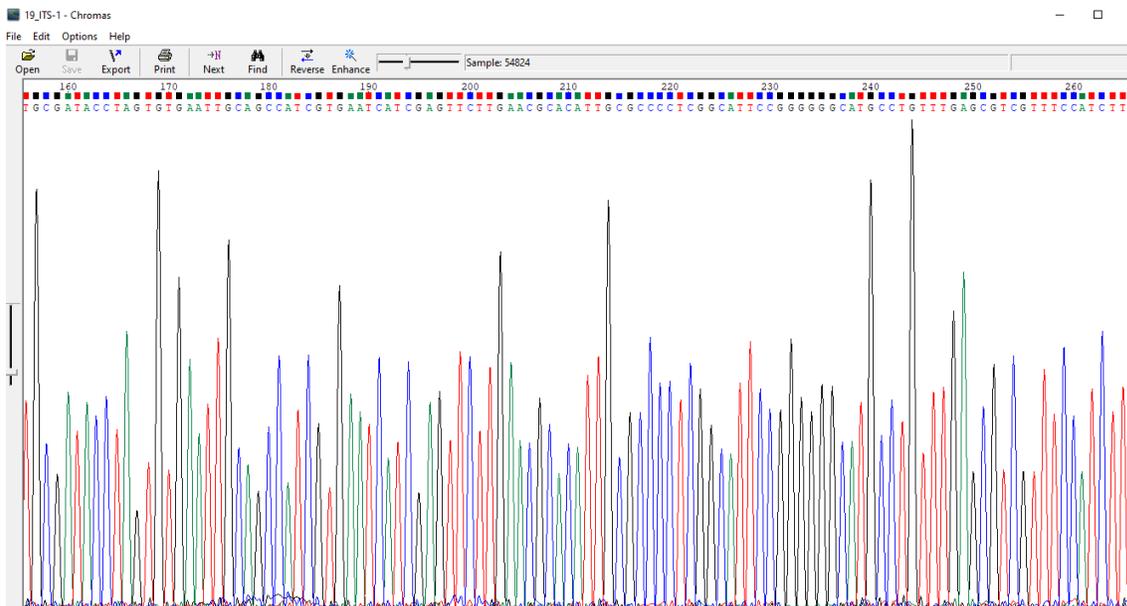


Figura 15. Electroferograma de un producto de PCR correspondiente al aislado L.3.48.1.Y de pozol.

Aunque se realizó la amplificación de ITS 1 e ITS 4, la mayoría de las secuencias consenso se realizaron a partir del primer ITS 1, ya que el primer ITS 4 presentaba dificultades para secuenciarse correctamente.

Una vez obtenidas las secuencias de interés, revisado los electroferogramas y realizado correcciones en algunas pares de bases de las secuencias, éstas se alinearon en el programa Clustal Omega y se convirtieron a formato FASTA, se ingresaron a la base de datos del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) y se compararon para encontrar regiones de similitud en las secuencias e identificar a los aislados. La herramienta empleada fue BLAST: Basic Local Alignment Search Tool (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y la base de datos seleccionada fue “Internal transcribed spacer región (ITS) from Fungi type and reference material”.

Al obtener los resultados del BLAST, éstos se acomodaron en tablas con la identificación de cada aislado, el porcentaje de identidad y las horas de fermentación. En el cuadro 8 se visualizan todas las muestras identificadas y las horas de fermentación en las que se aislaron.

Cuadro 8. Hongos identificados en el pozol a diferentes tiempos de fermentación.

Aislados de levaduras			
0 h	9 h	24 h	48 h
<i>Candida tropicalis</i> L.12.0.1.X per ident: 98.85%	<i>Candida tropicalis</i> L.5.9.1 per ident: 98.33%	<i>Trichosporon sp</i> L.3 A .24.1 per ident: 96.05%	<i>Pichia kudriavzevii</i> L.2.48.1.X per ident: 99%
<i>Candida tropicalis</i> L.10.0.1.X per ident: 99.43%	<i>Candida tropicalis</i> L.3.9.1.X per ident: 99.31%	<i>Trichosporon asahii</i> L.4 A .24.1 per ident: 99.78%	<i>Pichia kudriavzevii</i> L.5.48.1.Y per ident: 97.04%
<i>Candida tropicalis</i> L.1.0.1 per ident: 99.74%	<i>Candida tropicalis</i> L.3.9.1 per ident: 100%	<i>Trichosporon asahii</i> L.6.24.1.X per ident: 93.58%	<i>Pichia kudriavzevii</i> L.1.48.1.X per ident: 98.38%
<i>Candida tropicalis</i> L.3.0.1.X per ident: 91.57%	<i>Candida tropicalis</i> L.5.9.1.X per ident: 99.70%	<i>Candida tropicalis</i> L.4.24.1.X per ident: 88.26%	<i>Pichia kudriavzevii</i> L.10.48.1.Y per ident: 99.05%
	<i>Candida tropicalis</i> L.2.9.1.X per ident: 95.55%	<i>Candida tropicalis*</i> L.7.24.1.X per ident: 83.95%	<i>Pichia kudriavzevii</i> L.3.48.1.Y per ident: 100%
	<i>Candida tropicalis</i> L.2.9.1 per ident: 99.75%	<i>Trichosporon asahii*</i> L.2.24.1.X per ident: 82%	<i>Candida tropicalis*</i> L.6.48.1.Y per ident: 95.26%
	<i>Candida tropicalis*</i> L.6.9.1 per ident: 77.54%		<i>Pichia kudriavzevii</i> L.7.48.1.Y per ident: 100%
	<i>Candida tropicalis*</i> L.6.9.1.X per ident: 80%		<i>Candida tropicalis*</i> L.9.48.1.Y per ident: 82.59%
Aislados de hongos filamentosos			
0 h	9 h	24 h	48 h
<i>Cladosporium welwitschiicola</i> F.2.0.1 per ident: 100%	No hay aislados amilolíticos a las 9 y 24 h		<i>Cladosporium welwitschiicola</i> F.5.48.3 per ident: 100%
<i>Cladosporium oxysporum</i> F.11.0.1 per ident: 94.43%			
<i>Cladosporium welwitschiicola</i> F.1.0.1 per ident: 99.67%			

Los valores referidos (per ident) corresponden al porcentaje de identidad en BLAST de las muestras aisladas. Las muestras con asterisco refieren porcentajes bajos.

En total se identificaron 33 aislados de hongos presentes en el pozol a diferentes tiempos de fermentación, los aislados F.2.1, F.2.1.0.3 y F.1.1 no están en la tabla porque la nomenclatura no refiere el tiempo en el que se aislaron, pero todos corresponden a *Cladosporium welwitshiicola* y tuvieron un porcentaje de identidad mayor a 95%.

Ben Omar y Ampe (2000) observaron que la cantidad de hongos aumentaba con las horas de fermentación, lo cual se puede observar a las 48 h, cuando más hongos se encuentran; también resulta interesante que en ese lapso la diversidad es más alta con tres especies: *Candida tropicalis*, *Pichia kudriavzevii* y *Cladosporium welwitshiicola*.

Se debe resaltar que todas las levaduras (excepto *Candida tropicalis*) fueron identificadas en tiempos precisos en este alimento, ya que *Trichosporon asahii* sólo aparece a las 24 h y *Pichia kudriavzevii* a las 48 h; aunque se podría pensar que existe algún tipo de sucesión ecológica en este alimento, se necesitan más estudios para poder elaborar afirmaciones de este tipo.

Pichia kudriavzevii es el estado teleomorfo de *Candida krusei*, es decir, el estado reproductivo sexual de este microorganismo, por lo tanto, a nivel taxonómico son sinónimos; este microorganismo de acuerdo con Kurtzman y Fell (2010) no puede crecer en almidón soluble ni degradarlo, algo que no concuerda con este estudio, ya que sí creció en medio con almidón y se encontraron halos de actividad, aunque ésta podría ser mínima y se necesitan más estudios para analizar su capacidad de hidrolizar almidón.

Los aislados de *Pichia kudriavzevii* están ampliamente distribuidos en la naturaleza. A menudo se encuentran en fermentaciones espontáneas y la especie se utiliza para producir varios alimentos fermentados tradicionales. Esta levadura no se considera un organismo patógeno, es un microorganismo con estatus de “generalmente reconocido como seguro” dado por la FDA, porque se ha utilizado durante siglos para fabricar productos alimenticios como la yuca fermentada y el cacao en África, la leche fermentada en el Tíbet o para bebidas fermentadas de

maíz en México y Colombia. También tiene potencial como probiótico (Douglass *et al.*, 2018).

Ulloa (1974) reportó a *Candida* en todas las horas de fermentación, lo que concuerda con lo encontrado en este análisis; un aporte importante del presente trabajo es la descripción de las levaduras y la identificación a nivel de especie. Este género ha sido reportado en artículos a nivel mundial como uno de los más comunes en alimentos fermentados, encontrándose en platillos típicos como la *Injera*, originaria de Etiopía, o la *Togwa* (bebida fermentada preparada a partir de yuca, maíz, sorgo, mijo o sus combinaciones) originaria de África (Mugula *et al.*, 2003; Mulaw y Tesfayeh, 2017).

Ulloa & Kurtzman (1975) encontraron a *Candida tropicalis* y *Trichosporon* en el pozol, por medio de una caracterización morfológica y fisiológica, lo que se comprueba con las técnicas moleculares empleadas en este estudio. De acuerdo con estos autores, *Trichosporon* no es amilolítico, lo cual contrasta con lo encontrado en este trabajo.

La presencia de *Trichosporon asahii* en alimentos no es rara, de hecho, ha sido reportada en trabajos previos (Lim y Tay, 2011) en los que esta levadura aparece en el *Tempeh*, un alimento fermentado a base de soya muy popular en Indonesia. En ese mismo trabajo se reportó la capacidad de esta levadura para competir contra varias especies de *Candida*, lo cual podría ayudar en un futuro a entender las interacciones ecológicas en el pozol.

Wacher *et al.*, (2000) reportaron la presencia de *Cladosporium cladosporoides* en el pozol, mientras que en este estudio se encontraron dos especies de éste género: *Cladosporium oxysporum* y *Cladosporium welwitshiicola*; la última es una especie de reciente descubrimiento (Braun *et al.*, 2017). Como se mencionó previamente, en este género la región ITS suele ser insuficiente para identificar hasta nivel especie, por lo que se recomienda emplear otros genes *barcoding* para corroborar la identificación hasta este nivel taxonómico. Este hongo filamentoso también se encuentra en otros alimentos como el *Meju*, un condimento importante de Corea, el

cual se elabora remojando e hirviendo la soya para enseguida fermentarla (Dae-Ho *et al.*, 2013).

Después de identificar molecularmente a los aislados, se realizó una búsqueda en CAZy (<http://www.cazy.org/>). Esta base de datos describe las enzimas que degradan, modifican o crean enlaces glucosídicos, por lo tanto, si existen genomas secuenciados de los hongos encontrados en este trabajo y tienen actividad amilolítica deberán encontrarse en esta base de datos a las enzimas encargadas de hidrolizar el almidón en estos microorganismos.

Al revisar la bibliografía (van der Kaaij *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2012) se decidió buscar en las familias GH13, GH15 y GH31 GH57, GH77 pues la mayoría de las enzimas amilolíticas están divididas en éstas. A excepción de *Pichia kudriavzevii*, en la que se encontraron dos α -amilasas, una glucoamilasa, y una α -glucosidasa (ver registro en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AWU74506.1>) de ninguna hay alguna caracterización publicada, lo cual podría explicarse por la ausencia de genomas secuenciados y por lo tanto, la poca información que existe sobre los sistemas amilolíticos de estos microorganismos.

Aunque no se encontraron estas enzimas en CAZy, diversos estudios mencionan especies con actividad amilolítica en levaduras de los géneros *Candida* y *Trichosporon* (De Mot *et al.*, 1984; Linardi *et al.*, 1993) por lo que en el futuro se pueden caracterizar a los sistemas amilolíticos de estos aislados. En el caso de *Cladosporium*, existen también artículos que refieren actividad amilolítica en el género, particularmente en *Cladosporium cladosporoides* (Augustin *et al.*, 1981). En el presente trabajo se identificaron aislados del pozol correspondientes a *Cladosporium welwitschiicola* la cual es una especie de reciente descubrimiento (Braun *et al.*, 2017), por lo que aún faltan muchos estudios para describir los mecanismos por los cuales este microorganismo hidroliza almidón. Tampoco se encontró información sobre actividad amilolítica en *Cladosporium oxysporum*.

h) Construcción de árbol filogenético

Los enfoques comparativos filogenéticos representan un grupo muy poderoso de métodos para inferir, recuperar o analizar patrones de evolución. A menudo se aplican para reconstruir secuencias ancestrales de proteínas o ácidos nucleicos y estados ancestrales de rasgos morfológicos o fisiológicos en una filogenia dada a través de la cual las especies o secuencias están relacionadas entre sí (Misra *et al.*, 2011). El objetivo de construir un árbol filogenético en este estudio fue encontrar qué tan parecidas o diferentes son las especies identificadas en el pozol.

La construcción de un árbol filogenético requiere cuatro pasos distintos: 1) identificar y adquirir un conjunto de secuencias de DNA o proteínas homólogas, 2) alinear estas secuencias, 3) estimar un árbol a partir de las secuencias alineadas y 4) presentar el árbol de tal manera que transmita claramente la información relevante (Barry, 2013).

Para la construcción de este árbol se empleó el programa MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (<https://www.megasoftware.net/>)

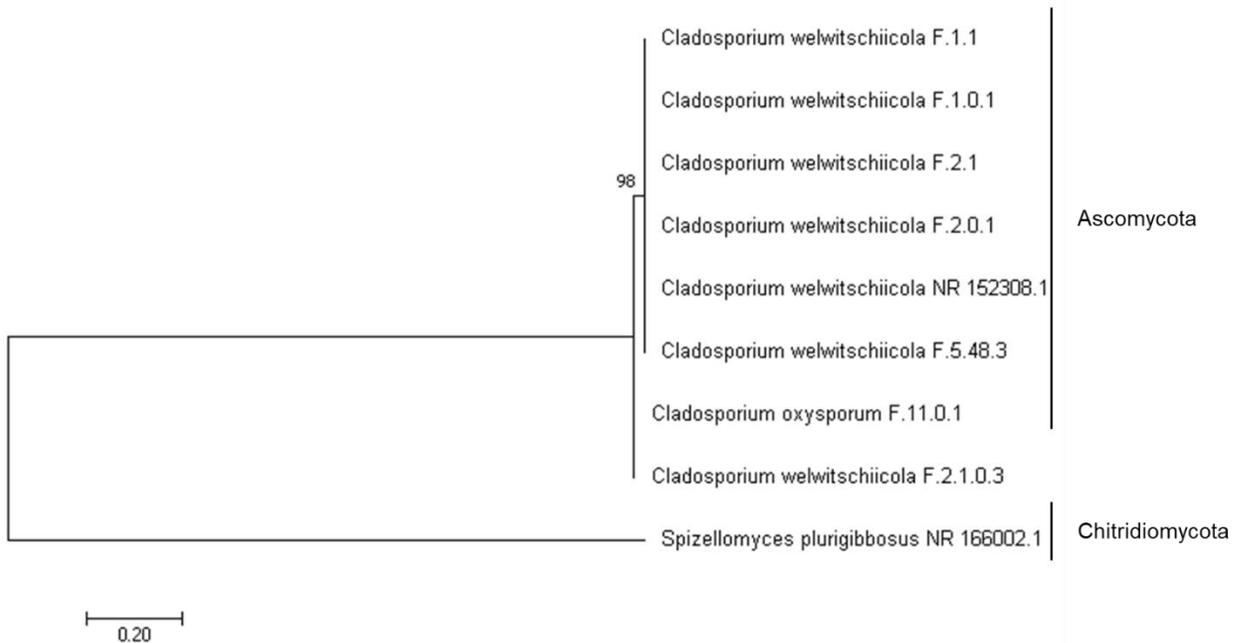


Figura 16. Árbol filogenético de hongos filamentosos con actividad amilolítica en el pozol.

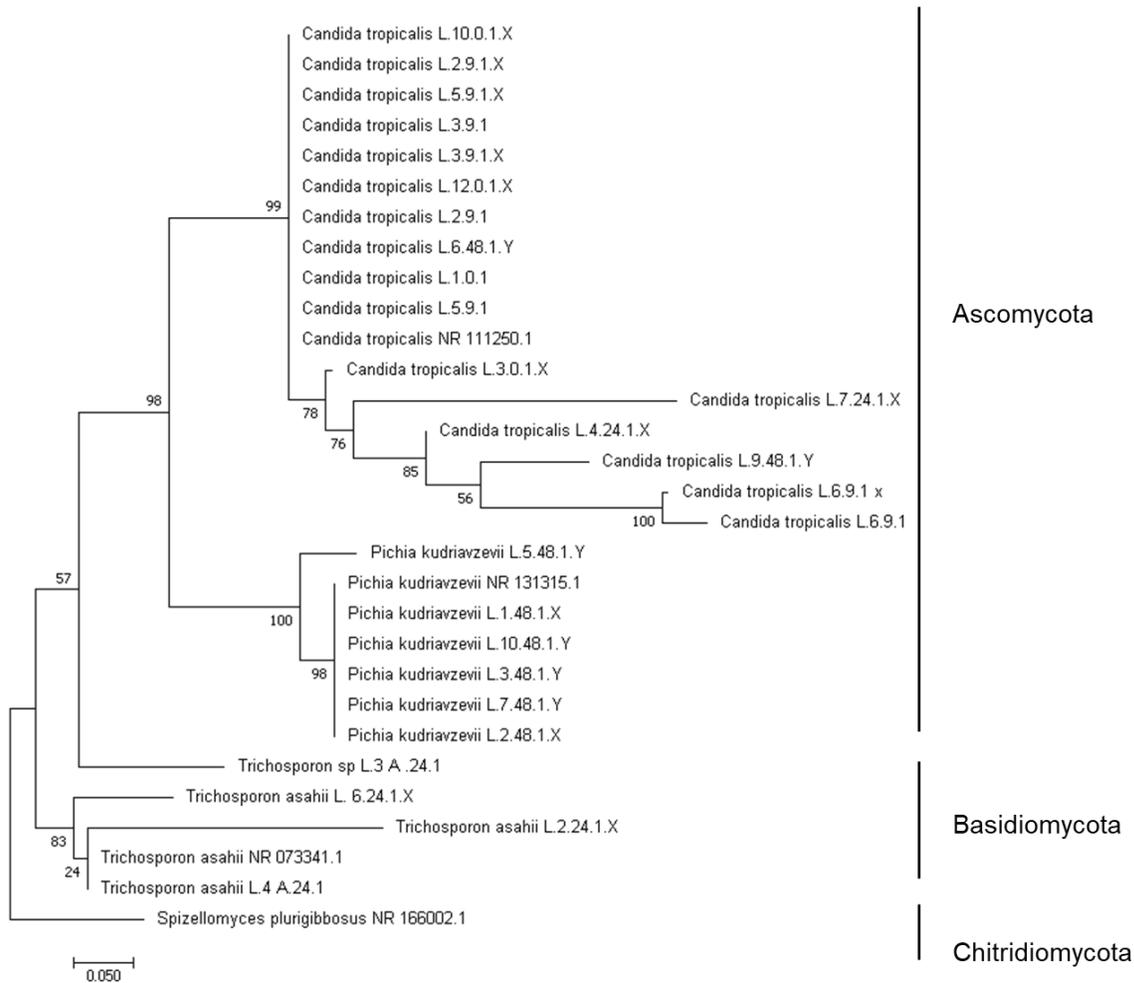


Figura 17. Árbol filogenético de levaduras con actividad amilolítica en el pozol.

Para el grupo externo (outgroup), se eligió a una especie que no estuviera emparentada directamente con los filos Ascomycota (*Candida*, *Cladosporium*, *Pichia*) y Basidiomycota (*Trichosporon*), siendo esta *Spizellomyces plurigibbosus*, la cual pertenece al filo Chytridiomycota (Webster y Weber, 2007). Otro paso importante consistió en añadir secuencias verificadas del NCBI de cada uno de los microorganismos identificados en este trabajo para poder ver las similitudes entre los aislados y las secuencias del NCBI.

El método empleado para la construcción de ambos árboles fue el de máxima verosimilitud basado en el modelo de Tamura-Nei. Se infirió a partir de un bootstrap

de 1500 repeticiones para representar la historia evolutiva de los taxones analizados. Los árboles iniciales para la búsqueda heurística se obtuvieron automáticamente aplicando los algoritmos *Neighbor Join* y *BioNJ*. En total se ingresaron 9 secuencias en el árbol de los hongos filamentosos: 7 de los aislados del pozol, y 2 secuencias de NCBI: 1 del grupo externo: *Spizellomyces plurigibbosus* y la otra de una representante de los aislados identificados: *Cladosporium welwitschiicola* (Figura 16). En el caso del árbol de levaduras se ingresaron 30 secuencias: 26 de los aislados, 1 del grupo externo y las restantes de cada representante de los aislados identificados: *Candida tropicalis*, *Pichia kudriavzevii* y *Trichosporon asahii* (Figura 17).

El árbol filogenético de los hongos filamentosos muestra la similitud de las secuencias ingresadas y se observa como todas están emparentadas, lo cual se espera porque pertenecen al mismo género. Este árbol no puede considerarse referente hasta el nivel de especie porque se necesitan más dianas genéticas en este género para llegar a ese nivel taxonómico, lo cual a su vez explica que, aunque se hayan encontrado dos especies diferentes en el BLAST en el árbol estén más emparentadas que incluso las de la misma especie, como sucede con *Cladosporium oxysporum* y *Cladosporium welwitschiicola* (F.2.1.0.3).

El árbol filogenético de las levaduras se agrupó conforme lo esperado, ya que *Candida* y *Pichia* pertenecen al grupo de los Ascomycota mientras *Trichosporon* pertenece al grupo Basidiomycota. En el caso de *Candida* las secuencias son menos parecidas, lo cual podría indicarnos que son cepas diferentes, aunque se necesitan más análisis para afirmarlo. Los aislados pertenecientes a *Pichia* se agruparon con el grupo de referencia del NCBI a excepción del aislado L.5.48.1.Y.

Trichosporon presentó más secuencias distintas entre sí, ya que sólo se agruparon los aislados L.4.A.24.1, L.2.24.1.X y el grupo de referencia, mientras que los aislados L.6.24.1.X y L.3.A.24.1 no se incluyeron en ese grupo, lo cual indica que las secuencias son menos parecidas y podrían tratarse de cepas o especies distintas, especialmente el L.3.A.24.1 que en el BLAST dio un alto porcentaje de

identidad con varias especies del género, por lo que se propone emplear dianas genéticas complementarias como TEF1 α (Hoang *et al.*, 2019).

VII. CONCLUSIONES

Se corroboró la actividad amilolítica de hongos filamentosos y levaduras en placa y se identificaron 33 aislados, pertenecientes a los genera *Cladosporium*, *Candida*, *Pichia* y *Trichosporon*. Se encontraron 16 aislados pertenecientes a *Candida*, el cual fue el género presente en todas las horas de fermentación. *Pichia* se encontró a las 48 horas de fermentación y se identificaron 6 aislados mientras que *Trichosporon* se encontró únicamente a las 24 h con un total de 4 aislados. *Cladosporium* fue el único género de hongos filamentosos encontrados en la masa presentes a las 0 y 48 h de fermentación; aunque se encontraron dos especies, son tan parecidas que se recomienda el uso de dianas genéticas complementarias.

Todos estos microorganismos ya habían sido mencionados en diferentes alimentos fermentados en todo el mundo, pero es la primera vez que se reportan como amilolíticos presentes en la masa del pozol. El hecho de no encontrar en las bases de datos enzimas relacionadas con la capacidad de hidrolizar almidón de estos microorganismos, se explica por la falta de secuencias y la poca investigación realizada en hongos comparada con toda la información disponible de bacterias, lo cual debe subsanarse ya que los hongos son microorganismos importantes que nos ayudarían a dilucidar interacciones ecológicas en este y otros alimentos fermentados.

VIII. PROSPECTIVAS

- Identificar molecularmente a las cepas xilanolíticas y celulolíticas aisladas del pozol.
- Analizar el metaproteoma del pozol e identificar a las enzimas fúngicas relacionadas con la utilización de polisacáridos.
- Describir a los sistemas amilolíticos de las cepas identificadas del pozol.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Aiyer, P. V. (2005). Amylases and their applications. *African Journal of Biotechnology*, 1525-1529.
- Alejos Velázquez, L. P., Aragón Martínez, M. C., Cornejo Romero, A. (2014). Extracción y purificación del ADN. En A. Cornejo Romero, A. Serrato Díaz, B. Rendón Aguilar, M. G. Rocha Munive, *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos* (págs. 1-25). Distrito Federal: INECC- SEMARNAT.
- Augustin, J., Zemek, J., Fassatiova, O., & Kunlak, L. (1981). Production of a- amylase by microscopic fungi. *Folia Microbiologica*, 142-146.
- Barry, G. H. (2013). Building Phylogenetic Trees from Molecular Data with MEGA. *Molecular Biology and Evolution*, 1229-1235.
- Begerow, D., Nilsson, H., Unterseher, M., Maier, W. (2010). Current state and perspectives of fungal DNA barcoding and rapid identification procedures. *Applied Microbiology Biotechnology*, 99-108.
- Belitz, H. D., y Grosch, W. (1997). *Química de los alimentos*. Zaragoza, España: Acribia.
- Ben Omar, N., y Ampe, F. (2000). Microbial community dynamics during production of the mexican fermented maize dough Pozol. *Applied and environmental microbiology*, 66(9), 3664-3673.
- Braun, U., Crous, P. W., Groenewald, J. Z., Cai, L., Chen, Q., Marincowitz, S. Zhang, Y. (2017). Genera of phytopathogenic fungi: GOPHY 1. *Studies in mycology*, 99-216.
- Cañas, A., Barzana, E., Owens, J. D., & Wachter, C. (1993). La elaboración de pozol en los altos de Chiapas. *Ciencia*(44), 219-229.

- Caporal Flores, M. (2014). Alimentos fermentados de maíz en México, Latinoamérica y África. *Tesis de licenciatura*. Distrito Federal: UNAM.
- Cepero de García, M. C., Restrepo Restrepo, S., Franco-Molano, A. E., Cárdenas Toquica, M., Vargas Estupiñan, N. (2012). *Biología de hongos*. Bogotá, Colombia: Universidad de los Andes, Facultad de Ciencias.
- Chen, W., Xie, T., Shao, Y., & Chen, F. (2012). Phylogenomic relationships between amylolytic enzymes from 85 strains of Fungi . *PLoS ONE*, 1-15.
- Cruz, U. S., y Ulloa, M. (1973). Alimentos fermentados de maíz consumidos en México y otros países latinoamericanos. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural*(34), 423-457.
- Cuadros-Orellana, S., Rabelo Leite, L., Smith, A., Dutra Medeiros, J., Badotti, F., Fonseca. (2013). Assessment of fungal diversity in the environment using metagenomics: a decade in review . *Fungal Genomics & Biology*, 1-13.
- Dae-Ho, K., Seon-Hwa, K., Soon-Wo, K., Jong-Kyu, L., Seung-Beom, H. (2013). Mycoflora of Soybeans Used for Meju Fermentation. *Mycobiology*, 100-107.
- De Mot, R., Van Oudendijck, E., Hougaerts, S., Verachert, H. (1984). Effect of medium composition on amylase production by some starch-degrading yeasts. *FEMS Microbiology Letters*, 169-173.
- Díaz Ruíz, G., Wachter Rodarte, C. (2003). Métodos para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados. *Revista latinoamericana de microbiología*, 45(1-2), 30-40.
- Díaz-Ruiz, G., Guyot, J. P., 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. doi:10.1128/AEM.69.8.4367-4374.2003

- Douglass, A., Offei, B., Braun-Galleani, S., Coughlan, A. Y., Martos, A., Ortíz-Merino, R. (2018). Population genomics shows no distinction between pathogenic *Candida krusei* and environmental *Pichia kudriavzevii*: One species, four names. *PLOS Pathogens*, 1-27.
- Espinosa, L. (2007). Guía práctica sobre la técnica de PCR. En L. Eguiarte, V. Souza, X. Aguirre, *Ecología molecular* (págs. 517-526). México DF: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Fierro Fierro, F. (2014). Electroforesis de ADN. En A. Cornejo Romero, A. Serrato Díaz, B. Rendón Aguilar, M. G. Rocha Munive, *Herramientas moleculares aplicadas en ecología*. México: INECC.
- Fogarty, W. M. (1983). Microbial amylases. En W. M. Fogarty, *Microbial enzymes and biotechnology* (págs. 1-92). London: Applied Science Publishers.
- González Pillado, S. C. (2018). *Influencia de la granulometría en la masa de pozol, sobre la presencia y dinámica de crecimiento de microorganismos*. CDMX: UNAM.
- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Kumar, V., Chauhan, B. (2003). Microbial amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry*, 1599-1616.
- Hoang, M. T., Irinyi, L., Chen, S. C., Sorrell, T. C. (2019). Dual DNA Barcoding for the Molecular Identification of the Agents of Invasive Fungal Infections. *Frontiers in Microbiology*, 1647.
- Homolka, L. (2013). Methods of Cryopreservation in Fungi. En V. Gupta, M. Tuohy, M. Ayyachamy, K. Turner, & A. O'Donovan, *Laboratory protocols in Fungal Biology* (págs. 9-16). New York, NY: Springer.
- Jiménez Vera, R., González Cortés, N., Magaña Contreras, A., Corona Cruz, A. (2010). Evaluación microbiológica y sensorial de fermentados de pozol blanco, con cacao (*Theobroma cacao*) y coco (*Cocos nucifera*). *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de alimentos*, 1(1), 70-80.

- Kurtzman, C. P., Fell, J. W. (2010). *The Yeasts*. USA: Elsevier Science.
- Lim, S. L., Tay, S. T. (2011). Diversity and killer activity of yeasts in Malaysian fermented food samples. *Tropical Biomedicine*, 438-443.
- Lim, T. K. (2013). Chapter Zea Mays . En *Edible Medicinal and Non-Medical Plants* (págs. 416-447). New York: Springer science + business media .
- Linardi, V. R., Andrade, C., Figueira, M. M., Souza, V. (1993). Characterization of the amyolytic system of Candida strains. *Folia Microbiologica* , 281-284.
- López-Jácome, L. E., Hernández-Durán, M., Colín-Castro, C. A., Ortega-Peña, S., Cerón-González, G., Franco-Cendejas, R. (2014). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Investigación en discapacidad*, 10-18.
- Márquez Valdelamar, L. M., Serrato Díaz, A., Cerritos Flores, R. (2014). Secuenciación de fragmentos de ADN. En A. Cornejo Romero, A. Serrato Díaz, B. Rendón Aguilar, M. G. Rocha Munive, *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos técnicos y prácticos* (págs. 231-249). Distrito Federal: INECC SEMARNAT.
- Martínez, A. (2019). Microorganismos degradadores de polisacáridos aislados de la fermentación del pozol. *Tesis de licenciatura*. UNAM. CDMX.
- Misra, J. K., Tewari, J. P., Deshmukh, S. K. (2011). *Systematics and Evolution of Fungi*. Boca Raton, FL: Taylor & Francis Group.
- Mugula, J. K., Narvhus, J. A., Sorhaug, T. (2003). Use of starter cultures of lactic acid bacteria and yeasts in the preparation of towga, a Tanzanian fermented food. *International Journal Of Food Microbiology*, 307-318.
- Mulaw, G., Tesfayeh, A. (2017). Technology and microbiology of traditionally fermented food and beverage products of Ethiopia: A review. *African Journal Of Microbiology Research*, 825-844.

- Nuraida, L., Wachter, C., Owens, J. (1995). Microbiology of pozol, a Mexican fermented maize dough. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 11, 567-571.
- Okeke, B. C., Hall, W. R., Nanjundaswamy, A., Thomson, S. M., Yasaman, D., Sawyer, L., Prescott, A. (2015). Selection and molecular characterization of cellulolytic-xylanolytic fungi from surface soil-biomass mixtures from Black Belt sites. *Microbiological research*, 24-33.
- Paliwal, R. L. (2001). Usos del maíz. En FAO, *El maíz en los trópicos: mejoramiento y producción* (págs. 45-46). Roma: FAO.
- Papagianni, M. (2004). Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes . *Biotechnol Adv*, 189-259.
- Paredes López, O., Guevara Lara, F., Bello Pérez, L. A. (2009). La nixtamalización y el valor nutritivo del maíz. *Ciencias*, 60-70.
- Raja, H. A., Miller, A. N., Pearce, C. J., Oberlies, N. H. (2017). Fungal identification using molecular tools: a primer for the natural products research community. *Journal of natural products*, 756-770.
- Rizo Villagrana, J. M. (2012). *Enzimas amilolíticas del pozol, aproximación proteómica*. Distrito Federal: UNAM.
- Salazar Montes, A. M., Sandoval Rodríguez, A. S., Armendáriz Borunda, J. S. (2013). *Biología molecular. Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud*. Distrito Federal: Mc Graw Hill Education.
- Sambrook, J., Green, R. M. (2012). *Molecular cloning*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sankaranarayanan, A., Amerasan, N., Dhanasekaran, D. (2020). *Fermented Food Products*. Boca Raton: CRC Press.

- Saranraj, P., Stella, D. (2013). Fungal amylase- A Review. *International Journal of Microbiological Research*, 203-211.
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, A. C., Chen, W. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *PNAS*, 109(16), 6241-6246.
- Seifert, K. A. (2009). Progress towards DNA barcoding of fungi. *Molecular ecology resources*, 83-89.
- Serna-Saldívar, S. O., Gómez, M. H., Rooney, L. W. (1990). Technology chemistry and nutritive value of alkaline-cooked corn products. *Advances in cereal science and technology*, 243-295.
- Serrato Díaz, A., Flores Rentería, L., Aportela Cortez, J., Sierra Palacios, E. (2014). PCR: Reacción en cadena de la polimerasa. En A. Cornejo Romero, A. Serrato Díaz, B. Rendón Aguilar, & M. G. Rocha Munive, *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos* (págs. 53-73). México: SEMARNAT-INECC.
- Silva, S., Negri, M., Henriques, M., Oliveira, R., Williams, D. W., Azeredo, J. (2012). *Candida glabrata*, *Candida parasilopsis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance . *FEMS Microbiology Review*, 288-305}}.
- Souza Monteiro, P., Maghales, P. (2010). Application of microbial α -amylase in industry. A review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 850-861.
- Steinkraus, K. (1983). Lactic acid fermentation in the production of foods from vegetables, cereals and legumes. *Antonie van Leeuwenhoek*(49), 337-48.
- Ulloa, M. (1974). Mycofloral succession in pozol from Tabasco, Mexico. *Boletín Sociedad Mexicana de Micología* .

- Ulloa, M., Kurtzman, C. P. (1975). Occurrence of *Candida parasilopsis*, *C. tropicalis*, and *Saccharomyces cerevisiae* in pozol from Tabasco, Mexico. *Bol. Soc. Mex. Mic.*, 7-12.
- Ulloa, M., Herrera, T., Lappe, P. (1987). *Fermentaciones tradicionales indígenas de México*. México: Serie de investigaciones sociales .
- Van Burik, J. A., Schreckhise, R. W., White, T. C., Bowden, R. A., Myerson, D. (1998). Comparison of six extraction techniques for isolation of DNA from filamentous fungi. *Medical Mycology* , 299-303.
- Van der Kaaij, R. M., Janecek, S., van der Maarel, M. J., Dijkhuizen, L. (2007). Phylogenetic and biochemical characterization of a novel cluster of intracellular fungal α -amylase enzymes. *Microbiology*, 4003-4015.
- Wacher, C. (2014). La biotecnología alimentaria antigua: Los alimentos fermentados. *Revista Digital Universitaria*, 8(15), 2-14.
- Wacher, C., Cañas, A., Barzana, E., Lappe, P., Ulloa, M., Owens, J. D. (2000). Microbiology of Indian and Mestizo pozol fermentations. *Food microbiology*, 17, 251-256.
- Webster, J., Weber, R. (2007). Introduction to fungi. *New York: Cambridge University Press*.
- Xu, J. (2016). Fungal DNA barcoding. *Genome*, 913-932.
- Zhang Y. Z., Zhang, S., Liu, X. Z., Wen, H. A., Wang, M. (2010). A simple method of genomic DNA extraction suitable for analysis of bulk fungal strains. *Letters in applied microbiology*.

ANEXO I

a) Medio para hongos (Okeke et al., 2015)

Componentes	Cantidad g/L
KH_2PO_4	2
$(NH_4)_2SO_4$	1.2
$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	0.5
$CaCl_2$	0.1
Extracto levadura	1.5
Agar	15
Fuente de carbono 0.5%	5

b) Soluciones para extracción de DNA genómico

Componentes	Concentración final de los reactivos
Tritón 200x	2%
SDS	1%
NaCl	100mM
EDTA	1mM

Buffer de carga 6x para DNA	Buffer TE
0.25% azul de bromofenol	Tris HCL 1M/ EDTA 0.5 M pH 8
0.25% cianol FF de xileno	1000 mL Tris- HCL 1 M
30% glicerol	200 μL EDTA 0.5 M