



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Estudio de cepas de *Weissella confusa* para metabolizar carbohidratos disponibles en el pozol

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Ing. Diana Hernández Oaxaca

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Agustín López Munguía Canales  
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Lorenzo Patrick Segovia Forcella  
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

Dra. Romina Rodríguez Sanoja  
[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)

Cuernavaca, Morelos. Diciembre, 2018.



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.

## **Integrantes del jurado de examen de grado**

Dr. José Adelfo Escalante Lozada

Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis. Instituto de Biotecnología, UNAM.

Dr. Adrián Ochoa Leyva

Departamento de Microbiología Molecular. Instituto de biotecnología, UNAM.

Dr. Francisco Ruíz Terán

Departamento de Alimentos y Biotecnología. Facultad de Química, UNAM.

Dra. Gloria Díaz Ruíz

Departamento de Alimentos y Biotecnología. Facultad de Química, UNAM.

Dr. Fidel Alejandro Sánchez Flores

Unidad de Secuenciación Masiva y Bioinformática. Instituto de Biotecnología, UNAM.

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de Ingeniería y Tecnología Enzimática del Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), bajo la dirección del Dr. Agustín López Munguía Canales y el apoyo técnico de la M.C. Ma. Elena Rodríguez Alegría y el T.L. Fernando González Muñoz del mismo laboratorio. Los análisis filogenéticos y de identificación taxonómica se hicieron bajo el apoyo y asesoría del Dr. Luis Fernando Lozano Aguirre Beltrán del Programa de Genómica Evolutiva del Centro de Ciencias Genómicas de la UNAM.

El proyecto fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) mediante la beca número 273012 y por el apoyo otorgado por la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) a través del proyecto DGAPA/PAPIIT/UNAM/IN22391

## Dedicatorias

A toda mi familia Oaxaca porque sin su apoyo, confianza y amor no hubiera siquiera iniciado la maestría. En especial a **mi mamá** que me apoya incondicionalmente en cada decisión que tomo y a mi hijo **Balám** porque me impulsa a ser mejor persona. A mi tía **Mary** por ser una pieza clave para que pudiera comenzar el posgrado, junto con mis tías **Lila, Hada, Maxi** que siempre están pendientes de mí y me apoyan incondicionalmente y a mi tía **Susy** por la ayuda que nos ha brindado en los momentos difíciles.

A mis amigos de toda la vida porque me han llenado de alegría y son la familia que he escogido. A **Adriana, Silvia, Mabel, Víctor, Christian y Jesús**, porque siempre me hacen reír y enojar, porque a pesar de estar lejos han estado en los momentos más difíciles y en las alegrías me han recibido con cervezas y comida. Posiblemente la vida nos siga alejando, pero sé que siempre estaremos unidos.

A Rodolfo por ser mi mejor amigo y un soporte en mi vida, este trabajo no se hubiera logrado sin tu apoyo. Gracias por enseñarme tanto, por caminar a mi lado y por todo lo que representas para mí.

A todos mis seres queridos que partieron en este trayecto, Jacky, abuelita, papá y Ruy. Aunque ya no estén presentes sigo aprendiendo de Ustedes.

## Agradecimientos

Al **Dr. Agustín López Munguía Canales**, por darme la oportunidad de pertenecer a un gran grupo de trabajo, por todas las enseñanzas, el apoyo y la guía incondicional en la realización del proyecto. Por la calidez humana que le caracteriza, su alegría. Tengo todo que aprender de Usted, es un gran ejemplo a seguir como científico y como ser humano. Gracias por todo.

A los miembros del comité tutor **Dr. Lorenzo Segovia Forcella** y **Dra. Romina Rodríguez Sanoja** por sus comentarios, sugerencias y discusiones durante los seminarios de avances.

A los miembros del jurado de examen **Dr. Adelfo Escalante Lozada**, **Dr. Adrián Ochoa**, **Dr. Francisco Ruíz Terán**, **Dra. Gloria Díaz Ruíz** y **Dr. Alejandro Sánchez Flores** por la revisión y los aportes realizados a este trabajo y por el tiempo que se tomaron para discutirlo.

Al **Dr. Luis Fernando Lozano Aguirre Beltrán** por el apoyo y la asesoría en los análisis bioinformáticos. Por tu energía y disposición, sin tu ayuda no lo habría logrado.

A la **Dra. Rosa Ma. Gutiérrez Ríos**, **Dr. Enrique Merino Pérez** y sus estudiantes **Lic. Nori Castañeda Gómez** y **M.C. Nataly Morales Galeana** por el apoyo con reactivos y la asesoría brindada en los experimentos de biología molecular.

A la **M. C. Ma. Elena Rodríguez Alegría**, el **T.L. Fernando González Muñoz** y la **M.C. Luz Cristina Vallejo** por la asesoría técnica brindada durante la realización del proyecto.

A las laboratoristas **Aurelia Ocampo Vargas** y **Judith Uribe Soriano** porque gracias a su trabajo los experimentos fueron más sencillos y porque son un soporte para el funcionamiento del laboratorio.

A los miembros de docencia **Antonio Guillen** y **Gloria Villa** por su valiosa ayuda y disposición en todos los tramites.

A mis compañeros del laboratorio **Jaime**, **Cris**, **Ibeth** y **Ale** por las discusiones y consejos a largo del proyecto. Por las pláticas de todo y nada, por escuchar mis dramas cuando no salían mis experimentos, por hacer divertido el trabajo. Gracias por la amistad y la confianza que me han brindado.

A mis compañeros de maestría **Rafa Bustamante** por enseñarme a hacer los análisis de CAZy, a **Luigui** por ayudarme cuando me atoraba con algún comando, a **Rafa López** y **Julián** por las pláticas y discusiones que teníamos en los pasillos. Por la solidaridad que he encontrado en todos Ustedes.

A mis amigos **Aranza**, **Oscar**, **Nori**, **Luigui**, **Ibeth** y **Ale** por compartir sufrimientos y alegrías. Gracias por su apoyo, confianza, complicidad y amistad, la maestría fue más divertida con Ustedes.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>DEDICATORIAS</b> .....	<b>4</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>5</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>8</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>10</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>11</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>12</b>
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	<b>13</b>
2.1 EL POZOL.....	13
2.2 COMPOSICIÓN DEL GRANO DE MAÍZ .....	14
2.3 MICROBIOLOGÍA DEL POZOL .....	16
2.4 EL GÉNERO <i>WEISSELLA</i> Y SUS NICHOS ECOLÓGICOS .....	20
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	<b>24</b>
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	<b>24</b>
4.1 OBJETIVO GENERAL .....	24
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>25</b>
5.1 MICROORGANISMOS .....	25
5.2 CINÉTICAS DE CRECIMIENTO Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.....	25
5.2.1 <i>Preparación del inóculo</i> .....	25
5.2.2 <i>Evaluación de crecimiento con diferentes fuentes de carbono</i> .....	25
5.2.3 <i>Producción de xilooligosacáridos</i> .....	26
5.2.4 <i>Determinación de actividad xilanolítica</i> .....	27
5.2.5 <i>Determinación de la actividad xilosidasa</i> .....	27
5.2.6 <i>Cromatografía en capa fina</i> .....	27
5.2.7 <i>Cromatografía de intercambio iónico (HPAEC)-PAD</i> .....	28
5.2.8 <i>Determinación de actividad glicosiltransferasa</i> .....	28
5.2.9 <i>Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)</i> .....	28
5.2.10 <i>Cromatografía de permeación en Gel (GPC)</i> .....	28
5.3 ANÁLISIS GENÓMICO .....	29

5.3.1 Extracción de DNA.....	29
5.3.2 Secuenciación de los genomas.....	29
5.3.3 Ensamble y Anotación de genomas.....	29
5.3.4 Predicción y anotación de genes.....	31
5.3.5 Verificación de las cepas .....	31
5.3.6 Búsqueda de genes codificantes para enzimas degradadoras de carbohidratos (CAZy).....	32
5.4 SELECCIÓN DE GENES.....	34
5.4.1 Electroforesis en gel desnaturalizante (SDS-PAGE) .....	34
5.4.2 Lisis celular.....	35
5.4.3 Búsqueda de genes similares a las glicosiltransferasas de Wcp-3a .....	35
5.5 EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE LOS GENES SELECCIONADOS .....	36
5.5.1 Amplificación de genes seleccionados.....	36
5.5.2 Clonación de genes codificantes .....	36
5.5.3 Transformación de células.....	36
5.5.4 Selección de clones.....	37
5.5.5 Expresión de genes y obtención de extracto enzimático .....	37
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIONES .....</b>	<b>38</b>
6.1 FERMENTACIONES .....	38
6.1.1 Fermentaciones control.....	38
6.1.2 Fermentaciones con xilano .....	39
6.1.3 Fermentaciones con xilooligosacáridos (XOS).....	40
6.1.4 Fermentaciones con sacarosa.....	48
6.2 ANÁLISIS GENÓMICO .....	53
6.2.1 Extracción de DNA cromosómico y datos de secuenciación generados.....	53
6.2.2 Limpieza de los datos .....	53
6.2.3 Ensamble de genomas.....	54
6.2.4 Anotación de los ensamblados.....	56

6.2.5 Identificación taxonómica de las cepas <i>WcL17</i> y <i>Wcp-3a</i> aisladas del pozol.....	57
6.2.6 Búsqueda de genes codificantes .....	62
6.3 SELECCIÓN DE GENES.....	67
6.3.1 Selección de Glucosiltransferasa.....	67
6.3.2 Selección de $\beta$ -xilosidasa .....	70
6.4 EXPRESIÓN DE ENZIMAS GLUCOSILTRANSFERASA Y $\beta$ -XILOSIDASA.....	73
6.4.1 Expresión del gen <i>Dsr_Wcp_02205</i> .....	73
6.4.2 Expresión de la enzima $\beta$ -xilosidasa.....	77
6.5 <i>WEISSELLA</i> EN LA METAGENÓMICA DEL POZOL .....	80
<b>7. CONCLUSIONES .....</b>	<b>81</b>
<b>8. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>82</b>
<b>8. REFERENCIAS.....</b>	<b>83</b>

## Índice de Figuras

<b>FÍGURA 1. ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN DEL GRANO DE MAÍZ.....</b>	<b>15</b>
<b>FIGURA 2. CRECIMIENTO DE 5 CEPAS DE WEISSELLA EN MRS-GLUCOSA. CADA CEPA SE DESCRIBE CON UN SÍMBOLO ESPECÍFICO.....</b>	<b>38</b>
<b>FIGURA 3. CRECIMIENTO DE WEISSELLA SPP. EN MEDIO MRS-XILANO. ....</b>	<b>39</b>
<b>FIGURA 4. A) PRODUCCIÓN DE XILOOLIGOSACÁRIDOS MEDIANTE HIDRÓLISIS ÁCIDA EN DIFERENTES CONDICIONES .....</b>	<b>41</b>
<b>FIGURA 5. CRECIMIENTO DE LAS CEPAS DE WEISSELLA SPP EN XOS COMO FUENTE DE CARBONO.....</b>	<b>42</b>
<b>FIGURA 6. CONSUMO DE XOS POR CEPAS WEISSELLA A LOS LARGO DEL CULTIVO DESCRITO EN LA FIGURA 5.....</b>	<b>43</b>
<b>FIGURA 7. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (TLC) DEL PERFIL DE OLIGOSACÁRIDOS MODIFICADO POR LA ACTIVIDAD XILOSIDASA EN REACCIONES CON LOS MEDIOS DE CULTIVO DE CADA UNA DE LAS CEPAS. ....</b>	<b>44</b>
<b>FIGURA 8. PERFIL DE CONSUMO DE XOS DURANTE LA FERMENTACIÓN MEDIANTE LA CEPA WCL17 ANALIZADOS MEDIANTE HPAEC-PAD .....</b>	<b>45</b>
<b>FIGURA 9. PERFIL DE ACTIVIDAD XILOSIDASA POR WCL17. ....</b>	<b>47</b>
<b>FIGURA 10. CULTIVO DE 5 CEPAS DE WEISSELLA AISLADAS DEL POZOL EN MEDIO MRS-SACAROSA. ....</b>	<b>48</b>
<b>FIGURA 11. CINÉTICAS DE CRECIMIENTO DE TRES CEPAS DE WEISSELLA (<i>W. CONFUSA SNC45</i>, <i>W. CONFUSA SNC40</i> Y <i>W. PARAMESENTEROIDES</i>) EN MRS-SACAROSA, SELECCIONADAS POR SU MAYOR EFICIENCIA EN CRECIMIENTO Y ACTIVIDAD SOBRE SACAROSA. SE REPORTA TAMBIÉN EL CONSUMO DE SACAROSA Y LA EVOLUCIÓN DE GLUCOSA Y FRUCTOSA,</b>	

ADEMÁS DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA A LAS 3 H ASÍ COMO LA DISTRIBUCIÓN DE PESO MOLECULAR DEL POLÍMERO DESDE LAS 0 A LAS 6 Y 12 H DE CULTIVO.....	50
FIGURA 12. FORMACIÓN DE POLÍMERO POR WP EN MEDIO DE REACCIÓN CON SACAROSA.....	52
FIGURA 13. CALIDAD DE LECTURAS DE SECUENCIACIÓN DE LA CEPA WCL17.....	53
FIGURA 14. CALIDAD DE LECTURAS DE SECUENCIACIÓN DE LA CEPA WCP.....	54
FIGURA 15. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS ENSAMBLES REALIZADOS PARA EL GENOMA DE WCL17.....	55
FIGURA 16. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS ENSAMBLES REALIZADOS PARA EL GENOMA DE WCP-3A.....	56
FIGURA 17. UBICACIÓN DE LAS DOS CEPAS DE <i>WEISSELLA</i> AISLADAS DE POZOL WCL17 Y WCP, DENTRO DE UN ÁRBOL FILOGENÉTICO DE MÁXIMA VEROSIMILITUD CONSTRUIDO CON SECUENCIAS DE RRNA DE ESPECIES REPRESENTATIVAS DE <i>WEISSELLA</i> . ....	59
FIGURA 18. UBICACIÓN DE LAS DOS CEPAS DE <i>WEISSELLA</i> AISLADAS DE POZOL WCL17 Y WCP, DENTRO DE UN ÁRBOL FILOGENÉTICO DE MÁXIMA VEROSIMILITUD CONSTRUIDO CON SECUENCIAS DE GENES ÚNICOS (“HOUSEKEEPING”) DE ESPECIES REPRESENTATIVAS DE <i>WEISSELLA</i> . ....	60
FIGURA 19. ANÁLISIS BASADO EN EL PROMEDIO DE IDENTIDAD DE NUCLEÓTIDOS (POR SUS SIGLAS EN INGLÉS ANIM). .	61
FIGURA 20. PERFIL DEL POTENCIAL DEL GÉNERO <i>WEISSELLA</i> PARA DEGRADAR CARBOHIDRATOS COMPLEJOS Y EN PARTICULAR, EL DE LAS DOS CEPAS SELECCIONADAS EN ESTE TRABAJO: WCL17 Y WCP. ELABORADO CON BASE EN LA INFORMACIÓN OBTENIDA DEL GENOMA DE LAS CEPAS HASTA AHORA SECUENCIADAS Y LA BASE DE DATOS CAZY. ....	63
FIGURA 21. RESUMEN DEL NÚMERO DE GENES QUE CORRESPONDEN A CAZYMES DENTRO DE LAS CEPAS DE <i>WEISSELLA</i> WCL17 Y WCP-3A .....	66
FIGURA 22. GENES CODIFICANTES PARA GLUCOSILTRANSFERASAS Y ANÁLISIS DE SU SECUENCIA.....	68
FIGURA 23. ZIMOGRAMA DE ACTIVIDAD GLICOSILTRANSFERASA DE PROTEÍNAS ASOCIADAS A LAS CÉLULAS Y AL SOBRENADANTE DE UN CULTIVO DE LA CEPA DE <i>WEISSELLA</i> CONFUSA WCP. ....	69
FIGURA 24. GENES CODIFICANTES PARA $\beta$ -XILOSIDASA Y ANÁLISIS DE SU SECUENCIA .....	71
FIGURA 25. ZIMOGRAMA DE ACTIVIDAD $\beta$ -XILOSIDASA DE PROTEÍNAS ASOCIADAS A LAS CÉLULAS O DEL SOBRENADANTE DE CULTIVOS DE LA CEPA WCL17. ....	72
FIGURA 26. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA AL 1% DE LA AMPLIFICACIÓN DEL GEN DSR_WCP_02205.....	73
FIGURA 27. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA AL 1% DE LAS CONSTRUCCIONES DIGERIDAS POR ENZIMAS DE RESTRICCIÓN.....	74
FIGURA 28. EXPRESIÓN DE LA ENZIMA GLUCOSILTRANSFERASA DE WCP-3A, VERIFICADA MEDIANTE SDS-PAGE Y ZIMOGRAMA DE ACTIVIDAD. ....	75
FIGURA 29. ANÁLISIS POR GPC-HPLC DE LOS POLISACÁRIDOS SINTETIZADOS POR LA ENZIMA WCP_02205, CORRESPONDIENTE A .....	76
FIGURA 30. PRODUCTOS DE REACCIÓN DE POLÍMERO PRODUCIDO POR WCP_02205 SOMETIDO A LA ACCIÓN DE UNA CON UNA DEXTRANASA.....	76

FIGURA 31. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA AL 1% DE AMPLIFICACIÓN, CLONACIÓN Y DIGESTIÓN DE WCL17_01258 Y PET22B(+)	78
FIGURA 32. SDS-PAGE DE PET22-BXL_WCL17_01258 EXPRESADA EN BL21	79

## Índice de Tablas

TABLA 1. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LAS ESTRUCTURAS DEL GRANO DE MAÍZ	15
TABLA 2. ESPECIES DE WEISSELLA Y SU FUENTE DE AISLAMIENTO	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
TABLA 3. WEISSELLA SPP. EN FERMENTADOS A BASE DE CEREALES	23
TABLA 4. PRODUCCIÓN DE XILOOLIGOSACÁRIDOS	26
TABLA 5. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS GENOMAS REPRESENTATIVOS DEL GÉNERO WEISSELLA Y LOS GENOMAS SECUENCIADOS EN ESTE TRABAJO	33
TABLA 6. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS MUESTRAS DE DNA Y DE LOS DATOS GENERADOS POR ILLUMINA NEXTSEQ500	53
TABLA 7. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA ANOTACIÓN DE LOS GENOMAS	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
TABLA 8. DATOS GENERADOS EN BLAST DE LA SECUENCIA 16S DE RRNA DE AMBOS GENOMAS	57
TABLA 9. PORCENTAJE DE IDENTIDAD DE GLUCOSILTRANSFERASAS DE WCP-3 <sup>a</sup> CON GLUCOSILTRANSFERASAS DE ORGANISMOS YA CARACTERIZADOS	70

## Resumen

El género *Weissella* lo integra un grupo de bacterias Gram-positivas, catalasa negativa, anaerobias facultativas con un metabolismo fermentativo. Las cepas del género que hasta ahora se conocen se han aislado de una gran diversidad de nichos ecológicos que van desde la piel, la leche y las heces de animales y seres humanos, hasta los alimentos, principalmente los fermentados. A lo largo del mundo existe una gran variedad de alimentos fermentados a base de cereales de los que se han aislado e identificado diversas especies de este género bacteriano. Tomando como base el pozol, bebida fermentada a base de maíz nixtamalizado, nos preguntamos qué papel podría estar cumpliendo en la fermentación. Tomando como antecedente la nula actividad amilolítica reportada en las cepas estudiadas en este trabajo, se evaluó como alternativa de fuente de carbono en el pozol, la capacidad para metabolizar xilano, xilooligosacáridos y sacarosa de cinco cepas de *Weissella* aisladas del pozol. No se observó crecimiento significativo en xilano de abedul, pero sí en xilooligosacáridos y sacarosa. La mayor actividad xilosidasa y glucosiltransferasa mostrada sobre estos sustratos por las cepas WcL17 y Wcp-3a respectivamente, llevó a su selección para caracterización genómica. Se ensamblaron y anotaron los genomas de ambas cepas con un tamaño de 2.3 Mb en 30 contigs para WcL17 y 2.2 Mb en 45 contigs para Wcp-3a. La asignación taxonómica realizada ubicó a ambas cepas en la especie *Weissella confusa*. Se realizaron análisis genómicos para evaluar el contenido génico codificante para enzimas activas sobre carbohidratos (CAZy), los que revelaron un contenido de 4 GH y 3 CBM que actúan sobre almidón en ambas cepas; 7 GH, 7 CE (en WcL17), 6 CE (en Wcp-3a) que actúan sobre hemicelulosa; 7 GH (en WcL17) y 5 GH (en Wcp-3a) que actúan sobre celulosa y, 2 GH (en WcL17), 3 GH (en Wcp-3a) y 1 CBM en ambas cepas que actúan sobre sacarosa. Con el fin de verificar la funcionalidad de al menos dos genes, se realizó la expresión heteróloga del gen WcL17\_01258 codificante para una  $\beta$ -xilosidasa (GH3) y del gen Wcp\_02205 codificante para una glicosiltransferasa (GH70), obteniendo una actividad de  $4.4 \pm 0.071$  y  $0.06 \pm 0.019$  U por mililitro de cultivo respectivamente. Estos resultados sugieren que ambas cepas tienen el potencial a nivel de secuencia para metabolizar la sacarosa, residuos de hemicelulosa y almidón que se encuentran disponibles en el pozol, y en general la amplia versatilidad de las cepas del género para participar en procesos de fermentación de productos naturales con fuentes de carbono y energía heterogéneas.

## 1. Introducción

El pozol, del náhuatl *pozolli*, es una bebida ácida obtenida a partir de la fermentación de maíz nixtamalizado. En la antigüedad, era uno de los componentes culturales más importantes de los mayas peninsulares; se ofrendaba a los dioses y a los espíritus en ceremonias relacionadas con el cultivo y la cosecha del maíz (Vasallo, 2016). En la actualidad, se consume en el sureste de México y en algunos países de Centroamérica, particularmente entre los grupos indígenas de estas regiones. El pozol sigue siendo un alimento de importancia nutricional, cultural y económica; forma parte de la dieta fundamental de estos pueblos (Sangwan *et al.*, 2014).

Desde hace varias décadas, se ha estudiado la complejidad microbiológica que da lugar a la fermentación de esta bebida tradicional mesoamericana, partiendo de la base de que las bacterias ácido lácticas (BAL) son dominantes en todas las etapas de fermentación del pozol (Ampe *et al.*, 1999). Mediante técnicas microbiológicas, bioquímicas y moleculares, se ha identificado una amplia diversidad bacteriana en la masa fermentada. Los principales géneros bacterianos detectados incluyen *Clostridium*, *Bacillus*, *Agrobacterium*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Weissella*, siendo los seis últimos los más frecuentemente reportados a lo largo de la historia de la investigación microbiológica de esta bebida (Ulloa *et al.*, 1987; ben Omar y Ampe, 2000; Escalante *et al.*, 2001; Bolaños *et al.*, 2006).

Considerando la alta concentración de almidón del pozol, Díaz y col. (2003) evaluaron la actividad amilolítica de 40 cepas aisladas de esta bebida, demostrando que las pertenecientes al género *Streptococcus* tenían el mayor crecimiento sobre este sustrato. Sin embargo, reportaron también que, en comparación con otras bacterias ácido-lácticas, estas cepas presentaban una actividad hidrolítica marcadamente baja. Dado lo anterior y tomando en cuenta la composición del grano de maíz y la baja concentración de monosacáridos tras la nixtamalización, Cooper y col. (2016), evaluaron el crecimiento y la actividad enzimática de este género sobre xilano de abedul y xilano aislado del nejayote. En ambos sustratos, las cepas evaluadas, crecieron y presentaron actividad hidrolítica tomando preferencia por el xilano aislado del nejayote.

Por otra parte, López y col. (2018) realizaron una prueba rápida (Api50CH kit.) del consumo de carbohidratos de diferentes especies de *Weissella*, también aisladas del pozol. En este estudio las pruebas para consumo de almidón resultaron negativas en todas las cepas estudiadas y positivas para el

consumo de xilosa, entre otros azúcares. Además, los mismos autores, demostraron la utilización de xilooligosacáridos por una de las cepas evaluadas.

Estos resultados sugieren que aún en ausencia de actividad xilanolítica, la hemicelulosa disponible tras la nixtamalización del maíz, podría ser asimilada por microorganismos presentes en la masa fermentada con actividad hidrolítica sobre xilooligosacáridos.

Por otro lado, Uscanga y col. (2010) evaluaron muestras de maíz nixtamalizado de cinco estados de la república en función del contenido de dextrana e inulina, tras agregar dextranasa e inulinasa antes y después de añadir sacarosa a la masa. Los máximos valores de dextrana fueron de  $0.444 + 0.280$  % antes de agregar sacarosa y de  $2.006 + 0.272$  % después de añadir sacarosa. Para el caso de la inulina, los máximos valores fueron  $1.953 + 0.766$  % y  $4.838 + 1.001$  % antes y después de agregar sacarosa respectivamente. Si bien, en dicho estudio no se atribuyó la actividad glicosiltransferasa a un microorganismo en particular, si se pone en evidencia la presencia de estos polímeros antes y después de añadir sacarosa, hecho que ocurre en el consumo de pozol, el cual es preferentemente consumido con cacao y azúcar (sacarosa).

En este sentido, el presente trabajo se integra a un proyecto global sobre la fermentación del pozol, que es analizada simultáneamente con una estrategia proteómica y genómica. En este caso, considerando el papel preponderante del género *Weissella*, los reportes sobre su capacidad xilanolítica y de formación de polisacáridos, el proyecto tiene como objetivo explorar la capacidad bioquímica y genómica de diversas cepas de *Weissella* aisladas del pozol para asimilar total o parcialmente la hemicelulosa y la sacarosa, compuestos disponibles en el grano de maíz.

## **2. Antecedentes**

### **2.1 El pozol**

*Pozol*, viene del náhuatl *pozolli* que significa espumoso. El pozol es una bebida ácida no alcohólica, fermentada a partir de la masa de maíz nixtamalizada. En una revisión del contenido del Chilam Balam de Chumayel, se hace referencia al pozol como uno de los componentes culturales más importantes de los mayas peninsulares. Era ofrendado a los dioses y a los espíritus como bebida refrescante en ceremonias relacionadas con el cultivo y cosecha del maíz. Su uso medicinal para controlar la diarrea y la fiebre también está asentado (Wacher, 1993; Vasallo, 2016).

En la actualidad, el pozol es elaborado y consumido en los estados de Tabasco, Chiapas, Veracruz, Yucatán, Campeche, Quintana Roo, Oaxaca y algunos países de América Central, particularmente por los grupos indígenas de estas regiones (Ulloa et al., 1987 en Garibay et al., 1993; Wachter, 1993). Al aumentar el valor nutritivo del maíz nixtamalizado, no requerir equipos ni utensilios especiales para su preparación y tener un bajo costo de producción, el pozol sigue siendo un alimento de importancia nutricional, cultural y económica (Long, 2008). Constituía y sigue constituyendo parte de la columna vertebral de la alimentación de las regiones del sur de México y Guatemala, se sugiere como un alimento funcional por su alto contenido en fibras y microorganismos benéficos para la salud intestinal.

El proceso de elaboración del pozol comienza retirando materia extraña de la mazorca de maíz, posteriormente los granos son hervidos en exceso de agua conteniendo aproximadamente 1% w/v de cal. En algunas regiones los granos se dejan enfriar y se someten a una segunda cocción, pero en ambos casos, los granos son lavados retirando la mayor parte del pericarpio para dejar el endospermo libre. Los granos ya nixtamalizados son molidos y la masa resultante es moldeada en forma esférica y envuelta en hojas de árbol de plátano (en algunas regiones se ha remplazado la hoja por bolsas de plástico). Las bolas de masa nixtamalizada se dejan entonces fermentar a temperatura ambiente por un tiempo que puede ser desde unas cuantas horas, hasta 15 días, dependiendo del gusto del consumidor, esta se diluye con agua antes de ser consumida (Cañas et al, 1993).

## **2.2 Composición del grano de maíz**

El origen del maíz (*Zea mays ssp. Mays*) se dio a partir de un proceso de domesticación y mejoramiento del teosintle (*Zea mays ssp. Parviglumis*), proceso que se remonta hacia unos 8 000 años A.C. En este proceso han estado involucrados los primeros pobladores de Mesoamérica, los grupos indígenas de esas regiones y los actuales agricultores (Wang *et al.*, 1999; Chávez, 2004). Es uno de los cereales más importantes a nivel mundial debido a su uso para preparación de diversos alimentos.

La estructura del grano de maíz está conformada por cuatro partes fundamentales: 1) pilorriza 2) germen, 3) endospermo y 4) pericarpio (Figura 1). Su composición química depende de diversos factores como el tipo de variedad y el ambiente, sin embargo, lo caracteriza ser rico en carbohidratos (Tabla 1).

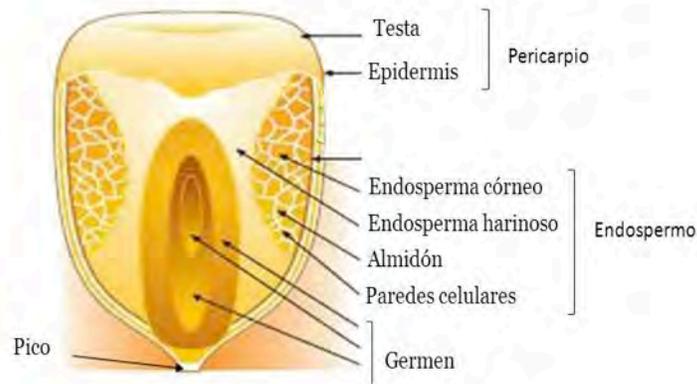


Figura 1. Estructura y composición del grano de maíz. (Tomada de Hablemos de culturas, mayo 2017. <http://hablemosdeculturas.com/partes-de-una-semilla/>)

Tabla 1. Composición química de las estructuras del grano de maíz

Componente químico	Pericarpio (%)	Endospermo (%)	Germen (%)
Proteína	3.7	8.0	18.4
Fibra cruda	86.7	2.7	8.8
Cenizas	0.8	0.3	10.5
Almidón	7.3	86.4	8.3
Azúcar*	0.34	0.62	10.8

\*Sacarosa es la más abundante (FAO, 1992)

1) El pico es una estructura cónica que une al grano con el olote y se compone principalmente por hemicelulosa y celulosa. 2) El germen posee un alto contenido de grasa (~33%) y proteína (~18%), pero con bajo contenido de almidón (~8%). 3) El endospermo es rico en almidón (~86%), medio en proteína (~8%) y bajo en grasas (~1%). El grano de maíz posee dos tipos de endospermo, el harinoso que contiene gránulos de almidón sueltos alrededor del germen y el endospermo córneo que está compuesto por gránulos de almidón en la periferia. Estos son empaquetados por paredes celulares, las cuales están compuestas por  $\beta$ -glucanos, arabinosilanos, proteínas y ácidos fenólicos. 4) El pericarpio es la capa externa que envuelve al grano, rica en fibra cruda y compuestos fenólicos. La fibra cruda está compuesta principalmente por hemicelulosa, celulosa y lignina (Singh *et al.*, 2014).

### 2.3 Microbiología del pozol

Desde hace muchos años se ha tratado de dilucidar la complejidad microbiológica y la fisiología del proceso de fermentación del pozol. Tras este objetivo, se ha construido una historia de identificación microbiológica robusta.

Uno de los primeros estudios se realizó por Ulloa en 1974, quien aun con métodos convencionales analizó la microbiota en muestras de pozol a lo largo de la fermentación, pudiendo verificar que estaban presentes hongos, levaduras y bacterias. Dentro de estas últimas identificó a *Achromobacter pozolis*, *Aerobacter aerogenes*, *Agrobacterium azotophilum*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas mexicana*.

Un hecho que destaca es el carácter natural de la fermentación de la masa, es decir, la microbiota presente es el resultado de la inoculación que ocurre durante la elaboración de la bebida. En este sentido, Wachter y col. (1993), identificaron diferentes grupos microbianos en todas las etapas del proceso, desde la nixtamalización del maíz hasta la fermentación de la masa. Los resultados mostraron la presencia de bacterias ácido-lácticas (BAL), bacterias mesófilas aerobias, enterobacterias, levaduras y hongos, a partir del tratamiento alcalino del grano. Los primeros tres grupos aumentaron significativamente a partir de las 11 h de fermentación manteniéndose constantes hasta las 30 h. Mientras que las levaduras y mohos disminuyeron al inicio de la fermentación de la masa y aumentaron a partir de las 30 h de incubación. El grupo de BAL fue el más abundante en todos los puntos de fermentación evaluados.

Más adelante, se realizó un estudio comparativo en muestras de masa envuelta en bolsas de plástico y en hojas de plátano, en el que se encontró que la microbiota predominante fueron las BAL e identificaron cepas de *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus confusus*, *Lactococcus lactis* y *Lactococcus raffinolactis* (Nuraida et al., 1995). Los hongos y levaduras sólo se desarrollaron en las muestras de pozol envuelto en hojas de plátano, que mostró una microbiota en la superficie de la masa en dos días.

Los trabajos anteriores fueron realizados mediante métodos dependientes de cultivo, basados en técnicas microbiológicas clásicas y caracterizaciones bioquímicas. El primer artículo que reportó identificaciones microbianas en el pozol basadas en métodos moleculares, fue el reportado en 1999 por Ampe y col. En efecto, mediante sondas de rRNA cuantificaron grupos y géneros específicos de una muestra de pozol evaluada a las 12h y 5 días de fermentación, identificaron los géneros *Lactococcus* y

*Leuconostoc*, como dominantes en la etapa inicial, pero menos importantes en la etapa final, donde el dominio fue por *Lactobacillus* y sus géneros asociados. Además, la señal dada para las sondas correspondientes al género *Streptococcus* y a eucariontes fue significativa, sin dejar de lado la detección de enterobacterias.

En un estudio con enfoque polifásico a partir de una muestra de pozol de Villahermosa, Tabasco, se demostró que mediante una combinación de técnicas dependientes e independientes de cultivo es posible detectar un mayor grupo de microorganismos presentes en muestras complejas. En dicho estudio se evaluó con microscopía electrónica de barrido la periferia, el centro y el nivel medio de la masa fermentada, observándose bacterias, hongos filamentosos y levaduras en la periferia, mientras que en el centro y medio de la bola, bacterias y gránulos de almidón fueron evidentes. Los resultados de hibridaciones con sondas de RNA, en concordancia con aislamientos con medios de cultivo específicos, indicaron que el grupo que incluía *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* y *Weissella* estaba presente en todas las fases de la fermentación. Los mayores porcentajes fueron representados por *Leuconostoc* y *Weissella*, seguido por *Pediococcus* y *Streptococcus*. Las enterobacterias sólo fueron identificadas en la periferia mientras que hongos filamentosos y levaduras se detectaron, además de en la periferia, en el centro de la bola, aunque en menor proporción. Complementariamente analizaron amplicones de la región V3 del 16S rDNA, mediante electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE). Esto permitió la identificación de las especies *Acetobacter acetii*, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus bovis*, *Weissella* y *Leuconostoc* (Ampe *et al.*, 1999). Bajo el mismo enfoque polifásico se identificó el género *Streptococcus* en un rango de 25-75% del total de la microbiota encontrada. Las BAL se hicieron notorias desde los 2 días de fermentación, e incluyeron a *Lactobacillus fermentum*, *L. plantarum*, *L. casei* y *L. delbrueckii*. Una vez más, los mohos y levaduras se identificaron en la periferia. Por otro lado, la presencia de bibidobacterias, enterococos y enterobacterias sugieren el origen fecal de algunos microorganismos importantes en el pozol (ben Omar y Ampe, 2000).

Por su parte, Wachter y col. (2000), realizaron un análisis microbiológico comparativo entre pozol indígena y pozol mestizo, este último diferenciado por una segunda cocción del grano antes de su molienda. No hubo gran diferencia entre las muestras de pozol indígena y mestizo, sin embargo, *Leuconostoc* fue más abundante en el pozol mestizo y *Candida* lo fue en el pozol indígena. Detectaron

que en el pozol mestizo el género *Leuconostoc* es seguido en abundancia por *Lactococcus* y *Pediococcus*, además de *Candida* y otras levaduras.

También mediante el empleo de métodos moleculares, Escalante y col. (2001) construyeron una biblioteca génica mediante la clonación de amplicones del 16S rDNA. Las clonas únicas identificadas pertenecen a *Lactococcus lactis*, *Streptococcus suis*, *Lactobacillus plantarum*, *L. casei*, *L. alimentarium*, *L. delbrueckii* y *Clostridium sp.*

Tomando muestras en un espacio más amplio, Bolaños (2004) evaluó 7 muestras de pozol de 7 productores diferentes del estado de Tabasco en las diferentes fases de la masa (periferia, medio y centro). Amplificó la región V3 del 16S rDNA extraído de las muestras y mediante DGGE pudo detectar a *Streptococcus suis*, *Weissella spp.*, *Pediococcus urinae* y *Aerococcus spp.* como microorganismos constantes. *Lactobacillus*, a pesar de encontrarse en la mayoría de las muestras recién molidas, tendió a desaparecer mientras la fermentación avanzaba, mientras que *Leuconostoc* y *Lactococcus* se encontraron esporádicamente a lo largo de la fermentación. Los resultados reportados por Bolaños en 2004, sugirieron la dificultad para asignar una banda a cada microorganismo puro, consecuencia de la micro-heterogeneidad debida a la existencia de varias copias del gen ribosomal con variaciones en la secuencia. Este problema fue atendido realizando el mismo experimento y número de muestras, pero utilizando amplicones del gen de la subunidad  $\beta$  de la RNA polimerasa *rpoB*, el cual es reconocido como *housekeeping*. Las muestras analizadas demostraron que *Streptococcus infantarius*, *Weissella confusa* y *Lactococcus lactis* están presentes en todo el proceso de fermentación y en todas las fases de las muestras. No así, *Lactobacillus plantarum*, *L. fermentum* y *Leuconostoc mesenteroides*, los cuales se observaron a partir de las 48 h de fermentación (López, 2006).

Por otro lado, en sintonía hacia la comprensión de la naturaleza de la fermentación de la masa del pozol, se realizó un estudio proteómico que permitiera identificar proteínas y enzimas requeridas para la utilización del sustrato presente en el maíz y con ello, asignarlas a un origen microbiano. Las proteínas y péptidos encontrados pertenecían a un gran número de organismos, sin embargo, la abundancia relativa fue dominada por *Lactobacillus* y *Acetobacter*, aunque también se presentaron en menor medida grupos microbianos encontrados en otros estudios como: *Bifidobacteria*, *Streptococcus*, *Weissella* y *Lactococcus* además de *Gluconacetobacter* y *Gluconobacter*, géneros por primera vez identificados en la masa. En el caso de los hongos, *Aspergillus* es el más representado (Cárdenas *et al.*, 2014). La asignación de proteínas

funcionales para metabolizar carbohidratos se está realizando mediante estudios meta-proteómicos por el mismo grupo de investigación.

Considerando que el almidón es el sustrato principal en el grano de maíz, Díaz y col. (2003), eligieron 40 cepas aisladas del pozol y las caracterizaron en función de su actividad amilolítica. El estudio de ribotipificación mostró tres grupos principales *Streptococcus*, *Lactococcus* y *Enterococcus*. *Streptococcus infantarius* fue el más amilolítico y presentó una velocidad específica de crecimiento alta ( $0.94 \text{ h}^{-1}$ ). Sin embargo, la producción de amilasa ( $130.7 \text{ U/h g células secas}$ ) y el rendimiento de esta, relativo a la biomasa fue bajo ( $139 \text{ U/g células secas}$ ). Estos resultados permiten pensar que el almidón, a pesar de encontrarse en mayor proporción, no es el único sustrato asimilable por la microbiota compleja que caracteriza a la bebida en estudio.

En concordancia con lo anterior, Flores (2007) evaluó cualitativamente la actividad xilanolítica de una colección de 94 BAL aisladas de diversas muestras de pozol, encontrando que algunas cepas de *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Weissella* y *Enterococcus*, fueron capaces de metabolizar el xilano utilizado como sustrato.

Explorando con mayor detalle la utilización del xilano del grano de maíz por cepas obtenidas de masa nixtamalizada, se evaluaron 12 bacterias de los géneros *Lactobacillus*, *Weissella*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Enterococcus* y otros no identificados al realizar el trabajo. Se verificó la hidrólisis de xilano por formación de halos de actividad, demostrando que *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Leuconostoc* fueron incapaces de metabolizarlo. Por otra parte, *Streptococcus*, *Weissella* y *Enterococcus* presentaron capacidad de hidrólisis en orden decreciente. Para complementar el estudio, se evaluó el crecimiento y la actividad enzimática de *Streptococcus infantarius* 25124, sobre arabinoxilano de maíz (aislado del nejayote) y xilano de abedul, encontrando que el crecimiento y la actividad fueron positivos sobre ambos sustratos, pero con una notable preferencia por arabinoxilano de maíz. Este hecho pone de manifiesto la posibilidad de que el arabinoxilano, presente en los granos de maíz sea un sustrato de importancia para los organismos que dan lugar a la bebida fermentada (Cooper *et al.*, en preparación). Bajo la misma teoría, López y col. (2018), evaluaron el crecimiento de una cepa de *Weissella confusa* (*W.confusa* L9) sobre xilano de abedul y sobre xilooligosacáridos, reportando un bajo crecimiento en xilano, pero mejor en xilooligosacáridos. Asimismo, realizaron una prueba rápida de utilización de distintos azúcares resultando negativa para almidón y positiva para xilosa.

Como se ha mencionado, la historia tras la búsqueda de la composición microbiana y la utilización de sustratos como fuente de carbono de tales microorganismos ha sido intensa. Sin embargo, aún existen múltiples interrogantes. Un hecho que resalta es la frecuencia en la presencia de diversos géneros bacterianos, la mayoría de ellos capaces de metabolizar el almidón, lo cual no es de extrañar. No así la presencia del género *Weissella*, el cual se reporta con nula actividad amilolítica (López *et al.*, 2018). En este sentido, y bajo la misma hipótesis de utilización de xilano, en el presente trabajo se pretende analizar la capacidad de 5 cepas de *Weissella* aisladas del pozol para metabolizar hemicelulosa y sacarosa, que como ya hemos señalado, además del almidón, se encuentran disponibles en el grano de maíz.

#### **2.4 El género *Weissella* y sus nichos ecológicos**

El género *Weissella* pertenece al filum Firmicutes, clase Bacilli, orden Lactobacillales y familia Leuconostaceae. La historia taxonómica de este género es interesante, ya que antes de su designación, seis especies del género se encontraban agrupadas dentro del género *Leuconostoc*, el cual estaba dividido en tres: *sensu stricto*, *oenos* y *paramesenteroides*. Este último tenía un subgrupo denominado Lactobacilos atípicos. En 1993, Collins y col. realizaron un profundo estudio del género *Leuconostoc* que incluía pruebas fenotípicas, bioquímicas y moleculares. Las bases fenotípicas mostraron una difícil diferenciación pues el género *Leuconostoc* se caracteriza por tener una morfología atípica, es decir, no tiene formas bacilares ni cocos sino pequeños bacilos con extremos cónicos, mientras que el género *Weissella* comprende esta morfología atípica, bacilos y cocos. Por su parte, las bases bioquímicas mostraron que los lactobacilos atípicos poseían la capacidad para metabolizar arginina, característica inexistente en el resto de los *Leuconostoc*. Finalmente, las pruebas moleculares del gen 16S del rRNA permitieron la reagrupación de las especies que se encontraban dentro de los Lactobacilos atípicos: *W. confusa*, *W. halotolerans*, *W. kandleri*, *W. minor* y *W. viridescens* y la especie que estaba dentro de *L. paramesenteroides*: *W. paramesenteroides* (Collins *et al.*, 1993). Actualmente el género agrupa a 21 especies, de las cuales sólo 12 genomas se encuentran publicados. Las bacterias asignadas a este género son Gram-positivas, catalasa negativa, no formadoras de endospora, carentes de citocromo y no motiles con excepción de *W. beninensis*. Son anaerobias facultativas con un metabolismo fermentativo y pueden

crecer en temperaturas que oscilan entre los 15 y 37 °C, sin embargo *W. confusa* y *W. cibaria* son capaces de crecer a 45 °C (Padonou *et al.*, 2010).

Las cepas de *Weissella* que hasta ahora se conocen, se han aislado de una gran diversidad de nichos, como se resume en la Tabla 2. Un ejemplo de ellos son la piel, la leche y las heces, tanto de animales como de seres humanos. Se han encontrado especies de *Weissella* también en frutas, verduras, plantas, suelo, carne, pescados y mariscos. Sin embargo, lo que más destaca es la amplia variedad de alimentos fermentados de diversa naturaleza, como productos lácteos y cárnicos, frutas, vegetales y cereales, en los que cepas de *Weissella* están presentes. Un dato adicional es que estos alimentos fermentados no están en un solo sitio geográfico, si no que se encuentran distribuidos a lo largo de mundo. Tal es el caso del kimchi y el Jeotgal de origen coreano, las masas madre europeas y otros alimentos tradicionales de Asia y África, además del queso Cotija y el pozol de México, por mencionar solo algunos (Fusco *et al.*, 2015).

Tabla 2. Especies de *Weissella* y su fuente de aislamiento

<i>Weissella spp.</i>	Fuentes
<i>W. fabalis</i>	Granos de cacao fermentados
<i>W. fabaria</i>	Granos de cacao fermentados
<i>W. ghanensis</i>	Granos de cacao fermentados
<i>W. beninensis</i>	Yuca fermentada
<i>W. jogaejeotgali</i>	Jeotgal (alimento fermentado de mariscos)
<i>W. thailandensis</i>	Jeotgal, queso Cotija, carnes y pescado fermentados de Tailandia
<i>W. paramesenteroides</i>	Embutidos fermentados, frutas y verduras fermentados, leche fermentada, queso, yuca, masa madre, cereales fermentados, pescado.
<i>W. hellenica</i>	Alimentos fermentados de embutidos, vegetales, leche y carne, queso, bebida fermentada de maíz.
<i>W. bombi</i>	Intestino de abejorro
<i>W. halotolerans</i>	Productos cárnicos, mariscos, queso, embutidos fermentados, pantano
<i>W. ceti</i>	Ballena

<i>W. viridescens</i>	Productos cárnicos, salami seco, kimchi, leche fermentada, queso, sedimentos, peces
<i>W. minor</i>	Lodos, frutas y verduras fermentadas, salami seco
<i>W. uvarum</i>	Uvas de vino
<i>W. diestrammenae</i>	Intestino de camello
<i>W. kandleri</i>	Plantas de primavera y del desierto
<i>W. koreensis</i>	Kimchi
<i>W. cibaria</i>	Alimentos de Malasia, muestras clínicas, animales, heces humanas, frutas y verduras fermentadas, queso, yuca fermentada, alimentos y bebidas fermentados a base de cereales, masa madre, granos de cacao fermentados, embutidos y pescado fermentados, pantano, lago, piel, vagina, saliva, pacientes enfermos y sanos
<i>W. confusa</i>	Alimentos de Malasia, muestras clínicas, animales, heces humanas, frutas y verduras fermentadas, queso, yuca fermentada, alimentos y bebidas fermentados a base de cereales, masa madre, granos de cacao fermentados, embutidos y pescado fermentados, kimchi, caña de azúcar, harina de trigo para pasta, pantano, piel, vagina, saliva, pacientes enfermos y sanos
<i>W. oryzae</i>	Granos de arroz fermentados, bebida a base de cereales
<i>W. soli</i>	Suelo, kimchi, jeotgal, tofú, puerro fermentado, col fermentada, pantano

(Fusco *et al.*, 2015; Fessard y Remize, 2017)

Como puede concluirse de la información recopilada en la Tabla 2, existe una gran diversidad de alimentos fermentados de donde se han aislado diferentes *Weissella spp.*, lo cual refuerza la capacidad de este género bacteriano para adaptarse a una multitud de ambientes y desempeñar un papel importante en los procesos de fermentación. En este sentido se ha puesto especial atención para evaluar su posible uso como organismo central en intentos de industrialización de procesos de fermentación de alimentos (Fessard y Remize, 2017).

Ahora bien, si pensamos en el maíz como sustrato de la fermentación del pozol, podemos restringir la comparación con microorganismos aislados solo de bebidas y alimentos fermentados a base de cereales. En la Tabla 3, se enlistan algunos ejemplos de alimentos a base de cereales de donde se han identificado diferentes especies de *Weissella*.

Tabla 3. Especies del género *Weissella* spp. reportadas en fermentados a base de cereales

Fermentos a base de cereal	<i>Weissella</i> spp. identificadas
Togwa (Alimento a base de sorgo, maíz, trigo)	<i>W. confusa</i>
Gari, Attieke, Lafun (yuca)	<i>W. paramesenteroides</i> , <i>W. cibaria</i> , <i>W. confusa</i> , <i>W. beninensis</i>
Idli batter (Alimento Indù a base de arroz y grano negro)	<i>W. confusa</i> , <i>W. cibaria</i>
Sourdough (Masa madre de trigo, francesa, italiana turca)	<i>W. confusa</i> , <i>W. cibaria</i> , <i>W. paramesenteroides</i>
Pozol (Bebida mexicana, fermentada a base de maíz )	<i>W. paramesenteroides</i> , <i>W. confusa</i> , <i>W. cibaria</i>
Granos de arroz fermentados	<i>W. oryzae</i>
Chicha (bebida a base de maíz)	<i>W. confusa</i> , <i>W. hellenica</i> , <i>W. paramesenteroides</i>
Kunu-Zaki (alimento a base de cereales de Nigeria)	<i>W. confusa</i>
Boza (bebida a base de cereales de Bulgaria)	<i>W. confusa</i> , <i>W. oryzae</i>
Fura (alimento a base de mijo africano)	<i>W. confusa</i>
Borde (bebida de cereal etíope)	<i>W. confusa</i> , <i>W. viridescens</i>
Grano de cacao fermentado	<i>W. cibaria</i> , <i>W. ghanensis</i> , <i>W. confusa</i> , <i>W. paramesenteroides</i> , <i>W. fabaria</i> , <i>W. fabalis</i>
Makgeolli (bebida a base de almidón de Corea)	<i>W. confusa</i> , <i>W. cibaria</i> , <i>W. paramesenteroides</i>

(Fessard y Remize, 2017).

Los datos mostrados sugieren la importancia de estos microorganismos en los alimentos fermentados, aunque muchos estudios se han concentrado solo en identificar la presencia de las bacterias a lo largo de la fermentación. Tal es el caso del Togwa, del que se hicieron evaluaciones de nueve muestras de productores diferentes en Tanzania y determinaron entre otras cosas las BAL presentes durante las 0, 4, 8, 12 y 24 h de fermentación, reportando concretamente la presencia de *W. confusa* en muestras de todas las horas (Mugula *et al.*, 2003). Por otra parte, en Fura se demostró que *W. confusa* y *Lb. fermentum* son las especies dominantes, ya que ambas fueron aisladas de ocho sitios de procesamiento diferentes en el norte de Ghana, África (Owusu *et al.*, 2012). Otro ejemplo es el del Borde, elaborado a base de varios cereales, entre ellos sorgo y maíz, en el que Abegaz (2007) realizó un seguimiento de la fermentación durante 48 h con muestras cada 6 h. Las pruebas microbiológicas y genotípicas permitieron identificar a *W. confusa*, *W. viridescens*, *Lb. brevis* y *P. pentosaceus* como especies dominantes durante la fermentación.

### **3. Hipótesis**

*Weissella* spp. dispone del potencial genómico necesario para poder degradar xilano, xilooligosacáridos y sacarosa entre otras fuentes de carbono disponibles en el pozol.

### **4. Objetivos**

#### **4.1 Objetivo general**

Evaluar la contribución de cepas de *Weissella* en la fermentación del pozol, en términos del potencial enzimático que actúa sobre hemicelulosa y sacarosa.

#### **4.2 Objetivos específicos**

- Determinar la capacidad de cinco cepas de *Weissella* aisladas del pozol para crecer sobre xilano, xilooligosacáridos y sacarosa, evaluando su actividad hidrolítica y de transglicosidación.
- Analizar a nivel genómico la capacidad de metabolizar diversas fuentes de carbono de las cepas de *Weissella* que resulten con mayor actividad sobre los sustratos estudiados.
- Seleccionar y expresar heterológamente las enzimas de interés y referirlas al maíz nixtamalizado para pozol.

## **5. Materiales y métodos**

### **5.1 Microorganismos**

Se trabajó con un set de cepas de *Weissella*, previamente aisladas del pozol por trabajos realizados en el grupo que dirige la Dra. Carmen Wachter Rodarte en el Departamento de Alimentos de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México. Se eligieron 5 cepas, las cuales corresponden de acuerdo con la identificación molecular realizada por secuenciación Sanger de la región 16s del rDNA realizada en el laboratorio de la Dra. Wacher a *Weissella confusa* (WcSnc45), *Weissella confusa* (WcSnc40), *Weissella confusa* (WcL9), *Weissella confusa* (WcL17) y *Weissella paramesenteroides* (Wp3a). Las cepas se preservaron a -80 °C en glicerol al 50 % v/v.

### **5.2 Cinéticas de crecimiento y actividad enzimática**

#### **5.2.1 Preparación del inóculo**

Se reactivaron las cepas estudiadas, las cuales estaban preservadas a -80 °C. Se tomó una alícuota al 10% v/v para inocular en medio Man Rogosa y Sharpe (MRS) (Difco, USA). Los cultivos se incubaron a 30 °C durante 24 h y posteriormente se transfirió una alícuota al 10% v/v a otro medio MRS que fue incubado a 30° por 12 h. y utilizado como inóculo para cada fermentación.

#### **5.2.2 Evaluación de crecimiento con diferentes fuentes de carbono**

Considerando las fuentes de carbono disponibles en el pozol y tomando en cuenta los estudios que demuestran la ausencia de actividad amilolítica en el género estudiado, se realizó una evaluación de crecimiento en medio MRS con algunas modificaciones, usando como única fuente de carbono xilano, xilooligosacáridos (XOS), glucosa y sacarosa al 1% de manera independiente (López *et al.*, 2018). Aquí vale la pena señalar que se realizó un estudio para definir las condiciones de producción de XOS por hidrólisis ácida, el cual es descrito en la siguiente sección.

Los ensayos se realizaron por duplicado, inoculando con 0.6% v/v de pre inóculo. Durante la fermentación se tomaron dos mL de cada cultivo, para medir el crecimiento por Densidad Óptica (DO) en un espectrofotómetro Beckman DU650, a una longitud de onda de 600 nm tomando como blanco el medio de cultivo utilizado, a cada muestra se le midió el pH. Posteriormente la muestra se centrifugó a

12 000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente, se recuperó el sobrenadante y se trasladó a dos tubos Eppendorf de 1.5 mL, uno de los viales se incubó por 10 min en agua en ebullición para inactivar las enzimas que pudieran estar presentes. Finalmente, ambos viales fueron almacenados a -4 °C para posteriores estudios. En una primera instancia, el crecimiento y los muestreos se realizaron a las 0, 3, 6, 12, 24 y 48 h, sin embargo, a partir de los resultados obtenidos en la fermentación con sacarosa, se realizaron cinéticas de crecimiento por triplicado con este sustrato, tomando muestras cada 30 min durante 6 h, de ahí cada hora hasta las 12 h y posteriormente a las 24 y 48 h de incubación.

### 5.2.3 Producción de xilooligosacáridos

Con la finalidad de verificar, cuál era la mejor estrategia de producción de XOS, se realizó una prueba de hidrólisis ácida de xilano de abedul (Sigma, Alemania), siguiendo diversas metodologías reportadas en la literatura y resumidas en la Tabla 4.

Tabla 4. Diversas estrategias exploradas para la producción de xilooligosacáridos a partir de xilano de abedul.

Ácido	Temperatura de incubación	Tiempo de incubación	Agitación	Referencia
Ácido sulfúrico 0.25 M	100 °C	30 min	s/a	Akpinar <i>et al</i> , 2009
Ácido sulfúrico 0.25 M	120 °C	10 min	s/a	Akpinar <i>et al</i> , 2009
Ácido sulfúrico 0.1 M	100 °C	90 min	150 rpm	Yang <i>et al</i> , 2016.
Ácido cítrico 0.1 M	100 °C	90 min	150 rpm	Yang <i>et al</i> , 2016.
Ácido sulfúrico 0.02 M	120 °C	10 min	s/a	Lin <i>et al</i> , 2017.
Ácido cítrico 0.02 M	120 °C	10 min	s/a	Lin <i>et al</i> , 2017.

\*s/a = sin agitación

Los XOS formados fueron analizados por cromatografía en capa fina, como se describe en la sección 5.2.6. Se eligió la metodología que presentó mejor producción, la cual se repitió con un gradiente de tiempo de incubación, correspondiente a 30, 45, 60, 90 y 120 min. El mejor resultado fue elegido como metodología a seguir para producir esta fuente de carbono y utilizarla en la preparación del medio de cultivo para la fermentación correspondiente, y como sustrato en la determinación de actividad xilosidasa.

#### **5.2.4 Determinación de actividad xilanolítica**

Una unidad de actividad enzimática (U) se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1  $\mu\text{mol}$  de azúcar por minuto. En este sentido, la actividad fue determinada por la velocidad de liberación de poder reductor, mediante el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) propuesto por Miller (1959). Se construyó una curva estándar de xilosa a concentraciones de 0, 0.5, 1, 1.5 y 2 g/L. Posteriormente se determinó la actividad en tubos Eppendorf de 1.5 mL con un volumen de reacción de 600  $\mu\text{L}$  que contenían 300  $\mu\text{L}$  de sustrato (0.5% de xilano de abedul en buffer de acetatos 0.1 M pH 5.3) y 300  $\mu\text{L}$  de sobrenadante. La mezcla de reacción se incubó a 50 °C y 800 rpm durante 6 h. Se tomaron 50  $\mu\text{L}$  de la muestra a las 0, 3 y 6 h y la reacción se detuvo con 50  $\mu\text{L}$  de DNS, posteriormente los tubos se incubaron en agua en ebullición durante 5 min y se trasladaron a hielo durante 5 min. A continuación, se agregaron 500  $\mu\text{L}$  de agua y finalmente se midió la absorbancia a una  $\lambda 540 \text{ nm}$  en un espectrofotómetro Beckman DU650, usando como blanco el tiempo 0 de reacción.

#### **5.2.5 Determinación de la actividad xilosidasa**

La actividad xilosidasa se llevó a cabo en tubos Eppendorf de 1.5 mL con una mezcla de reacción de 180  $\mu\text{L}$  de sobrenadante, 180  $\mu\text{L}$  de XOS y 40  $\mu\text{L}$  de buffer de acetatos 0.1 M a pH 5.5. Los tubos se incubaron a 50 °C y 800 rpm durante 5 h. Se verificó la hidrólisis de XOS y la acumulación de xilosa por cromatografía en capa fina, como se describe en la sección 5.2.6. Los resultados obtenidos en las placas fueron verificados por cromatografía de intercambio aniónico, como se describe en la sección 5.2.7.

#### **5.2.6 Cromatografía en capa fina**

Para verificar la producción de XOS y el consumo de los mismos a lo largo de la fermentación con esta fuente de carbono, se realizaron cromatografías en capa fina (TLC). Para ello se utilizaron placas de aluminio cubiertas con gel de sílice 60 (Merck, Alemania), en las que se colocaron 20  $\mu\text{g}$  de las muestras correspondientes a cada experimento y se corrieron dos veces usando una fase móvil de etanol, butanol y agua a una relación de 15:9:6 (v/v/v). Las placas fueron secadas al aire y reveladas con  $\alpha$ -naftol y calor. Además de las muestras a analizar, se colocaron 2  $\mu\text{L}$  de un estándar que contenía xilosa (x1) (Sigma, US), xilobiosa (x2), xilotriosa (x3), xilotetraosa (x4), xilopentosa (x5) y xilohexosa (x6) (Megazyme, Irlanda).

### **5.2.7 Cromatografía de intercambio iónico (HPAEC)-PAD**

Con la finalidad de determinar y cuantificar el consumo de XOS a lo largo de la fermentación y verificar los resultados obtenidos de la reacción enzimática descrita en la sección 5.2.5. Los sobrenadantes inactivados se centrifugaron y analizaron por cromatografía de intercambio iónico acoplada a un detector de pulso amperométrico (HPAEC-PAD) en un equipo Dionex con un detector electroquímico (ED50 Dionex), utilizando una columna CarboPac PA-200, equilibrada a 30 °C con 100 mM de NaOH a un flujo de 0.5 mL/min. Los XOS fueron eluidos con un gradiente de acetato de sodio que consistió en 5-100 mM en 20 min, 100-300 mM en 70 min, de los cuales, los últimos 15 min fueron para restablecer las condiciones iniciales. Las muestras analizadas fueron diluidas 1:10 para su óptima detección. Se realizó una curva patrón a partir de un estándar preparado a 3  $\mu$ moles/mL que contenía (x1), (x2), (x3), (x4) y (x6).

### **5.2.8 Determinación de actividad glicosiltransferasa**

Se evaluó la actividad enzimática de los sobrenadantes correspondientes a las fermentaciones con sacarosa como fuente de carbono, mediante el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) propuesto por Miller (1959) y descrito en el apartado 5.2.4. La reacción se llevó a un volumen de 260  $\mu$ L de los cuales 150  $\mu$ L fueron buffer de acetatos 50 mM a pH 6.0, 60  $\mu$ L de sobrenadante y 50  $\mu$ L de sacarosa al 60 %. La reacción fue detenida a los tiempos 0, 10, 20 y 30 min. El tiempo 0 min se usó como blanco en la medición por absorbancia. Para esta determinación se generó una curva patrón con soluciones equimolares de glucosa y fructosa a concentraciones de 0, 0.5, 1, 1.5 y 2 g/L.

### **5.2.9 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)**

Para cuantificar los azúcares liberados tras la fermentación con sacarosa, los sobrenadantes inactivos se analizaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en un equipo Ultimate 3000 Dionex con un detector de índice de refracción, usando como fase estacionaria una columna Prevail Carbohydrate ES (250 x 4.6 mm) a 30 °C y como fase móvil acetonitrilo:agua a una relación 75:25 (v/v) y un flujo de 1 mL/min. Se realizó una curva patrón, usando un estándar de 10 mg/mL con fructosa, glucosa y sacarosa.

### **5.2.10 Cromatografía de permeación en Gel (GPC)**

Para comprobar si había producción de polímero durante la fermentación con sacarosa, los sobrenadantes inactivados previamente, se centrifugaron a 13 000 rpm durante 10 min y se analizaron por cromatografía de permeación en gel (GPC) en un equipo Ultimate 3000 Dionex, con un detector por índice de refracción, dos columnas de Ultrahydrogel Linear (7.8 x 300 mm) y de Ultrahydrogel 500 (7.8 x 300 mm), empleando como fase móvil nitrato de sodio 0.1 M a un flujo de 0.8 mL/min y 35 °C.

### **5.3 Análisis genómico**

#### **5.3.1 Extracción de DNA**

Para atender el segundo objetivo de este trabajo y como se describe en los resultados, se seleccionaron dos cepas, una que presentó la mayor actividad glicosil hidrolasa (*Weissella paramesenteroides* (Wp-3a) y otra que presentó mayor consumo e hidrólisis de XOS (*Weissella confusa* (WcL17)).

La extracción del DNA cromosomal de las cepas seleccionadas se realizó utilizando un kit de extracción comercial UltraClean Microbial DNA Isolation (MO BIO, QUIAGEN) siguiendo las especificaciones del fabricante. La calidad y cantidad de DNA extraído se verificó en un espectrofotómetro Nanodrop a 260 nm.

#### **5.3.2 Secuenciación de los genomas**

Se realizó la secuenciación de los genomas de las cepas seleccionadas en la Unidad de Secuenciación Masiva del Instituto de Biotecnología de la UNAM, en una plataforma Illumina NextSeq500, se secuenciaron ~ 5 millones de lecturas de 2 x 75 pb y un inserto de 550 pb.

#### **5.3.3 Ensamble y Anotación de genomas**

Los datos generados por la secuenciación se utilizaron para ensamblar y anotar los genomas secuenciados. El tratamiento de los datos se realizó en el servidor del Centro de Ciencias Genómicas (CCG) [chichen.ccg.unam.mx](http://chichen.ccg.unam.mx).

##### **5.3.3.1 Limpieza de lecturas y reporte de calidad**

El primer paso fue verificar que todos los datos presentaran una calidad adecuada para posteriores tratamientos. En este sentido, se realizó una limpieza ejecutando TrimGalore, una herramienta

bioinformática rápida y eficaz, que permite recortar (trimear) secuencias de baja calidad en los extremos, así como la eliminación de adaptadores. Este programa permite diversas indicaciones: se especificó que realizara un reporte de calidad, que reconociera secuencias pareadas y que eliminara adaptadores universales de Illumina. Una vez realizada la limpieza, se comparó la calidad reportada tras la limpieza y la reportada en la secuenciación para corroborar que la calidad hubiera aumentado (Krueger, 2015).

### 5.3.3.2 Ensamble de genomas

El ensamble de genomas es un proceso computacional que tiene como objetivo unir lecturas cortas procedentes de la secuenciación, para formar secuencias contiguas más largas (contigs) y finalmente reconstruir una secuencia completa.

Se realizó un ensamble de *novο* que si bien es más complejo y más tardado que el ensamble por genoma de referencia no delimita el proceso de ensamblaje a una referencia, que pudiera ocasionar pérdida de información. Los ensambladores que se utilizaron están basados en la teoría de De Bruijn Graph, la cual consiste en la extracción de lecturas, a partir de las originales, llamadas k-mer. Con este algoritmo se genera un grafo en el que los nodos son los k-mers que son conectados por adyacencia y solape, es decir, por la coincidencia exacta entre ellos. Las lecturas resultantes de la conexión entre k-mers, son denominados contigs. Un concepto importante en el ensamble de genomas es el del valor de N50, el cual se refiere a la longitud del contig más pequeño dentro del grupo de contigs largos, cuyas longitudes combinadas representa el 50% del ensamble.

Se realizaron ensambles con tres ensambladores diferentes y especificaciones variables, para determinar el más eficiente en función de dar como resultado el menor número de contigs y el mayor valor de N50. El primer ensamble se ejecutó con VelvetOptimiser, el cual utiliza dos programas independientes pero complementarios. Velvet, que construye la estructura de los datos requeridos para el ensamble y Velvetg que construye el grafo de De Bruijn a partir de los parámetros indicados en línea de comandos, en donde se especificó el tamaño de los k-mers a utilizar para dicha construcción. Este programa determina el mejor tamaño de k-mer y la cobertura adecuada (Zerbino, 2010).

El siguiente ensamblador fue IDBA-UD que requiere la previa ejecución de un script escrito en python llamado `interleave_fastq.py`, que permite la integración de las lecturas *paired-end* y arroja un solo archivo fastq. Este ensamblador, solo reconoce los formatos fasta, por lo que se convirtió el archivo fastq

generado por Interleave a fasta. Hecho esto se ejecutó la línea de comandos correspondiente para realzar el ensamble, especificando el tamaño mínimo y máximo de k-mer y el rango de elección de ellos (Peng *et al.* 2010).

El tercer y último ensamblador fue SPAdes, en el que como en los otros ensambladores, se especificó el tamaño de k-mers a evaluar (Bankevich *et al.*, 2012).

Una vez realizados los ensambles, se compararon con el programa QUAST que permite la entrada de múltiples ensambles y evalúa cada uno, para ser comparado (Gurevich *et al.*, 2013). Se tomaron los dos mejores ensambles para realizar un refinamiento ejecutando el programa Metassembler, el cual fusiona varios ensambles generando un menor número de contigs y mayor calidad de estos (Wences y Schatz 2015).

#### **5.3.4 Predicción y anotación de genes**

La anotación de genes se hizo ejecutando Prokka que es una herramienta bioinformática rápida para la anotación de genomas procariotas y genera archivos listos para subirse a bases de datos (Seemann, 2014).

#### **5.3.5 Verificación de las cepas**

Para verificar la naturaleza de las cepas secuenciadas, ensambladas y anotadas, se extrajo la secuencia correspondiente al marcador 16S para verificar con un BLAST el género y especie correspondiente.

##### **5.3.5.1 Inferencia filogenética**

Con el fin de evaluar la naturaleza de las cepas secuenciadas y ubicarlas en un punto evolutivo dentro del género estudiado, se construyeron dos filogenias de máxima verosimilitud, basadas en alineamientos múltiples de secuencias realizados con los software Muscle (Edgar, 2004), para predecir el modelo filogenético se utilizó PROTTEST (Darriba *et al.*, 2011) y RAXML (Stamatakis, 2006) para armar la filogenia. En esta última, la fiabilidad estadística se determinó con un análisis de Bootstrap usando 100 iteraciones. El primer árbol se construyó con todas las proteínas ribosomales de todas las especies de *Weissella* depositadas en la página de genomas de referencia de NCBI tomando sólo el genoma representativo de cada especie (Tabla 3) y de los genomas obtenidos en este trabajo. Con los mismos datos se extrajeron las secuencias de los genes *housekeeping* D-Ala-D-Ala ligasa (*dll*), fosfoglucomutasa (*pgm*), glucosa 6-

fosfato dehidrogenasa (*g6pd*), RNA polimerasa subunidad beta (*rpoB*), RNA polimerasa subunidad alfa (*rpoA*) y fenilalanina tRNA sintetasa (*pheS*) para armar la segunda filogenia.

El estudio filogenético fue reforzado con un cálculo del promedio de identidad de nucleótidos (por sus siglas en inglés ANI) mediante pyani.py. Este es una aproximación bioinformática a los experimentos de hibridación DNA-DNA en donde se parte del supuesto de que, al comparar dos o más genomas, un valor ANI mayor a 96% es un indicativo de que se trata de la misma especie (Richter y Rosello, 2009).

### **5.3.6 Búsqueda de genes codificantes para enzimas degradadoras de carbohidratos (CAZy)**

Los genomas secuenciados en este trabajo y los genomas de referencia utilizados en los análisis filogenéticos (Tabla 5) se re-anotaron como se describe en la sección 5.3.4. Las secuencias de aminoácidos de cada uno de los genomas se mapearon contra la base de datos de dominios conservados de enzimas que actúan sobre carbohidratos (CAZy), mediante el programa HMMERscan y el pipeline propuesto por la dbCAN (Yin *et al.*, 2012).

Tabla 5. Características generales de los genomas representativos del género *Weissella* y los genomas secuenciados en este trabajo

Nombre	No. de acceso Refseq	Características				Aislamiento	Lugar de aislamiento	Fecha de publicación	Autores
		Tamaño (Mb)	# contigs	N50	Cobertura				
<i>W. bombi</i>	GCF_900094835.1	1.82	30	114,246	759 X	N/D	N/D	40816	Joint Genome Institute
<i>W. cibaria</i>	GCF_001308145.2	2.57	1	-	102	Alimentos fermentados	India	81015	Institute of Himalayan Bioresource Technology
<i>W. confusa</i> LBAE	GCF_000239955.1	2.28	71	63,653	N/D	Masa madre de trigo	Francia	221211	Laguerre, S.
<i>W. confusa</i> DSM	GCF_001436895.1	2.21	82	96,695	100x	Embutidos fermentados	China	52214	University Inner Mongolia
<i>W. confusa</i> MBF8	GCF_001884305.1	2.18	44	84,171	28x	Productos se soya	Indonesia	201016	University of Otago
<i>W. confusa</i> AB3E41	GCF_900166935.1	2.25	54	146,189	250x	Mosto dulce de cerveza africana	Costa de marfil	230217	Micalis Institute
<i>W. halotolerans</i> DSM	GCF_000420365.1	1.35	8	325,056	N/D	Salchicha	Alemania	90713	Joint Genome Institute
<i>W. hellenica</i>	GCF_900095015.1	1.81	33	99,337	795 X	N/D	N/D	40816	Joint Genome Institute
<i>W. jogaejeotgali</i>	GCF_001932615.1	2.14	1	-	497.3 X	Fermentado de mariscos coreano	Corea del sur	191015	University Kyung Here
<i>W. Kandleri</i> DSM	GCF_001438705.1	1.33	36	96,380	100 X	Embutidos fermentados	China	52214	University Inner Mongolia
<i>W. koreensis</i> KACC	GCF_000219805.1	1.44	1	-	N/D	Kimchi	Corea	280611	University Chung-Ang
<i>W. minor</i> DSM	GCF_001437425.1	1.76	50	123,342	100x	Embutidos fermentados	China	52214	University Inner Mongolia
<i>W. oryzae</i>	GCF_000691805.2	2.12	72	148,611	2000x	Granos de arroz fermentados	Japón	10514	National Institute of Livestock and Gasland Science
<i>W. paramesenteroides</i>	GCF_000160575.1	1.98	36	106,888	11x	Humano	N/D	1110	Baylor College of Medicine
<i>W. soli</i> KACC	PRJNA343417	1.68	1	-	439	Kimchi	Corea	91916	National Institute of Agricultural
<i>W. viridescens</i> DSM	GCF_001437355.1	1.53	34	86,165	100x	N/D	N/D	52214	University Inner Mongolia
<i>W. confusa</i> WcL17		2.31	30	155975	402.8x	Pozol	Chiapas	Este trabajo	UNAM
<i>W. confusa</i> Wcp-3a		2.22	45	119794	498x	Pozol	Tabasco	Este trabajo	UNAM

## 5.4 Selección de genes

A partir de la anotación genómica de las cepas secuenciadas, se hizo una búsqueda de genes codificantes para las enzimas de interés, es decir glicosiltransferasas para la cepa Wcp-3a y xilosidasas para la cepa Wcl17.

### 5.4.1 Electroforesis en gel desnaturizante (SDS-PAGE)

Para poder seleccionar un gen correspondiente a cada actividad enzimática de interés, para posteriormente aislarlo, caracterizar la actividad bioquímica de la enzima para la que codifica y referirla a la estructura de la masa de maíz nixtamalizado, se realizaron zimogramas de actividad mediante electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). En estos, se permite ver bandas de actividad enzimática correspondientes a la actividad de una enzima expresada por un gen particular, ubicada en el gel de acuerdo con su peso molecular.

Los geles fueron preparados al 10% y las muestras fueron corridas en una cámara de electroforesis Hoefer Mighty Small II a 10 mA durante 4 h aproximadamente. En cada gel, se cargaron muestras por duplicado, separadas por un carril que contenía 4  $\mu$ L de marcador de peso molecular PageRuler #26616 de Thermo Scientific, un carril de muestra se utilizó para corroborar la actividad y el otro para teñir las proteínas presentes. Para la detección de actividad glicosiltransferasa se cargaron 430  $\mu$ g de proteína provenientes de un sobrenadante de fermentación con sacarosa de la cepa Wcp-3a. Para verificar la expresión del gen codificante para esta actividad, se cargaron 150  $\mu$ g de fracción soluble de una lisis celular (ver apartado 5.4.2) de *E.coli* BL21 tras su inducción (ver sección 5.5.5)

Para la detección de actividad  $\beta$ -xilosidasa de la cepa Wcl17, se cargaron 250  $\mu$ g de proteína provenientes tanto de sobrenadantes como de fracciones solubles e insolubles de células lisadas tras una fermentación con XOS (ver apartado 5.4.2).

Una vez terminada la corrida electroforética, el gel se dividió en dos fragmentos, el que contenía el carril correspondiente al marcador de peso molecular y un carril con la muestra. El primero se tiñó con una solución GelCode Blue Stain de Thermo Scientific por 2 h, y posteriormente se lavó con agua durante toda la noche. El fragmento que contenía las muestras se lavó 3 veces por 20 min con una solución de Tween 80 al 1% (v/v) en buffer de acetatos 50mM y pH 6.0 para la actividad glicosiltransferasa, mientras que para la actividad  $\beta$ -xilosidasa la solución se lavó con buffer fosfatos 50mM a pH 7.0. Posterior a los lavados con Tween, los geles se lavaron 2 veces con el buffer correspondiente, posteriormente se incubaron con el sustrato requerido para cada actividad.

Para la detección de glicosiltransferasa los geles se incubaron en sacarosa al 10% en buffer acetatos 50 mM pH 6.0 durante 4 h a 30 °C, después del periodo de incubación los geles se lavaron con una solución de etanol al 70% durante 20 min. Posteriormente, los geles se incubaron en una solución de ácido peryódico al 0.7% más 5% de ácido acético al 5% durante una hora, realizando el último lavado con una solución de ácido acético al 5% con metabisulfito de sodio al 0.2% hasta obtener un fondo claro. Finalmente, el gel se incubó con reactivo de Schiff durante 20 min. Este, al entrar en contacto con el polímero formado, por acción de la enzima, se torna de color morado y de esta manera se puede visualizar la banda donde esta presente la actividad glicosiltransferasa. Para la detección de  $\beta$ -xilosidasa los geles se incubaron en buffer fosfatos 50 mM pH 7.0 a 37 °C durante 20 min. Posteriormente, el buffer fue retirado y se añadieron 1.5 mL de una solución de p-nitrophenol xilopiranosido 5 mM en buffer fosfatos pH 7.0 y se dejó reaccionar a 37 °C durante 30 min. El p-nitrophenol libre es amarillo, pero unido a una molécula de xilosa es incoloro, sin embargo, al entrar en contacto con una enzima capaz de hidrolizar este tipo de enlaces, se torna de color amarillo. Es así que puede visualizar la actividad del éster por acción de una enzima de este tipo.

#### **5.4.2 Lisis celular**

Para poder verificar la actividad  $\beta$ -xilosidasa mediante zimogramas de actividad, se recuperaron por centrifugación las células de un cultivo de 12 h de WcL17 con 50 mL de MRS-XOS y se lavaron con buffer fosfatos 50 mM pH 7.0. Éstas fueron re-suspendidas en 5 mL del mismo buffer, e incubadas posteriormente a 4 °C con lisozima a una concentración de 1 mg/mL durante 30 min. Tras la incubación se congelaron y descongelaron 3 veces y se sonicaron en frío por cuatro ciclos (10 s encendido / 30 s apagado) a 70% de amplitud, mediante un sonicador 130-Watt Ultrasonic Processor Modelo CV18. Finalmente se centrifugaron a 13 000 rpm durante 20 minutos a 4 °C, el sobrenadante fue separado de los restos celulares y se analizó por separado.

Otro método de lisis probado fue mediante la adición de urea. En este caso las células recuperadas se re-suspendieron en 5 mL de una solución del mismo buffer con urea 8M y se incubaron a 25 °C durante una hr. Posteriormente se centrifugaron a 13 000 rpm durante 10 min a 4 °C, la fracción soluble se dializó contra el buffer fosfatos 50 mM pH 6.0 a 4 °C durante 24 h y la fracción celular se re-suspendió en el mismo buffer para llevar a cabo las pruebas de actividad.

#### **5.4.3 Búsqueda de genes similares a las glicosiltransferasas de Wcp-3a**

Los zimogramas realizados para detectar la actividad glicosiltransferasa mostraron que los dos genes codificantes en la cepa Wcp-3a eran activos, por lo que no hubo elementos suficientes para seleccionar un solo

gen para ser caracterizado. En este sentido, se realizó un BLAST en la plataforma en línea UniProt (<http://www.uniprot.org/blast/>) para verificar con que proteínas ya caracterizadas tenían mayor porcentaje de identidad los genes de Wcp-3a, codificantes para esta actividad.

## 5.5 Expresión heteróloga de los genes seleccionados

Se seleccionó el gen denominado Dsr\_Wcp\_02205 codificante para la actividad glicosiltransferasa, el cual está codificado en el genoma de la cepa Wcp-3a, mientras que para la actividad  $\beta$ -xilosidasa, se seleccionó el gen denominado Bxl\_W17\_01258 codificado en el genoma de la cepa WcL17.

### 5.5.1 Amplificación de genes seleccionados

El DNA de ambas cepas fue extraído como se describe en la sección 5.3.1. Para la amplificación de los genes se diseñaron oligos con un sitio de restricción BamHI en los oligos sentido y un sitio XhoI en los oligos antisentido (mostrado en negritas). Para el gen Dsr\_Wcp\_02205 se utilizó el par: sentido ATT **GGA TCC** ATG GAA AAG ATT AAA GAA CAT TAT AAG y antisentido TAT **CTC GAG** CTA ATC TTT TTT ATG CTT TTT ACT CG y para el gen Bxl\_W17\_01258 se utilizó el par: sentido CGT ATC **GGA TCC** ATG ACC CAG CAA CTC ACA CAC G y antisentido CGT ATC **CTC GAG** TTA ATG CAT CGT CTG ACT ACC GG. Las amplificaciones se desarrollaron con la enzima Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific). Las condiciones de reacción fueron: Desnaturalización inicial de 2 minutos a 94 °C; hibridación de 30 ciclos 30 s a 94 °C, 40 s a (62 °C para Dsr y 70 °C para Bxl) y 5 min a 68 °C; extensión final de 10 min a 68 °C. Los productos de la amplificación se purificaron con el sistema High Pure PCR product purification kit (Roche)

### 5.5.2 Clonación de genes codificantes

El gen Dsr\_Wcp\_02205 se clonó en el vector pJET 1.2-blunt (Thermo Scientific). Los plásmidos pJET-Dsr\_Wcp\_02205 y pET-22b (+) (Novagen) se digirieron con las enzimas BamHI y XhoI (Thermo Scientific) durante toda la noche a 37 °C, de igual forma se digirieron los productos de amplificación.

Para clonar los productos de amplificación en el vector de expresión pET-22b(+), este se trató después de la digestión con una fosfatasa (Thermo Scientific) durante 1 hr a 37 °C. Posterior a la defosforilación del vector linearizado, los genes fueron clonados usando el kit Rapid DNA Ligation (Thermo Scientific), la relación inserto:vector fue de 3:1 y se incubó a 4 °C durante toda la noche.

### 5.5.3 Transformación de células

Se transformaron células electro competentes de *E. coli* DH-5 $\alpha$  con 10  $\mu$ L de cada construcción, estas se recuperaron en 700  $\mu$ L de medio SOC previamente calentado y se incubaron a 37  $^{\circ}$ C durante 1 h. Posteriormente fueron seleccionadas en cajas Petri con agar Luria-Bertani (LB) adicionadas con 200  $\mu$ g/mL de ampicilina.

#### **5.5.4 Selección de clonas**

Se seleccionaron colonias aleatoriamente y se incubaron en 3 mL de medio LB con ampicilina durante 14 h a 37  $^{\circ}$ C y 200 rpm. Se extrajo el DNA plasmídico (Miniprep) de cada colonia mediante el método propuesto por Sambrook *et al.*, 1989. Posteriormente se verificaron mediante digestiones como se describe en la sección 5.5.2 y por PCR como se describe en la sección 5.5.1. Las colonias positivas se volvieron a incubar bajo las mismas condiciones y se realizó un Miniprep con el kit GeneJET Plasmid Miniprep Kit Purification (Thermo Scientific). El gen en el DNA extraído se secuenció en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Los ensayos de secuenciación se realizaron en ambos sentidos.

#### **5.5.5 Expresión de genes y obtención de extracto enzimático**

Para producir las enzimas recombinantes se transformaron células de la cepa *E. coli* BL21 con el plásmido correspondiente a cada clona positiva, la transformación se realizó como se describe en el apartado 5.5.3. Se seleccionó una colonia de cada clona y se incubaron por separado en 5 mL de medio LB con ampicilina durante 16 h a 37  $^{\circ}$ C y 200 rpm. Posteriormente se inocularon en 50 mL de medio YT2X y se incubaron a 37  $^{\circ}$ C y 200 rpm hasta alcanzar una  $DO_{600}=0.6$ . Una vez alcanzada la DO esperada se realizaron inducciones con 0.2 mM y 1 mM de IPTG, con el objetivo de verificar si había un efecto en la concentración de inductor sobre la expresión enzimática. Después de la inducción los cultivos fueron incubados a 18  $^{\circ}$ C y 200 rpm durante 8 h y 18 h respectivas a la concentración de IPTG. Pasado el tiempo de incubación, las células fueron colectadas mediante centrifugación a 12 000 rpm durante 15 min y se lavaron con buffer acetatos 50 mM pH 6.0. Las células de cada cultivo fueron re-suspendidas en buffer acetatos 50 mM pH 6.0 y se lisaron con lisozima, choque térmico y sonicación, como se describe en la sección 5.4.2.

Para verificar que las construcciones realizadas fueran funcionales, se cuantificó la actividad enzimática como se describe en la sección 5.2.8 y mediante zimogramas de actividad como se describe en la sección 5.4.1.

## 6. Resultados y discusiones

### 6.1 Fermentaciones

En esta sección se describe el análisis del comportamiento de las 5 cepas de *Weissella* aisladas del pozol y seleccionadas para este estudio. La caracterización se hace en términos de la velocidad de crecimiento y el consumo de los dos sustratos analizados de acuerdo con la estrategia planteada en la introducción: los xilanos y la sacarosa.

#### 6.1.1 Fermentaciones control

Con el fin de monitorear el crecimiento en el medio de cultivo óptimo para este tipo de microorganismos, se realizaron pruebas de crecimiento en caldo MRS-Modificado añadiendo 1% de glucosa. Estos experimentos sirvieron como control positivo de crecimiento. La Figura 2, muestra gráficamente los resultados obtenidos.

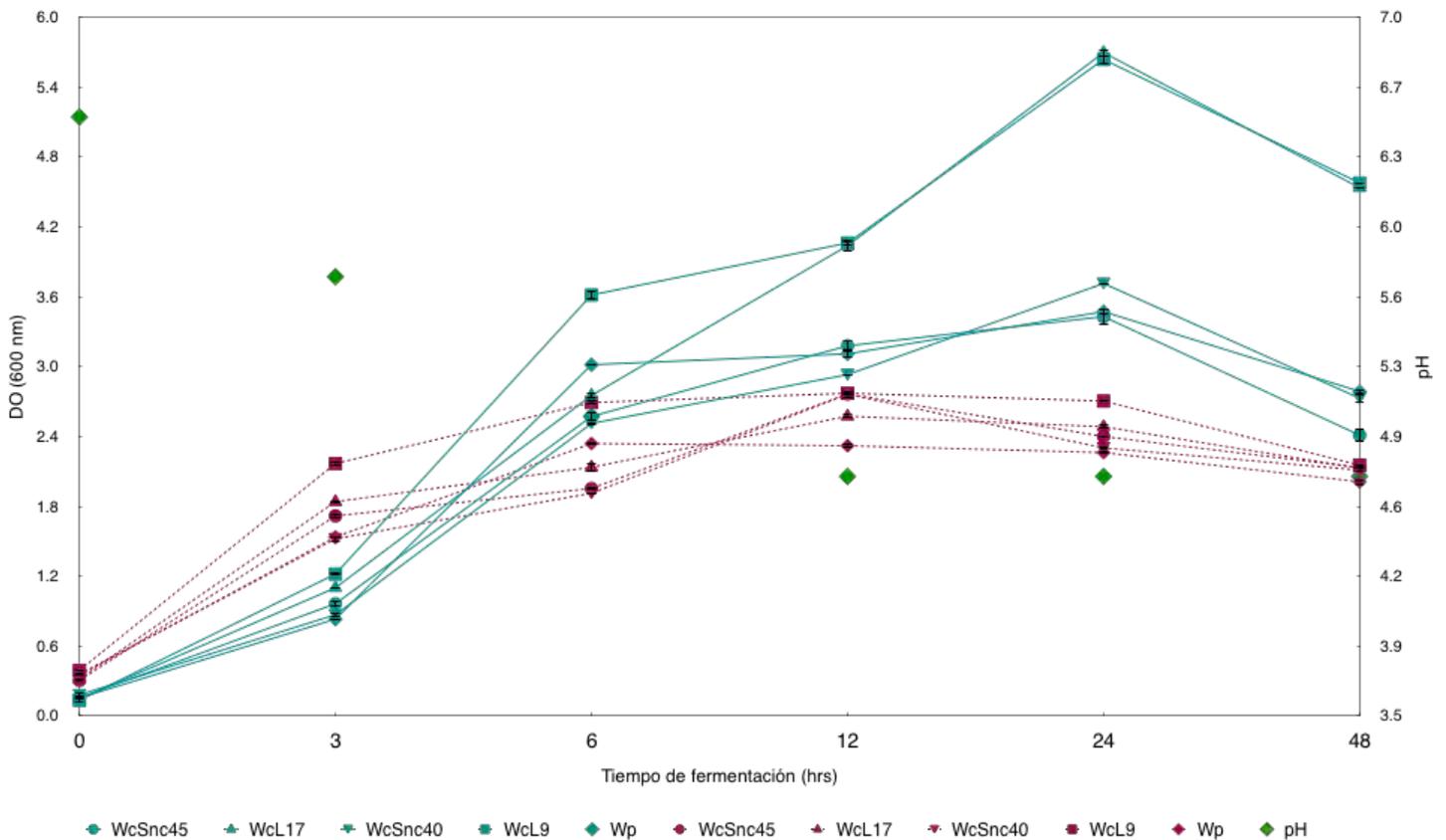


Figura 2. Crecimiento de 5 cepas de *Weissella* en MRS-glucosa. Cada cepa se describe con un símbolo específico. Color azul, la evolución de la DO en medio MRS comercial; color guinda, la evolución de la DO en MRS-Glucosa y color verde, la caída de pH a lo largo de ambas fermentaciones. Las líneas verticales, indican los valores de la desviación estándar en cada punto, de dos replicas. Cada símbolo corresponde a una cepa.

Todas las cepas evaluadas crecieron eficientemente en ambos medios y, como puede apreciarse, no hubo crecimiento diferencial entre el conjunto de microorganismos. Esperadas diferencias se observaron al considerar el contenido de glucosa en el medio, ya que se dio un mayor crecimiento en MRS comercial, el cual contiene ~2% de glucosa, que en MRS con 1% de glucosa. Se observó además un decremento en los valores de pH de 6.5 a 4.5. Esta variación es característica de las BAL, debido a la producción natural de ácidos orgánicos (Rondón *et al*, 2011).

### 6.1.2 Fermentaciones con xilano

Una vez que se comprobó la viabilidad de las cepas, se estudió su crecimiento en xilano de abedul. El uso de este polisacárido por el género *Weissella* sugeriría la importancia de la hemicelulosa en la fermentación de la masa nixtamalizada.

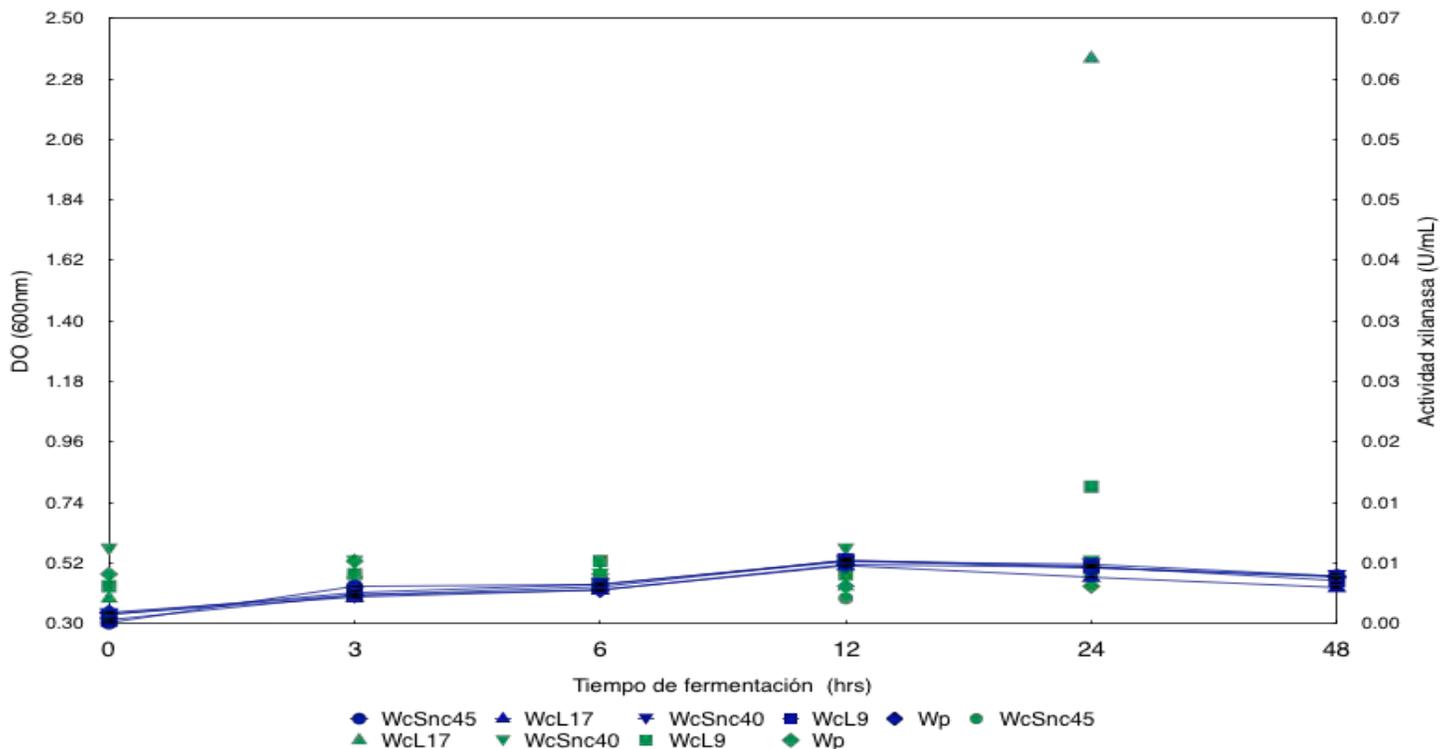


Figura 3. Crecimiento de *Weissella* spp. en medio MRS-Xilano. Color azul, la evolución de la DO. Color verde, la actividad xilanólítica a lo largo de la fermentación. Las líneas verticales, indican los valores de la desviación estándar. Cada símbolo corresponde a una cepa.

De la Figura 3 se infiere que hay un escaso crecimiento de las cepas estudiadas en xilano de abedul. La evaluación de pH no reveló ningún cambio a lo largo del muestreo, manteniéndose en 6.5 para todos los casos. Derivado del mismo resultado, la actividad xilanólítica fue escasa en todos los puntos. Sin embargo, en los sobrenadantes

de WcL17 se observó un valor de actividad enzimática de 0.061 U/mL que, si bien es extremadamente bajo, fue significativamente mayor al que mostraron el resto de las cepas, en las que se alcanzaron valores a penas de 0.005 U/mL.

La pobre o nula utilización de este sustrato puede deberse a diversos factores. Primeramente, al tipo de xilano utilizado, ya que, en las paredes celulares que envuelven los gránulos de almidón de maíz se encuentran arabinoxilanos, que son polímeros de xilosa decorados con arabinosas y/o ácido glucurónico, mientras que el xilano de abedul, es un polisacárido más complejo y con muchas y diversas ramificaciones (Singh *et al.*, 2014). Otro de los factores es que las cepas estudiadas pueden no poseer de actividad endoxilanasas codificada en su genoma y requieran de un primer procesamiento del polisacárido. Por esta razón, se procedió a analizar el mismo comportamiento en XOS.

### **6.1.3 Fermentaciones con xilooligosacáridos (XOS)**

Considerando la suposición anterior, con la idea de explorar la contribución de *Weissella* en la fermentación del pozol, partiendo de la base de que no posee actividad amilolítica, pero que si son capaces de metabolizar xilosa, nos propusimos verificar su capacidad para consumir xilooligosacáridos (XOS).

#### **6.1.3.1 Producción de (XOS)**

Se realizaron fermentaciones con este sustrato como única fuente de carbono. Estos compuestos son sumamente costosos, y se comercializan a nivel de mg (Megazyme, Irlanda). Por tal motivo, exploramos diversos estudios en los que se describe la obtención de XOS mediante la hidrólisis de xilano, ya sea por métodos enzimáticos o ácidos. En un trabajo previo en el laboratorio de la Dra. Wachter (López- Hernández *et al.*, 2018), se realizaron ambos tipos de hidrólisis, demostrando que *W. confusa* L9 tenía preferencia por XOS obtenidos por hidrólisis ácida, más que por los obtenidos mediante hidrólisis enzimática.

Tomando en cuenta este antecedente, se decidió producir XOS por vía de una hidrólisis ácida. Con la finalidad de obtener una buena producción de estos, se probaron tres condiciones de hidrólisis ácida, cada una con dos variaciones. Los resultados de estos tratamientos fueron verificados por cromatografía en capa fina (TLC), donde la eficiencia del proceso se evalúa en términos del número y la intensidad de las manchas (XOS). En la Figura 4 se muestran los resultados obtenidos.

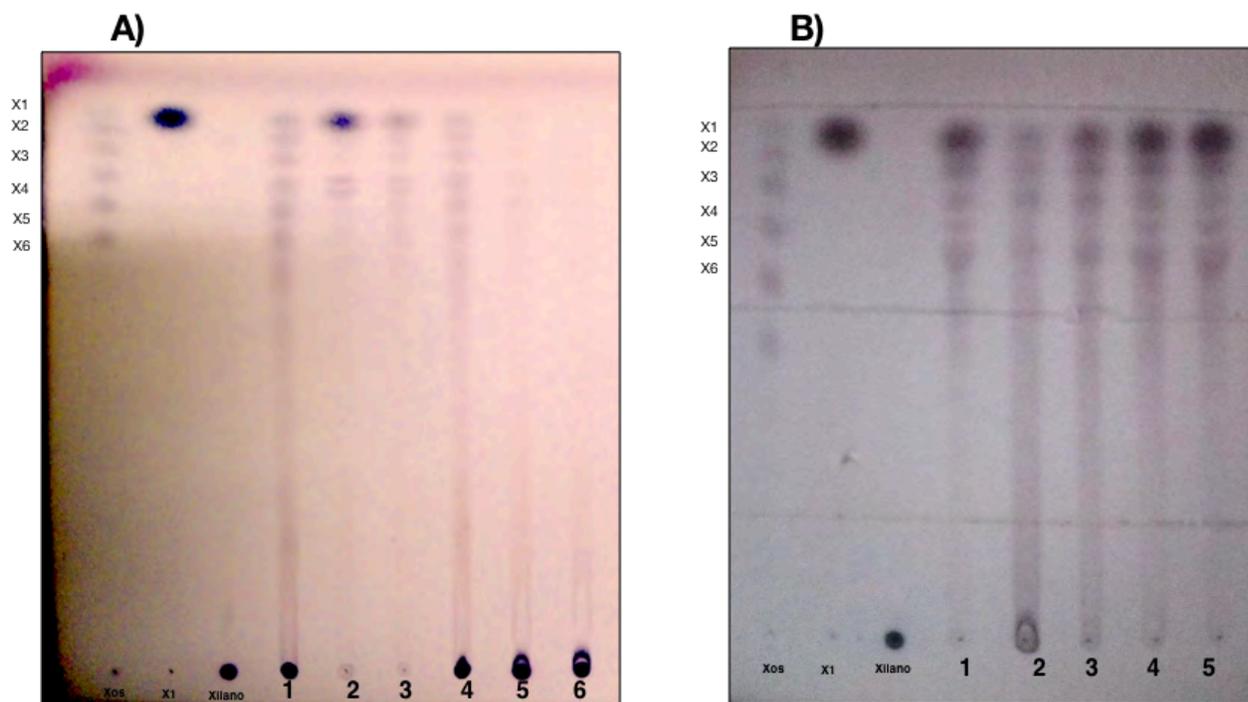


Figura 4. A) Producción de xilooligosacáridos mediante hidrólisis ácida en diferentes condiciones. Carril 1. estándar de XOS. Carril 2. xilosa. Carril 3. xilano. Carril 4. Método 1.1 Carril 5. Método 1.2. Carril 6. Método 2.1. Carril 7. Método 2.2. Carril 8. Método 3.1. Carril 9. Método 3.2. B) Producción de xilooligosacáridos con el método 1.1 a diferentes tiempos de incubación. Carril 1. estándar de XOS. Carril 2. xilosa. Carril 3. xilano. Carril 4. 60 min, Carril 5. 30 min. Carril 6. 45 min. Carril 7. 90 min. Carril 8.120 min.

La TLC mostrada en la Figura 4-A, muestra la distribución de XOS obtenidos por hidrólisis de xilano en condiciones diferentes. Se eligió el proceso de acuerdo con aquellas condiciones de menor obtención de xilosa y mayor producción de XOS a partir de 2 moléculas de xilosa (xilobiósido). El carril 4 muestra el método elegido, el cual consiste en el tratamiento con ácido sulfúrico a 0.25 M incubado a 30 °C, de una muestra con 2 % de xilano durante 30 min.

Una vez elegida la condición óptima de producción, se evaluó el efecto del tiempo de incubación en la generación de XOS, para ello, se incubaron las muestras a 100 °C, durante 30, 45, 60, 90 y 120 min. En el carril indicado con el tiempo 3 (45 min) de la Figura 4-B, se observa el tiempo de incubación seleccionado por mostrar cualitativamente mayor producción de XOS con una mínima acumulación de xilosa y mayor remoción de xilano.

Estos resultados permitieron tener una idea de la disponibilidad de XOS en el medio de cultivo. A pesar de no ser un método cuantitativo, se puede inferir globalmente la concentración por la intensidad de las bandas. Es evidente que a partir de los 60 min de incubación aumenta la acumulación de xilosa, y antes de los 45 min aún existe xilano sin hidrolizar.

### 6.1.3.2 Evaluación de crecimiento en XOS

Teniendo claro el método a seguir para la producción de XOS, se realizaron las fermentaciones correspondientes a la utilización de este sustrato como única fuente de carbono.

Las fermentaciones con XOS permitieron diferenciar el grupo de cepas evaluadas. Con la cepa WcL17 se obtuvo el mayor crecimiento con una DO de  $0.92 \pm 0.004$  a las 24 h de crecimiento, seguido de WCL9 con una DO de  $0.85 \pm 0.005$ . Mientras que la menor fue de  $0.48 \pm 0.001$  unidades de absorbancia. En comparación con los datos obtenidos en las fermentaciones sobre xilano, todas las cepas crecieron bien. Sin embargo, el crecimiento sigue siendo bajo relativo a los crecimientos control con glucosa. La siguiente pregunta consistió en dilucidar si el crecimiento mostrado era consecuencia de la utilización de la xilosa disponible tras la hidrólisis de xilano o si estos microorganismos tienen la posibilidad de degradar XOS. En consecuencia, se analizó la evolución de los XOS a lo largo de la fermentación por TLC. El consumo de XOS mostrados en la TLC confirma que el crecimiento no se dio solo por la utilización de xilosa, si no también por la degradación de XOS, cuya concentración disminuye durante el proceso.

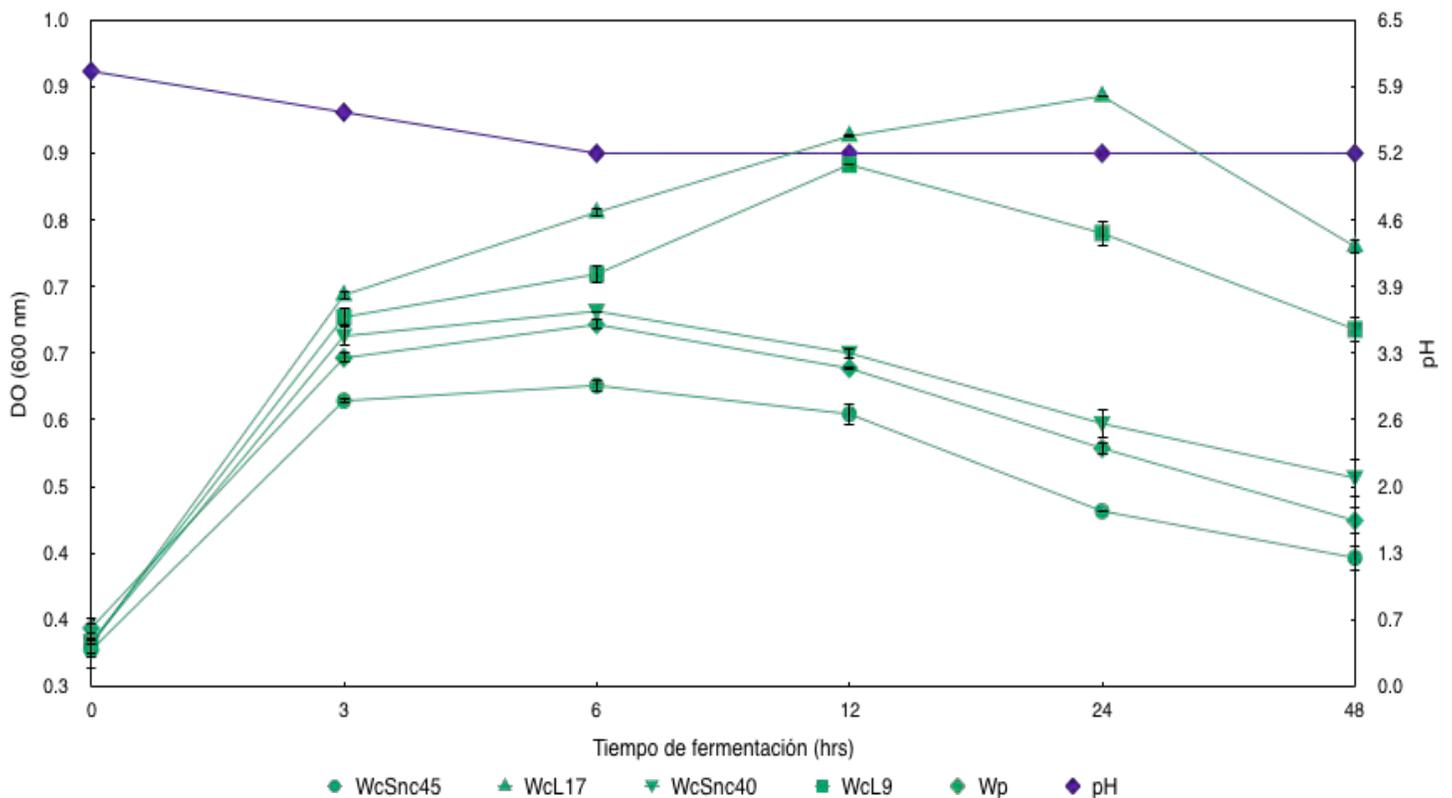


Figura 5. Crecimiento de las cepas de *Weissella* spp. en XOS como fuente de carbono. Color verde, la DO alcanzada. Color morado, la caída de pH a lo largo de la fermentación. Las líneas verticales, indican los valores de la desviación estándar de tres replicas. Cada símbolo corresponde a una cepa.

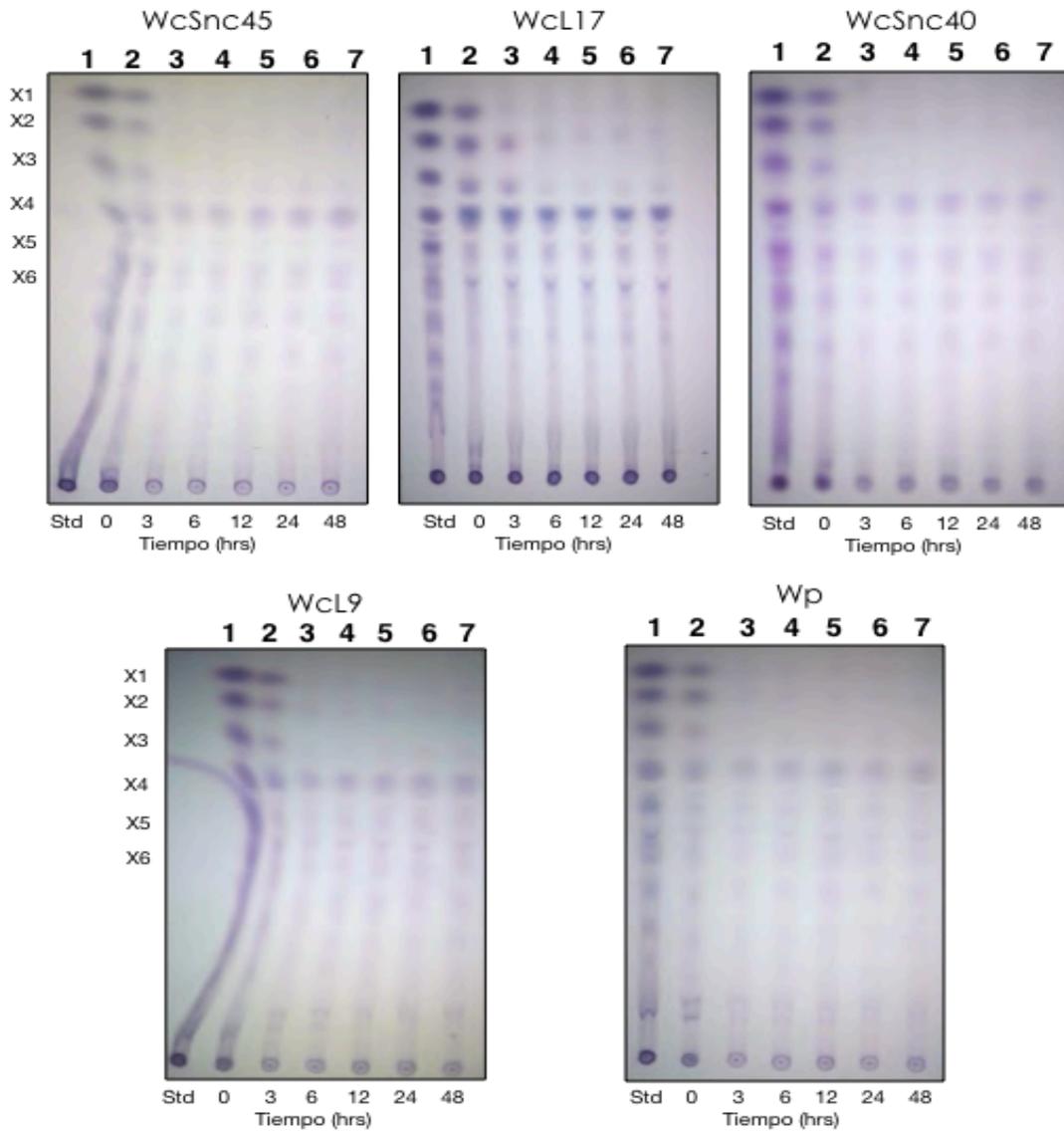


Figura 6. Cromatografías en capa fina (TLC) del consumo de XOS por cepas *Weissella a* lo largo del cultivo descrito en la Figura 5.

En la Figura 6 puede observarse que todas las cepas tienen mayor preferencia por XOS de cadena corta, consumiendo casi en su totalidad la xilosa (X1), X2, y X3. La concentración de otros XOS de mayor peso molecular permanece casi constante, con excepción de X4 en el que se percibe una escasa disminución de la intensidad de la banda a través del tiempo. Es evidente que, desde las 3 h de incubación los XOS de cadena corta ya han sido metabolizados casi en su totalidad. En particular, la cepa WcL17 no presenta un consumo tan acelerado, requiriendo de 6h para degradarlos casi en su totalidad. Sin embargo, esta es la cepa que presentó mayor DO, aunque a tiempos más largos. Los resultados obtenidos demuestran que el grupo de las cinco bacterias

evaluadas, tiene similar preferencia para metabolizar xilosa, xilobiosa y xilotriosa, aunque no fue posible cuantificar la cantidad consumida de cada xilosido.

### 6.1.3.2 Evaluación de la actividad xilosidasa

Para tener una mayor comprensión de la forma en la que los XOS son consumidos por este grupo de organismos, se realizó un ensayo de actividad enzimática como se detalla en la metodología. Los resultados de este experimento, también fueron verificados por TLC y se muestran en la Figura 7.

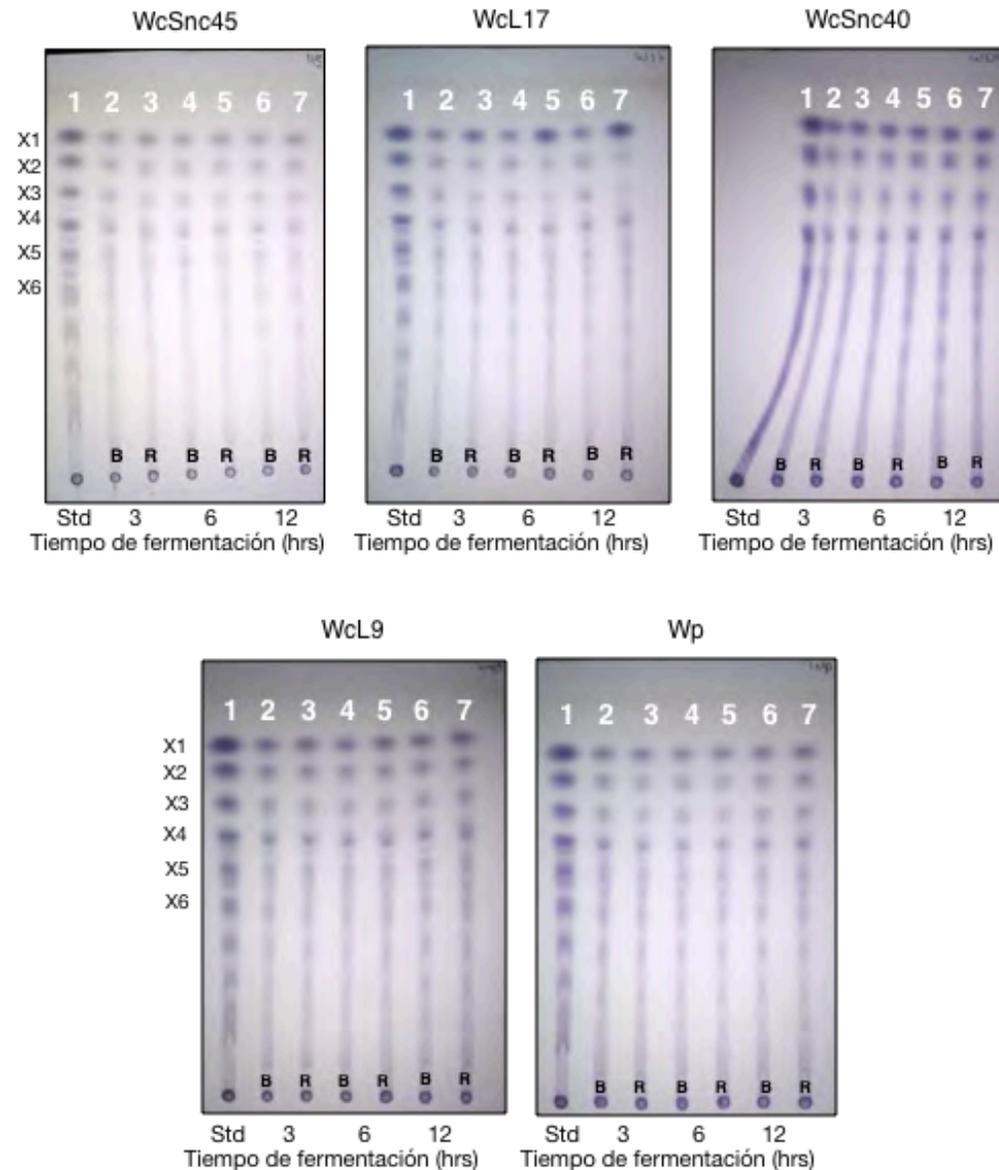


Figura 7. Cromatografía en capa fina (TLC) del perfil de oligosacáridos modificado por la actividad xilosidasa en reacciones con los medios de cultivo de cada una de las cepas estudiadas. Las letras B y R indican el tiempo 0 y 5 h de reacción respectivamente.

En la Figura 7 se observan las evaluaciones de actividad enzimática en el sobrenadante. Una vez más, se puede apreciar que la cepa WcL17 se diferencia de las demás. Esta conclusión se obtiene de observar cualitativamente la disminución de la intensidad en las bandas correspondientes a X2 y X3 en comparación con el blanco (B) que corresponde a los tiempos iniciales de la reacción, aunado a la acumulación de xilosa al final de la reacción (R).

### 6.1.3.3 Perfiles de consumo y actividad xilosidasa de WcL17

Los resultados presentados, es decir, el perfil de consumo de XOS a lo largo de la fermentación y el perfil de degradación de estos por la actividad enzimática presente en el sobrenadante de cultivo, justifican la elección de la cepa WcL17 para futuros experimentos. Con el fin de contar con más detalle sobre el comportamiento de la cepa, se analizaron con mayor detalle las muestras obtenidas de la fermentación y de la reacción enzimática, empleando para ello cromatografía de intercambio aniónico HPAEC-PAD. Los resultados de las Figuras 6 y 7, específicos para la cepa WCL17 se analizan entonces en las Figuras 8 y 9.

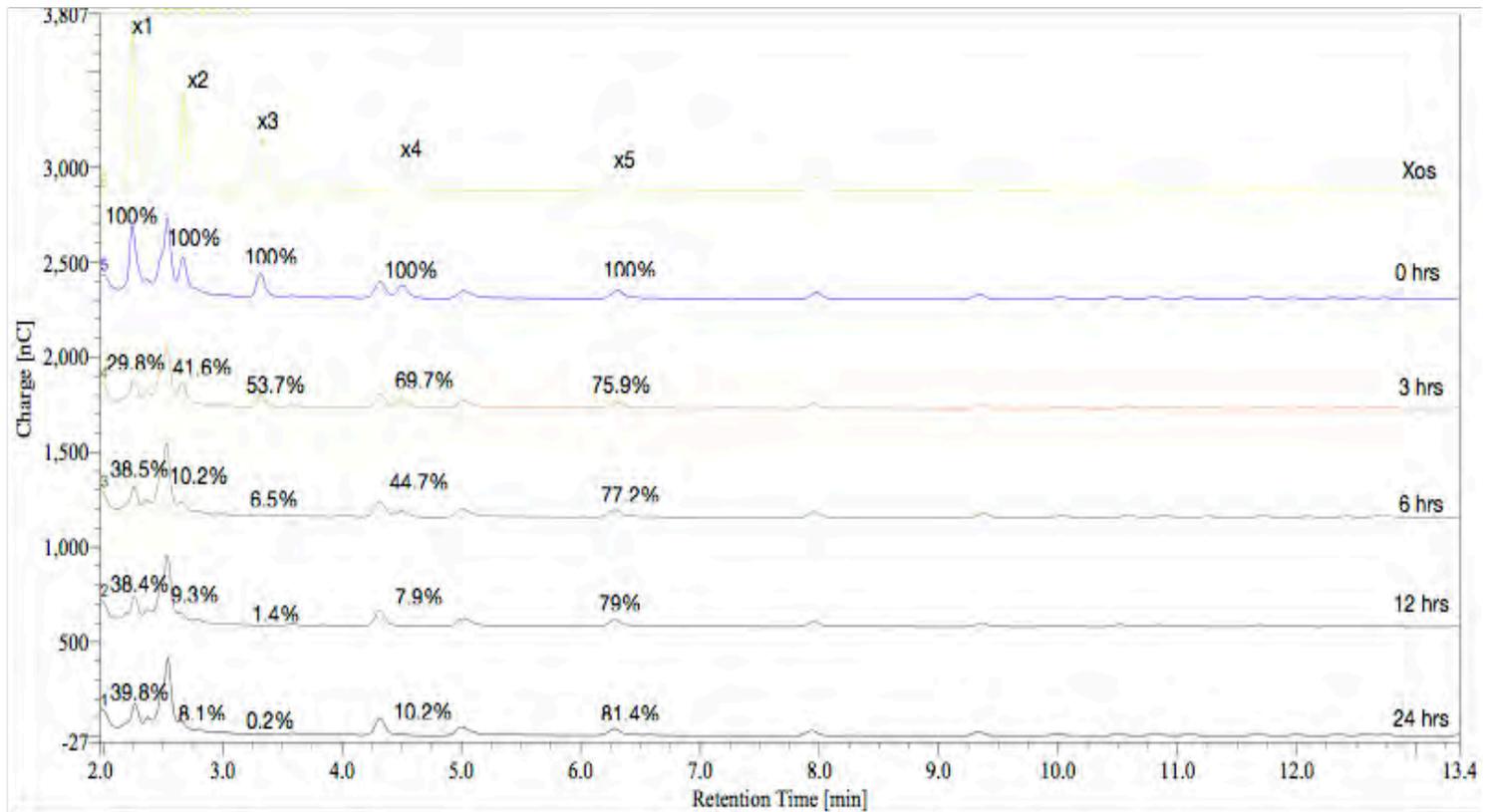


Figura 8. Perfil de consumo de XOS durante el cultivo de la cepa WcL17, analizado mediante HPAEC-PAD. Las líneas: Amarilla) estándar; Azul) 0 h de cultivo; Naranja) 3 h de cultivo; Verde) 6 h de cultivo; Morado) 12 h de cultivo y Gris) 24 h de cultivo.

En la Figura 8 se corrobora la utilización preferencial por X1, X2 y X3. Con esta técnica es más evidente la utilización de X4, hecho que no podía observarse claramente por TLC. Se muestra además un pico pegado a la xilotetraosa, que puede tratarse de la banda observada en la TLC, la cual enmascaraba el resultado de X4, dando la impresión de que había muy poca degradación. Esto podría indicar que la hidrólisis de xilano, da lugar a XOS de diferente conformación. Para esto sería necesaria la presencia de una enzima con alta especificidad de sustrato, como las xilosidasas reportadas que catalizan la endohidrólisis de enlaces 1,3-beta-D-xilosídicos (EC 3.2.1.32), de enlaces 1,4-beta-D-xilosídicos (EC 3.2.1.8) o incluso las que hidrolizan los enlaces alfa xilosídicos (Falck, *et al.*, 2016). La xilotetraosa utilizada como estándar tiene uniones entre xilosas de tipo 1,4-β-D-xilosídicos, por tanto, WCL17 puede tener en el genoma un gen que dé lugar a una β-xilosidasa EC 3.2.1.8. Como sea, los perfiles mostrados ponen de manifiesto la capacidad de WCL17 para metabolizar XOS de cadena corta, obteniéndose una reducción a las 24 h de incubación para X2 de un 91.9%, X3 de un 99.8% y X4 de un 88.8%, además de la xilosa que se redujo un 70% a las 12 h. Como consecuencia de la hidrólisis de los XOS (X2, X3 y X4), la concentración de xilosa aumenta a las 24 h.

Como se mencionó anteriormente, el perfil de los productos derivados de la actividad xilosidasa sobre los XOS también fue evaluado. En la Figura 9 se muestra por HPAEC-PAD la degradación de XOS derivada de la reacción enzimática con el sobrenadante de cultivo tomado a las 3, 6 y 12 h. El cambio en la concentración de XOS se expresa en porcentaje y se reporta la acumulación de xilosa tras 5 h de reacción con los tres sobrenadantes. Se observa, además, una reducción de X2, X3 y X4.

El mayor porcentaje de hidrólisis de XOS medido por la acumulación de xilosa se dio en las reacciones con la(s) enzima(s) producidas a 6 h de cultivo, aumentando un 50% con respecto al inicio de la reacción. Por otro lado, las disminuciones más fuertes de X2, X3 y X4 se observaron en las reacciones con los sobrenadantes de 12 h de incubación. Con todo esto, también puede inferirse que la actividad enzimática es más fuerte a medida que el microorganismo crece. Y que el bajo crecimiento y actividad se deben a un problema de concentración de XOS en el medio de cultivo, pues recordemos que el tratamiento de hidrólisis de xilano no fue caracterizado en términos de pureza y concentración.

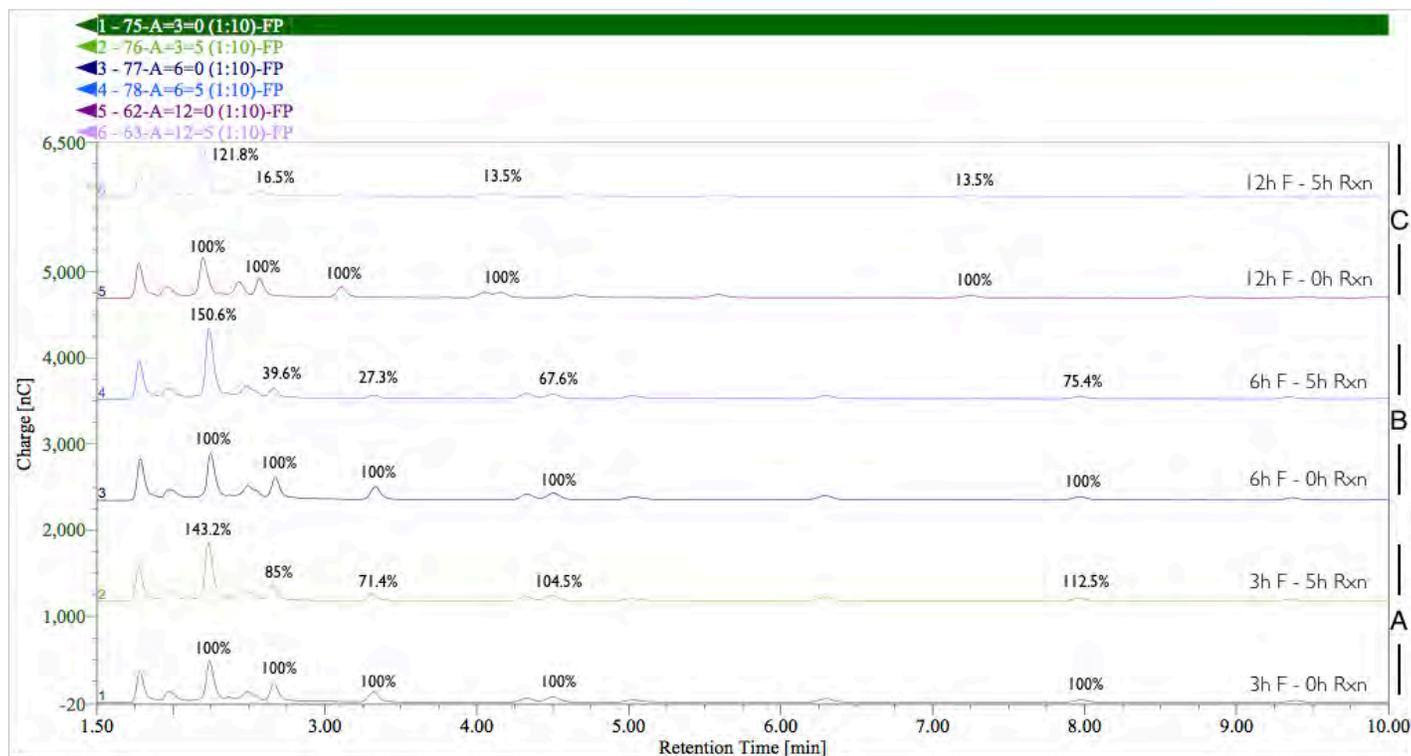


Figura 9. Perfil de actividad xilosidasa de WcL17, evaluada en sobrenadantes de diferentes tiempos de cultivo en XOS. Los tiempos de fermentación se indican con una F en: A) 3 h, B) 6 h y C) 12 h. Los colores verde, azul y morado oscuros corresponden al tiempo 0 h de reacción (Rxn). Los colores verde, azul y morado claros corresponden al tiempo 5 h de reacción (Rxn).

Con todos los experimentos mostrados se pone de manifiesto que *Weissella confusa* WcL17, es capaz de metabolizar XOS de cadena corta, pero no xilano, o al menos con muy baja especificidad. Al pensar en la fermentación del pozol y la frecuencia en que este género se ha encontrado a lo largo de las investigaciones sobre la microbiología de esta bebida, se puede inferir que otros microorganismos presentes podrían ser los responsables de hidrolizar el xilano de la hemicelulosa del maíz liberando XOS que son metabolizados por otros organismos, incluyendo a *Weissella confusa* L9 y L17, estudiadas hasta el momento. Otra opción es que el tratamiento de nixtamalización genere dichos productos a partir de la hemicelulosa. Dada la complejidad microbiana en el pozol, no es difícil pensar en este hecho. Hay estudios, en otros alimentos fermentados, que comprueban un comportamiento similar por el género *Weissella* spp. Como las aisladas de verduras y alimentos fermentados indúes (batido Idli y el fermentado de repollo) en donde se demostró que 4 de 6 cepas estudiadas, eran capaces de utilizar XOS como fuente de carbono, preferencialmente X2 y X3, mientras que no podían hidrolizar el xilano. No sólo los estudios microbiológicos y bioquímicos confirman este comportamiento. En el trabajo referido, se realizó una búsqueda de genes xilanolíticos en las especies de *Weissella*, que hasta ese momento estaban secuenciadas y disponibles en las bases de datos NCBI-genome (Benson *et al.*, 2005) y CAZY

(Cantarel *et al.*, 2009). En la exploración realizada, encontraron genes con potencial para codificar exo xilanasas (EC 3.2.1.156), que actúa sobre el xilano oligomérico, para  $\beta$ -xilosidasa, endo-xilanasas, y un gen para una enzima arábica específica. Si bien, no todas las especies de *Weissella* presentaron en su genoma estas actividades, el correspondiente a *W. confusa* y *W. cibaria* si contienen algunos de ellos (Patel *et al.*, 2013). Por otra parte, un hecho interesante es que los XOS son considerados prebióticos por ser metabolizados por la microbiota intestinal con resultados benéficos para la salud humana, lo que refuerza la idea de que el género en estudio es probiótico. Esta aseveración ya ha sido demostrada en un trabajo en el que se aislaron 8 cepas de *Weissella* de las especies *cibaria* y *confusa* de heces humanas. En este trabajo, el potencial probiótico de dichos organismos fue evaluado resultando algunas de ellas positivas (Lee *et al.*, 2012).

#### 6.1.4 Fermentaciones con sacarosa

La evaluación del crecimiento en sacarosa de las cinco cepas en estudio se realizó con la finalidad de abarcar otro aspecto relacionado con el papel de *Weissella* en la fermentación del pozol. Se trata de la producción de polisacáridos, característica de muchas especies del género, considerando que este sustrato está disponible en el grano de maíz. Por lo tanto, se realizaron fermentaciones en medio MRS-Sacarosa. La Figura 10 muestra los resultados obtenidos.

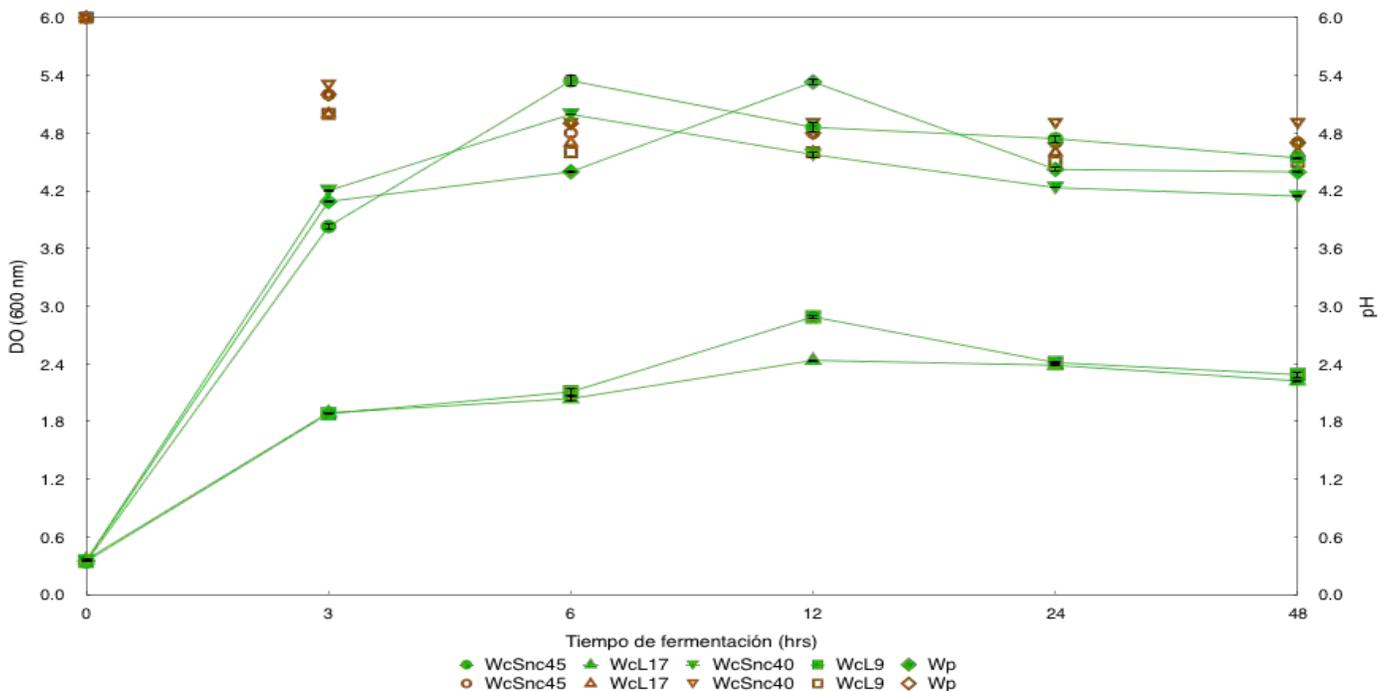


Figura 10. Cultivo de 5 cepas de *Weissella* aisladas del pozol en medio MRS-Sacarosa. Color verde, evolución de la DO. Color marrón, la caída de pH a lo largo de la fermentación. Las líneas verticales, indican los valores de la desviación estándar de dos replicas. Cada símbolo corresponde a una cepa.

La Figura 10 pone en evidencia la capacidad de todas las cepas para crecer en este sustrato. También puede observarse que tres cepas crecieron con mayor eficiencia en sacarosa que las dos restantes, curiosamente WcL17 y WcL9, las cepas que mostraron mayor capacidad para crecer en xilooligosacáridos. La Densidad Óptica alcanzada fue mayor ( $5.34 \pm 0.067$  para WcSnc45 a las 6 h de cultivo) que la observada en los cultivos control con glucosa, donde el valor más alto de DO fue de  $2.77 \pm 0.012$  por WcL9 a las 12 h de incubación. Se monitoreó también la actividad enzimática en todos los puntos muestreados. Una unidad de actividad enzimática fue definida como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1  $\mu\text{mol}$  de glucosa o fructosa por minuto. Así, se obtuvo la mayor actividad a las 3 horas de fermentación como se resume en la Tabla 6 con una caída drástica de actividad a partir de las 6 h en todos los casos. Es probable que la pérdida de actividad este asociada a la caída de pH, que también se observó a partir de la 3ª hora de cultivo, como también se documenta en la Tabla 6.

Tabla 6. Actividad glicosiltransferasa y pH a las 3 y 6 h de cultivo en sacarosa de cinco cepas de *Weissella* spp. aisladas del pozol

Cepa analizada	U/mL (3h)	pH (3h)	U/mL (6 h)	pH (6 h)
WcSnc45	$0.33 \pm 0.06$	5.2	$0.079 \pm 0.010$	4.8
WcL17	$0.15 \pm 0.03$	5.0	$0.043 \pm 0.010$	4.6
WcSnc40	$0.25 \pm 0.09$	5.3	$0.118 \pm 0.004$	4.9
WcL9	$0.074 \pm 0.022$	5.0	$0.069 \pm 0.005$	4.6
Wcp-3a	$0.516 \pm 0.025$	5.2	$0.182 \pm 0.008$	4.9

A partir de estos resultados se decidió estudiar detalladamente el comportamiento de las tres cepas que mostraron mayor crecimiento y actividad enzimática. Para ello se realizaron cinéticas de crecimiento, actividad enzimática, cuantificación del consumo de sustrato y verificación de producción de polímero, mismas que se reportan en la Figura 11.

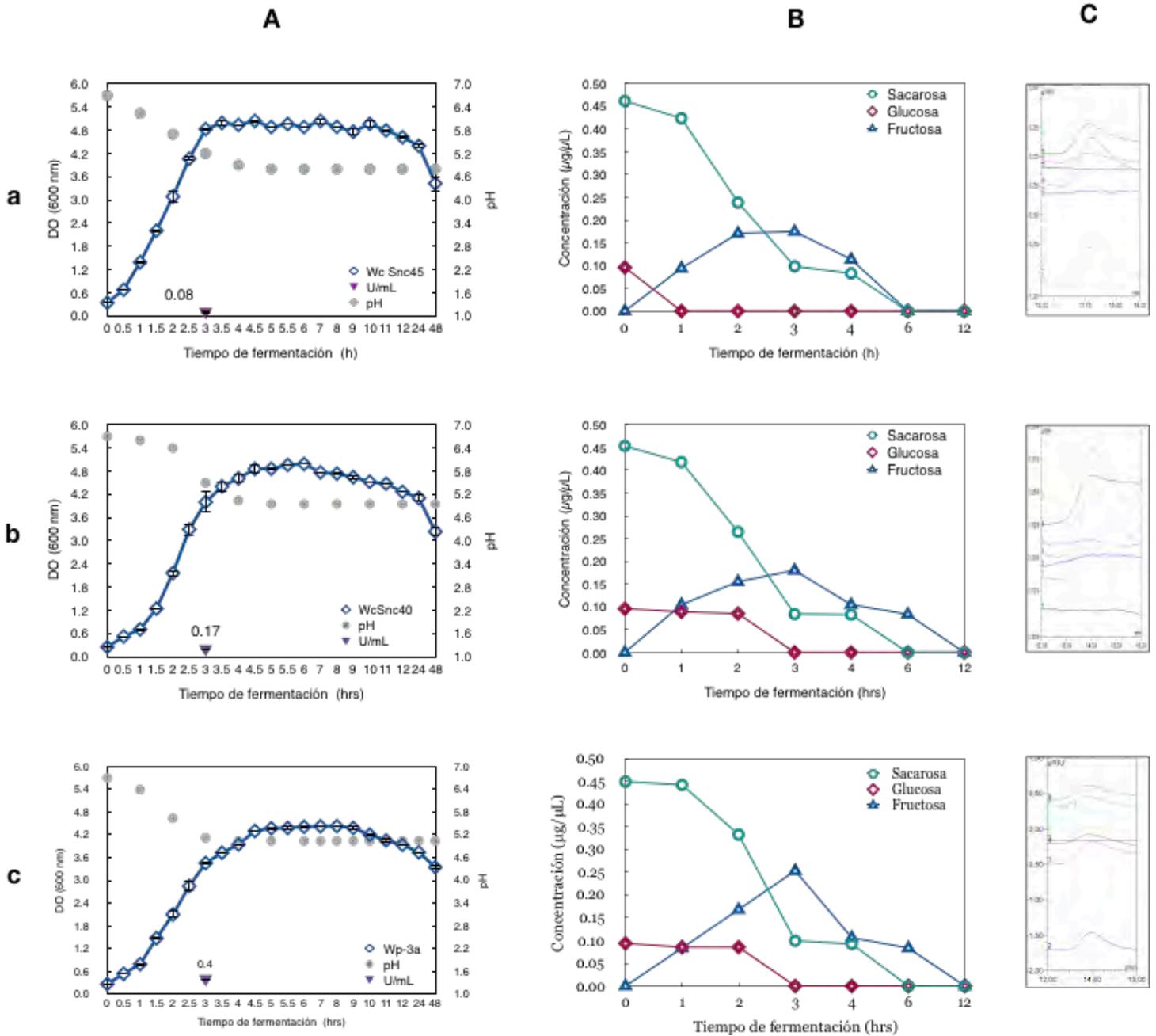


Figura 11. Cinéticas de crecimiento, consumo de sustrato y formación de polímero. **a)** *W. confusa Snc45*, **b)** *W. confusa Snc40* **c)** *W. paramesenteroides*. **A)** Cinéticas de crecimiento, determinación de pH y actividad enzimática sobre sacarosa. Las líneas verticales indican la desviación estándar de tres réplicas biológicas. **B)** Cuantificación por HPLC del consumo de sacarosa y, evolución de glucosa y fructosa a lo largo de la fermentación. **C)** Detección de formación de polímero por HPLC-GPC en sobrenadantes de fermentación desde 0 h a 6 h y 12 h de cultivo.

En la Figura 11 puede observarse el crecimiento de las tres cepas seleccionadas. La fase exponencial termina a las tres horas de crecimiento, comenzando la fase pre estacionaria. La fase de latencia termina transcurriendo una hora de incubación para Snc40 y Wp, mientras que para Snc45 se observa que termina rápidamente, iniciando el crecimiento a las 0.5 h. Un hecho interesante es que la mayor actividad enzimática sigue obteniéndose a las 3 h de fermentación permaneciendo casi constante en el resto de la fermentación (se incluye únicamente el valor a las 3h). Lo mismo ocurre con el pH, el cual deja de disminuir a las 3.5 h.

Los resultados obtenidos en estas cinéticas concuerdan con el ensayo general de las fermentaciones con las 5 cepas (Figura 10), en donde las tres cepas seleccionadas mostraron el mayor crecimiento y actividad enzimática. Coincide también que Wp es la cepa con mayor actividad enzimática (0.4 U/ml) y la cepa Snc45 la menor (0.08 U/ml). Las mediciones de actividad en esta segunda etapa del experimento son más precisas que las efectuadas cuando se seleccionaron las cepas, en términos de número de réplicas las cuales en este caso fueron 3.

De forma complementaria a la medición de actividad, se llevó a cabo la medición de la evolución del consumo de sacarosa, y de la presencia de glucosa y fructosa en el medio de cultivo, mismos que se reportan en la Figura 11. Para las tres cepas de *Weissella* se observa que el nivel de sacarosa, aunque no se consume en su totalidad, decrece considerablemente durante la fase exponencial de crecimiento y se termina a las 6 horas de cultivo, cuando las bacterias en los tres cultivos se encuentran en fase estacionaria de crecimiento. Un dato interesante es que, con excepción de la cepa Snc45, se observa la acumulación de fructosa al medio desde la primera hora de incubación y hasta la 3ª hora, a partir de la cual disminuye hasta su consumo total a las 12 h de cultivo.

La liberación de este azúcar corrobora la actividad glicosiltransferasa de la enzimática evaluada (acumulación de fructosa y consumo de glucosa, resultado de emplear la glucosa tanto como fuente de carbono del microorganismo, así como monómero del polisacárido, presumiblemente dextrana), liberando entonces la fructosa al medio. Por otra parte, dado el consumo preferencial de glucosa, la fructosa se acumula, hasta que empieza a ser consumida por las bacterias una vez agotada la sacarosa, por lo que disminuye al paso del tiempo. Otra característica son los niveles de glucosa, pues la concentración de este azúcar en el medio de cultivo se agota antes de terminarse la sacarosa. Como se señaló, la glucosa se destina tanto al crecimiento, como a la síntesis del polímero. Para corroborar esta hipótesis, se demostró la presencia del polímero por Cromatografía de Permeación en Gel (GPC), como también se muestra en la Figura 11-C, se evaluó en sobrenadantes de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 12 h de cultivo. Se observa en todos los casos la formación de polímero, exceptuando el tiempo 0 h (línea negra), de acuerdo a la señal la cual eluye después de 14 min y con base en los estándares, corresponde

a polímero de más de 668,000 Da. Los resultados de cuantificación de consumo de sacarosa y liberación de fructosa al medio para después metabolizarse (Figura 11-B), sugieren que el polímero sintetizado por estas bacterias, es un glucano. Aunque deberá comprobarse de qué tipo de glucano se trata, cabe la posibilidad de que sea tipo dextrana ya que el género *Weissella* ha sido reportado como dextrano positivo (Schmid *et al.*, 2015).

Una característica que llama la atención, es que durante el crecimiento de la cepa Wp, el polímero sintetizado durante la reacción enzimática confiere al medio de reacción una alta viscosidad, impidiendo su fácil cuantificación.



Figura 12. Formación de polímero por Wp en medio de reacción con sacarosa.

En la Figura 12 se presenta una evidencia del aspecto del polímero, y el hecho de que su viscosidad le impide fluir en tubos puestos de cabeza. Esta reacción se llevó a cabo con los sobrenadantes del cultivo de la cepa crecida en un medio con sacarosa. Este comportamiento en conjunto con los valores de actividad glicosiltransferasa permitió seleccionar la cepa Wp para continuar con el análisis a nivel genómico. Los resultados presentados en este apartado sugieren además de la glucosa, la utilización de XOS y sacarosa como fuente de carbono por estos microorganismos. Sustratos que se encuentran disponibles en el maíz nixtamalizado, aunque en bajas proporciones (González, 2018). Se decidió secuenciar la cepa Wp y WcL17 para su análisis genómico en busca de genes codificantes para actividades hidrolíticas y así esclarecer más el papel de este género en la fermentación del pozol.

## 6.2 Análisis genómico

### 6.2.1 Extracción de DNA cromosómico y datos de secuenciación generados

Se secuenciaron los genomas de las cepas WcL17 y Wcp en la plataforma Illumina NextSeq500. La Tabla 6 describe las características del DNA utilizado y de los datos generados.

Tabla 6. Características generales de las muestras de DNA de las cepas del género *Weissella* seleccionadas para su secuenciación genómica y de los datos generados por Illumina NextSeq500

Cepa	Concentración de DNA (ng/μL)	Relación 260/280	μg entregados para secuenciación	# de lecturas generadas X2	Tamaño del genoma	Profundidad
WcL17	100	1.89	2.6	6,204,472	2.3 Mb	402X
Wcp	149.7	1.91	3.8	7,394,234	2.2 Mb	498X

### 6.2.2 Limpieza de los datos

Las lecturas generadas por la plataforma de secuenciación fueron limpiadas para evitar tener datos de mala calidad o de adaptadores. Las Figuras 13 y 14 exponen el promedio de la calidad de las lecturas generadas por la plataforma de secuenciación y tras la limpieza realizada con TrimGalore.

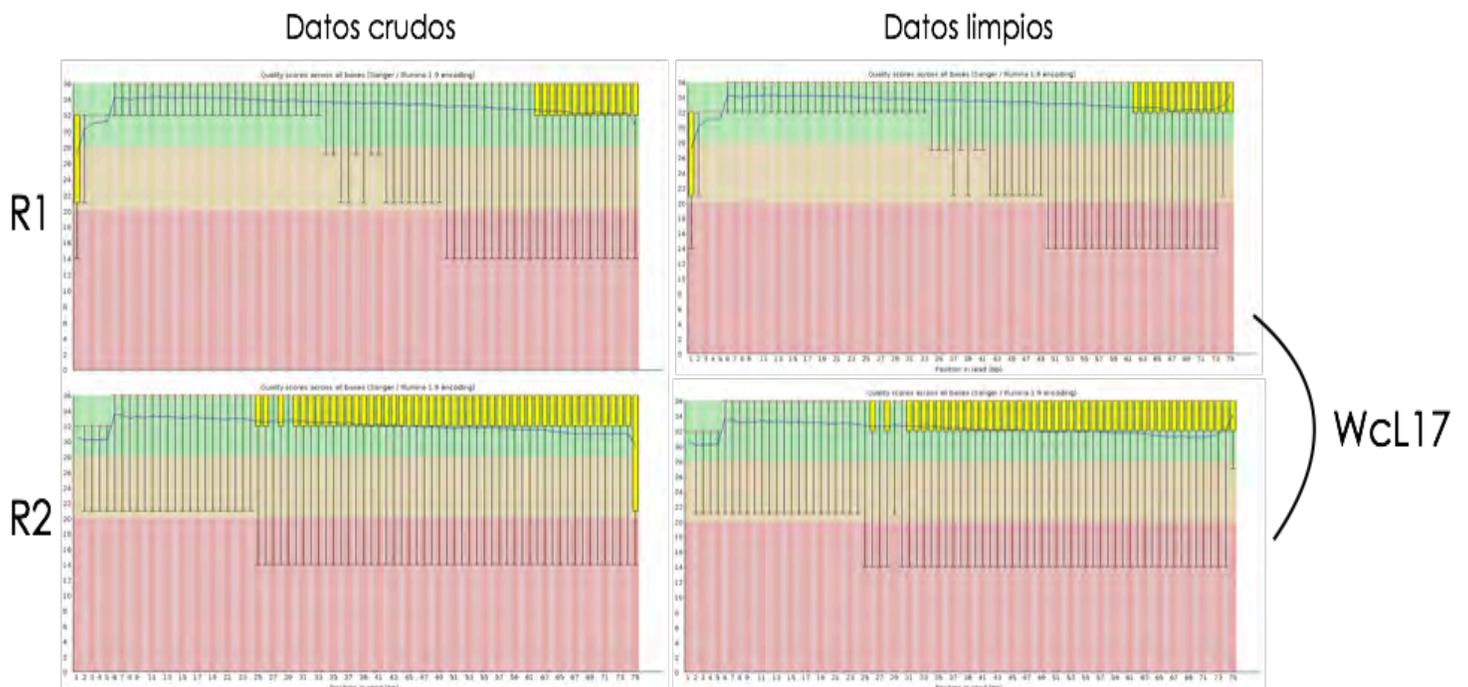


Figura 13. Calidad de lecturas de secuenciación de la cepa WcL17



Figura 14. Calidad de lecturas de secuenciación de la cepa Wcp

En dichas Figuras, el promedio está indicado por la línea azul; el eje Y de las gráficas representa la calidad de las lecturas, las que a partir de un valor de 30 se consideran de excelente calidad, a partir de 20 de calidad aceptable, y con valores inferiores a a 20, de mala calidad. En el eje X se representa el número de base dentro de la lectura generada.

En términos generales la calidad de las lecturas generadas fue buena. Sin embargo, para tener la seguridad de no trabajar con secuencias que pudieran venir de los adaptadores utilizados para secuenciar, se decidió hacer la limpieza, tras la cual, se puede observar que la calidad aumentó en las últimas bases de las lecturas. El número de lecturas después de la limpieza se redujo de 6,204,472 a 6,185,922 en el caso de WcL17 y de 7,394,234 a 7,340,348 en el caso de Wcp.

### 6.2.3 Ensamble de genomas

Una vez hecha la limpieza de las lecturas, se realizaron diversas versiones de ensamblajes para cada genoma, utilizando tres ensambladores VelvetOptimiser (Zerbino y Birney, 2008), SPAdes 3.6.0 (Nurk *et al.*, 2013) e IDBA-UD. La diferencia entre versiones fue el tamaño de k-mer y el número de pasos.

Un buen ensamblaje está determinado por el número de contigs, los que deben reducirse al menor número posible, como consecuencia de una mayor cantidad de lecturas ensambladas. Otro parámetro para determinar si un ensamblaje es de buena calidad o no, está determinado por el valor de N50, el cual indica el tamaño del

contig más pequeño dentro del grupo de los contigs más largos, cuyas longitudes combinadas representa el 50% del tamaño del genoma. Así, mientras más elevado es el valor de N50 mayor es el tamaño del 50% de los contigs, consecuencia de más bases ensambladas.

Las características generales de los ensamblajes llevados a cabo con los tres programas se muestran en las Figuras 15 y 16.

Statistics without reference	spades_v1	spades_v2	spades_v3	VelOpt	idba_vf	EnsMet2	SSPACE_WcL17_EnsMet2.final.sc...	WcL17GF.gapf
# contigs	46	48	45	36	74	39	29	30
# contigs (>= 0 bp)	125	90	80	90	122	39	29	30
# contigs (>= 1000 bp)	40	41	39	33	63	35	27	28
# contigs (>= 5000 bp)	28	31	28	26	39	27	24	23
# contigs (>= 10000 bp)	24	26	24	21	34	23	19	19
# contigs (>= 25000 bp)	22	23	22	19	28	21	18	18
# contigs (>= 50000 bp)	18	18	18	15	20	17	15	15
Largest contig	307 852	307 852	307 848	595 555	208 796	307 848	308 521	308 521
Total length	2 308 827	2 309 303	2 308 755	2 307 761	2 293 842	2 310 232	2 310 929	2 310 516
Total length (>= 0 bp)	2 319 462	2 316 205	2 314 807	2 319 456	2 308 551	2 310 232	2 310 929	2 310 516
Total length (>= 1000 bp)	2 304 350	2 303 988	2 304 286	2 305 546	2 285 282	2 307 026	2 309 208	2 308 795
Total length (>= 5000 bp)	2 275 433	2 281 878	2 280 214	2 288 545	2 222 131	2 286 934	2 299 918	2 294 185
Total length (>= 10000 bp)	2 242 179	2 238 637	2 246 974	2 248 438	2 182 300	2 253 694	2 261 303	2 260 945
Total length (>= 25000 bp)	2 215 840	2 196 592	2 220 643	2 214 115	2 082 340	2 227 175	2 245 850	2 245 492
Total length (>= 50000 bp)	2 073 214	2 011 798	2 078 043	2 069 082	1 790 686	2 084 646	2 121 703	2 121 458
N50	103 703	98 211	103 701	174 136	76 248	119 606	155 975	155 975
N75	75 593	64 107	75 588	63 818	52 615	77 129	84 597	84 516
L50	6	7	6	4	10	6	5	5
L75	13	14	13	10	19	12	10	10
GC (%)	44.66	44.66	44.66	44.66	44.66	44.65	44.66	44.66
<b>Mismatches</b>								
# N's	0	0	0	1548	0	0	214	0
# N's per 100 kbp	0	0	0	67.08	0	0	9.26	0

Figura 15. Características generales de los ensamblajes realizados para el genoma de WcL17.

En la Figura 15 se muestran versiones de ensamblajes para el genoma de WcL17. tres con el programa SPAdes, una versión con Velvet Optimiser y una versión más con IDBA-UD. A partir del valor del N50, se eligieron los dos mejores ensamblajes de las versiones mencionadas, los cuales corresponden a spades\_v3 y VelOpt cuyo número de contigs generados fueron 80 y 90 con valores de N50 de 103 701 y 174 136 respectivamente.

Una vez elegidos los dos mejores ensamblajes, se refinó cada uno con el programa SSPACE\_Standard\_v3.0\_linux, el cual genera scaffolds a partir de contigs, es decir, un contig tomando como datos de unión de las lecturas limpias.

Al tener los dos mejores ensamblajes refinados se generó un nuevo ensamblaje con el programa Metassembler, el cual mapea los ensamblajes de entrada contra las lecturas limpias con la finalidad de buscar lecturas que coincidan entre los contigs de los ensamblajes e ir llenando gaps, para finalmente generar un ensamblaje con un menor número de contigs (Wences *et al.*, 2015). El resultado de este proceso se muestra en la Figura 15 con el

encabezado EnsMet2, el cual muestra un número de contigs de 39 y una N50 de 119 606. La salida de Metassembler muestra una notable mejora en el ensamblaje, en comparación con los dos mejores ensamblajes elegidos, al reducir el número de contigs y aumentando el valor de N50. Finalmente, la salida de metassembler se refinó nuevamente con SSPACE, generando 29 contigs y una N50 de 155 975. Este último ensamblaje fue curado con GapFiller\_v1-10\_linux-x86\_64 el cual mapea la salida de SSPACE con las lecturas para unir los scaffolds extendiendo las uniones con bases tomadas de las lecturas y no con N's, lo cual genera malas anotaciones (Boetzer y Pirovano, 2012). El ensamblaje final para el genoma de WcL17 fue de 30 contigs una N50 de 155 975 y 0 N's.

Show heatmap  
Worst Median Best

Statistics without reference	contigsV1spa	contigsV2spa	contigs_VelOpt_v1	contigs_VelOpt_v2	contig_v1	contig_v3	contig_v4	contig_v5	QB.A.ctgs	SSPACE Wcp_Met1.final.scaffol...	WcpGF.gapfilled.final
# contigs	49	50	49	51	89	80	80	80	47	37	45
# contigs (>= 0 bp)	90	103	122	131	139	128	126	126	49	37	45
# contigs (>= 1000 bp)	44	46	47	49	76	72	72	72	44	36	42
# contigs (>= 5000 bp)	32	32	30	30	47	41	41	41	32	28	30
# contigs (>= 10000 bp)	28	28	25	24	36	33	33	33	28	25	26
# contigs (>= 25000 bp)	23	21	22	22	28	26	26	26	23	22	22
# contigs (>= 50000 bp)	16	15	18	17	19	19	19	19	16	17	16
Largest contig	182 998	211 920	182 917	182 909	163 142	163 170	163 170	163 170	182 998	212 244	212 244
Total length	2 224 828	2 223 039	2 216 508	2 215 588	2 203 433	2 212 185	2 212 185	2 212 189	2 224 723	2 226 345	2 226 747
Total length (>= 0 bp)	2 231 294	2 232 183	2 233 225	2 233 274	2 219 011	2 227 410	2 226 920	2 226 948	2 225 414	2 226 345	2 226 747
Total length (>= 1000 bp)	2 221 685	2 220 357	2 215 114	2 214 202	2 195 332	2 206 588	2 206 588	2 206 592	2 222 834	2 225 785	2 224 519
Total length (>= 5000 bp)	2 195 848	2 187 413	2 175 308	2 169 178	2 124 531	2 130 908	2 130 908	2 130 912	2 196 997	2 208 321	2 197 979
Total length (>= 10000 bp)	2 169 333	2 161 504	2 141 709	2 127 184	2 050 205	2 074 780	2 074 780	2 074 784	2 170 482	2 186 905	2 171 367
Total length (>= 25000 bp)	2 069 876	2 023 078	2 087 490	2 083 538	1 890 236	1 931 853	1 931 853	1 931 857	2 070 051	2 127 609	2 090 265
Total length (>= 50000 bp)	1 818 333	1 808 907	1 933 502	1 879 752	1 593 542	1 692 572	1 692 572	1 692 572	1 818 508	1 947 252	1 872 236
N50	114 808	119 798	114 457	114 497	74 155	78 748	78 748	78 748	114 808	119 923	119 794
N75	64 005	79 483	77 314	77 306	38 653	51 982	51 982	51 982	64 005	79 481	79 481
L50	8	7	8	8	12	11	11	11	8	7	7
L75	14	13	14	14	21	19	19	19	14	13	13
GC (%)	44.66	44.66	44.67	44.67	44.68	44.67	44.67	44.67	44.66	44.67	44.67
Mismatches											
# N's	0	0	1416	1132	0	0	0	0	0	812	0
# N's per 100 kbp	0	0	63.88	51.09	0	0	0	0	0	36.47	0

Figura 16. Características generales de los ensamblajes realizados para el genoma de Wcp-3a.

En el caso del genoma de Wcp-3a se siguió el mismo flujo de trabajo descrito para WcL17. Se seleccionaron los ensamblajes generados por SPAdes con número de contigs de 90 y 103, y valores de N50 de 114 808 y 119 798 en la versión 1 y versión 2 respectivamente. Tras refinar cada uno y generar un mejor ensamblaje con metassembler, el ensamblaje se redujo a 49 contigs y una N50 de 114 808. Al refinarse con SSPACE a 37 contigs y una N50 de 119 923 pero con un total de 812 N's. Sin embargo, al curarse con GapFiller el ensamblaje final quedó en 45 contigs, N50 de 119 794 y 0 N's.

## 6.2.4 Anotación de los ensamblajes

Los ensamblajes generados para cada genoma fueron anotados con el programa PROKKA, en la siguiente Tabla se enlista el contenido general de los genomas ensamblados.

Tabla 7. Características generales de la anotación de los genomas de WcL17 y Wcp-3a

Cepa	WcL17	Wcp
CDS	2213	2163
tRNA	117	110
rRNA	6	14
Hypothetical proteins	933	909

### 6.2.5 Identificación taxonómica de las cepas WcL17 y Wcp-3a aisladas del pozol.

Con la finalidad de corroborar la especie de las cepas secuenciadas, se extrajo la secuencia correspondiente al marcador rDNA 16S de cada genoma y se utilizó BLASTN en el portal de NCBI para verificar el estatus taxonómico de las cepas (Altschul *et al.*, 1990). Los resultados se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Datos generados en BLAST de la secuencia 16S de rRNA de los genomas de las cepas de *Weissella* WcL17 y Wcp .

Cepa	Identidad generada en BLAST	Cobertura	E valor	Identidad
WcL17	<i>Weissella confusa</i> strain JCM 1093	95%	0.0	99%
	<i>Weissella cibaria</i> strain 11-1-59	97%	0.0	99%
Wcp-3a	<i>Weissella confusa</i> strain JCM 1093	95%	0.0	100%
	<i>Weissella cibaria</i> strain 11-1-59	97%	0.0	99%

Los resultados de los datos generados por el BLAST mostrados en la Tabla 8 muestran el porcentaje de identidad y cobertura que arrojó cada BLAST para las dos cepas, indicando que ambas cepas podrían corresponder a *W. confusa* o bien a *W. cibaria*. Estos resultados no resolvieron con claridad la asignación taxonómica de las cepas secuenciadas, por lo que se decidió hacer un estudio filogenético que permitiera robustecer el análisis de identificación de las cepas secuenciadas. Para ello se construyeron dos filogenias, una tomando los genes ribosomales y otra tomando 5 marcadores *housekeeping* como se describe en la metodología. Las secuencias ribosomales y los genes únicos se extrajeron de cada uno de los genomas secuenciados, así como de los genomas representativos del género *Weissella* (Tabla 5). Los dos árboles filogenéticos fueron construidos a

partir de alineamientos múltiples de secuencias de aminoácidos. Estos fueron evaluados por jModelTest (Darriba *et al.*, 2012) que para el caso de la filogenia de los genes ribosomales predijo un modelo IWAG y para la filogenia de los genes *housekeeping* un modelo IGM. Los árboles fueron construidos con RaxML (Stamatakis, 2014) con el modelo predicho y 100 repeticiones bootstrap. Finalmente, ambos fueron visualizados con Geneious v11 (Kearse *et al.*, 2012).

La Figura 17 muestra la filogenia construida con las secuencias de los RNA ribosomales, en la que puede observarse un buen soporte de las ramas internas, mientras que las ramas externas están soportadas con valores entre 43 y 100. Se puede observar que, a nivel de genes ribosomales, *Weissella cibaria* se agrupa muy cerca de *Weissella confusa*, lo cual explica los resultados obtenidos con BLASTN en donde el gen 16S del rDNA apuntaba tanto para *W. confusa* como para *W. cibaria*. Sin embargo, tomando todos los genes ribosomales es claro discernir entre una especie y otra. En efecto, la filogenia construida con los genes *housekeeping* que se muestra en la Figura 18, se puede observar un buen soporte de las ramas entre especies. Si recordamos que la identificación por sanger (hecha en trabajos previos) de las cepas WcL17 y Wcp-3a indicaba que se trataba de *W. confusa* y *W. paramesenteroides* respectivamente, con estos análisis filogenéticos se puede corroborar que las cepas secuenciadas en este trabajo corresponden a *W. confusa*. No se descarta que la confusión pudo deberse a un mal etiquetado de las muestras, ya sea a la hora de recibir las cepas o a bien a la hora de trabajar con ellas en este trabajo.

Por otro lado, estos análisis ponen en evidencia que el uso de marcadores *housekeeping* y proteínas ribosomales son una alternativa a la ambigüedad que representa la asignación taxonómica exclusivamente por 16S rRNA, puesto que a pesar de ser esencial y encontrarse en todas las bacterias, presenta una baja resolución, pudiendo resolver el estatus taxonómico sólo a nivel de género (Janda y Abbott, 2007).

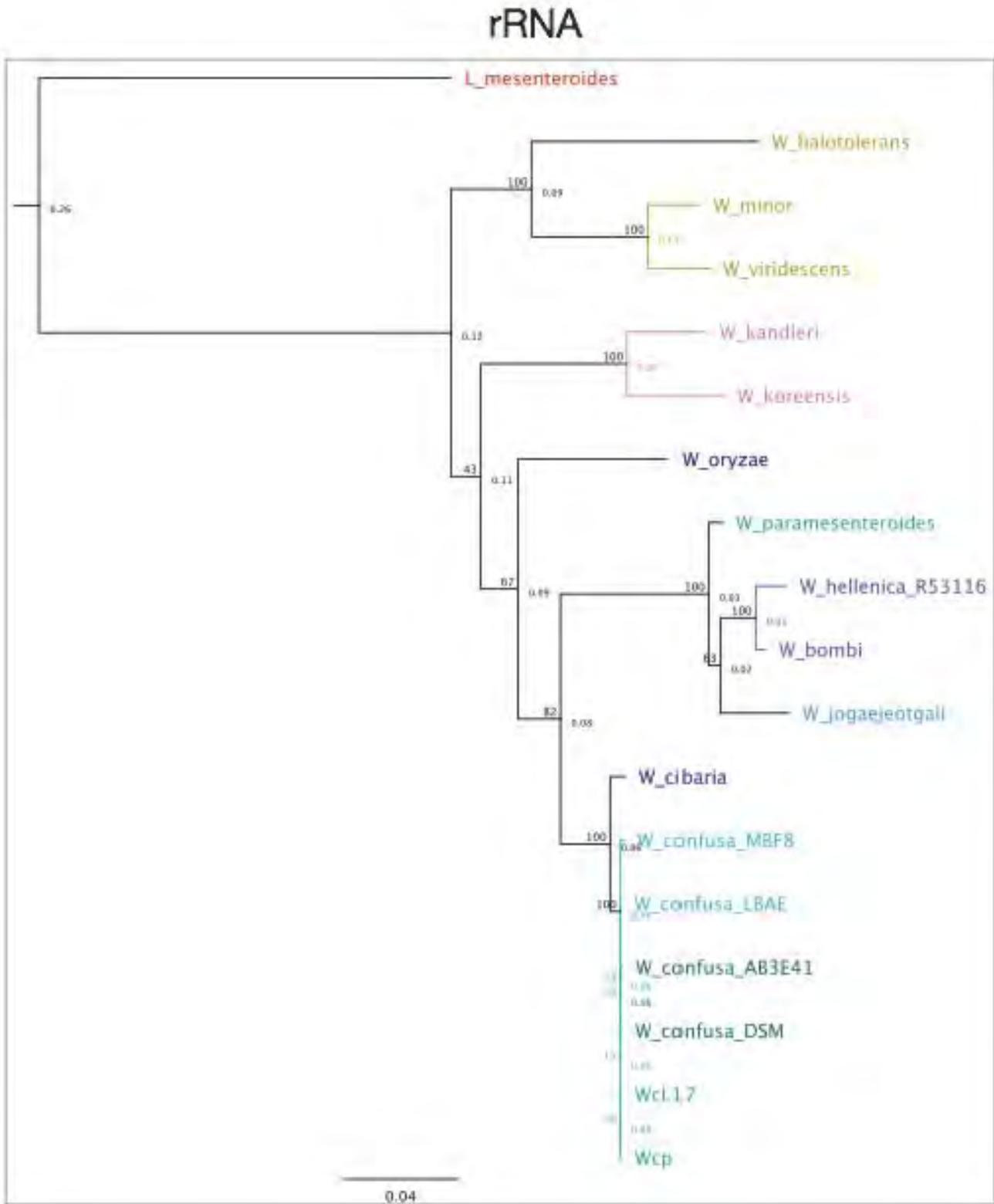


Figura 17. Ubicación de las dos cepas de *Weissella* aisladas de pozol Wcl17 y Wcp, dentro de un árbol filogenético de máxima verosimilitud construido con secuencias de rRNA de especies representativas de *Weissella*.

# Housekeeping

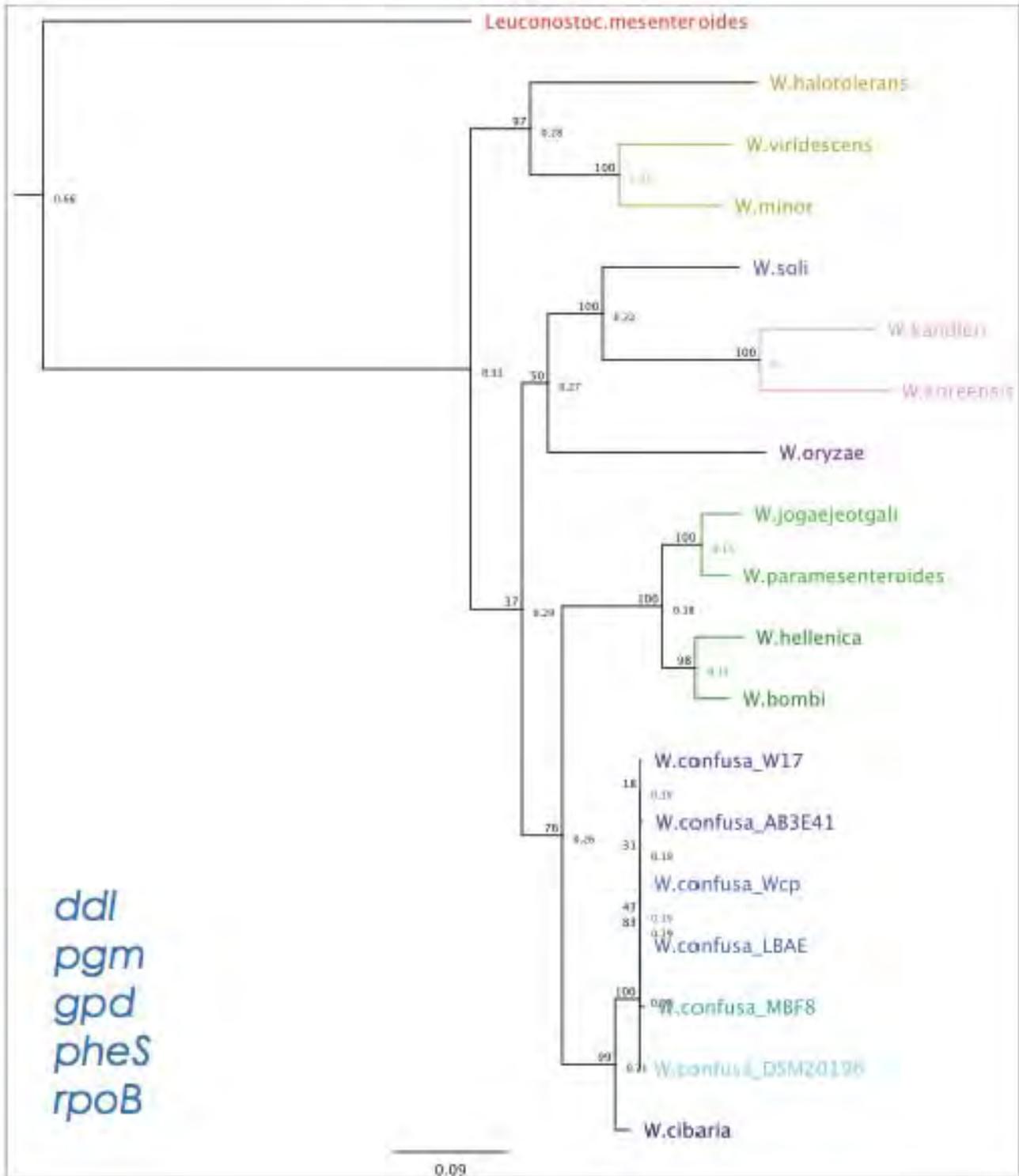


Figura 18. Ubicación de las dos cepas de *Weissella* aisladas de pozol WcL17 y Wcp, dentro de un árbol filogenético de máxima verosimilitud construido con secuencias de genes únicos (“housekeeping”) de especies representativas de *Weissella*.

Por otra parte, con la filogenia construida a partir de los marcadores *housekeeping* se esperaba encontrar diferencias puntuales que mostraran con claridad la separación de las cepas de *W. confusa* y pusieran en evidencia que, aunque son de la misma especie, se trata de dos cepas diferentes. Sin embargo, no fue posible establecer dichas diferencias con este tipo de análisis, por lo que se realizó un análisis de promedio de identidad de nucleótidos (ANI por sus siglas en inglés), con la finalidad de posicionar los genomas de las cepas Wcp-3a y Wcl17 dentro del género *Weissella* y de discernir diferencias entre las cepas secuenciadas a nivel de genoma completo (Figura 19).

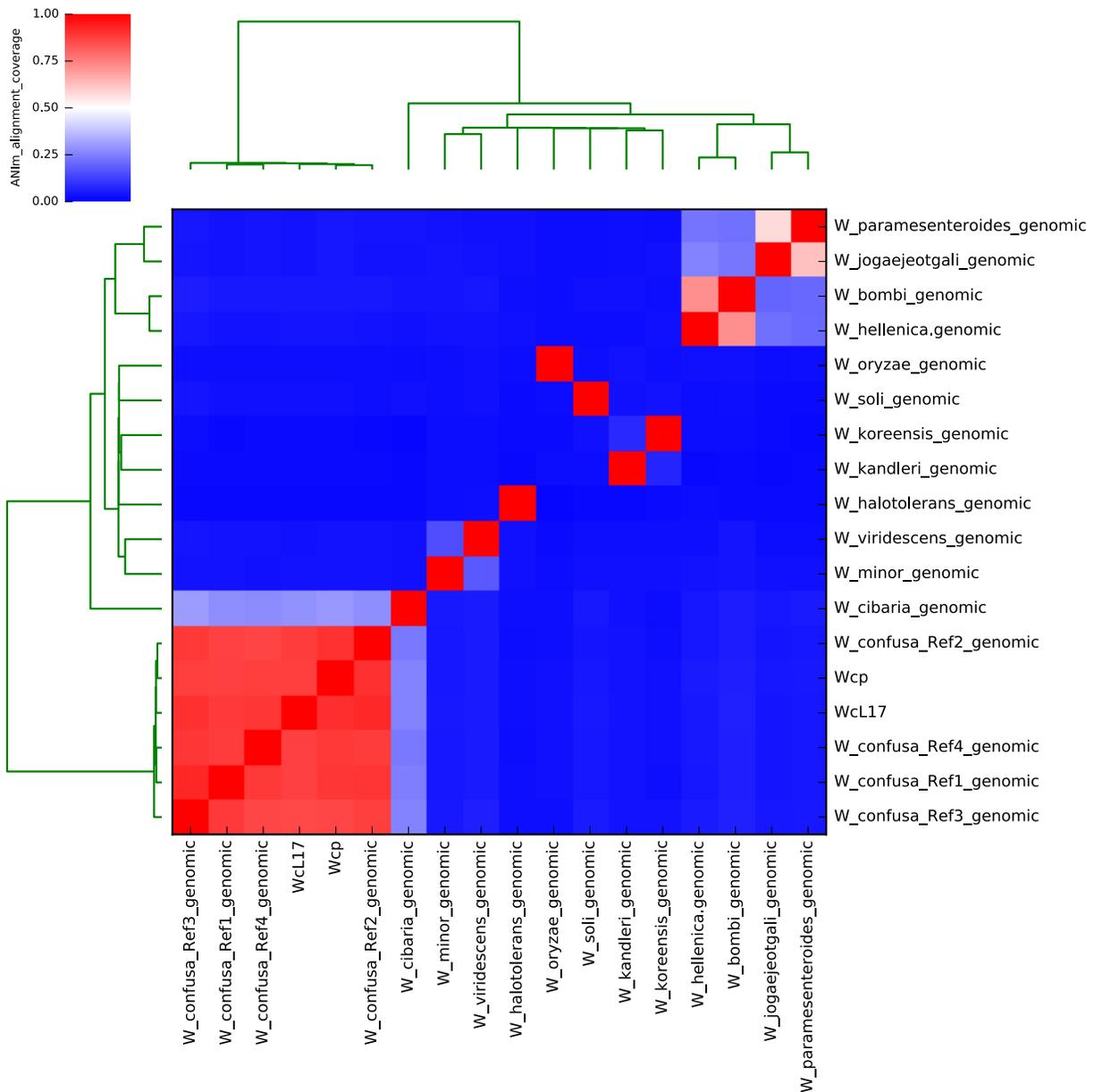


Figura 19. Análisis basado en el promedio de identidad de nucleótidos (por sus siglas en inglés ANI).

Análisis de identidad de nucleótidos del genoma de WcL17, Wcp y todos los genomas representativos de especies de *Weissella* hasta el momento reportados.

Los análisis de ANIm son una aproximación bioinformática a las técnicas de hibridación DNA-DNA (DDH, por sus siglas en inglés) para hacer asignaciones taxonómicas. Siempre que los valores de ANI entre genomas sean mayores a 96% se pueden considerar miembros de la misma especie (Richter y Rosselló, 2009). Este tipo de análisis se ha convertido en una herramienta ampliamente utilizada como patrón de oro de próxima generación para la delimitación de especies bacterianas sustituyendo a las técnicas de DDH (Kim *et al.*, 2014).

El mapa de calor que se muestra en la Figura 19 representa las asignaciones taxonómicas de especies de *Weissella*. Se observa una fuerte cercanía de *Weissella cibaria* con el grupo de genomas de *Weissella confusa*. De hecho, el porcentaje ANIm fue de entre 86.90% y 87.78% respecto al grupo. De esta forma puede explicarse la identidad que mostraba el marcador 16S de los genomas secuenciados con el par *cibaria/confusa*. Por otra parte, dentro del grupo formado por los genomas de *Weissella confusa* se reveló un valor ANIm que oscila entre 97.72% y 98.57% mientras que entre WcL17 y Wcp-3a el porcentaje fue 97.93. Estos valores refuerzan los resultados obtenidos con las filogenias mostradas en las Figuras 17 y 18, donde se ubica a las cepas secuenciadas dentro de la especie *W. confusa*. Finalmente, el valor obtenido de ANIm entre WcL17 y Wcp-3a pone de manifiesto que se trata de cepas diferentes.

### 6.2.6 Búsqueda de genes codificantes

Una vez resuelta la asignación taxonómica de los genomas de WcL17 y Wcp-3a y, con el fin de evaluar las cepas con respecto al tema central de este proyecto, es decir su capacidad genómica para degradar carbohidratos, se realizó un análisis de genoma completo contra la base de datos de enzimas activas sobre carbohidratos (CAZy). Esta base de datos deriva de la base de datos de dominios conservados de la misma plataforma, pero con un archivo construido con modelos ocultos de Markov (por sus siglas en inglés HMM) para representar la firma de cada una de las 308 familias CAZyme. Estas familias están divididas en 5 grupos: glicosil hidrolasas (GH), esterasas de carbohidratos (CE), liasas de polisacáridos (PLS), módulos de unión a carbohidratos (CBM) y glicosiltransferasas (GT) (Yin *et al.*, 2012).

Con esta poderosa base de datos, es factible realizar una búsqueda de dominios conservados en genomas y metagenomas completos, para poder hacer una inferencia del potencial de las bacterias para degradar carbohidratos complejos. Como resultado de este análisis, en la Figura 20 se muestra el potencial génico para degradar carbohidratos de las dos cepas seleccionadas en este trabajo comparado con el potencial total del género definido a partir de los genomas de referencia descritos en la Tabla 5.

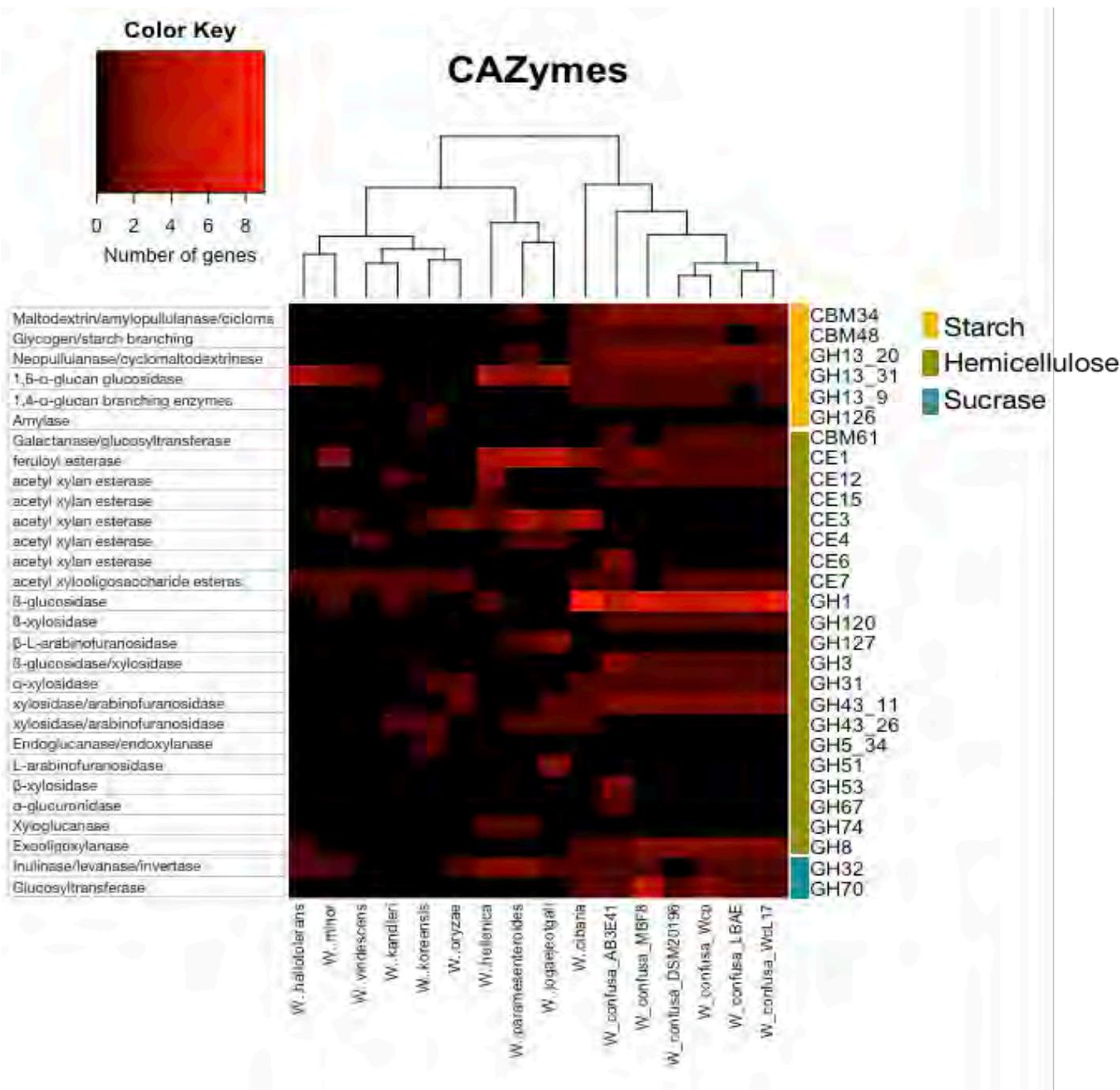


Figura 20. Perfil del potencial del género *Weisella* para degradar carbohidratos complejos y en particular, el de las dos cepas seleccionadas en este trabajo: Wcl17 y Wcp. Elaborado con base en la información obtenida del genoma de las cepas hasta ahora secuenciadas y la base de datos CAZY.

En la Figura 20, el número de genes de cada familia CAZY en cada genoma está representado por la intensidad de color como se muestra en la clave de color (color key). El color negro indica ausencia génica mientras que el rojo más intenso indica la presencia de un máximo de 9 genes. Así, la intensidad intermedia de rojos indica un menor número de genes proporcionalmente menor a 9. Las familias CAZY agrupadas en la banda de color

amarillo indican el grupo de familias que actúan sobre almidón, mientras que las que están agrupadas en la banda verde actúan sobre hemicelulosa y celulosa. Finalmente, las que actúan sobre sacarosa se indican con la banda azul.

En el mapa de calor puede observarse que el grupo de las cepas de *W. confusa* y *W. cibaria* poseen una batería de genes CAZy más abundante que el resto de las especies. El mayor número de genes los contienen las cepas MBF8 y AB3E41 con 29, WcL17 con 27, Wcp y *W. cibaria* con 26, DSM20196 y LBAE con 24; mientras que los genomas que menor cantidad de genes CAZy poseen son *W. kandleri* y *W. viridescens* con 4 y 3 respectivamente. Esta diferencia puede explicarse debido a la fuente de aislamiento, pues como se muestra en las Tablas 4 y 5, las especies *W. kandleri* y *W. viridescens* se han aislado mayoritariamente de productos cárnicos (Fusco *et al.*, 2015). Por lo que al no ser una fuente rica en carbohidratos complejos no es un medio en el que las cepas hubieron podido evolucionar para poder actuar sobre carbohidratos para su supervivencia.

Otro aspecto que destaca es la cantidad de CAZymes que actúan sobre hemicelulosa, en donde nuevamente el par *W. confusa/cibaria* posee el mayor número. *W. cibaria* y *W. confusa* AB3E41 contienen 19, WcL17 y MBF8 contienen 17, LBAE contiene 16, Wcp y DSM20196 contienen 15. Sin embargo, otras especies también poseen un número considerable de genes que actúan sobre este sustrato, tal es el caso de *W. jogaejeotgali*, *W. paramesenteroides* y *W. hellenica* que contienen 14, 11 y 9 respectivamente. Mientras que el resto de las especies poseen entre 5 y 2 genes. Nuevamente, lo anterior puede relacionarse con la fuente de aislamiento, ya que las especies que muestran un mayor contenido de estos genes han sido aisladas en su mayoría de alimentos fermentados a base de cereales y vegetales. En este sentido la hemicelulosa, al formar parte de la estructura de la pared celular de estos alimentos, puede ser una fuente de carbono importante para el desarrollo bacteriano que requiere de una amplia diversidad de actividades. Ante la existencia de una amplia batería de CAZymes que actúan sobre este sustrato, es muy probable que el papel funcional de estas especies esté relacionado con la degradación de la hemicelulosa presente en los alimentos fermentados a base de cereales y vegetales.

Por otra parte, la familia GH32 que actúa sobre sacarosa está presente en casi todas las especies, con la excepción de *W. viridescens*, *W. kandleri* y *W. koreensis* mientras que GH70 sólo se encuentra en el par *W. confusa/cibaria* siendo MBF8 y Wcp-3a las cepas que mayor contenido génico de esta familia poseen. No es de extrañar que esta familia se encuentre en las especies mencionadas, los reportes existentes de glucosiltransferasas del género *Weissella* se han atribuido a ellas.

Un hecho interesante son las familias que actúan sobre almidón o sus derivados, en las que el grupo de *W. confusa* está posicionado a nivel intermedio de acuerdo con el contenido de genes de familias que actúan sobre

este sustrato, que corresponde a contar con 1 o 2 genes para cada familia, mientras que las de nivel superior correspondería a el mayor número, es decir, 3 genes. Si bien, en este sustrato el grupo de las cepas secuenciadas en este trabajo no sobresalen, si es destacable el hecho de la existencia de estos genes en los genomas de *W. confusa* ya que, como se había mencionado anteriormente, no hay reportes de actividad amilolítica en esta especie y en las pruebas API que reportan López-Hernández y col. (2018) no se encontró capacidad para degradar almidón. Esto sugiere revisar con más detalle experimental la capacidad de las cepas seleccionadas en particular, y las cinco analizadas en general, para afirmar o descartar la capacidad para degradar almidón y/o sus derivados.

En lo que al pozol respecta, los análisis CAZymes del metagenoma del pozol realizado por López-Sánchez (en proceso), sugieren que a nivel del metagenoma completo analizado a diversos tiempos de fermentación, hay genes con potencial de ser activos sobre almidón, hemicelulosa, sacarosa y otros azúcares. De manera particular, los genomas de WcL17 y Wcp-3a contienen el 25% de las familias que se encontraron en el metagenoma del pozol, lo que sugiere el posible papel que las cepas están teniendo en la masa de maíz nixtamalizado a través de las CAZymes detectadas.

Si bien, el gran número de CAZymes detectadas en los genomas de WcL17 y Wcp-3a es interesante, las actividades enzimáticas evaluadas en este trabajo se centraron a enzimas xilanolíticas, xilosídicas y glucosiltransferasas. En este sentido, la Figura 21 muestra el número de genes encontrados en los genomas de las cepas secuenciadas, así como una descripción gráfica de su función.

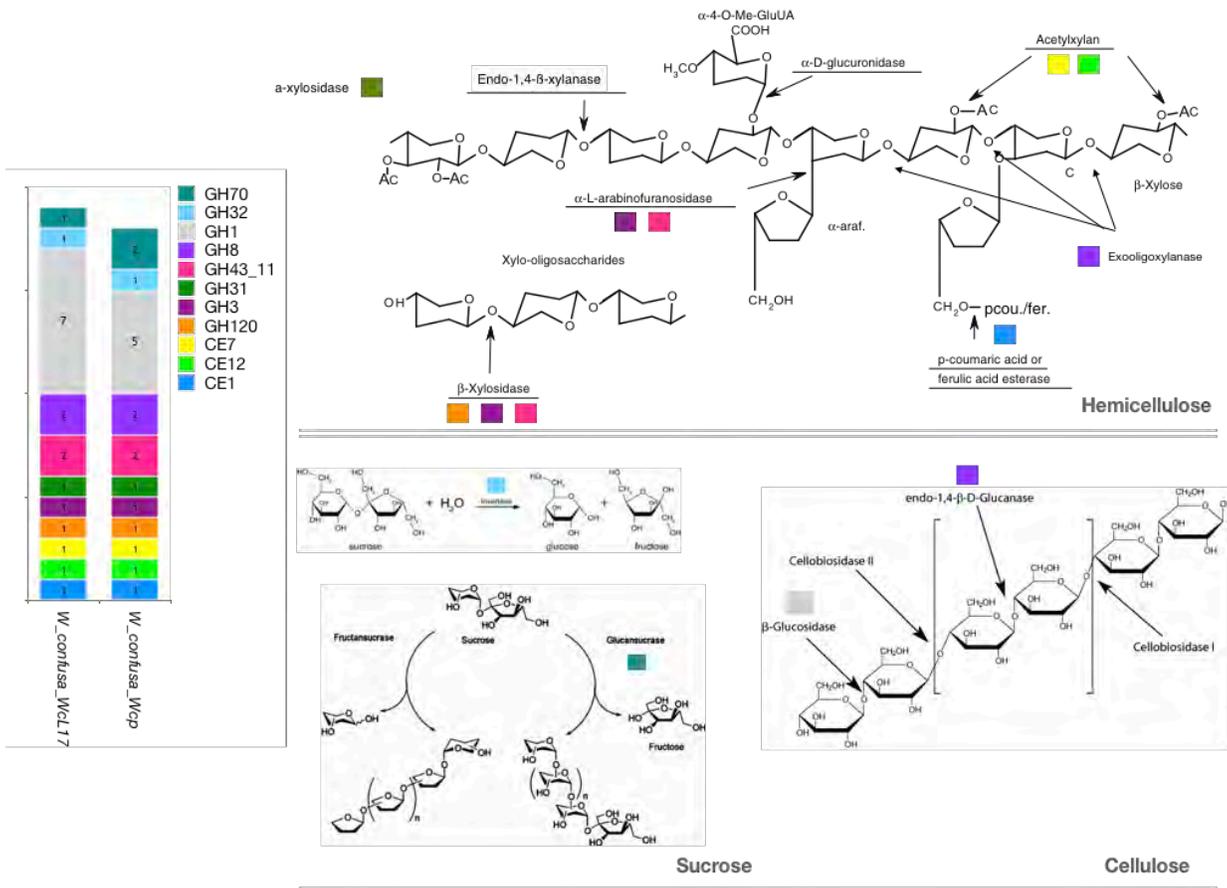


Figura 21. Resumen del número de genes que corresponden a CAZymes dentro de las cepas de *Weissella* WcL17 y Wcp-3a, así como un esquema de su probable función.

Se observa en esta Figura que el grupo de enzimas que se requiere para degradar la hemicelulosa está casi completo, con excepción de la enzima más importante de este tipo para una eficiente acción: la endo-1,4- $\beta$ -xilanasa. Por otra parte, se observa la presencia de la exo-oligoxilanasa (GH8) que tiene la capacidad de generar oligosacáridos de hasta tres moléculas de xilosa a partir de xilano soluble. Sin embargo, esta actividad no se observó en los cultivos en los que las 5 cepas se crecieron en xilano como única fuente de carbono. Una fuerte posibilidad, es el que la actividad depende de la fuente de xilano, ya que el empleado (xilano de abedul) tiene una estructura de diferente naturaleza al que se encuentra en el maíz.

La presencia de un gran número de genes con actividad  $\beta$ -xilosidasa explica el comportamiento que mostraron las cepas evaluadas en el crecimiento sobre xilooligosacáridos que, si bien no fue significativo, si mostró capacidad de degradación sobre este sustrato.

Una actividad enzimática a la cual no se le había prestado atención es la  $\beta$ -glucosidasa (GH1), que permite a la bacteria crecer en celulosa, sustrato que también forma parte de la pared celular de los granos de maíz. Aunada a esta familia, se observa una GH8 anotada en el genoma como endo-glucanasa, que podría actuar en conjunto

con la  $\beta$ -glucosidasa para complementar el complejo enzimático requerido para degradar completamente la celulosa.

En el caso de que estos genes sean funcionales, se podría sugerir que WcL17 y Wcp-3a requieren de otros microorganismos que posean estas actividades enzimáticas complementarias, particularmente la endo-xilanas, para actuar de forma sinérgica en el consorcio microbiano que el pozol representa.

La presencia de las enzimas invertasa (GH32) y glicosiltransferasa (GH70) explican la fácil asimilación de este sustrato que se constató en los experimentos descritos en el apartado 6.1.4. También demuestra que la diferencia en el comportamiento observado con la cepa Wcp-3a con respecto a WcL17 en cuanto a un mayor crecimiento y actividad enzimática, probablemente se deba a que la primera posee un gen extra de la familia GH70.

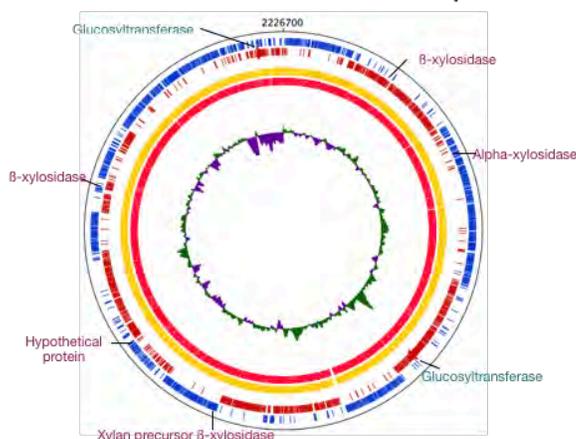
Si bien, la Figura 21 da un panorama amplio de la capacidad a nivel genómico que tienen las cepas secuenciadas, para degradar los sustratos evaluados en este trabajo, es importante recordar que en concordancia con los resultados obtenidos en las fermentaciones descritas en el apartado 6.1, se seleccionó a la cepa Wcp-3a por su actividad glicosiltransferasa y a la cepa WcL17 por su actividad  $\beta$ -xilosidasa. Por tal motivo nos centramos en seleccionar un gen codificante para cada una de las actividades mencionadas en su respectivo genoma.

## **6.3 Selección de genes**

### **6.3.1 Selección de Glucosiltransferasa**

Atendiendo al objetivo tres de este trabajo, se analizaron los genes codificantes para glicosiltransferasa en el genoma de Wcp-3a, el cual fue secuenciado debido a la actividad enzimática mostrada. Se analizó la región intergénica de cada gen río arriba del codón de inicio, para buscar posibles promotores que dieran un indicio de posible funcionalidad de ambos genes, explorando la secuencia con el software en línea BPRM de Softberry (Soloviev y Salamov, 2011). En sintonía con la verificación de función a nivel de secuencia, se realizó una búsqueda de motivos conservados característicos de la familia GH70, los cuales fueron realizados mediante un alineamiento de secuencias aminoacídicas basado en ClustalW pero hecho con Geneious v11 (Figura 22).

### A) *Weissella confusa* Wcp



### B)

Posibles regiones promotoras y asignación funcional de genes codificantes para Glucosiltransferasas de Wcp

Gen	Identificador	Región promotora		Familia CAZy	Tamaño del gen (pb)	Tamaño de la proteína (kDa)
		-10	-35			
Glucosyltransferase -SI precursor	Wcp_00664	Tttaaaaat	Ttgttt	GH70	4239	155.8
Glucosyltransferase -SI precursor	Wcp_02205	P(1392) Ttttagtat P(321) gttcataat P(768) gtgtattat	P(1372) tttatt P(300) ttgtaa P(743) ttgacg	GH70	4980	182.2

### C)



Figura 22. Genes codificantes para glucosiltransferasas y análisis de su secuencia.

A) Genes codificantes para glucosiltransferasa en Wcp-3a. B) Características generales de las secuencias y posibles regiones promotoras. C) Alineamiento de las secuencias e identificación de motivos conservados.

En la Figura 22-A se muestra una representación del genoma completo de Wcp-3a: los anillos exteriores representan la cadena sentido (azul) y anti-sentido (rojo) del cromosoma, los anillos intermedios representan el número de contigs del ensamble y el anillo central representa el contenido de GC. Los genes de interés en este trabajo se encuentran marcados de acuerdo con su posición en el genoma. Se observa que esta cepa posee dos genes codificantes para glucosiltransferasa mientras que la cepa WcL17 posee sólo uno. Esta diferencia podría explicar el comportamiento de ambas cepas en presencia de sacarosa, donde Wcp-3a destacó notablemente en comparación con WcL17 (sección 6.1.4). En la Figura 22-B se indican las características generales de las secuencias codificantes. El software BPROM de Softberry encontró una posible región promotora río arriba del codón de inicio del gen Wcp\_00664 y dos río arriba del codón de inicio del gen Wcp\_02205. Ambos genes corresponden a la familia GH70 de CAZy, familia que codifica para enzimas glucosiltransferasas, que se ha reportado pueden ser del tipo dextransacarasas, alternansacarasas, reuteransacarasas o  $\alpha$ -4,6-glucanotransferasas, dependiendo de la estructura del glucano sintetizado, su tamaño y su grado de ramificación (Cantarel *et al.*, 2008). A pesar de codificar para el mismo tipo de actividad, se observa también que la longitud de su secuencia difiere y por ende el peso molecular de la enzima que codifica. En la Figura 25-C se muestra el alineamiento de las secuencias y en este la identificación de los motivos conservados, los cuales se encuentran distribuidos dentro del dominio A de la secuencia, que codifica para el dominio catalítico de proteínas pertenecientes a esta familia. Dentro del motivo II se encuentra el residuo

nucleófilico y el catalizador ácido/base en el motivo III, mientras que el residuo estabilizador del estado de transición se encuentra en el motivo IV. El residuo dentro del motivo 1 que corresponde al subsitio -1 y el subsitio +1 también se localiza en el motivo II (Moulis *et al.*, 2006).

Si bien, los análisis *in silico*, permiten dar una idea de la función que estos genes pueden poseer, no son suficientes para poder seleccionar un gen para cada especificidad, con el fin poder estudiarlo. Por este motivo una estrategia de selección fue realizar zimogramas de actividad como se describe en la sección 5.4.1, con la finalidad de observar las bandas que presentaran actividad enzimática y poder diferenciarlas de otras proteínas sin actividad. En la Figura 23 se muestra el zimograma que muestra la actividad glicosiltransferasa de las proteínas producidas por Wcp-3a.

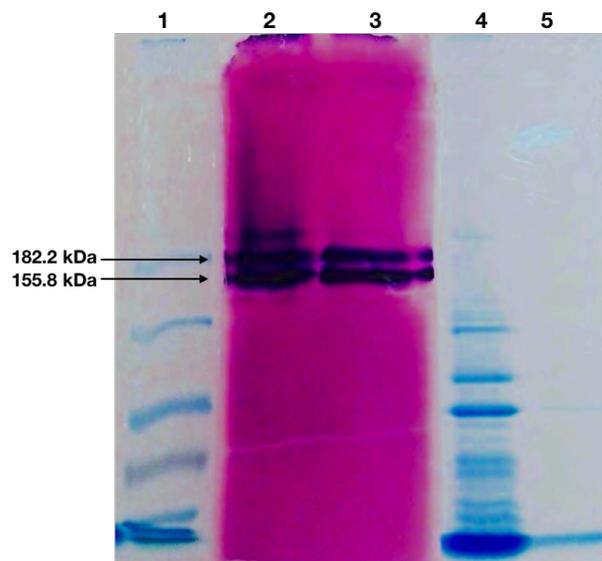


Figura 23. Zimograma de actividad glicosiltransferasa de proteínas asociadas a las células y al sobrenadante de un cultivo de la cepa de *Weissella confusa* Wcp. El color morado indica el zimograma de actividad y el color azul indica la tinción con comasie. Carril 1) Marcador de peso molecular. Carril 2) células. Carril 3) Sobrenadante. Carril 4) Células. Carril 5) Sobrenadante.

La información que aporta la Figura 23 confirma la función de los genes evaluados, en donde las bandas moradas indican la formación de polímero sobre sacarosa. En el fragmento del gel, en el que las proteínas fueron teñidas no es evidente (visible) la presencia de las proteínas que corresponden a las buscadas, pero el zimograma permite fácilmente confirmar que estas enzimas no sólo están presentes en las células y en el sobrenadante, sino que son activas y por ende funcionales.

Al mostrarse activas las dos glucosiltransferasas codificadas en el genoma de Wcp-3a, tampoco en este caso fue posible tener un criterio de selección de una sola proteína a caracterizar. Por lo tanto, se realizó un BLAST en la

base de datos UniProt, con la finalidad de tener una idea de la similitud que las secuencias encontradas en la cepa Wcp con otros genes ya caracterizados. La Tabla 9 muestra los resultados.

Tabla 9. Porcentaje de identidad de glucosiltransferasas de Wcp-3a con glucosiltransferasas de organismos ya caracterizados

Gen consulta	Organismos compatibles	Identidad	DOI
Wcp_00664	<i>Weissella confusa</i>	99.2%	<a href="https://doi.org/10.1007/s00253-012-4447-8">https://doi.org/10.1007/s00253-012-4447-8</a>
	<i>Weissella cibaria</i>	99.0%	<a href="https://doi.org/10.1080/10826068.2012.737400">https://doi.org/10.1080/10826068.2012.737400</a>
	<i>Weissella confusa/cibaria</i>	98.7%	<a href="https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.02067.x">https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.02067.x</a>
Wcp_02205	<i>Lactobacillus curvatus</i>	85.9%	<a href="https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02281">https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02281</a>
	<i>Lactobacillus sakei</i>	93.5%	<a href="https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.11.002">https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.11.002</a>
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	54.9%	<a href="https://doi.org/10.1007/s10529-008-9711-8">https://doi.org/10.1007/s10529-008-9711-8</a>

En dicha Tabla, puede constatarse que el gen Wcp\_00664 mostró amplia identidad con genes caracterizados provenientes de cepas del mismo género, incluso de la misma especie. Sin embargo, llama la atención el gen Wcp\_02205 que no mostró identidad con ningún gen proveniente de cepas del mismo género, sino que las similitudes más altas fueron con genes de organismos de diferente género y especie, aunque de la misma clase y familia como el caso de *Leuconostoc mesenteroides*. Estas evidencias nos hicieron optar por este último gen para llevar a cabo la caracterización, dado que una secuencia similar no ha sido encontrada y caracterizada hasta ahora en alguna cepa del género *Weissella*.

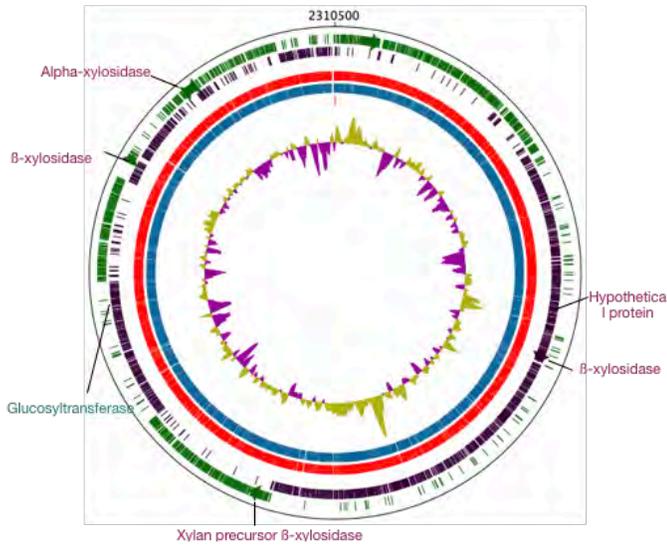
### 6.3.2 Selección de $\beta$ -xilosidasa

Para el caso de la selección de un gen codificante para  $\beta$ -xilosidasa, que se encuentre en el genoma de WcL17, se siguió la misma estrategia explicada en el apartado 6.3.1, con excepción de la búsqueda de motivos conservados (Figura 24).

En la Figura 24-A se puede observar una representación del genoma completo de WcL17: los anillos exteriores representan la cadena sentido (verde) y anti sentido (morado) del cromosoma, los anillos intermedios representan el número de contigs del ensamble y el anillo central representa el contenido de GC. Los genes de interés en este trabajo se encuentran marcados de acuerdo a su posición en el genoma. Se observa que esta cepa posee 5 genes codificantes para actividades xilosídicas, 1 para una  $\alpha$ -xilosidasa, 3 para  $\beta$ -xilosidasa y 1 gen

anotado como hypothetical protein, pero que de acuerdo con los análisis de CAZy posee el dominio característico de la familia GH120, correspondiente a  $\beta$ -xilosidasas. Es de destacar que la cepa Wcp-3a contiene el mismo número y tipo de genes codificantes para este tipo de actividad (Figura 22-A), resultado que puede dar un indicio del probable papel xilósido que estas cepas poseen y que están sometidas a una presión de selección que les permite habitar en este tipo de ambientes.

**A)** *Weissella confusa* WcL17



**B)**

Gen	Identificador	Región promotora		Familia/EC	Tamaño del gen (pb)	Tamaño de la proteína (kDa)
		-10	-35			
Hypotetial protein	WcL17_00623	ccatatact	tttcgg	GH120	1923	72.43
Xylan 1,4-beta-xylosidase	WcL17_01258	tgtaaaag	ttgaaa	GH3		78.16
Beta-xylosidase	WcL17_01909	tgttattat	ttgcgt	GH43_11		61.61
Beta-xylosidase	WcL17_00725	ggttaaaaa	TTGACA	GH43_11		63.73
Alpha-xylosidase	WcL17_02040	ttaattat	ttcggct	GH31		79.98

Figura 24. Genes codificantes para  $\beta$ -xilosidasa y análisis de su secuencia.

A) Genes codificantes para  $\beta$ -xilosidasa en WcL17. B) Características generales de las secuencias y posibles regiones promotoras.

En la Figura 24-B se indican las características generales de las secuencias codificantes. El software BPROM de Softberry permitió encontrar una posible región con potencial de ser reconocidos por la RNA polimerasa para su transcripción, por lo que se concluye que pueden ser activos. En la Figura se reporta también la asignación dentro de las familias de glicosil hidrolasas (GH) propuestas por Cantarel *et al.*, 2008. Tales asignaciones corresponden a las familias GH120, GH3, GH43 y GH31, todas ellas encargadas de despolimerizar cadenas de xilooligosacáridos.

Teniendo claras las características generales de los genes analizados, se realizó un zimograma de actividad  $\beta$ -xilosidasa, que permitiera seleccionar un gen que mostrara actividad bajo las condiciones de ensayo (Figura 25).

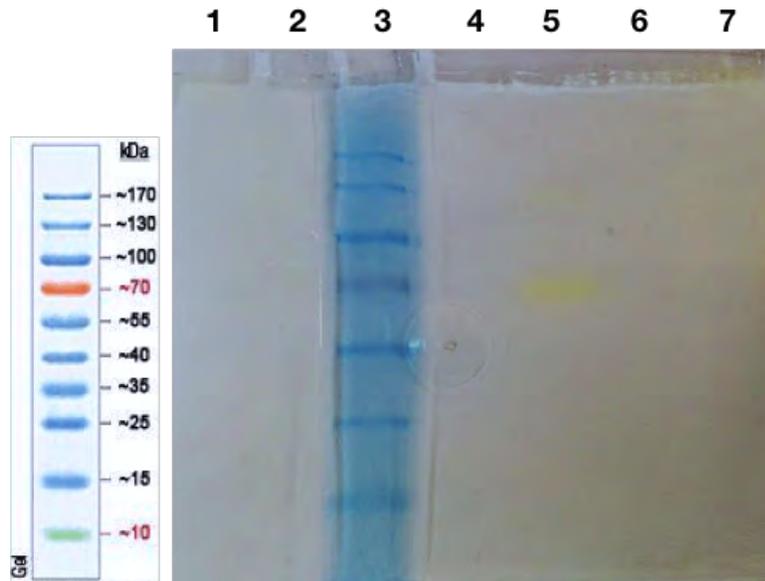


Figura 25. Zimograma de actividad  $\beta$ -xilosidasa de proteínas asociadas a las células o del sobrenadante de cultivos de la cepa WcL17.

En los carriles: 1) Células completas. 2) Sobrenadante. 3) Marcador de peso molecular 10-170 kDa. 4) Fracción celular de lisis con urea. 5) Fracción soluble de lisis con urea. 6) Fracción soluble de lisis con lisozima. 7) Fracción celular de lisis con lisozima.

La actividad  $\beta$ -xilosidasa, es visible con bandas de color amarillo por la liberación de p-nitrofenol, tal y como se describe en la sección 5.4.1. Como puede observarse en la Figura 25, el carril correspondiente a las células completas (1) muestra una ligera coloración amarilla en el borde del gel, mientras que el carril donde se cargó sobrenadante de la fermentación (2), no se observa ninguna coloración. Estos hechos indican que las enzimas con actividad sobre XOS, no fueron desnaturalizadas lo suficiente para poder migrar en el gel y que evidentemente son intracelulares, lo cual fue corroborado por la ausencia de péptido señal (datos no mostrados). En los carriles 4 y 6, correspondientes a fracción celular de lisis con urea y a fracción soluble de lisis con lisozima respectivamente, no se observa ninguna banda con coloración amarilla, mientras que en el carril 7 con fracción celular de lisis con lisozima se observa el mismo fenómeno que en el carril 1, lo cual indica que la lisis celular con lisozima no es suficiente para extraer este tipo de enzimas del espacio intracelular de WcL17. Contrario a los carriles recién descritos, en el carril 5 puede observarse una banda bien definida que está posicionada muy cerca de la banda correspondiente a 70 kDa del marcador de peso molecular. Con estos resultados y con base a los datos mostrados en la Figura 27-B se tenían dos opciones: que el gen que mostró ser activo bajo las condiciones ensayadas correspondiera a una GH120 o a una GH3. Por lo anterior, se realizó un BLAST en la base de datos UNIPROT en el que la secuencia aminoacídica de GH120 no mostró homología

para ninguna  $\beta$ -xilosidasa descrita. Por lo antes expuesto, se seleccionó el gen WcL17\_01258 (GH3) para su caracterización.

Es necesario mencionar, que todos los ensayos de actividad xilosidasa descritos en la sección 6.1.3.2 fueron realizados solo con el sobrenadante de fermentación. En ellos pudo observarse degradación de XOS, lo que pudo deberse a la recuperación de una mínima cantidad de este tipo de enzimas al tiempo que se centrifuga y se recupera el sobrenadante. Bajo esta premisa, es posible que la capacidad de degradación de XOS por WcL17, haya sido subestimada al trabajar con una muy baja concentración de enzima.

#### 6.4 Expresión de enzimas glucosiltransferasa y $\beta$ -xilosidasa

Los resultados anteriores permitieron seleccionar dos genes codificantes para las actividades enzimáticas de interés. Las enzimas para las que codifican fueron expresadas para después ser evaluadas sobre masa de maíz nixtamalizado para pozol, determinando el efecto que tienen sobre dicho sustrato. Esto permitirá corroborar si las actividades enzimáticas evaluadas en este trabajo tienen injerencia en la fermentación de pozol, y por ende, permitirá contribuir a describir el papel que *Weissella* tiene en la elaboración de esta bebida tradicional mexicana.

##### 6.4.1 Expresión del gen Dsr\_Wcp\_02205

Mediante el diseño de oligonucleótidos específicos se logró amplificar el gen Dsr\_Wcp\_02205, codificante para una glucosiltransferasa. La Figura 26 muestra un gel de electroforesis en donde se aprecia el fragmento de amplificación correspondiente.

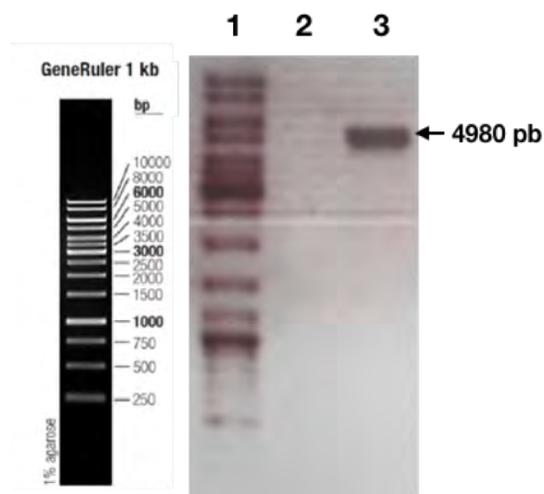


Figura 26. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la amplificación del gen Dsr\_Wcp\_02205. En los carriles: 1) Marcador de peso molecular de 250-10000 pb. 2) Control negativo. 3) Dsr\_Wcp\_02205

El producto de amplificación se logró clonar en el vector pJET1.2 dando como resultado la construcción pJET-Dsr\_Wcp\_02205. Al momento de la subclonación en pET22b(+) no se logró recuperar una concentración suficiente del inserto, por lo que se decidió clonar directamente el producto de amplificación en el vector de expresión pET22b(+). Los resultados se muestran en la Figura 27.

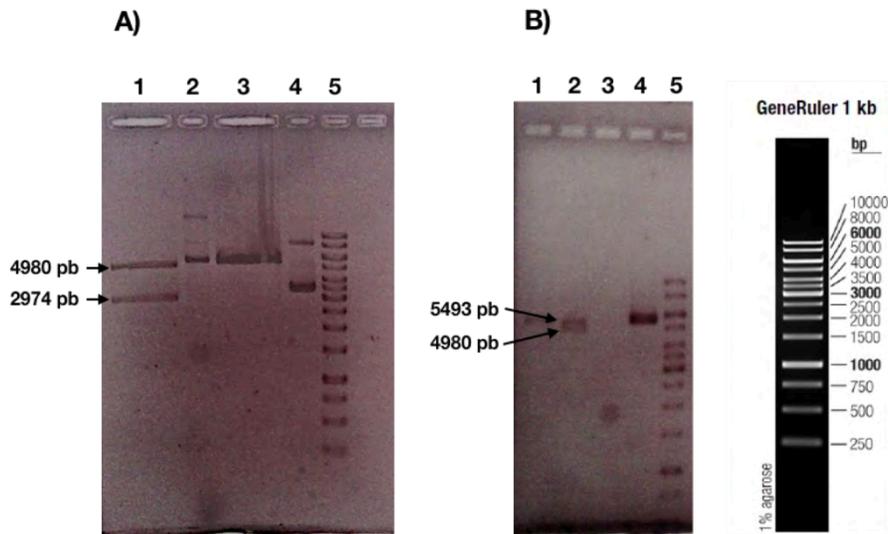


Figura 27. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de las construcciones digeridas por enzimas de restricción. En A) Carriles: 1. Digestión de pJET-Dsr\_Wcp\_02205, 2. Construcción pJET-Dsr\_Wcp\_02205 sin digerir, 3. Digestión de vector pET22b(+) vacío y 4. Vector pET22b(+) vacío sin digerir. En B) Carriles: 1. Digestión de vector pET22 vacío, 2. Digestión de pET22-Dsr\_Wcp\_02205, 3. Carril vacío, 4. Construcción pET22-Dsr\_Wcp\_02205 sin digerir. En ambos casos el carril 5 muestra el marcador de peso molecular de 250-10000 pb.

Para corroborar que la digestión de la construcción pET22-Dsr\_Wcp\_02205, mostrada en la Figura 27-B carril 2, correspondía al gen Wcp\_02205, la banda se envió para su secuenciación a la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Las secuencias entregadas se utilizaron para hacer un BLAST entre ellas y la secuencia nucleotídica correspondiente a Wcp\_02205. Los nucleótidos de los extremos 5' y 3' de la secuencia del inserto en el vector, correspondieron 99% con los extremos del gen Dsr\_Wcp\_02205, según los datos de secuenciación.

Una vez comprobada la construcción pET22-Dsr\_Wcp\_02205 se transformaron células competentes de *E. coli* BL21-DE3, mismas que fueron incubadas con 0.2 y 1 mM de IPTG para expresar la enzima codificante en el inserto del vector y al mismo tiempo evaluar la influencia de la concentración del inductor. El nivel de expresión fue evaluado por medición de la actividad cuantificando azúcares reductores y por un zimograma de actividad. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 28. En A carriles 1 y 2 puede apreciarse la banda correspondiente a la proteína expresada (~180 kDa), aunque no se observa una sobreexpresión de esta respecto a todo el extracto proteico. Se corroboró su actividad en el fragmento del gel utilizado para hacer el zimograma

(Figura 28-A carriles 4 y 5) donde se puede observar la formación de polímero. La diferencia en la concentración de IPTG, no influyó en la cantidad de proteína expresada pues en ambos carriles se observa formación de polímero y los datos de cuantificación de poder reductor indicaron que en ambas inducciones se obtuvo una actividad de  $0.06 + 0.019$  U por mililitro de cultivo de la cepa recombinante.

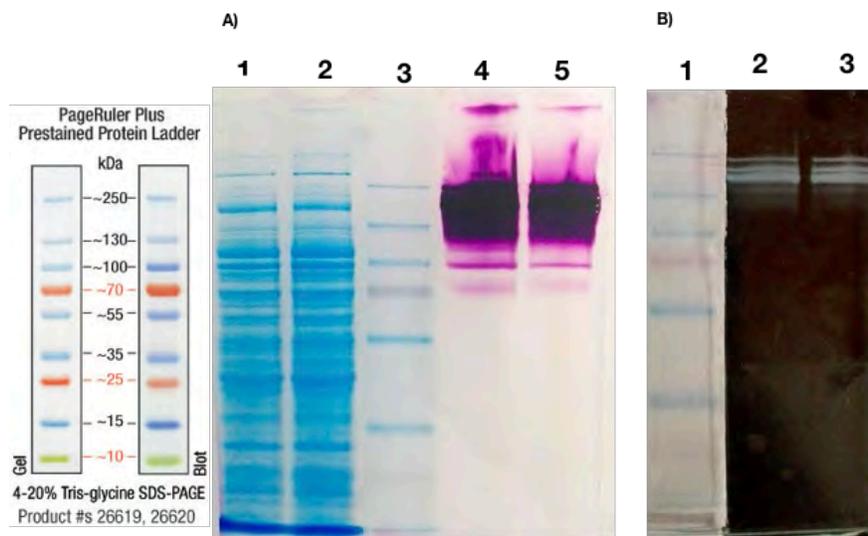


Figura 28. Expresión de la enzima glucosiltransferasa de Wcp-3a, verificada mediante SDS-PAGE y zimograma de actividad. En A) Carriles 1) Inducción con 0.2 mM de IPTG. 2) Inducción con 1 mM de IPTG. 3) Marcador de peso molecular de 10-170 kDa. 4) Zimograma de inducción con 0.2 mM de IPTG. 5) Zimograma de inducción con 1 mM de IPTG. En B) Carriles 1) Marcador de peso molecular de 10-170 kDa. 2) Zimograma de inducción con 0.2 mM de IPTG. 3) Zimograma de inducción con 1 mM de IPTG.

En la Figura 28-A carriles 4 y 5 no se puede apreciar una banda de actividad definida puesto que el reactivo de Schiff reaccionó con todo el polímero difundido en la sección correspondiente. Pero en contraste con esta falta de definición, en la Figura 28-B se puede apreciar un perfil de bandeado sin teñir, el cual es más definido. En esta, es más evidente que la enzima expresada presenta bandas derivadas de un evento auto proteolítico que no interviene en la formación de polímero. Es importante resaltar que este comportamiento ya ha sido reportado en este tipo de enzimas (Argüello *et al.*, 2005).

Con el fin de identificar el polímero que produce la enzima expresada, se realizó una reacción de la enzima con sacarosa y el producto se evaluó mediante cromatografía de alta resolución (HPLC) con una columna de permeación en gel como se menciona en la metodología. En la Figura 29-a) se observa que Wcp\_02205 produce un polímero de alto peso molecular de más de 668,000 Da., mientras que en 29-b) se observa un pico correspondiente a un peso de 8335.80 Da.

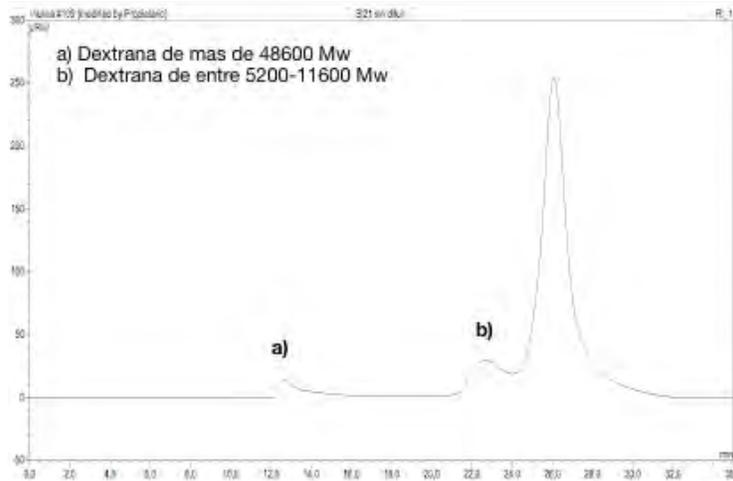


Figura 29. Análisis por GPC-HPLC de los polisacáridos sintetizados por la enzima Wcp\_02205, correspondiente a *Weissella confusa* Wcp-3a.

Por otra parte, con la finalidad de saber si el polímero sintetizado por Wcp\_02205 es una dextrana, el producto de la reacción anterior se utilizó como sustrato de una reacción en la que se agregó una enzima con actividad dextranasa, enzima capaz de romper los enlaces  $\alpha$ -1,6 entre glucosas que forman el dextrano (Figura 30).

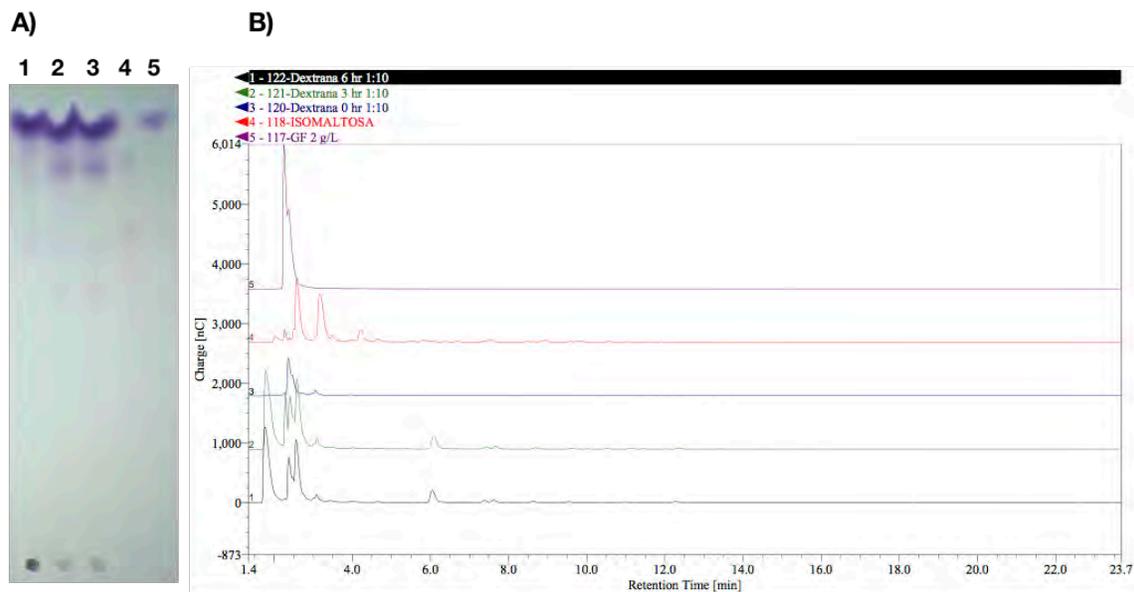


Figura 30. Productos de reacción de polímero producido por Wcp\_02205 sometido a la acción de una dextranasa. A) Placa de Cromatografía en capa fina de productos de reacción. Carriles: 1) Tiempo 0 h de reacción. 2) Tiempo 3 h de reacción. 3) Tiempo 6 h de reacción. 4) Estándar de isomaltosa e isomaltooligosacáridos. 5) Estándar de glucosa y fructosa. B) Cromatografía HPAEC-PAD de los productos de reacción y los estándares utilizados. En morado estándar de glucosa y fructosa, en rojo isomaltosa e isomaltooligosacáridos, en azul tiempo 0 de reacción, en verde tiempo 3 h de reacción y en negro tiempo 6 h de reacción

La Figura 30-A puede observarse el aumento en la intensidad del punto correspondiente a la isomaltosa, un disacárido de glucosas, y la generación de otros isomaltooligosacáridos.

En la Figura 30-B se presenta el mismo experimento, pero observado en cromatografía de intercambio aniónico (HPAEC-PAD). En esta se aprecia que el polímero sintetizado por Wcp\_02205 tras reaccionar con dextranasa, se genera isomaltosa e isomaltooligosacáridos de longitud desconocida. Se observa también una señal que no corresponde ni a glucosa ni a fructosa, por lo que se requiere de experimentos más detallados para verificar que productos se generan tras la hidrólisis del polímero en cuestión. Sin embargo, con estos resultados se pone de manifiesto que el polímero que sintetiza Wcp\_02205 es una dextrana de alto y bajo peso molecular.

#### **6.4.2 Expresión de la enzima $\beta$ -xilosidasa**

Uno de los genes codificantes para  $\beta$ -xilosidasa del genoma de WcL17, se seleccionó con el fin de caracterizar su enzima codificante y referirla a la masa de maíz nixtamalizado. Se trata del gen WcL17\_01258 que codifica para una  $\beta$ -xilosidasa (GH3), la cual mostró actividad en el zimograma realizado a partir de la lisis de células obtenidas tras una fermentación con XOS (sección 6.3.2). Para ello, mediante oligonucleótidos específicos se amplificó el gen el cual tiene una longitud de 2142 pb. Una vez aislado el gen, se clonó directamente en el vector de expresión pET22b(+), que contiene un promotor T7 que se caracteriza por ser un promotor fuerte. Contiene además una etiqueta de histidinas que se sitúa a un costado del sitio múltiple de clonación y por ende se posiciona en el extremo C terminal de la secuencia insertada. Esta etiqueta permite la purificación de la enzima expresada en un solo paso, mediante una columna de afinidad a níquel. Para corroborar que la clonación del gen WcL17\_01258 en el vector pET22b(+) fue exitosa, esta construcción se trató con las enzimas de digestión XhoI y BamHI. Estos resultados se ilustran en la Figura 31.

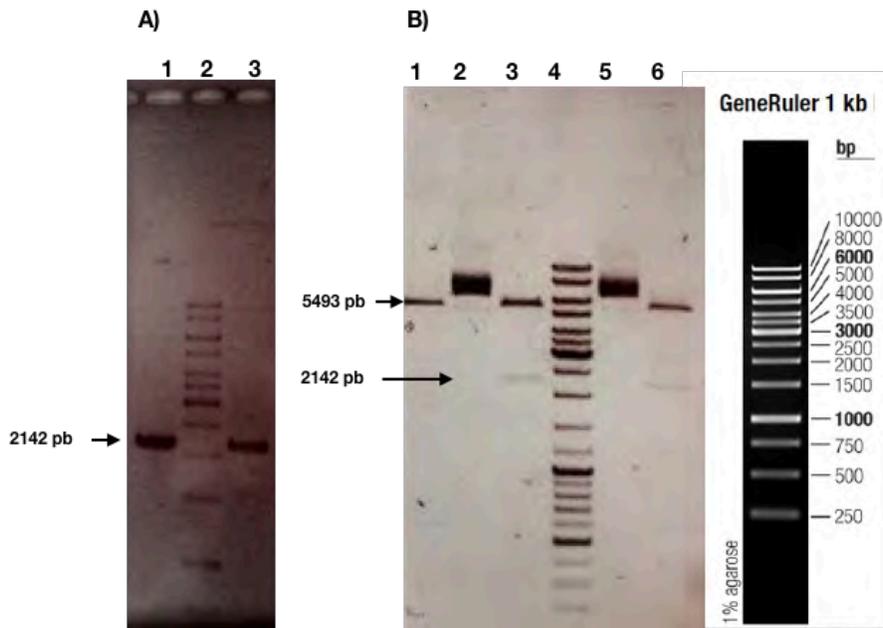


Figura 31. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de amplificación, clonación y digestión de WcL17\_01258 y pET22b(+). En A) Carriles: 1 y 3. Amplificación de WcL17\_01258, 2. Marcador de peso molecular de 1 kb. En B) Carriles: 1. Digestión de vector pET22 vacío, 2 y 5. Construcción de pET22-Bxl\_WcL17\_01258, 3 y 6. Digestión de pET22-Bxl\_WcL17\_01258, 4. Marcador de peso molecular de 1 kb.

Una vez corroborada la construcción pET22-Bxl\_WcL17\_01258, se envió a la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología de la UNAM para su secuenciación. Las secuencias entregadas se utilizaron para hacer un BLAST contra el gen WcL17\_01258, el que mostró un porcentaje de identidad de 99.7 % en los extremos 3' y 5' (Datos no mostrados).

Se llevó a cabo la expresión del gen, insertando la construcción pET22-Bxl\_WcL17\_01258 en el cromosoma de una cepa electro-competente de *E. coli* BL21. La actividad fue verificada mediante cuantificación de liberación de p-nitrofenol y mediante zimograma de actividad, tal y como se describe en la sección 5.4.1. Al observar el zimograma de actividad de esta enzima se observó un perfil de bandas que no correspondían al tamaño esperado, por lo que se realizaron tratamientos adicionales a las muestras con la finalidad de demostrar que la expresión fue exitosa. En la Figura 32 se muestran los resultados obtenidos.

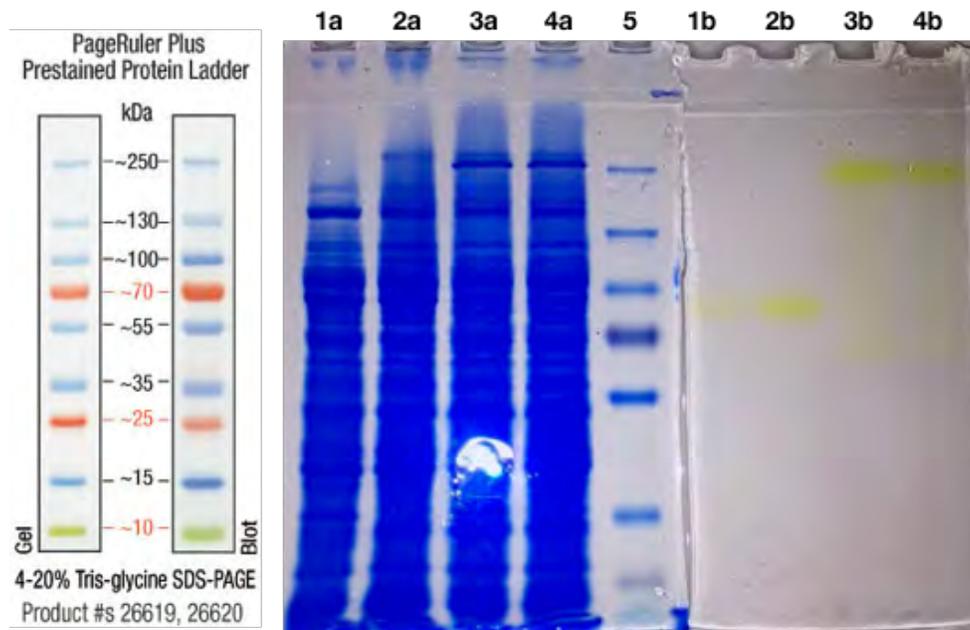


Figura 32. SDS-PAGE de pET22-Bxl\_WcL17\_01258 expresada en BL21. a) gel de proteínas teñido con azul de coomassie. b) zimograma de actividad. Carriles 1a y 1b. Muestra tratada con  $\beta$ -mercaptoetanol y urea 8 M en el buffer de carga, carriles 2a y 2b. Muestra calentada a 70 °C durante 10 min, carriles 3a y 3b. Muestra tratada con urea 8M en el buffer de carga, carriles 4a y 4b. Muestra sin ningún tratamiento adicional.

Con la Figura 32 se puede corroborar que la expresión heteróloga de Bxl\_WcL17\_01258 en BL21 fue exitosa, ya que se obtuvieron  $4.4 \pm 0.071$  U por mililitro de cultivo de la cepa recombinante. Como puede observarse, en los carriles 1a y 2a que fueron tratados con  $\beta$ -mercaptoetanol y urea, y con temperatura respectivamente, no se observa la banda de los carriles 3a y 4a. Es de destacar que la banda que se observa en el gel de coomassie, ya que se presenta en el zimograma de actividad con un peso molecular de tres veces el correspondiente al peso molecular predicho para la  $\beta$ -xilosidasa GH3 codificante a partir del gen WcL17\_01258 (78 kDa), mientras que las muestras tratadas con  $\beta$ -mercaptoetanol, urea y temperatura presentan una sola banda de actividad en el peso molecular esperado. Con estos resultados se puede inferir que, al someter la muestra a alta temperatura, esta es capaz de separar los oligómeros que conforman el multímero que parece estar formando la enzima, tal y como se muestra en los carriles 3 y 4 que no fueron sometidos a alta temperatura.

Si bien, se ha logrado expresar esta  $\beta$ -xilosidasa GH3 codificada por el genoma de WcL17, falta corroborar que, en efecto, esta sea capaz de hidrolizar xilooligosacáridos presentes en la masa de maíz nixtamalizado, generados por esta cepa o por otros microorganismos presentes en esta masa.

## 6.5 *Weissella* en la metagenómica del pozol

De manera simultánea a este trabajo y como parte del mismo proyecto, se secuenciaron genomas de muestras de pozol tomadas a las 0, 9, 24 y 48 h de fermentación mediante secuenciación de próxima generación (por sus siglas en inglés NGS) tanto de las regiones V3 y V4 del marcador 16S del rDNA como por *shotgun*. Los resultados de la secuenciación por *shotgun* no revelaron la presencia de *Weissella* spp. aunque pudieran estar presentes en las lecturas que fueron asignados al orden Lactobacillales donde no se encontró ninguna asignación taxonómica a la clase dentro de este orden. Caso contrario a lo que sucede con la asignación taxonómica de la secuenciación de las regiones V3 y V4 del 16S rDNA, donde si se reporta la presencia del género *Weissella*. En la muestra de 0 h encontraron una abundancia relativa del 0.05%, que pasó a 3.89% a las 9 h, 1.89% a las 24 h y 1.80% a las 48 h. Estos resultados sugieren que *Weissella* spp. se encuentran desde el inicio de la fermentación, llegando al nivel de mayor abundancia a las 9 h; a partir de esta hora, a medida que el tiempo de fermentación transcurre, *Weissella* va disminuyendo. Puede inferirse también que, con estos porcentajes de abundancia relativa, *Weissella* spp. no se encuentran sobre representadas y para este caso el género no es dominante (López Sánchez, en preparación).

Por otro lado, con los mismos datos metagenómicos se hizo la predicción y anotación genómica, misma que sirvió para asignar dominios de proteínas activas sobre carbohidratos (CAZy) y aunque estos análisis no permiten afirmar que los genes encontrados sean activos, se puede sugerir su presencia y probable actividad. Los resultados de este análisis sugieren entonces que la actividad hidrolítica en la masa fermentada está dominada por familias de glicosil hidrolasas (GH), carboxil esterases (CE) y módulos de unión a carbohidratos (CBM) que actúan sobre el almidón, el xilano, los xilooligosacáridos y sacarosa. A pesar de la falta de robustez en estos análisis, debido a que sólo se tomó una muestra de cada tiempo de fermentación, los resultados resultan interesantes al evidenciar la gran cantidad de GH que actúan sobre hemicelulosa y respaldan la hipótesis del papel que el género *Weissella* pudiera estar teniendo en la fermentación de la masa de maíz nixtamalizado.

## 7. Conclusiones

Las cinéticas de crecimiento y actividad sobre xilano de abedul de 5 cepas de *Weissella* aisladas del pozol no mostraron crecimiento ni actividad enzimática significativa, probablemente debido al tipo de xilano utilizado para estos ensayos.

Las cinéticas de crecimiento y actividad enzimática sobre xilooligosacáridos mostraron un mayor crecimiento respecto a las evaluadas sobre xilano de abedul. Dos de las cinco cepas crecieron más en comparación con el resto, de estas, la cepa WcL17 presentó el mayor crecimiento y una notable actividad enzimática por lo que se seleccionó esta cepa para su secuenciación y posterior caracterización genómica en términos de capacidad para metabolizar carbohidratos disponibles en el pozol.

Tres de las cinco cepas evaluadas en sacarosa mostraron mayor crecimiento y actividad enzimática sobre este sustrato, por lo que se realizaron estudios más detallados sobre estas. A pesar de que Wcp-3a no fue la cepa que presentó mayor crecimiento, si fue la que arrojó mayor actividad enzimática y en las reacciones de medición enzimática se observó una alta viscosidad. Razón por la cual se seleccionó esta cepa para su secuenciación y búsqueda de contenido genético con potencial activo sobre carbohidratos disponibles en el pozol.

Se secuenciaron, ensamblaron y anotaron los genomas de las dos cepas seleccionadas por su actividad xilosidasa (WcL17) y glicosiltransferasa (Wcp-3a). La asignación taxonómica de estas permitió agruparlas en la especie *Weissella confusa*.

Tras el análisis de los genomas de Wcp-3a y WcL17, en función de su capacidad para actuar sobre carbohidratos, se reveló que *Weissella confusa* es una especie rica en familias CAZy que actúan sobre hemicelulosa, celulosa, sacarosa y sobre residuos de almidón. Las cepas analizadas poseen el potencial para degradar carbohidratos disponibles en la masa de maíz nixtamalizado para pozol, si bien ambas cepas no poseen las actividades principales (endo- $\beta$ -1,4-xilanasas y  $\alpha$ -amilasa) para degradar xilano y almidón respectivamente, si puede metabolizar residuos que queden disponibles tras la acción de este tipo de enzimas secretadas por otros microorganismos.

La expresión heteróloga del gen codificante para glicosiltransferasa GH70 de la cepa Wcp-3a y el gen codificante para  $\beta$ -xilosidasa GH3 de la cepa WcL17, mostró que ambos genes son activos y probablemente funcionales en la fermentación del pozol.

## 8. Perspectivas

Caracterizar las enzimas glicosiltransferasa y  $\beta$ -xilosidasa, expresadas en BL21 y referir las actividades a la masa de maíz nixtamalizado, con el fin de corroborar o descartar el uso de estas enzimas por Wcp-3a y Wcl17 en su contribución a la fermentación del pozol.

Aislar, expresar, caracterizar y referir actividad de todas las enzimas que codifican para actividades que actúan sobre hemicelulosa, las cuales están en los genomas de Wcp-3a y Wcl17, según los análisis de CAZy, con el fin de verificar si estos son activos y si lo son, evaluarlos sobre maíz nixtamalizado para pozol.

Realizar ensayos de crecimiento y actividad de Wcp-3a y Wcl17 sobre almidón para corroborar o descartar la condición amilolítica que reveló el análisis de CAZy de estas cepas.

Realizar ensayos de crecimiento y actividad de Wcp-3a y Wcl17 sobre celulosa para corroborar o descartar la condición celulolítica que reveló el análisis de CAZy de estas cepas.

Realizar un análisis transcriptómico de Wcl17 y Wcp-3a en masa de maíz nixtamalizado para pozol, que permita evaluar que genes se expresan y con ello verificar de que manera están contribuyendo estas cepas a la fermentación de la masa para pozol.

## 8. Referencias

Abegaz, K. (2007). Isolation, characterization and identification of lactic acid bacteria involved in traditional fermentation of borde, an Ethiopian cereal beverage. *African Journal of biotechnology*, 6(12).

Akpinar, O., Erdogan, K., & Bostanci, S. (2009). Production of xylooligosaccharides by controlled acid hydrolysis of lignocellulosic materials. *Carbohydrate Research*, 344(5), 660-666.

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215(3), 403-410.

Ampe, F., ben Omar, N., Moizan, C., Wacher, C., & Guyot, J. P. (1999). Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in Mexican pozol, a fermented maize dough, demonstrates the need for cultivation-independent methods to investigate traditional fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(12), 5464-5473.

Argüello-Morales, M., Sánchez-González, M., Canedo, M., Quirasco, M., Farrés, A., & López-Munguía, A. (2005). Proteolytic modification of *Leuconostoc mesenteroides* B-512F dextranase. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 87(2), 131-141.

Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., ... & Pyshkin, A. V. (2012). SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of computational biology*, 19(5), 455-477.

Ben Omar, N., & Ampe, F. (2000). Microbial community dynamics during production of the Mexican fermented maize dough pozol. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(9), 3664-3673.

Boetzer, M., & Pirovano, W. (2012). Toward almost closed genomes with GapFiller. *Genome biology*, 13(6), R56.

Bolaños S., López G., Pérez A., Guyot J.P., Wacher C. Study On The Variability In The Microbial Composition Of Pozol From Different Producers, Using 16S rRNA and rpoB PCR-DGGE. 11th International Symposium on Microbial Ecology (ISME-11), August 2006, Vienna, Austria (cartel).

Cantarel, B. L., Coutinho, P. M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V., & Henrissat, B. (2008). The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics. *Nucleic acids research*, 37(suppl\_1), D233-D238.

Cañas Urbina, A.O., Bárzana García, E., Owens, J.D. & Wachter Rodarte, M.C. 1993 La elaboración de pozol en los altos de Chiapas. *Ciencia (Mexico)* 44, 219–229

Cárdenas, C., Barkla, B. J., Wacher, C., Delgado-Olivares, L., & Rodríguez-Sanoja, R. (2014). Protein extraction method for the proteomic study of a Mexican traditional fermented starchy food. *Journal of proteomics*, 111, 139-147.

Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., & Posada, D. (2011). ProtTest 3: fast selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics*, 27(8), 1164-1165.

Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., & Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature methods*, 9(8), 772-772.

Delcher AL, Harmon D, Kasif S, White O, Salzberg SL. Improved microbial gene identification with GLIMMER, *Nucleic Acids Research* 27:23 (1999), 4636-4641.

Díaz-Ruiz, G., Guyot, J. P., Ruiz-Teran, F., Morlon-Guyot, J., & Wacher, 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*, 69(8), 4367-4374.

Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research*, 32(5), 1792-1797.

Escalante, A., Wacher, C., & Farres, A. (2001). Lactic acid bacterial diversity in the traditional Mexican fermented dough pozol as determined by 16S rDNA sequence analysis. *International journal of food microbiology*, 64(1), 21-31.

Falck, P., Linares-Pastén, J. A., Adlercreutz, P., & Karlsson, E. N. (2016). Characterization of a family 43  $\beta$ -xylosidase from the xylooligosaccharide utilizing putative probiotic *Weissella* sp. strain 92. *Glycobiology*, 26(2), 193-202.

- Garibay, M. G., Ramírez, R. Q., & Canales, A. L. M. (Eds.). (1993). *Biotecnología alimentaria*. Editorial Limusa.
- González Pillado Sarah Carolina (2018). *Influencia de la granulometría en la masa de pozol, sobre la presencia y dinámica de crecimiento de microorganismos*. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., & Tesler, G. (2013). QUASt: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*, *29*(8), 1072-1075.
- Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2007). 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *Journal of clinical microbiology*, *45*(9), 2761-2764.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., ... & Thierer, T. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, *28*(12), 1647-1649.
- Kim, M., Oh, H. S., Park, S. C., & Chun, J. (2014). Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *64*(2), 346-351.
- Krueger, F. (2015). Trim Galore: A wrapper tool around Cutadapt and FastQC to consistently apply quality and adapter trimming to FastQ files.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, *227*(5259), 680-685.
- Lee, K. W., Park, J. Y., Jeong, H. R., Heo, H. J., Han, N. S., & Kim, J. H. (2012). Probiotic properties of *Weissella* strains isolated from human faeces. *Anaerobe*, *18*(1), 96-102.
- Lin, Q., Li, H., Ren, J., Deng, A., Li, W., Liu, C., & Sun, R. (2017). Production of xylooligosaccharides by microwave-induced, organic acid-catalyzed hydrolysis of different xylan-type hemicelluloses: Optimization by response surface methodology. *Carbohydrate Polymers*, *157*, 214-225.
- Long, J. (2008). *Tecnología alimentaria prehispánica*. Estudios de cultura Náhuatl, (39), 127-136.

Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, 31(3), 426-428.

Mugula, J. K., Nnko, S. A. M., Narvhus, J. A., & Sørhaug, T. (2003). Microbiological and fermentation characteristics of togwa, a Tanzanian fermented food. *International journal of food microbiology*, 80(3), 187-199.

Owusu-Kwarteng, J., Akabanda, F., Nielsen, D. S., Tano-Debrah, K., Glover, R. L., & Jespersen, L. (2012). Identification of lactic acid bacteria isolated during traditional fura processing in Ghana. *Food microbiology*, 32(1), 72-78.

Padonou, S.W.; Schillinger, U.; Nielsen, D.S.; Franz, C.M.A.P.; Hansen, M.; Hounhouigan, J.D.; Nago, M.C.; Jakobsen, M. *Weissella beninensis* sp. nov., a motile lactic acid bacterium from submerged cassava fermentations, and emended description of the genus *Weissella*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2010**, 60, 2193–2198.

Patel, A., Falck, P., Shah, N., Immerzeel, P., Adlercreutz, P., Ståhlbrand, H., ... & Nordberg Karlsson, E. (2013). Evidence for xylooligosaccharide utilization in *Weissella* strains isolated from Indian fermented foods and vegetables. *FEMS microbiology letters*, 346(1), 20-28.

Peng, Y., et al. (2010) IDBA- A Practical Iterative de Bruijn Graph De Novo Assembler. RECOMB. Lisbon.

Richter M, Rossello-Mora R (2009) Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 19126-19131.

Richter, M., & Rosselló-Móra, R. (2009). Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(45), 19126-19131.

Rondón, C. F., Leal, M., Ramírez, J. R., Sánchez, E., Moreno, M., Castro, G., & Barboza, Y. (2011). Tiempo de almacenamiento e identificación de bacterias ácido lácticas en carnes de res picada empacadas al vacío. *Revista Científica*, 21(5).

Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual* (No. Ed. 2). Cold spring harbor laboratory press.

- Sangwan, S., Kumar, S., & Goyal, S. (2014). Maize utilisation in food bioprocessing: An overview. In *Maize: Nutrition Dynamics and Novel Uses* (pp. 119-134). Springer India.
- Schmid, J., Sieber, V., & Rehm, B. (2015). Bacterial exopolysaccharides: biosynthesis pathways and engineering strategies. *Frontiers in microbiology*, 6, 496.
- Seemann T (2014) Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*. 30(14):2068-9.
- Seemann, T. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, 30(14), 2068-2069.
- Solovyev, V., & Salamov, A. (2011). Automatic annotation of microbial genomes and metagenomic sequences. *Metagenomics and its applications in agriculture, biomedicine and environmental studies*, 61-78.
- Stamatakis, A. (2006). RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*, 22(21), 2688-2690.
- Stamatakis, A. (2014). RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30(9), 1312-1313.
- Vassallo Rodríguez, M. (2016). Evanescencias en las traducciones del Chilam Balam de Chumayel: el maíz y el frijol del Sur, los ibes del Oriente y el pozol ritual. *Estudios de cultura maya*, 47, 119-150
- Wacher-Rodarte, C. (1993). Alimentos y bebidas fermentados tradicionales. *Biología alimentaria*, 312-349.
- Wacher, C., Canas, A., Cook, P. E., Barzana, E., & Owens, J. D. (1993). Sources of microorganisms in pozol, a traditional Mexican fermented maize dough. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 9(2), 269-274.
- Wacher, C., Cañas, A., Bárzana, E., Lappe, P., Ulloa, M., & Owens, J. D. (2000). Microbiology of Indian and Mestizo pozol fermentations. *Food Microbiology*, 17(3), 251-256.
- Wences, A. H., & Schatz, M. C. (2015). Metassembler: merging and optimizing de novo genome assemblies. *Genome biology*, 16(1), 207.
- Wences, A. H., & Schatz, M. C. (2015). Metassembler: merging and optimizing de novo genome assemblies. *Genome biology*, 16(1), 207.

Yang, Z. Y., Wu, D. T., Chen, C. W., Cheong, K. L., Deng, Y., Chen, L. X., ... & Li, S. P. (2016). Preparation of xylooligosaccharides from xylan by controlled acid hydrolysis and fast protein liquid chromatography coupled with refractive index detection. *Separation and Purification Technology*, *171*, 151-156.

Yin Y\*, Mao X\*, Yang JC, Chen X, Mao F and Xu Y, dbCAN: a web resource for automated carbohydrate-active enzyme annotation, *Nucleic Acids Res.* 2012 Jul;40(Web Server issue):W445-51

Zerbino, D. R. (2010). Using the velvet de novo assembler for short-read sequencing technologies. *Current protocols in bioinformatics*, *31*(1), 11-5.

Zhang JD and Wiemann S (2009). "KEGGgraph: a graph approach to KEGG PATHWAY in R and Bioconductor". *Bioinformatics*, pp. 1470–1471.