



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

INTERACCIONES ENTRE BACTERIAS

LÁCTICAS DURANTE LA FERMENTACIÓN DEL ALMIDÓN

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctora en Ciencias

PRESENTA:

M. en C. SANDRA BOLAÑOS NÚÑEZ

DRA. MARÍA DEL CARMEN WACHER RODARTE
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

DRA. ESPERANZA MARTÍNEZ ROMERO
CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS, UNAM

DRA. SYLVIE LE BORGNE
DEPARTAMENTO DE PROCESOS Y TECNOLOGÍA,
UAM

Ciudad de México, Abril 2023



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.

**INTERACCIONES ENTRE BACTERIAS
LÁCTICAS DURANTE LA FERMENTACIÓN DEL ALMIDÓN**

**TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
PRESENTA:**

M. en C. SANDRA BOLAÑOS NÚÑEZ

ASESORA

DRA. MARÍA DEL CARMEN WACHER RODARTE

Departamento de Alimentos y Biotecnología
Facultad de Química, UNAM

COMITÉ TUTORIAL ASIGNADO

Dra. Esperanza Martínez Romero

Centro de Ciencias Genómicas. UNAM

Dra. Sylvie Le Borgne

Departamento de Procesos y Tecnología. UAM

**ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL
LABORATORIO 324,
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA
CONJUNTO E, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.**

JURADO ASIGNADO PARA LA REVISIÓN DE ESTE TRABAJO:

DRA. AMELIA FARRÉS GONZÁLEZ SARABIA
Facultad de Química, UNAM

DR. JOSÉ ADELFO ESCALANTE LOZADA
Instituto de Biotecnología, UNAM

DRA. MA. DE LOS DOLORES REYES DUARTE
Departamento de Procesos y Tecnología, UAM

DR. FRANCISCO RUIZ TERÁN
Facultad de Química, UNAM

DRA. ROMINA RODRÍGUEZ SANOJA
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

AGRADECIMIENTOS

A la Doctora Carmen Wachter Rodarte por la asesoría y dirección de este proyecto. Por su amistad y calidez humana.

A la QFB Julieta Sandoval Guillén: mi amiga, mi soporte emocional; pero, sobre todo, el pilar fundamental para la culminación de este proyecto. Gracias July.

Al Dr. Jorge Alejandro Santiago Urbina por su valiosa colaboración y aportaciones que permitieron concluir este trabajo.

Al Dr. Francisco Ruiz Terán por sus contribuciones para reestructurar esta tesis. Muchas gracias.

A la Dra. Gloria Díaz Ruiz, por la asesoría y el soporte brindados en el desarrollo de esta investigación.

Al Dr. Agustín López Munguía, a la Dra. Maricarmen Quirasco Baruch, al Ing. Abel Blancas y al QFB Agustín Reyó, por las estancias permitidas y las facilidades otorgadas en sus laboratorios.

A la Biol. Teresa Flores por el soporte técnico durante el trabajo experimental, por sus enseñanzas y por su amistad.

Al QA. Alberto Pérez por ser mi coequipero, mi amigo y porque su soporte fue fundamental en el trabajo experimental de este proyecto.

A los miembros del Comité Tutorial: la Dra. Esperanza Martínez Romero y en especial a la Dra. Sylvie Le Borgne, por sus excelentes contribuciones, su paciencia y colaboración para la conclusión de este proyecto.

Al jurado de examen por las observaciones y sugerencias que ayudaron a que este trabajo culminara satisfactoriamente.

A la Coordinación del Posgrado en Ciencias Bioquímicas: Dra. Claudia Treviño Santa Cruz, a la MC. Norma Trejo, a Julio Ignacio Palacios, y en particular a Dra. Ana Brígida Clorinda Arias. Gracias por la paciencia y por la oportunidad de cerrar esta etapa en mi vida académica.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Posgrado de Ciencias Bioquímicas por permitirme realizar mis estudios de Doctorado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la BECA del Programa Nacional de Posgrado: Registro 167339.

Al Proyecto PAPIIT UNAM IN 223917 y PAIP 5000-9099 de la Facultad de Química de la UNAM.

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por el financiamiento para asistir y participar en: 1er Congreso Nacional de Nixtamalización (2004); XI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería (2005); 11th International Symposium on Microbial Ecology (2006).

DEDICATORIA

*La culminación de este Proyecto está dedicada
a mi amado hijo Eithan, mi campeón ajedrecista.*

*El camino para alcanzar las metas a veces es duro,
pero es más duro darte por vencido.*

*No desistas, ve a tu ritmo, no tengas miedo si vas lento,
al final, con disciplina y constancia vas a alcanzar tus objetivos,
vas a hacer realidad tus sueños.*

Tu poder está en tu mente.

"La fuerza no proviene de la capacidad física sino de la voluntad indomable"

Mahatma Gandhi

Contenido	
RESUMEN.....	9
INTRODUCCIÓN.....	10
Capítulo 1. GENERALIDADES.....	12
1.1. Mecanismos de interacciones microbianas positivas que benefician a los cocultivos de BAL.....	12
1.1.1 Mecanismos generales para interacciones microbianas positivas.....	13
1.2. Alimentos fermentados tradicionales.....	14
1.2.1. Alimentos fermentados tradicionales de México.....	15
1.2.2. El pozol.....	15
1.2.3. Bacterias lácticas en el pozol.....	16
1.2.4 Géneros de bacterias lácticas predominantes en el pozol.....	18
1.3. Generalidades del almidón.....	20
1.3.1. Hidrólisis del almidón.....	21
1.4 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) o PCR cuantitativo.....	23
HIPÓTESIS.....	30
OBJETIVOS.....	31
Objetivo general.....	31
Objetivos específicos.....	31
Capítulo 2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
2.1 Cepas de trabajo.....	33
2.1.2 Reactivación de las cepas.....	33
2.2 Identificación de la cepa <i>S. bovis</i> -25124.....	37
2.2.1 Extracción de DNA genómico.....	37
Concentración del reactivo en tubo de reacción.....	38
2.3 Montaje y validación de la técnica de RT-qPCR.....	40
2.3.1 <i>Diseño de oligonucleótidos específicos para Sii-25124, W. confusa L17 y Lb. plantarum A6</i>	40
2.3.2 Extracción de RNA total.....	40
2.3.3 Obtención de cDNA por retrotranscripción (RT-PCR).....	41
2.3.4 Validación ensayos de RT-qPCR.....	42
2.4 Fermentación del almidón en monocultivos y cocultivos.....	43
2.4.1 Preparación del precultivo.....	43
2.4.2 Monocultivos y cocultivos.....	44
2.4.3 Seguimiento de la fermentación.....	45

3.1 Cepas de trabajo.....	52
3.2 Identificación de la cepa <i>Streptococcus bovis</i> 25124.....	52
3.3 Montaje y validación de la técnica de qPCR.....	55
3.3.1 Diseño de oligonucleótidos específicos para <i>Sii-25124</i> , <i>W. confusa</i> L17 y <i>Lb. plantarum</i> A6	55
3.3.2 Validación de ensayos de RT-qPCR.....	55
3.4 Fermentación del almidón en monocultivos y cocultivos.	57
3.4.1 Biomasa, pH, velocidad máxima de crecimiento (μ_{max}) y concentración de DNA en cultivos puros.....	57
3.4.2. Fermentación del almidón, azúcares reductores, actividad amilolítica, producción de ácido láctico y productos de hidrólisis de almidón en cultivos puros	61
3.4.3. Biomasa, pH, velocidad máxima de crecimiento (μ_{max}) y concentración de DNA, fermentación del almidón, azúcares reductores, actividad amilolítica, Productos de hidrólisis de almidón y producción de ácido láctico en cultivos mixtos.....	64
3.4.4 Eficiencia de la fermentación de cultivos puros y cultivos mixtos.	69
CONCLUSIONES.....	72
BIBLIOGRAFÍA	73
ANEXOS	78
ANEXO I. Curva de calibración entre la densidad óptica y el peso seco	78
ANEXO II. Determinación de la actividad amilolítica por el método de extinción del complejo almidón-yodo.	79
ANEXO III. A. Azúcares reductores (método de DNS) y B. Azúcares totales (método de fenol-sulfúrico)	82
ANEXO IV. Compilado de resultados de Cultivos puros.....	84
ANEXO V. Compilado de resultados de Cultivos mixtos	87
ANEXO VI. Microbial Interactions between Amylolytic and Non-Amylolytic Lactic Acid Bacteria Strains Isolated during the Fermentation of Pozol	90

ÍNDICE DE TABLAS

No	Descripción	Página
Tabla 1.	Cepas seleccionadas para desarrollar el proyecto.	33
Tabla 2.	Oligonucleótidos usados para secuenciar la región V1 del gen RNAr 16S.	35
Tabla 3.	Protocolo para amplificar por PCR el fragmento V1 del gen RNAr 16S.	36
Tabla 4.	Condiciones solicitadas para la secuenciación de cepas. Instituto de Fisiología Celular-UNAM.	36
Tabla 5.	Concentración de reactivos utilizados para la amplificación del gen <i>sodA</i> mediante PCR.	37
Tabla 6.	Concentración de reactivos utilizados para la amplificación del gen <i>sodA</i> mediante PCR.	38
Tabla 7.	Componentes para las reacciones de RT-qPCR Applied Biosystems 7500.	43
Tabla 8.	Cepas utilizadas en monocultivo (cultivo puro).	44
Tabla 9.	Cepas utilizadas en cocultivo (cultivo mixto).	45
Tabla 10.	Componentes para las reacciones de RT-qPCR Applied Biosystems 7500.	49
Tabla 11.	Condiciones de amplificación para BLA.	50
Tabla 12.	Resultados de identificación de cepas por secuenciación.	52
Tabla 13.	Alineamiento en el BLAST (http://ncbi.nih.gov/) de secuencias de un fragmento interno del gen <i>sod A</i> de <i>S. bovis</i> 25124(Poyart. <i>et al.</i> , 1995). Porcentaje de similitud con los parientes más cercanos	53
Tabla 14.	Oligos diseñados por el proveedor Applied Biosystems. Secuencia y características.	55
Tabla 15.	Eficiencia y linealidad del ensayo de qPCR. Curvas de amplificación, valor de Cq, curva estándar con las 6 primeras diluciones (cuantificación absoluta).	56
Tabla 16.	Cepas usadas en este estudio para los cultivos puros y los cultivos mixtos.	57

Tabla 17. Velocidad específica máxima de crecimiento (μ) obtenida de la fermentación de MRS-almidón a 30°C, en cultivo puro y en cultivo mixto de *Lb. plantarum* A6, *Sii-25124* y *W confusa* L17. 59

ÍNDICE DE FIGURAS

No	Descripción	Página
Figura 1.	Representación esquemática de la estructura de la amilosa.	20
Figura 2.	Representación esquemática de la estructura de la amilopectina.	21
Figura 3.	Estructura química de las cadenas de amilopectina y amilosa y los sitios de hidrólisis por los diferentes tipos de amilasas.	23
Figura 4.	Los fluoróforos utilizados para seguir la amplificación del DNA durante la qPCR pueden ser de dos tipos: a) fluoróforos con afinidad por el DNA y b) sondas específicas para fragmentos del DNA, es decir, que sólo emiten fluorescencia cuando se ha amplificado un fragmento del DNA de interés.	24
Figura 5.	La utilización de las sondas TaqMan asegura que la fluorescencia registrada, corresponda únicamente a la generada por el producto de amplificación, el cual es altamente específico.	26
Figura 6.	Grafica que representa la fluorescencia detectada durante el experimento de qPCR, en función de los ciclos se obtiene una curva sigmoidea. Esta curva se realiza con diluciones 1/10 de un templado, entre más diluida la muestra, se necesitan más ciclos para ver señal.	28
Figura 7.	Solicitud enviada al Instituto de Fisiología Celular-UNAM para la secuenciación del fragmento de <i>sodA</i> amplificado con los oligonucleótidos d1 y d2.	39
Figura 8.	Preparación de precultivos de <i>Lb. plantarum</i> A6, Sii-25124; y <i>W. confusa</i> L17.	43
Figura 9.	Preparación de cultivos de <i>Lb. plantarum</i> A6, Sii-25124 y <i>W. confusa</i> L17.	46
Figura 10.	Diseño de experimento RT-qPCR para cuantificar el crecimiento de las bacterias en cultivo puro y en cultivo mixto.	51
Figura 11.	Dendrograma elaborado con 18 secuencias de aproximadamente 360 pb de un fragmento interno del gen <i>sod A</i> (609 pb) que codifica a la Superóxido dismutasa dependiente de manganeso (SOD-Mn) en estreptococos. D1	54
Figura 12.	Curvas de amplificación obtenidas con la utilización de cada par de oligonucleótidos específicos para cada bacteria. A. Sii-25124; B. <i>Lb. plantarum</i> A6; C. <i>W. confusa</i> 17.	56

Figura 13.	Concentración de biomasa durante la fermentación de caldo MRS-almidón a 30°C usando cultivos puros: <i>Lb. plantarum</i> A6, <i>Sii-25124</i> y <i>W. confusa</i> A17; y cultivos mixtos: <i>Lb.p-Si</i> ; <i>Lb.p-Wc</i> ; <i>Si-Wc</i> .	59
Figura 14.	Crecimiento microbiano determinado por la concentración de DNA en cultivos puros de <i>Lb. plantarum</i> A6 (<i>Lb.p</i>); <i>Sii-25124</i> (<i>Sinf</i>); y <i>W. confusa</i> 17 (<i>W.c</i>) en fermentaciones de caldo MRS-almidón.	60
Figura 15.	Valores de pH vs tiempo durante la fermentación en caldo MRS-Almidón a 30°C; durante 24 horas en cultivo puro de <i>Lb plantarum</i> A6, <i>Sii-25124</i> y <i>W confusa</i> L17.	60
Figura 16.	Cambio en la concentración de almidón durante la fermentación del caldo MRS-almidón a 30°C. En cultivos puros: <i>Lb. plantarum</i> A6 (<i>Lp</i>), <i>Sii-25124</i> (<i>Sif</i>) y <i>W. confusa</i> A17 (<i>Wc</i>); y cultivos mixtos: <i>Lb.p-Si</i> ; <i>L.p-Wc</i> ; <i>Si-Wc</i> .	62
Figura 17.	Cambio en la concentración de azúcares reductores totales (ART) durante la fermentación del caldo MRS-almidón.	63
Figura 18.	Actividad enzimática durante la fermentación del caldo MRS-almidón. En cultivos puros: <i>Lb. plantarum</i> A6 (<i>Lp</i>), <i>Sii-25124</i> (<i>Sif</i>) y <i>W. confusa</i> A17 (<i>Wc</i>); y cultivos mixtos: <i>Lb.p-Si</i> ; <i>Lb.p-Wc</i> ; <i>Si-Wc</i> .	63
Figura 19.	Producción de ácido láctico durante la fermentación de caldo MRS-almidón. En cultivos puros: <i>Lb. plantarum</i> A6 (<i>Lp</i>), <i>Sii-25124</i> (<i>Sif</i>) y <i>W. confusa</i> A17 (<i>Wc</i>); y cultivos mixtos: <i>Lb.p-Si</i> ; <i>Lb.p-Wc</i> ; <i>Si-Wc</i> .	64
Figura 20.	Crecimiento microbiano determinado por la concentración de DNA en cultivos mixtos de: (A) , <i>Lb. plantarum</i> A6 + <i>Sii-25124</i> ; (B) <i>Sii-25124</i> + <i>W. confusa</i> 17; (C) , <i>Lb. plantarum</i> A6 + <i>W. confusa</i> , 17 en fermentaciones de caldo MRS-almidón.	66
Figura 21.	Productos de la hidrolisis del almidón durante la fermentación con cultivos puros: (A) <i>Sii-25124</i> ; (B) <i>Lb. plantarum</i> A6 (C) <i>W. confusa</i> 17. Y con cultivos mixtos: (D) <i>Lb. plantarum</i> A6- <i>Sii-25124</i> ; (E) <i>Lb. plantarum</i> A6- <i>W. confusa</i> 17; (F) <i>Sii-25124-W. confusa</i> 17.	68
Figura 22.	Parámetros cinéticos de cultivos puros y cultivos mixtos en un modelo líquido de almidón soluble de papa; durante 24 horas de fermentación a 30°C	70

ABREVIACIONES

μ .	Velocidad específica de crecimiento
μg .	Microgramo
μL .	Microlitro
%	Porcentaje
BAL.	Bacterias ácido-lácticas
BALA.	Bacterias ácido-lácticas amilolíticas
$^{\circ}\text{C}$.	Grados centígrados
C.	Citocina
cDNA.	Complementary DNA (DNA complementario)
Ct.	Ciclo umbral
DNA.	Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)
DNS.	Ácido 3,5- Dinitro-Salicílico
$\text{DO}_{600\text{nm}}$.	Densidad óptica leída a 600 nm
E.	Eficiencia
g.	Gramos
G.	Guanina
h.	Hora
L.	Litro
<i>Lb.</i>	<i>Lactiplantibacillus</i>
Ln.	Logaritmo natural
mg.	Miligramo
MgCl_2 .	Cloruro de magnesio
min.	Minuto
mL.	Mililitro
mM.	Milimolar
MRS.	Medio Man, Rogosa y Sharpe
MRSA.	Medio Man, Rogosa y Sharpe con Almidón
NaCl.	Cloruro de sodio
NaOH.	Hidróxido de sodio
NCBI.	National Center for Biotechnology Information (Centro Nacional para Información en Biotecnología)
ng.	Nanogramo
NJ.	Neighbor-Joining
nd.	No determinado
p/p.	peso/peso
p/v.	peso/volumen
PCR.	Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa)
PCR-DGGE.	Reacción en Cadena de la Polimerasa-Electroforesis en Geles con Gradiente Desnaturalizante
pH.	Potencial de hidrógeno
QS.	Quorum Sensing
q_{lac}	Tasa específica de producción de ácido láctico.
q_p	La velocidad específica de producción de ácido láctico
q_{amy}	La velocidad específica de producción de producción de amilasa
$q_{s=}$	La velocidad específica de consumo de sustrato

RNA.	Ribonucleic acid (Ácido ribonucleico)
rpm.	Revoluciones por minuto
rRNA.	Ribosomal Ribonucleic acid (Ácido ribonucleico ribosomal)
tRNA T	transfer Ribonucleic acid (Ácido ribonucleico de transferencias)
RT-qPCR.	Quantitative reverse transcription PCR (PCR cuantitativa)
s.	segundo
<i>Sii.</i>	<i>Streptococcus infantarius subsp.infantarius</i>
SOD-Mn.	Superóxido dismutasa dependiente de manganeso
t.	Tiempo
Tm.	Temperatura de desnaturalización
UNAM.	Universidad Nacional Autónoma de México
V.	Volt
v/v.	volumen/volumen
W.	Weisella
Y.	Citosina o timina
$Y_{amy/x}$	El rendimiento de amilasa (unidades de amilasa producidas por gramo de peso seco celular).
$Y_{amy/s}$	El rendimiento de amilasa (unidades de amilasa producidas por gramo de azúcar utilizado)
$Y_{lac/s}$	El rendimiento de ácido láctico (gramos de ácido láctico producido por gramo de azúcar utilizado).
$Y_{lac/x}$	El rendimiento de ácido láctico (gramos de ácido láctico producido por gramo de peso seco celular).
$Y_{x/s}$	El rendimiento de biomasa.

RESUMEN.

El pozol es una bebida fermentada tradicional, ácida, no alcohólica elaborada a base de maíz, se ha demostrado que las bacterias lácticas amilolíticas (BALA) son importantes durante toda la fermentación. Lo anterior sugiere la presencia de relaciones tróficas entre BAL y BALA, que explicarían la diversidad de la población microbiana de este alimento.

Considerando lo anterior, se analizaron las relaciones entre BAL y BALA en un modelo líquido de almidón soluble de papa, al ser un medio comercial de manipulación menos compleja comparando con masa de nixtamal, y así efectuar un primer acercamiento para determinar si las BALA al hidrolizar el almidón promueven el desarrollo de las BAL, con el objeto de aplicar tecnologías simples y culturalmente aceptables, logrando una reducción en la viscosidad de los alimentos de destete elaborados a base de nixtamal.

En este trabajo se estudió el efecto de la inoculación de cultivos puros y mixtos de las cepas *S. infantarius*-ssp. *infantarius* (Sii-25124) amilolítica (BALA) y *Weissella confusa* 17 (*W. confusa* 17), ambas aisladas del pozol; y *Lactiplantibacillus plantarum* A6 (*Lb. plantarum* A6), (BALA) aislada de la yuca. Se cuantificó el crecimiento en monocultivo y en cultivo mixto durante 24 h; tomando muestras al tiempo cero y hasta las 7.0 horas, cada 30 minutos. A partir de las 8.0 horas y hasta las 12 horas, se tomaron muestras cada hora y se evaluaron los siguientes parámetros: pH, biomasa; peso seco, actividad amilolítica; azúcares reductores; azúcares totales; producción de ácido láctico; productos de hidrólisis del almidón; parámetros cinéticos de crecimiento y cuantificación de crecimiento usando RT-qPCR. Técnica que también fue validada en este proyecto para poder cuantificar en cultivo puro y en cultivo mixto a las bacterias.

Se encontró que las BALA: *Sii-25124* y *Lb. plantarum* A6, no promovieron el desarrollo de *W. confusa* L17 (BAL), cuando crecieron en un medio líquido con almidón soluble de papa, en cultivo mixto. Y que *Sii-25124* y *Lb plantarum* A6 en cultivo mixto hidrolizarán con mayor rapidez el almidón que en cultivo puro.

INTRODUCCIÓN.

Las bacterias ácido-lácticas (BAL) son uno de los grupos microbianos más estudiados debido a su importancia en la fermentación de alimentos y a su impacto positivo en la salud. Estas bacterias están presentes en múltiples fermentaciones alimentarias y también en ambientes naturales. Sin embargo, en fermentaciones naturales en alimentos, es casi imposible encontrarlas aisladas, sin que interactúen con otros microorganismos e inclusive con el sustrato (Rodríguez Amor & Dal Bello, 2019).

El pozol es una bebida fermentada tradicional, ácida, no alcohólica hecha a base de maíz y es de origen Maya. Esta bebida popular forma parte de la dieta, especialmente en los hogares de comunidades rurales del Sureste de México. Para prepararla, el nixtamal (el maíz sometido a un tratamiento térmico-alcalino) se muele y la masa obtenida se le da forma de bola, se envuelve en hojas de plátano y se fermenta a temperatura ambiente. La masa fermentada se disuelve en agua para preparar la bebida. En la fermentación natural se encuentra una microbiota compleja que incluye bacterias, levaduras y hongos.

Las bacterias lácticas son las primeras en crecer y son las responsables de la acidificación de la masa, por lo que en el pozol y en una gran variedad de alimentos fermentados, las BAL son de gran importancia. Por otro lado, las bacterias ácido lácticas amilolíticas (BALA), se encuentran en diferentes alimentos fermentados amiláceos, las especies más comunes pertenecen al género *Lactobacillus* (Olympia *et al.*, 1995), seguido de especies de *Lactococcus* y *Streptococcus*. En estudios previos, se ha reportado que en el pozol se encuentra una fuente diversa y dinámica de BALA y BAL, siendo *Streptococcus* el género que prevalece durante todo el proceso de fermentación; y *S. infantarius ssp. infantarius* 25124 (Sii-25124), la bacteria con mayor actividad amilolítica que se ha aislado de este producto. El objetivo de este trabajo fue comprender las interacciones en cocultivos entre las BALA y las BAL en condiciones de laboratorio, utilizando como sustrato MRS-almidón soluble de papa. Para ello fue esencial medir el crecimiento de cada especie en cultivo mixto.

En este estudio se utilizó la técnica de RT-qPCR como una herramienta rápida y eficaz para diferenciar entre dos especies de bacterias lácticas. El crecimiento en

los cocultivos se monitoreó a lo largo del tiempo, no sólo para el entendimiento de las interacciones en fermentaciones, sino también para el aprovechamiento biotecnológico de estos microorganismos en el pozol mismo al acelerar la hidrólisis del almidón.

Capítulo 1. GENERALIDADES.

1.1. Mecanismos de interacciones microbianas positivas que benefician a los cocultivos de BAL.

Los microorganismos han colonizado la mayoría de los ecosistemas naturales creciendo entrelazados e interactuando constantemente con otros microorganismos y con el medio que les rodea. Los científicos tratan de comprender los mecanismos subyacentes a estas interacciones para controlar mejor las comunidades microbianas y explotarlas en una amplia variedad de bioprocesos. Se ha optado por utilizar el término comunidad natural cuando se refiere a comunidades auto ensambladas de microorganismos ambientales en varios ecosistemas (Rodríguez Amor & Dal Bello, 2019), y cocultivo, cuando se refiere a asociaciones de microorganismos creadas por el hombre (Zhang. *et al.*, 2020). También se usa 'ensamblaje' como un término general que abarca tanto las comunidades auto ensambladas como los cocultivos.

Los procesos biotecnológicos dependen de tres tipos de ensamblajes:

1. Comunidades naturales: son asociaciones espontáneas de microorganismos dentro de un determinado ecosistema. Presentan la mayor complejidad en cuanto a las especies microbianas presentes y, por lo tanto, de las interacciones resultantes. La dinámica de las comunidades naturales está regida por selección. La evolución ocurre de tal manera que hay una constante hacia adelante y hacia atrás entre los sustratos convertidos disponibles y la mejora en la aptitud de los microorganismos establecidos. Las interacciones juegan un papel clave en la mejora de la forma física de los miembros en la población.

Las comunidades microbianas naturales se explotan en numerosos bioprocesos, están orientadas hacia resultados específicos. Este es el caso de los alimentos fermentados tradicionales, como el queso o el kimchi, así como en el compostaje (Wang. *et al.*, 2020).

2. Cocultivos artificiales: reúne ambos tipos de cocultivos artificiales y sintéticos, que requieren la intervención del humano y que al mostrar menos complejidad microbiana que las comunidades naturales, pueden ser estudiados como premisa

en un modelo sintético. Holzapfel. *et al.*, (2014) afirmaron que “es un enfoque factible en biotecnología para establecer comunidades microbianas (aquí referidas como cocultivos) integradas de cepas que no necesariamente coexistirían en la naturaleza. Los cultivos artificiales se ensamblan con dos propósitos; el primero es explotar las funciones expresadas por cada cepa. Este es de particular interés en el desarrollo de productos alimenticios fermentados en el que la actividad combinada de cocultivos microbianos es responsables de su característico sabor y textura. El segundo propósito es buscar la producción de un producto final específico, un enfoque que es relevante en campos como la producción de bioenergías, bioquímicos y alimentos (Petrova. *et al.*, 2013).

3.Cocultivo sintético: asociación de microorganismos en los que al menos una de las cepas es un organismo modificado genéticamente (Van de Guchte. *et al.*, 2002; Wang. *et al.*, 2020).

1.1.1 Mecanismos generales para interacciones microbianas positivas.

Las interacciones positivas pueden requerir contacto físico entre los microorganismos. Este contacto puede involucrar el flagelo, nanotubos, membranas o cadenas de vesículas. Es importante tener en cuenta que las moléculas compartidas por contacto directo pueden incluir algunos de los compartidos a través de la difusión en el medio. Al conjunto de moléculas disponibles en el medio y que son utilizados por al menos uno de los microorganismos interactuantes, se denomina bienes públicos. Éstos pueden ser nutricionales o no nutricional para la pareja que interactúa; en otras palabras, se pueden utilizar directamente para el crecimiento o para mejorar su actividad. Los productos no nutricionales pueden incluir Quorum sensing (QS) o componentes de biopelícula que pueden influir en la estructura espacial del cocultivo. Si los bienes son nutricionales, como los aminoácidos o los azúcares, los microorganismos interactúan a través de la alimentación cruzada. Otra interacción nutricional implica la de enzimas extracelulares que hidrolizan proteínas o polisacáridos complejos directamente en el medio (West. *et al.*, 2007).

1.2. Alimentos fermentados tradicionales

Un sinnúmero de microorganismos y enzimas son los responsables de las características propias de cada alimento fermentado como diversidad de sabores, texturas y aromas; incremento de la vida de anaquel y propiedades benéficas para la salud y enriquecimientos nutricionales (Vargas, 1993). Los alimentos fermentados son aquéllos cuyo procesamiento involucra el crecimiento y la actividad de microorganismos (bacterias, mohos o levaduras). Son productos antiguos, cuyo origen se pierde en los albores de la historia; probablemente surgieron en forma accidental y el hombre los acogió rápidamente debido a sus características sensoriales y a que podían ser conservados por un tiempo prolongado. Algunos de ellos se han industrializado y son de consumo generalizado en cualquier parte del mundo. Sin embargo, la mayoría de los conocidos hasta la fecha son de manufactura artesanal y se producen de forma regional.

Una gran variedad de bebidas y alimentos fermentados son distribuidos en todo el mundo, tales como; cerveza, vino, pan, embutidos, queso, yogurt y los diversos alimentos fermentados tradicionales de cada región. El proceso de fermentación enriquece a los alimentos mejorando su contenido nutricional a través de la biosíntesis de vitaminas, aminoácidos esenciales y proteínas; por otro lado, mejorando la digestibilidad de fibra y proteínas, incrementando la disponibilidad de micronutrientes y finalmente, degradando/inactivando factores anti-nutricionales (Guerrero. *et al.*, 2014). El proceso de fermentación reduce los componentes tóxicos presentes en los alimentos tales como aflatoxinas y cianógenos, así mismo, se producen factores antimicrobianos como lo son el ácido láctico, bacteriocinas, dióxido de carbono, peróxido de hidrógeno y etanol, los cuales inhiben o eliminan a los patógenos. El consumo de alimentos fermentados se ha incrementado considerablemente y una de las principales razones es porque los consumidores los consideran naturales y saludables al no contener conservadores químicos (Giraffa, 2004).

1.2.1. Alimentos fermentados tradicionales de México

Los alimentos fermentados en México datan de la época prehispánica. La tradición de elaborarlos y consumirlos ha persistido hasta la época actual. Sin embargo, hasta la fecha, únicamente se han estudiado sólo algunos de los más de 200 alimentos y bebidas fermentadas que hay en el país. Entre estos se encuentra: el tesgüino, el atole, el tepache (Cruz-Ulloa y Ulloa, 1973), el tamal agrio, la tortilla agria (Vargas, 1999); el pulque (Ulloa. *et al.*, 1976) el atole agrio y el pozol (Cruz-Ulloa y Ulloa, 1973), etc.

Los alimentos fermentados tradicionales se obtienen sin añadir inóculos, es decir que los microorganismos naturalmente presentes en el alimento, constituidos por microbiotas complejas, son responsables de la fermentación (Wacher, 2003). El proceso involucra la acción de hongos, levaduras y bacterias. Estos alimentos se han preparado y consumido por cientos de años y están fuertemente asociados a culturas y tradiciones. Los alimentos fermentados tradicionales forman parte de la dieta básica de las culturas, como alimento o como bebida (Wacher y Lappe, 1993). Además de que el grado de avance en la investigación de cada uno de ellos es variable, puede considerarse que su conocimiento microbiológico y químico es aún incipiente.

1.2.2. El pozol

Dentro de los alimentos fermentados prehispánicos en México, el pozol del náhuatl *pozolli* (espumoso), es una bebida refrescante ácida, no alcohólica, de origen maya. En el pozol ocurre una fermentación natural, ya que la realiza la microbiota nativa de la masa, sin la adición intencional de un inóculo. La mayoría de los microorganismos presentes en el maíz se eliminan durante la nixtamalización y durante la molienda ocurre la mayor inoculación tanto de bacterias lácticas, levaduras y mohos, como de bacterias no deseables, por ejemplo, enterobacterias (Wacher, 2003).

1.2.3. Bacterias lácticas en el pozol.

Nuraida. *et al.*, (1995) aislaron 26 BAL de diferentes etapas de fermentación del pozol entre las que predominó *Leuconostoc* spp., lactobacilos homofermentativos, lactococos y lactobacilos heterofermentativos productores de dextrano.

Ampe. *et al.*, (1999) determinaron la estructura microbiana de la masa mediante un enfoque polifásico utilizando métodos de cultivo y métodos independientes de cultivo. Se encontró que las bacterias lácticas constituyen entre el 90 y 97% de la microbiota activa. Del 25 al 50% de éstos son miembros del género *Streptococcus* y predominaron también *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum* y bacterias de los géneros *Leuconostoc* y *Weissella*.

Escalante. *et al.*, (2001) encontraron, mediante un análisis de secuencias de DNAr 16S obtenidas por amplificación del DNA total extraído del pozol, 14 secuencias únicas, identificadas como *Lactococcus lactis*, *Streptococcus suis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lb. casei*, *Lb. alimentarium*, *Lb. delbrueckii* y *Clostridium* sp. Indicando que las bacterias lácticas constituyen el grupo principal dentro de las bacterias Gram positivas del pozol.

Díaz-Ruiz. *et al.*, (2003) demostraron que las bacterias lácticas amilolíticas se encuentran a lo largo de la fermentación. Estas constituyen una proporción importante de las bacterias lácticas totales, principalmente durante las primeras horas de fermentación, cuando los valores de pH son más altos (7.4-5.9); sin embargo, a las 72 h de fermentación constituyen únicamente el 3% de las bacterias lácticas presentes. Esto sugiere la presencia de relaciones tróficas, que explicarían la diversidad de la población microbiana de este alimento. Es posible que las bacterias lácticas amilolíticas aporten sustratos para las bacterias lácticas no amilolíticas. Los mismos autores encontraron que las cepas de BAL con mayor actividad amilolítica se aislaron de las etapas iniciales de la fermentación, sugiriendo que los valores altos de pH inicial favorecieron tanto el crecimiento como la actividad amilolítica de las cepas. Por otro lado, determinaron la diversidad de estas bacterias en el pozol y encontraron que las bacterias con mayor actividad amilolítica son parientes cercanos de *Streptococcus bovis*, *Enterococcus sulfureus* y *Lactococcus lactis*, dentro de las cuales predomina la primera. La presencia e importancia de *Streptococcus bovis* entre las bacterias lácticas del pozol durante la fermentación

podría relacionarse con sus características fisiológicas de sobrevivir a valores altos de pH y a temperaturas altas, lo que seguramente promueve su permanencia después del proceso de nixtamalización del maíz, aunque la acidificación de la masa inhibiría su desarrollo durante etapas más avanzadas de la fermentación del pozol. Por otro lado, la capacidad para crecer muy rápido en presencia de almidón y la conversión eficiente de éste en biomasa; podría representar una ventaja ecológica para estas bacterias. Díaz-Ruiz. *et al.*, (2003) también reportaron que *S. bovis* posee una α -amilasa de alto peso molecular, unida a la célula, con mayor actividad a valores de pH cercanos a la neutralidad y con inestabilidad a valores de pH bajos. Utilizando la técnica de PCR-DGGE (Reacción en Cadena de la Polimerasa-Electroforesis en Geles con Gradiente Desnaturalizante), Bolaños. *et al.*, (2004) compararon y evaluaron la diversidad microbiana entre muestras de pozol de diferentes productores de Villahermosa, Tabasco; y observó que existe una mayor variación en la composición microbiológica de pozoles al inicio de la fermentación; sin embargo, al transcurrir el proceso, la estructura de la comunidad evoluciona con el tiempo y las poblaciones mejor adaptadas desplazan a las inicialmente presentes, de tal forma que después de 24 – 72 horas de fermentación, prevalecen los géneros *Streptococcus*, *Weissella*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* y *Leuconostoc*.

1.2.4 Géneros de bacterias lácticas predominantes en el pozol.

1.2.4.1 Género *Streptococcus*.

Los estreptococos son células Gram positivas, esféricas u ovoides, se les encuentra comúnmente en pares o formando cadenas. Estos cocos son anaerobios facultativos, homofermentativos, no forman esporas, son catalasa negativa y poseen requerimientos nutricionales complejos. Usando la técnica del DGGE, a través de la huella de la comunidad microbiana en una muestra de pozol, se encontró que el género *Streptococcus* está presente durante toda la fermentación. La banda más intensa correspondió a especies de *Streptococcus*, siendo *S. bovis* (homología del 99%) la especie predominante (Ampe. *et al.*, 1999). Se demostró que, dentro del grupo de bacterias lácticas amilolíticas del pozol, *Streptococcus* presenta la mayor actividad amilolítica, confirmando así su importancia durante la fermentación (Díaz-Ruiz. *et al.*, 2003). La presencia e importancia de *S. bovis* entre las bacterias lácticas del pozol durante la fermentación podría relacionarse con sus características fisiológicas de sobrevivir a valores altos de pH y a temperaturas altas, las que seguramente promueven su permanencia después del proceso de nixtamalización del maíz y facilitan su desarrollo durante la fermentación del pozol; por otro lado, la capacidad para crecer muy rápido en presencia de almidón y la conversión eficiente de sustrato en biomasa; podría representar una ventaja ecológica para estas bacterias (Díaz-Ruiz. *et al.*, 2003). El género *Streptococcus* incluye cepas capaces de crecer a pH de 9.6, algunas son termodúricas y su crecimiento se inhibe cuando el pH baja (<4) (Schelegel. *et al.*, 2003).

Díaz-Ruiz. *et al.*, (2003) reportaron la presencia de *S. bovis* durante todo el proceso de fermentación del pozol, a pesar de la disminución de pH a valores de 4.8-4.4. Se sugiere que la sobrevivencia de *S. bovis* en masa acidificada podría deberse a la formación de microambientes de pH más alto (mantenidos después del tratamiento alcalino de maíz).

1.2.4.2 Género *Weissella*.

Son células Gram positivas que crecen en pares o formando cadenas cortas, carecen de movilidad, las colonias son pequeñas, son catalasa negativa, aerobios facultativos, heterofermentativas, acidodúricas, crece a 15, 37 y 45°C, pero no a 4°C (Canon. *et al.*, 2020). Las cepas de *Weissella* se han aislado de distintas fuentes y muchas de ellas están asociadas con alimentos tradicionales fermentados.

Las cepas tipo de *W. cibaria* sp. nov., se aislaron del chili bo en Malasia, aunque también se han aislado de muestras clínicas en humanos y en animales (Björkroth, 2002). Las cepas tipo de *W. kimchii*, fueron aisladas del kimchi, que es un platillo fermentado tradicional de Corea elaborado a base de vegetales.

Weissella tiene la capacidad de producir dextrano, característica fenotípica distintiva del género. Las cepas de *W. confusa* se han detectado en azúcar de caña, jugo de zanahoria y ocasionalmente en leche bronca y drenajes (Björkroth, 2002), así como en el pozol (Ampe. *et al.*, 1999).

1.2.4.3. Género *Lactobacillus*.

Los *Lactobacillus* son células heterogéneas que presentan en su DNA un contenido de G (guanina) + C (citocina) del 35-55 % (Björkroth, 2002). Son estrictamente fermentativos y poseen requerimientos nutricionales complejos, crecen en diversos hábitats humanos (cavidades orales, intestino, vagina) y en otros hábitats como: plantas y vegetales, suelo, agua, alimentos fermentados (queso, etc.), en productos elaborados a base de cereales, en alimentos en descomposición, en frutas y vegetales, pescado, leche y sus derivados, carne y productos cárnicos, en bebidas fermentadas, entre otros. Son organismos acidúricos y acidofílicos, que bajan el pH de los alimentos que contienen carbohidratos fermentables hasta 4.0 debido a que producen ácido láctico. Como resultado, frecuentemente inhiben el crecimiento o matan a otras bacterias. Los lactobacilos crecen a un valor máximo de pH de 7.0, sin embargo, existen algunas excepciones dependiendo del sustrato y la cepa. Estos bacilos son usados como cultivos iniciadores para algunas variedades de quesos, en la producción de vinos y cervezas, masas fermentadas, entre otros. (Stiles y Holzapfel, 1997).

1.3. Generalidades del almidón.

El almidón es el principal carbohidrato de reserva sintetizado por las plantas superiores constituyendo una fuente de energía esencial para muchos organismos. Especialmente para el hombre, representa una fracción importante en un gran número de productos agrícolas como los cereales (maíz, trigo, arroz) cuyo contenido de almidón va del 30 al 80%; leguminosas (frijol, chícharo, haba) con un 25 a 50 % de almidón y tubérculos (papa, yuca) en los que el almidón representa un 60 y 90% de la materia seca (Luallen, 1988).

Químicamente, el almidón es un polímero de glucosas unidas unas a otras a través del oxígeno del C1 con el O del C4, a esta unión se le conoce como enlace glucosídico. Al final de la cadena se encuentra un grupo aldehído que forma el extremo reductor. En el almidón se encuentran presentes dos tipos de polímeros de glucosa: la amilosa y la amilopectina. La amilosa es un polisacárido lineal. Cuyas moléculas de glucosa están unidas por enlaces glucosídicos α -1,4, formando cadenas lineales largas. Adquiere espacialmente una conformación tridimensional helicoidal en la que cada vuelta de la hélice consta de seis moléculas de glucosa (Figura 1).

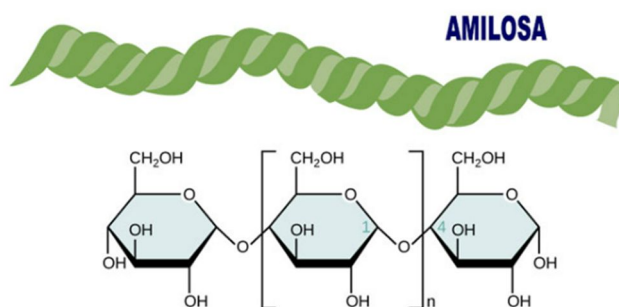


Figura 1. Representación esquemática de la estructura de la amilosa, (Biliaderis, 1991).

La amilopectina se diferencia de la amilosa porque contiene ramificaciones que le dan una forma molecular de un árbol; las ramas están unidas al tronco central (semejante a la amilosa) por enlaces α -D-(1,6), localizadas cada 15-25 unidades lineales de glucosa (Figura 2). Su peso molecular es muy alto ya que algunas

fracciones llegan a alcanzar hasta 200 millones de Daltons. La amilopectina constituye alrededor del 75% de los almidones más comunes.

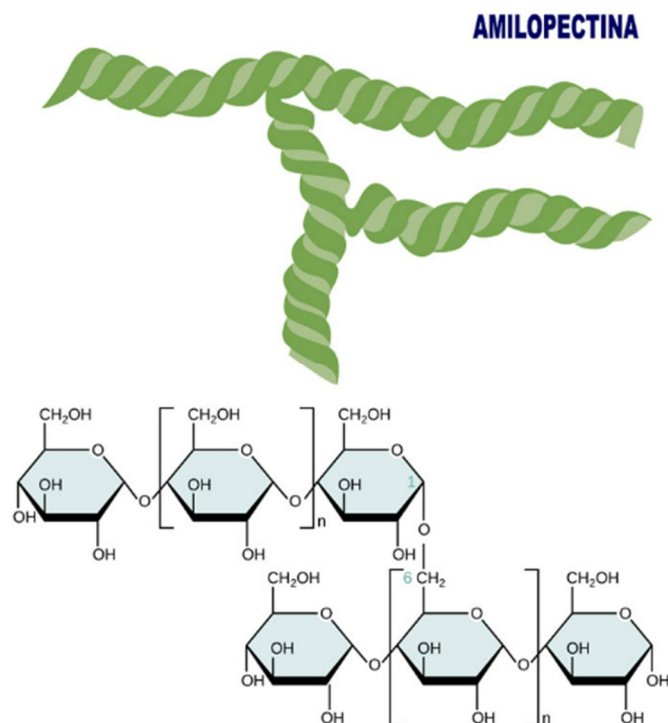


Figura 2. Representación esquemática de la estructura de la amilopectina, (Biliaderis, 1991).

1.3.1. Hidrólisis del almidón.

1.3.1.1 Amilasas y su clasificación.

Amilasa es el término empleado para identificar a un importante grupo de enzimas que se encarga de la hidrólisis de los enlaces glucosídicos entre las moléculas de glucosa presentes en carbohidratos, como el almidón.

Las amilasas se clasifican de acuerdo con el sitio donde son capaces de romper los enlaces glucosídicos como: endoamilasas o exoamilasas. Las primeras hidrolizan enlaces en regiones internas de los carbohidratos, mientras que las segundas solo pueden catalizar la hidrólisis de residuos en los extremos de los polisacáridos.

La clasificación tradicional se relaciona con la estereoquímica de sus productos de reacción, por lo que estas proteínas con actividad enzimática también se clasifican como α -amilasas, β -amilasas o γ -amilasas.

-Las α -amilasas (α -1,4-glucano 4-glucano hidrolasas) son endoamilasas que actúan sobre enlaces internos de sustratos de conformación lineal y cuyos productos poseen configuración α y son mezclas de oligosacáridos.

-Las β -amilasas (α -1,4-glucano maltohidrolasas) son exoamilasas vegetales que actúan sobre enlaces en los extremos no reductores de los polisacáridos como el almidón y cuyos productos hidrolíticos son residuos de β -maltosa.

-Las γ -amilasas también denominadas glucoamilasas (α -1,4-glucano glucohidrolasas) que, al igual que las β -amilasas, son exoamilasas capaces de remover unidades simples de glucosa de los extremos no reductores de los polisacáridos e invertir su configuración. Pueden hidrolizar tanto enlaces α -1,4 como enlaces α ,1-6, convirtiendo sustratos como el almidón a D-glucosa.

Con el arribo de las nuevas técnicas de análisis bioquímico tanto de las enzimas como de sus sustratos y productos (Figura 3), ciertos autores han determinado que existen al menos seis clases de enzimas amilasas (Cripwell, van Zyl, y Viljoen-Bloom, 2020):

1-Endoamilasas que hidrolizan enlaces glucosídicos α -1,4 y que pueden “saltarse” (*bypass*) enlaces α -1,6. Ejemplo de este grupo son las α -amilasas.

2-Exoamilasas capaces de hidrolizar α -1,4 cuyos principales productos son residuos de maltosa y no pueden “saltarse” los enlaces α -1,6. Ejemplo del grupo son las β -amilasas.

3-Exoamilasas capaces de hidrolizar enlaces α -1,4 y α -1,6 como por ejemplo las amiloglucosidasas (glucoamilasas) y otras exoamilasas.

4-Amilasas que solo hidrolizan enlaces glucosídicos α -1,6. En este grupo están enzimas “desramificadoras” y otras conocidas como pululanastas.

5-Amilasas como las α -glucosidasas, que preferencialmente hidrolizan enlaces α -1,4 de oligosacáridos cortos producidos por la acción de otras enzimas sobre sustratos como la amilosa o la amilopectina.

6-Enzimas que hidrolizan almidón hasta polímeros cíclicos no reductores de residuos D-glucosídicos conocidos como ciclodextrinas, como algunas amilasas bacterianas.

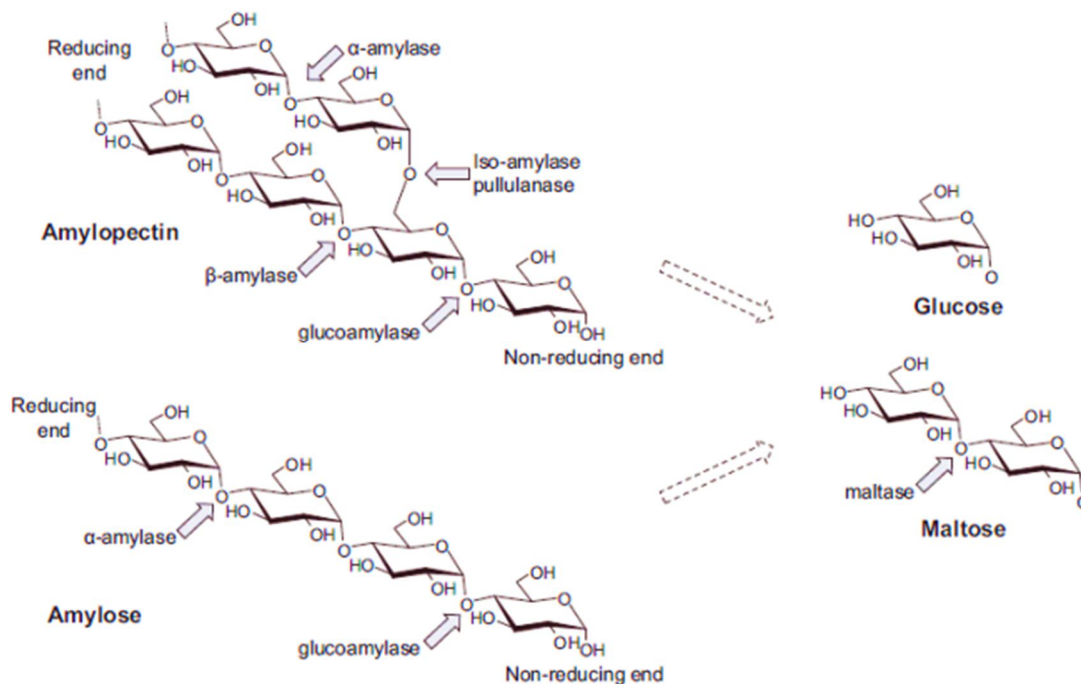


Figura 3. Estructura química de las cadenas de amilopectina y amilosa y los sitios de hidrólisis por los diferentes tipos de amilasas, (Cripwell, van Zyl y Viljoen-Bloom, 2020).

1.4 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) o PCR cuantitativo.

La técnica de PCR ha evolucionado dando lugar a la aparición de una gran variedad de métodos. La PCR a tiempo real (qPCR) es uno de estos métodos basado en la utilización de compuestos fluorescentes, que permite una rápida obtención de los resultados al no requerir de un análisis electroforético posterior de los productos de PCR. Esta técnica proporciona en tiempo real, a medida que transcurre la reacción de PCR, un resultado cuantitativo, ya que la emisión de fluorescencia producida es proporcional a la cantidad de copias de DNA amplificadas en la reacción, es decir, a la carga bacteriana de la muestra. El fundamento de la reacción de PCR a tiempo real o cuantitativa (qPCR) es el mismo que para la PCR tradicional. Por tanto, la

reacción necesitará de los mismos componentes que la PCR, explicada anteriormente.

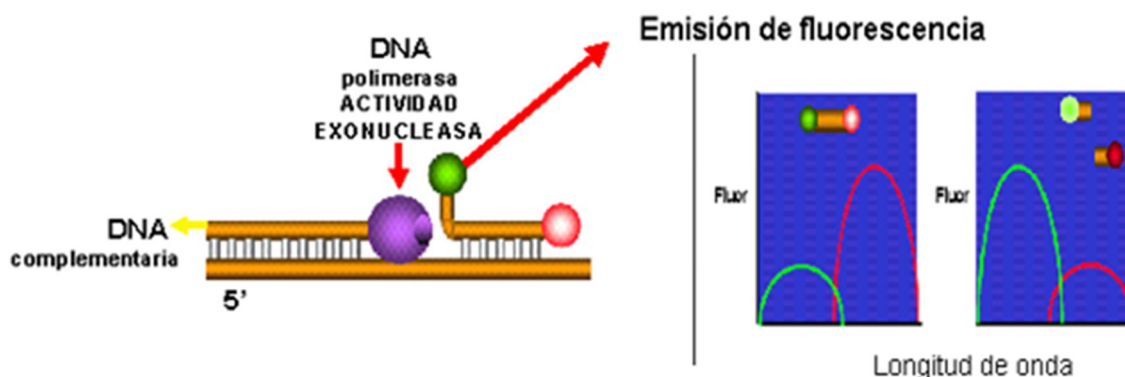


Figura 4. Los fluoróforos utilizados para seguir la amplificación del DNA durante la qPCR pueden ser de dos tipos: a) fluoróforos con afinidad por el DNA y b) sondas específicas para fragmentos del DNA, es decir, que sólo emiten fluorescencia cuando se ha amplificado un fragmento del DNA de interés.

Existen distintos tipos de ensayos de PCR cuantitativa, los cuales se pueden dividir en dos grandes grupos: sistemas no específicos y sistemas específicos (Figura 4). Los sistemas no específicos detectan la presencia o ausencia de amplicones, pero no proporcionan información sobre la identidad de los productos generados, ya que el fluorocromo se une a la doble hebra de DNA independientemente de la secuencia de éste. En este tipo de ensayos se incluyen, por ejemplo, los que utilizan "agentes intercaladores fluorescentes" de la doble cadena de DNA, (como el SYBR Green). Su principal inconveniente es la posibilidad de producir falsos positivos si aparecen productos de qPCR inespecíficos o dímeros de cebadores.

Los sistemas específicos emplean diversos tipos de sondas fluorescentes (TaqMan, "molecular beacons", "scorpions", etc.) que hibridan específicamente en la secuencia del DNA diana. Este tipo de sistemas solo cuantifican la amplificación del DNA específico del microorganismo estudiado.

Este estudio se centró en las sondas TaqMan, que se basan en la utilización de una sonda fluorogénica para detectar un amplicón específico a medida que se acumula durante la qPCR.

La utilización de sondas TaqMan como método de emisión fluorescente, es uno de los métodos específicos más ampliamente utilizados. Este se basa en una sonda fluorescente formada por un fluoróforo y un quencher, que hibrida a la secuencia de interés. De modo que cuando la DNA polimerasa actúa, ésta rompe la unión entre ambos, dando lugar a la liberación de fluorescencia (Torres-Caballero. *et al.* 2013). La PCR con sondas TaqMan exige diseñar los primers específicos para la región genómica de interés, así como las sondas TaqMan para cada segmento. Cada sonda TaqMan poseerá un fluoróforo y un quencher específico, de modo que cuando se produzca la replicación del alelo wild type o del mutado, la señal detectada será característica de cada uno. Esto permite conocer que variante de la secuencia se encuentra en cada medio de reacción (Torres-Caballero. *et al.*, 2020). Este método también se puede combinar con la PCR alelo específica para detectar mutaciones. Para ello, tal y como se muestra en la Figura 5, se basa en generar una reacción competitiva entre el primer específico del alelo que presenta la mutación y el primer específico al alelo wild type (silvestre no mutado). Este último presenta un olinucleótido que bloquea la replicación de este alelo, de modo que la amplificación solo ocurrirá a partir del alelo mutado (Pinilla. *et al.*, 2008).

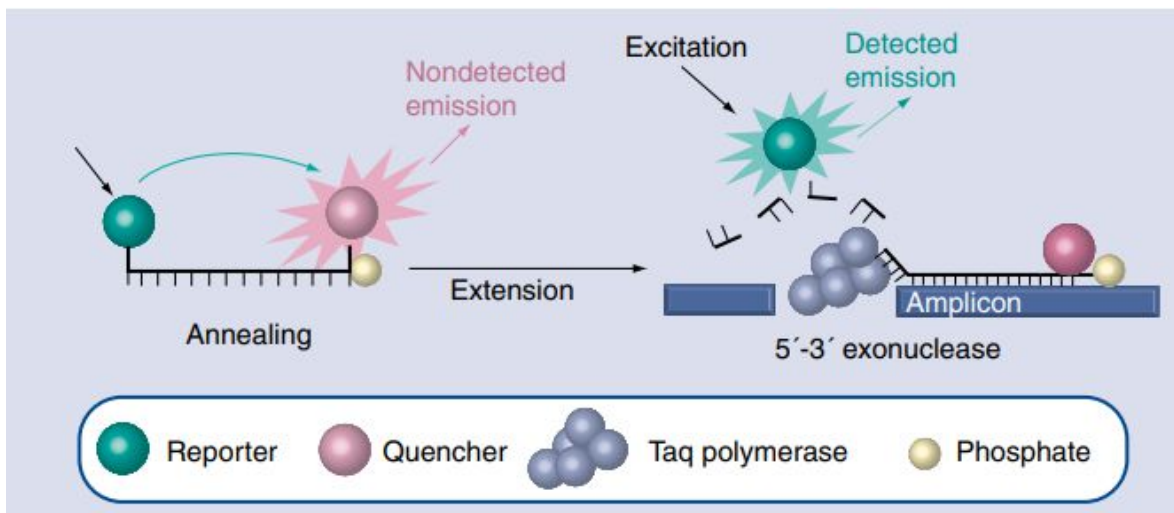


Figura 5. La utilización de las sondas TaqMan asegura que la fluorescencia registrada, corresponda únicamente a la generada por el producto de amplificación, el cual es altamente específico (Pinilla. *et al.*, 2008).

En el qPCR se determina el número del ciclo en el cual se supera un nivel “umbral” por arriba de la línea base (background) o sea cuando un producto de PCR es detectado (Figura 6). Este umbral se llama Threshold (umbral) y cada muestra tiene un Threshold cycle (Ct). Es decir, cuando cruza ese umbral que depende de la cantidad inicial de DNA blanco. En la fase de amplificación exponencial la cantidad de DNA producido y la fluorescencia tienen una relación lineal. El Ct es inversamente proporcional al número de copias del templado (Pinilla. *et al.*, 2008).

Línea de base (background) es la fluorescencia que se ve en los primeros ciclos (3 – 15) hay poco cambio en la fluorescencia, posteriormente empieza a aumentar significativamente con cada ciclo. El umbral o threshold se fija en la parte exponencial, cuando hay un aumento significativo de la fluorescencia por arriba de la línea de base calculada. El método para calcularlo depende de la plataforma de qPCR (equipo). En algunos equipos el software del instrumento usualmente establece el umbral a 10 veces la desviación estándar de la fluorescencia de la línea de base.

La eficiencia de la reacción PCR es muy importante para interpretar correctamente los resultados de la PCR cuantitativa. Depende del ensayo, del rendimiento de la

mezcla maestra y de la calidad de la muestra. Se calcula en función de una curva estándar.

La curva estándar está formada por varias reacciones de PCR cuantitativa realizadas sobre una serie de disoluciones 10X de DNA. La serie de disoluciones puede estar formada por el conjunto de las muestras de DNA con las que vas a experimentar diluidas 10 veces sucesivamente. Para crear una curva estándar, se deben representar los valores de Ct obtenidos de cada disolución (ver la parte superior de la siguiente figura) y cruzarlos con el logaritmo de los factores de dilución (FD) empleados para crear la curva estándar. Por tanto, la curva estándar es la línea de regresión que pasa por estos puntos (parte inferior izquierda de la siguiente figura). La pendiente de la línea de regresión se relaciona con la eficiencia de la amplificación mediante la fórmula detallada en la siguiente figura. Por lo general, se considera que una eficiencia de entre el 80 % y el 110 % es aceptable. Si es del 100 %, significa que la cantidad de producto de la reacción de PCR se está duplicando con cada ciclo. También puedes usar la línea de regresión para determinar la concentración de muestras desconocidas a partir de sus valores Ct.

1.4.1 Cuantificación absoluta

La técnica de cuantificación absoluta relaciona la señal obtenida con la RT-PCR al número de copias fijo de una secuencia de DNA estándar utilizando una curva de calibración.

Las curvas de calibración son altamente reproducibles y permiten la generación de datos específicos y sensibles. Sin embargo, el modelo de curvas de calibración externas tiene que ser rigurosamente validado con absoluta exactitud pues la cuantificación de la expresión genética en la PCR en tiempo real depende exclusivamente de la precisión de los estándares empleados (Bustin. *et al.*, 2005). Además, el diseño de secuencias estándar, su producción y la determinación exacta de sus concentraciones, así como su estabilidad a largo plazo y su almacenamiento son factores complejos y puede presentar algunos problemas. Estas

consideraciones hacen de la cuantificación absoluta un procedimiento laborioso, costoso y que no siempre pueden llevarse a cabo en todos los laboratorios.

Es importante mencionar que la eficiencia de la qPCR es la capacidad de la reacción de duplicar el número de copias de las cadenas de DNA o cDNA en cada ciclo (Pfaffl. 2001).

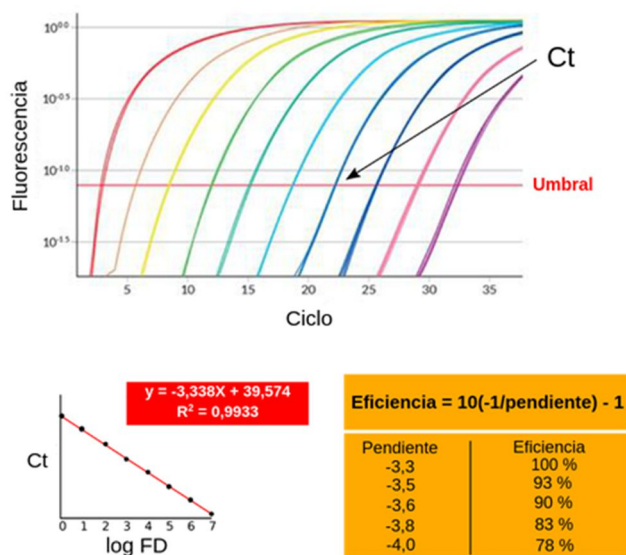


Figura 6. Gráfica que representa la fluorescencia detectada durante el experimento de qPCR, en función de los ciclos se obtiene una curva sigmoidea. Esta curva se realiza con diluciones 1/10 de un templado, entre más diluida la muestra, se necesitan más ciclos para ver señal (Pfaffl. M.W. 2001).

JUSTIFICACIÓN

En una encuesta realizada en un trabajo previo, se encontró que el 80% de las personas entrevistadas en Villahermosa, Tabasco, usarían una papilla a base de maíz nixtamalizado como primer alimento de destete para los infantes de comunidades mestizas (Rio, 1999). En este trabajo se propone comprender aspectos fisiológicos y ecológicos de las bacterias lácticas amilolíticas con el objeto de aplicar tecnologías simples y culturalmente aceptables para lograr una reducción en la viscosidad de los alimentos de destete a base de nixtamal. El pozol es una bebida fermentada de maíz, tradicional, muy popular y apreciada en el sureste del país, que podría ser utilizada primer alimento en niños pequeños de las comunidades indígenas.

HIPÓTESIS.

1. Las bacterias lácticas amilolíticas promoverán el desarrollo de las bacterias lácticas no amilolíticas.
2. Las bacterias lácticas amilolíticas en cultivo mixto hidrolizarán con mayor rapidez el almidón que en cultivo puro.

OBJETIVOS.

Objetivo general.

Comprender las interacciones entre las BALA y las BAL en un modelo líquido.

Objetivos específicos.

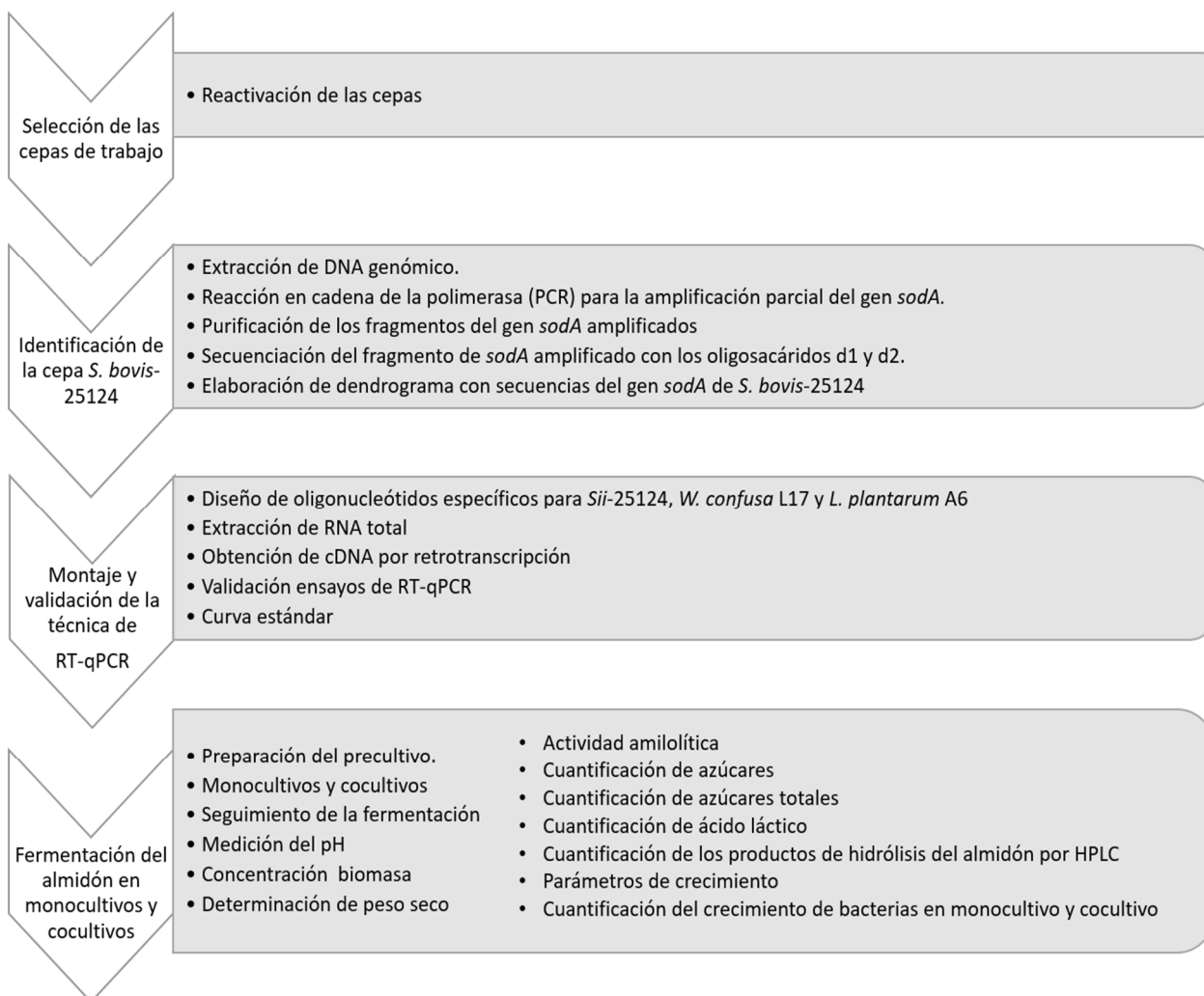
- Confirmar la identidad de *Streptococcus* cepa 25124.

- Validar un método para cuantificar en cultivo puro y en cultivo mixto, el crecimiento de cada BAL previamente seleccionada.

- Determinar si las BALA al hidrolizar el almidón promueven el desarrollo de las BAL.

Capítulo 2. MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo está dividido en cuatro partes: I. Selección de cepas de trabajo; II. Identificación de la cepa *S. bovis*-25124; III. Montaje y validación de la técnica RT-qPCR; IV. Fermentación del almidón en monocultivos y cocultivos.



2.1 Cepas de trabajo.

Para el experimento se seleccionaron las cepas *Streptococcus bovis*- 25124 y *Weissella confusa* L17 (Díaz-Ruiz. *et al.*, 2003; Flores-Espinosa, 1996) de la colección criogénica de microorganismos del pozol de Villahermosa, Tabasco; que se encuentra en el laboratorio 324 del Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química de la UNAM. También se trabajó con la cepa *Lactiplantibacillus plantarum* A6 (Giraud. *et al.*, 1991), proporcionada por el Dr. Jean Pierre-Guyot, del Institut de Recherche pour le Développement, Montpellier, France.

Tabla 1. Cepas seleccionadas para desarrollar el proyecto.

Cepa	Fuente origen	Condiciones de cultivo
<i>Streptococcus bovis</i> - 25124 (<i>Sii</i> -25124)	Pozol (Díaz-Ruiz <i>et al.</i> , 2003)	Amilolítica
<i>Weissella confusa</i> L17 (<i>W. confusa</i> L17)	Pozol (Flores-Espinosa, 1996)	No-Amilolítica
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> A6 (<i>Lb. plantarum</i> A6)	Yuca (Giraud. <i>et al.</i> , 1991)	Amilolítica

2.1.2 Reactivación de las cepas.

Las cepas se encontraban conservadas en glicerol (20% glicerol y 80% cultivo en caldo MRS) y almacenadas a temperatura de -70°C.

Para la reactivación de *S. bovis* 25124 y *Lb. plantarum* A6, se tomó por separado 1mL de la muestra conservada en glicerol y se inoculó en 10 mL de medio MRS-A (2% de almidón soluble de papa, Prolabo-Merck Eurolab) modificado: triptona (10 g/L; BD-Difco, Sparks, MD, EE. UU.), citrato de amonio (2.17 g/L; JT Baker, Phillipsburg, NJ, EE. UU.), acetato de sodio (5 g/L; JT Baker, Phillipsburg, NJ, EE. UU.), sulfato de magnesio heptahidratado (0.207 g/L; Sigma, St. Louis, MO, EUA), sulfato de manganeso (0.056 g/L; Sigma, St. Louis, MO, EUA), fosfato dipotásico (2.62 g/L; JT Baker, Phillipsburg, NJ, EUA), extracto de carne (10 g/L; BD-Difco, Sparks, MD, EE. UU.), extracto de levadura (5 g/L; BD-Difco, Sparks, MD, EE. UU.).

La activación de *W. confusa* L17 se realizó tomando 1 mL de la cepa conservada en glicerol e inoculándolo en 10 mL de medio MRS (Prolabo-Merck Eurolab).

Todas las cepas se incubaron a 30°C durante 24 h. Para la preparación de los inóculos, se transfirieron 10 mL de las cepas previamente activadas a 100 mL de MRS-A (modificado) o MRS glucosa (Tabla 1) y se incubaron a 30°C durante 12 horas. Los cultivos se utilizaron como iniciadores para los siguientes experimentos.

6.1.2.3 Comprobar la pureza de *W. confusa* L17 y de *Lb. plantarum* A6.

6.1.2.1 Extracción y purificación de DNA de las cepas puras.

Posterior a la reactivación de la cepa y después del período de incubación, se transfirió una alícuota de 1 mL a un tubo de ensayo con 9 mL de caldo APT, incubándose durante 24h a 30°C. Pasado el tiempo de incubación, se recuperó 1 mL de cultivo y se colocó en un microtubo, se trabajó por duplicado. Las células se centrifugaron a 14 000 rpm (centrífuga HERMLE Z160M) durante 10 min, se descartó el sobrenadante y el procedimiento se realizó dos veces más. Tras el último ciclo de centrifugación, se retiró con micropipeta el medio de cultivo remanente, con mucho cuidado de no extraer parte del pellet. A continuación, se adicionaron 500 mL de SSI (solución salina isotónica), resuspendiendo el pellet por agitación, por último, se centrifugó a 14 000 rpm durante 5 minutos. Se retiró la SSI remanente con micropipeta y el pellet se mantuvo a -20°C hasta el momento de la extracción de DNA.

Para la extracción del DNA, por separado, el pellet de cada bacteria fue depositado en un tubo. Se adicionó 20 µL de solución de lisozima [20 µg//µL], se incubó a 37°C durante 15 min o hasta visualizar viscosidad. Se adicionó 8 µL de solución de pronasa [10 µg/µL] y 8 µL de RNAsa [20 µg/µL]. Se agitó los tubos y se incubó a 65°C por 1h. Se adicionó 120 µL de SDS al 10% (p/v) a cada tubo y se incubó a 65°C durante 10 minutos. Los tubos se dejaron enfriar y se adicionó 600 µL de solución de fenol:cloroformo (25:24), se agitó vigorosamente hasta obtener una emulsión blanca. Se centrifugaron durante 10 min a 14000 rpm. Se recuperó la

primera fase acuosa y se colocó en un microtubo nuevo. Se adicionó 1 mL de etanol absoluto frío (-20 °C), se agitó suavemente cada muestra. Se centrifugó durante 10 minutos a 10000 rpm. Se retiró el sobrenadante con micropipeta y se dejó secar los precipitados. Se resuspendió en 50 µL de agua desionizada estéril y después se congelaron a -21°C.

Se comprobó la calidad de la extracción de DNA de las cepas mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (p/v) y buffer TBE [1X], revelada con una solución de bromuro de etidio y observada usando el Fluor-S (BIORAD).

6.1.2.2 Amplificación por PCR de un fragmento del gen RNAr 16 S y secuenciación de la región V1.

Se amplificó la región V1 del gen RNAr 16S utilizando los oligonucleótidos universales pA y 3, para bacterias (Tabla 2), bajo las condiciones mostradas en las Tablas 2 y 3, utilizando un termociclador Perkin Elmer 2400.

Tabla 2. Oligonucleótidos usados para secuenciar la región V1 del gen RNAr 16S.

Oligo	Secuencia 5'-3'	Posición	Orientación
pA	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	9-28	Reversa
3	GTTGCGCTCGTTGCGGGACT	1109- 1090	Hacia adelante
γ	ACTGCTGCCTCCCGTAGGAG	358-339	Hacia adelante

Tabla 3. Protocolo para amplificar por PCR el fragmento V1 del gen RNAr 16S.

Componente	Volumen [μL]	Concentración en la reacción
Buffer para PCR 10X	10	1 X
MgCl ₂	5	50 mM
dNTPs	2	10 mM
Primer 3	1	20 pmol/ μL
Primer pA	1	20 pmol/ μL
Templado	10	10 ng/ μL
Taq polimerasa	2	1 U/ μL
Agua destilada	Para 100	-----

(Muyzer. *et al.*, 1993).

Se visualizaron los productos de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, se revelaron con una solución de bromuro de etidio y se observaron a través del Fluor-S (BIORAD).

2.1.2.3. Limpieza de los productos de PCR de las cepas puras.

Los productos de PCR de las cepas fueron purificados utilizando el KIT PCR CLEAN-UP de Qiagen, siguiendo las instrucciones del proveedor.

2.1.2.4 Secuenciación.

Los productos de PCR se enviaron a secuenciar con el cebador gamma (γ) que incluyeron la región hipervariable V1 (Tabla 2) al Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Las condiciones requeridas para la secuenciación se muestran en las Tablas 4 y 5.

Tabla 4. Condiciones solicitadas para la secuenciación de cepas. Instituto de Fisiología Celular-UNAM.

Muestra	Concentración	Volumen
pA	20 ng/ μL	100 μL
3	20 ng/ μL	100 μL

Tabla 5. Concentración de reactivos utilizados para la amplificación del gen *sodA* mediante PCR.

	Concentración	Volumen
Muestra (cepas)	20 ng/ μ L	20 μ L
Cebador gamma (γ)	20 pm/ μ L	20 μ L

2.1.2.5 Comparación de secuencias.

La base de datos utilizada para comparar las secuencias de cepas de pozol fue el National Center for Biotechnology Information (<http://ncbi.nih.gov/>), como se reportó previamente.

2.2 Identificación de la cepa *S. bovis*-25124.

Se realizó el mismo procedimiento descrito en el punto 2.1.2.1.

2.2.1 Extracción de DNA genómico.

El DNA total de *S. bovis* 25124 se extrajo siguiendo el protocolo descrito por Lawson. *et al.* (1989). La confirmación de la extracción del DNA genómico a través del gel de agarosa y electroforesis horizontal, también se realizaron conforme a lo descrito por el mismo autor.

El DNA se analizó mediante la electroforesis en geles horizontales de agarosa (Pronadisa), a concentraciones del 0,8% al 2% en buffer TBE x 0,5, y una posterior tinción en una solución de bromuro de etidio para su visualización.

2.2.1.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación parcial del gen *sodA*.

Se amplificó un fragmento interno del gen *sodA* (I: inosina; R: adenina o guanina; Y: citosina o timina) de 480 pb que codifica a la superóxido dismutasa dependiente de manganeso (SOD-Mn) en estreptococos y en enterococos. Se utilizó un par de oligonucleótidos degenerados para los dominios I y II: **d1** CCITAYICITAYGAYGCIYTIGARCC; y **d2** ARRTARTAIGCRTGYTCCCAIACRTC (Poyart. *et al.*, 1995). El programa utilizado tuvo una desnaturalización inicial de

3min a 95°C, 30 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30s, alineamiento a 37°C durante 60s y extensión a 72°C durante 60s (termociclador Perkin Elmer 2400). En la Tabla 6 se enlistan los reactivos y las condiciones de la reacción.

Para la confirmación de la amplificación del DNA por PCR, se elaboró un gel de agarosa al 1.5% y se corrió una electroforesis (BioRad, México) con 70V durante 90 minutos, posteriormente los productos de PCR se revelaron con una solución de bromuro de etidio, observándolos a través del equipo Fluor-S (BIORAD).

Tabla 6. Concentración de reactivos utilizados para la amplificación del gen *sodA* mediante PCR.

Reactivo	Concentración del reactivo	Concentración del reactivo en tubo de reacción	µL
Buffer de la enzima	10x	1 x	5
MgCl ₂	25 mM	1.5 mM	3
dNTPs	10 mM	0.2 mM	1
Oligo d1	-----	0.5 mM	1
Oligo d2		0.5 mM	1
Taq polimerasa		1 /mL	1
DNA*	variable	variable	10
Agua destilada		-----	9

*DNA ~250 ng/µL (Poyart. *et al.*, 1995).

2.2.1.2 Purificación de los fragmentos del gen *sodA* amplificados.

El producto de PCR fue purificado utilizando el KIT PCR CLEAN-UP de Qiagen, siguiendo las instrucciones del proveedor. Posteriormente se etiquetaron los microtubos que contenían 1mL del producto de PCR y se enviaron a secuenciar al Instituto de Fisiología Celular-UNAM. Se entregaron 40 µL de muestra con una concentración de 50ng/µL, 100 µL de cada uno de los oligonucleótidos a una concentración de 20pm/µL (Figura 7).

SOLICITANTE: Sandra Bolaños Núñez

DEPARTAMENTO: Alimentos y Biotecnología, Lab 324. Conjunto E, Fac. Química.

TELÉFONO DE CONTACTO: 55 56225315

CORREO ELECTRÓNICO: wacher@unam.mx

FECHA: 19/02/2007

SOLICITUD DE SECUENCIACIÓN DE PRODUCTO DE PCR Instituto de Fisiología Celular-UNAM.

Muestra	Concentración de DNA	Volumen [μL]
<i>S. bovis</i>	50 ng/ μL	40
Oligonucleótido D1	20 pm/ μL	100
Oligonucleótido D2	20 pm/ μL	100

Secuencia de Oligonucleótido D1: CCITAYICITAYGAYGCIYTIGARCC

Secuencia de Oligonucleótido D2: ARRTARTAIGCRTGYTCCCAIACRTC

IMAGEN DEL GEL DE AGAROSA.

Se colocaron 2 μL de muestra en cada pozo

MM- Marcador molecular

Pb- pares de bases

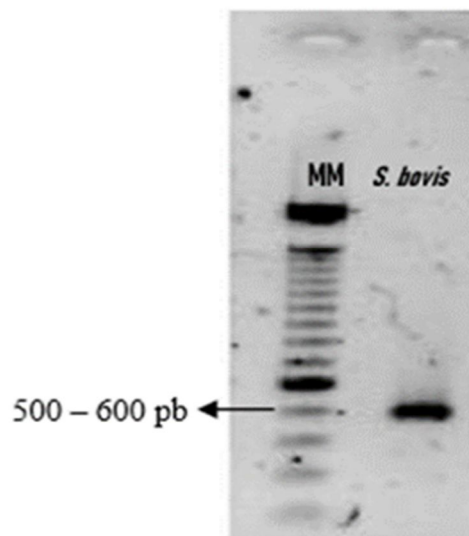


Figura 7. Formato de Solicitud enviada al Instituto de Fisiología Celular-UNAM para la secuenciación del fragmento de *sodA* amplificado con los oligonucleótidos D1 y D2. Se especifican los pormenores requeridos por el proveedor.

2.2.1.3 Secuenciación del fragmento de *sodA* amplificado con los oligonucleótidos *d1* y *d2*.

El Instituto de Fisiología Celular de la UNAM entregó los resultados en formato Fasta. Las secuencias resultantes fueron comparadas con las secuencias de la base de datos del **NCBI** (National Center of Biotechnology Information, EE. UU) mediante la herramienta Blast (utilizando el modo Highly similar sequences, algoritmo megablast y Somewhat similar sequences, algoritmo blastn) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

2.2.1.4 Elaboración de dendrograma con secuencias del gen *sodA* de *S. bovis*-25124.

Para la elaboración de dendrogramas se utilizaron los programas BioEdit Sequence Alignment Editor y MEGA 3.1 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis), y el algoritmo Neighbour Joining (con un Bootstrap de 10000 réplicas en el modelo de 2 parámetros de Kimura).

2.3 Montaje y validación de la técnica de RT-qPCR.

2.3.1 Diseño de oligonucleótidos específicos para *Sii-25124*, *W. confusa* L17 y *Lb. plantarum* A6

Los oligonucleótidos y la sonda utilizados en este ensayo se solicitaron diseñar al proveedor Applied Biosystems mediante el software Primer Express 2.0 (Applied Biosystems). El gen blanco al que se dirigen estos oligonucleótidos, fue el RNAt que codifica para el aminoácido de fenilalanina. La sonda utilizada para este experimento fue del tipo TaqMan[®].

2.3.2 Extracción de RNA total

El RNA de las cepas en estudio (*Sii-25124*; *Lb. plantarum* A6; *W. confusa* L17) se extrajo por separado y por duplicado. Se usó el KIT comercial Real Total RNA From Bacteria and Yeast (ref. RBMER04).

A un tubo de 1.5 mL se añadió 1mL de un cultivo bacteriano de 24h de crecimiento. Se centrifugó a 14 000 rpm durante 30 segundos, eliminando el sobrenadante. A

continuación, se resuspendieron las células en 540 µl de agua libre de nucleasas o EDTA 50 mM. Se adicionaron 60 µl de Lisozima (10 mg/mL) para debilitar la pared celular y hacer más eficiente la lisis celular. A continuación, la muestra se incubó a 37°C durante 60 minutos (Invertir la muestra periódicamente durante la incubación). Posteriormente, se centrifugó a 14 000 rpm durante 2 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se adicionaron al pellet celular 600 µl de Solución de Lisis (ER01B). Se pipeteó para resuspender y lisar las células. Se incubó la muestra a 65°C durante 5 minutos. A continuación, la muestra se dejó enfriar a temperatura ambiente, se adicionaron 300 µl de Solución Precipitación de Proteínas (ER02B) (Invertir el tubo unas 8-10 veces). La muestra se incubó en hielo durante 5 minutos. Se centrifugó a 14 000 rpm durante 5 minutos. Se observó la formación de un pellet (precipitado proteico). Se pasó el sobrenadante que contenía el RNA a un tubo con 600 µl de Isopropanol. Se mezcló por inversión varias veces. Se centrifugó a 14 000 rpm durante 3 minutos.

Se eliminó el sobrenadante y se adicionaron 600 µl de etanol 70 % (invertir varias veces para lavar el pellet de RNA). Se centrifugó a 14 000 rpm durante 2 minutos. Se eliminó cuidadosamente el etanol remanente evitando dañar al pellet. Durante 15 minutos se dejó invertido el tubo para su secado. Posteriormente se adicionaron 100 µl de Solución de Rehidratación (ER03) y se dejó el tubo con la muestra durante 30 minutos en hielo para asegurar la rehidratación del RNA. Posteriormente, se mantuvo la muestra a -70°C.

La calidad e integridad del RNA extraído se determinó con el equipo NanoDrop (NanoDrop 2000 Spectrophotometer, Thermo Scientific, AccesoLab, México).

2.3.3 Obtención de cDNA por retrotranscripción (RT-PCR)

Para la síntesis de cDNA se realizó una RT-PCR por separado y por triplicado para cada una de las cepas en estudio (*Sii-25124*; *Lb. plantarum* A6; *W. confusa* L17). Se utilizaron 3 µg de RNA. Para la transcripción reversa se utilizó el KIT High capacity cDNA reverse transcription (Ref. 200820; Thermo Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones del proveedor. Después de la PCR, las 3 réplicas de cada mezcla de RNA se colectaron en un mismo tubo y se purificaron con el KIT

QIAquick PCR Purification (Ref:K310001; QIAGEN) siguiendo el protocolo indicado por el fabricante y eluyendo las muestras en un volumen final de 30 μ l de agua DEPC.

El cDNA obtenido se cuantificó en el equipo NanoDrop (NanoDrop 2000 Spectrophotometer, Thermo Scientific, AccesoLab, México), obteniéndose concentraciones de 1000 a 3000 ng.

2.3.4 Validación ensayos de RT-qPCR.

2.3.4.1 Curva estándar.

Se tomo una muestra de cDNA de cada cepa (*Sii-25124*; *Lb. plantarum* A6; *W. confusa* L17), se realizó una curva de calibración con ocho concentraciones de DNA conocidas, se hicieron diluciones seriadas: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8} ng/ μ l, y tres réplicas por dilución. Se representó gráficamente el valor de Cq obtenido frente al logaritmo en base 10 de la concentración del cDNA y los puntos de la curva se ajustaron a una recta mediante una regresión lineal. A partir de la pendiente de la curva estándar se determinó la eficiencia de la reacción de amplificación mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Eficiencia} = 10^{(-1/\text{pendiente})} - 1.$$

Asimismo, el coeficiente de correlación R^2 obtenido en la regresión lineal se utilizó para determinar la linealidad del ensayo de qPCR.

El límite de detección (LOD) de un ensayo se corresponde con la menor concentración de DNA (en equivalentes de genoma completo por reacción) que se detecta de forma reproducible con una probabilidad del 95%. Así, para 20 repeticiones, el límite de detección fue aquel nivel más bajo que presentó uno o ningún resultado negativo. Para la determinación del *cutoff value*, se calculó el Cq medio del LOD + 2 veces la desviación estándar ($X + 2SD$) y el resultado se redondeó al número entero más próximo.

Las corridas se realizaron en el equipo 7500 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems), siguiendo las condiciones sugeridas por el proveedor (Applied Biosystems) Part Number 4331348, que se encuentran en la Tabla 7.

Tabla 7. Componentes para las reacciones de RT-qPCR Applied Biosystems 7500.

Concentración	Reactivo	μL /Rx	No Rx's
2X	Master Mix	10	50
20X	Ensayo (oligonucleótidos + TaqMan®)	1	50
	Agua grado molecular	4	50
	Stock (DNA)	5	50
		20 total	3 Rx c/u

2.4 Fermentación del almidón en monocultivos y cocultivos.

2.4.1 Preparación del precultivo.

El precultivo se obtuvo inoculando 10 mL del cultivo de la cepa activada en 100 mL de MRS-A (2% de almidón soluble de papa, Prolabo-Merck Eurolab) para *Sii-25124* y para *Lb. plantarum* A6. En el caso de *W. confusa* L17, se inocularon 10 mL del cultivo de la cepa activada en 100 mL de MRS (Prolabo-Merck Eurolab). Posteriormente las cepas se incubaron por 12h a 30°C (Figura 8).

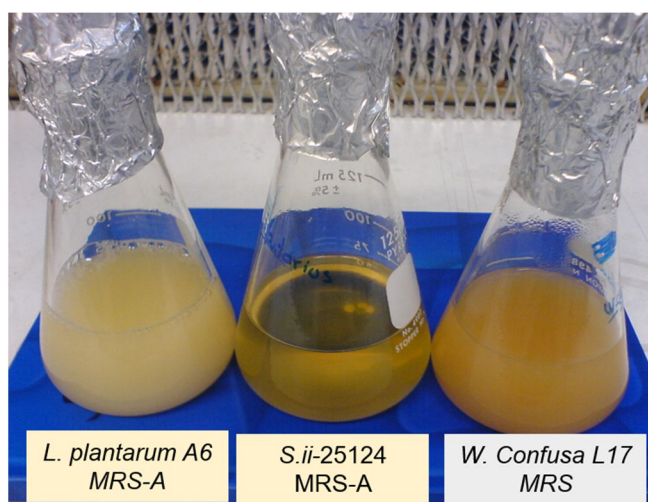


Figura 8. Preparación de precultivos de *Lb. plantarum* A6, *Sii-25124*; y *W. confusa* L17.

2.4.2 Monocultivos y cocultivos.

2.4.2.1 Monocultivos.

Para las cepas de *Sii-25124* y de *Lb. plantarum* A6, se prepararon por triplicado cultivos en matraces de 1 L con 800 mL de medio MRS con almidón soluble de papa, Prolabo-Merck Eurolab, (20 g/L) en lugar de glucosa. Del precultivo, se inoculó el volumen necesario hasta obtener una concentración de 1×10^6 UFC/mL, correspondiente a una densidad óptica de 600 nm (DO_{600nm}) de 0.1

Para la cepa de *W. confusa* L17, se prepararon por triplicado cultivos en matraces de 1 L con 800 mL de medio MRS (glucosa), Prolabo-Merck Eurolab. Del precultivo, se inoculó el volumen necesario hasta obtener una concentración de 1×10^6 UFC/mL, correspondiente a una densidad óptica de 600 nm (DO_{600nm}) de 0.1

Se incubaron en condiciones estáticas durante 24h a 30°C (Tabla 8).

Tabla 8. Cepas utilizadas en monocultivo (cultivo puro).

No	Monocultivos	Clasificación	
1	<i>Sii-25124</i>	Bacteria ácido-láctica amilolítica	BALA
2	<i>W. confusa</i> L17	Bacteria ácido-láctica No amilolítica	BAL
3	<i>Lb. plantarum</i> A6	Bacteria ácido-láctica amilolítica	BALA

2.4.2.2 Cocultivos

Se trabajó con tres cultivos mixtos o cocultivos integrados por: a) *Sii-25124* y *L. plantarum* A6, b) *Sii-25124* y *W. confusa* L17, c) *Lb. plantarum* A6 y *W. confusa* L17.

Se realizaron cultivos en matraces de 1 L con 800 mL de medio MRS con almidón soluble de papa, Prolabo-Merck Eurolab, (20 g/L) en lugar de glucosa (Tabla 9). Del precultivo, se inoculó el volumen necesario en una proporción de 1:1 hasta obtener una concentración de 1×10^6 UFC/mL, correspondiente a una densidad óptica (600 nm) de 0.1

Se incubaron en condiciones estáticas durante 24h a 30°C.

Tabla 9. Cepas utilizadas en cocultivo (cultivo mixto).

No	Cocultivos	Interacción
1	<i>Sii-25124</i> + <i>Lb. plantarum</i> A6	BALA + BAL
2	<i>Sii-25124</i> + <i>W. confusa</i> L17	BALA + BAL
3	<i>Lb. plantarum</i> A6 + <i>W. confusa</i> L17	BALA + BAL

2.4.3 Seguimiento de la fermentación.

Se evaluó el crecimiento de las bacterias en monocultivo (cultivo puro) y en cocultivo (cultivo mixto) durante 24h. A partir del tiempo cero y hasta las 7.0 horas, se colectaron muestras cada 30 minutos. A partir de las 8.0 horas y hasta las 12 horas, se tomaron muestras cada hora. A las 24 horas se tomó una muestra final. La fermentación se realizó por triplicado (Figura 9).



Figura 9. Preparación de cultivos de *Lb. plantarum* A6, *Sii-25124* y *W. confusa* L17.

2.4.3.1 Medición de pH.

La medición del pH se realizó en cada toma de muestra. Se hizo por triplicado utilizando un potenciómetro Jenway 3020 a 25°C.

2.4.3.2 Determinación de la concentración de la biomasa (peso seco vs a una DO_{600nm}).

Para cada cepa se realizó una curva de calibración que relacionó la DO_{600nm} y el peso seco celular. La concentración de biomasa se determinó midiendo la DO_{600nm} con espectrofotómetro Spectronic 21D (Milton Roy) y se relacionó con el peso seco medido después de dos ciclos de lavado y centrifugación, seguido de una etapa de secado a 80°C durante 24 h. Posteriormente, se realizó una curva de calibración entre la densidad óptica y el peso seco (Anexo I).

2.4.3.3 Actividad amilolítica.

La cuantificación de la actividad amilolítica en monocultivo (excepto *W. confusa* L 17) y en cultivo mixto, se inició centrifugando 10 mL del caldo fermentado a 10,000 rpm, 4°C durante 15 min.

Para detectar la actividad amilasa unida a las células de *Sii-25124*, se recuperaron los sedimentos celulares, se lavaron y se suspendieron en buffer de fosfatos 0.1 M (pH 6.8).

La actividad de la amilasa se ensayó a pH 6.8 y 37°C midiendo la capacidad del almidón de formar complejos con yodo como describen Agati. *et al.* (1998). Una

unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar 10 mg de almidón en 30 minutos (Anexo II).

Para cuantificar la actividad amilolítica de *Lb. plantarum* A6, se centrifugaron 10 mL de caldo fermentado a 10,000 rpm, 4°C por 15 min, y el sobrenadante libre de células se recuperó como un extracto de enzima crudo. La actividad enzimática se ensayó a pH 5.0 y 65°C utilizando el método de extinción de almidón-yodo (Anexo II).

Se comprobó la falta de actividad amilolítica de *W. confusa* 17 en las células y en el sobrenadante.

2.4.3.4 Cuantificación de azúcares reductores por DNS.

Se usó el método de ácido 3,5- dinitro-salicílico (DNS) (Miller, 1959) con glucosa como estándar, leyendo a una longitud de onda de 584 nm (Anexo III).

2.4.3.5 Cuantificación de azúcares totales (fenol-sulfúrico)

Se usó el método fenol-ácido sulfúrico (Dubois. *et al.*, 1956) con glucosa como estándar, leyendo a una longitud de onda de 490 nm (Anexo III).

2.4.3.6 Cuantificación de ácido láctico.

Las muestras se centrifugaron para separar las células (10 000 rpm durante 15 min a 4°C) y se filtraron con membranas de 0.22 µm de tamaño de poro (Millipore GSWP). Las muestras filtradas se analizaron en un cromatógrafo de líquidos Perkin Elmer 250, a éste se le conectó una columna de intercambio iónico (BIORAD Aminex HPX-87H, 300 x 7.8 mm) a 50°C. Se utilizó como fase móvil H₂SO₄ [0.01N] con un flujo de 0.58 mL/min; y como estándar se utilizó L-lactato (Sigma L-2250).

2.4.3.7 Cuantificación de los productos de hidrólisis del almidón por HPLC.

Las muestras se centrifugaron a 10,000 rpm durante 10 min y los sobrenadantes se filtraron a través de un filtro de membrana Millipore de 0.22 μm (EMD Millipore, Billerica, MA, EE. UU.). El ácido láctico se determinó con un sistema de cromatografía líquida (Perkin Elmer 250, Norwalk, CT, EE. UU.), equipado con un detector de índice de refracción (Perkin-Elmer 30, Norwalk, CT, EE. UU.), se utilizó una columna Aminex HPX-87H de exclusión aniónica (300 7,8 mm; Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.) y ácido sulfúrico (0.01 N) como fase móvil a un flujo de 0.6 mL/min y una temperatura de columna de 50°C. Se utilizó como estándar L-lactato (L-222; Sigma, Saint Louis, MO, EE. UU.).

El análisis de los productos de hidrólisis de la fermentación del almidón se realizó con cromatografía de líquido de alta eficiencia equipada con un detector de índice de refracción y una columna Prodigy 5 ODS 2 C18 (250 4,6 mm; Phenomenex, Torrance, CA, EE. UU.). Los productos se eluyeron con agua a un flujo de 0,8 mL/min y una temperatura de columna de 35 °C. La glucosa, maltosa, maltotriosa, maltotetraosa, maltopentaosa, maltohexaosa y maltoheptaosa se identificaron comparando su tiempo de retención con estándares (Sigma, Saint Louis, MO, EE. UU.).

2.4.3.8 Parámetros de crecimiento.

La velocidad específica máxima de crecimiento (μ_{max}) se determinó durante la fase de crecimiento exponencial como pendiente de la recta obtenida mediante la regresión lineal del \ln de la biomasa vs tiempo (Calderón. *et al.*, 2001). Los rendimientos de producto y de crecimiento ($Y_{\text{lac/s}}$, $Y_{\text{x/sv}}$ respectivamente) relativos al sustrato, se calcularon como la pendiente de las regresiones lineales, ya fuera del ácido láctico o de la biomasa vs sustrato residual. De manera equivalente, graficando los productos vs. la biomasa, se calcularon los rendimientos de amilasa y de ácido láctico respecto a la biomasa ($Y_{\text{amy/x}}$ y $Y_{\text{lac/x}}$ respectivamente).

Todos los cálculos se realizaron con los datos obtenidos durante la fase exponencial de crecimiento. Las velocidades específicas de producción de ácido láctico y de

producción de amilasa (q_p , q_{amy} respectivamente), así como las de consumo de sustrato (q_s) se calcularon de acuerdo con lo reportado por Pirt (1985): $q_p = Y_{p/x} \mu$ (μ para producto, por ejemplo, ácido láctico o amilasa) y $q_s = \mu / Y_{x/s}$).

Se determinaron diferencias significativas entre los cultivos puros y mixtos, para los parámetros cinéticos mediante análisis de varianza de una vía (LSD, = 0,05) utilizando el software estadístico Statgraphics Centurion XVI.I.

2.4.3.9 Cuantificación del crecimiento de bacterias en monocultivo y en cocultivo.

Las corridas se realizaron en el equipo 7500 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems), siguiendo las condiciones sugeridas por el proveedor (Applied Biosystems) Part Number 4331348, que se encuentran en la Tabla 5.

Se preparó la mezcla de reactivos para el número de reacciones deseadas. En este caso la mezcla fue para 77 reacciones de 20 μ L de volumen final.

1.- En un microtubo de 0.6 mL se preparó una mezcla de reacción con los componentes mencionados en la Tabla 10, con excepción del DNA.

Tabla 10. Componentes para las reacciones de RT-qPCR Applied Biosystems 7500.

Concentración	Reactivo	μ L /Rx	No Rx's	Volumen (μ L)
2X	Master Mix	10	77	770
20X	Ensayo (oligonucleótidos + TaqMan®)	1	77	77
	Agua grado molecular	4	77	308
	Stock (DNA)	5	77	385
		20 total	3 Rx c/u	1612 mix total

2.- Se repartieron 15 μ L de la mezcla de reacción descrita en el punto anterior a cada pozo de una microplaca para qPCR de 96 pozos para Applied Biosystems 7500, hasta completar los 15 pozos (Figura 11).

3.-Se adicionaron 5 μ L del DNA de cada muestra a analizar (stock de DNA de la muestra que se preparó con anterioridad).

Precauciones: Descongelar perfectamente el DNA previo a su utilización, atemperar y homogenizar la muestra antes de tomar el volumen indicado. Al terminar de utilizar el DNA de las muestras y de los controles almacenarlos a -20 °C.

4.- Una vez cargada la placa, se selló con la cubierta óptica, se homogenizó y centrifugó.

5.- Se introdujo la placa al termociclador qPCR Applied Biosystems 7500 y se programó con las condiciones de amplificación mostradas en la Tabla 11 y se inició la reacción.

Tabla 11. Condiciones de amplificación para BLA.

No de Ciclos	Temperatura	Tiempo
1 ciclo	55 °C	02:00 min
1 ciclo	95 °C	10:00 min
40 ciclos	95 °C	00:15 seg
	60.0 °C	01:00 min

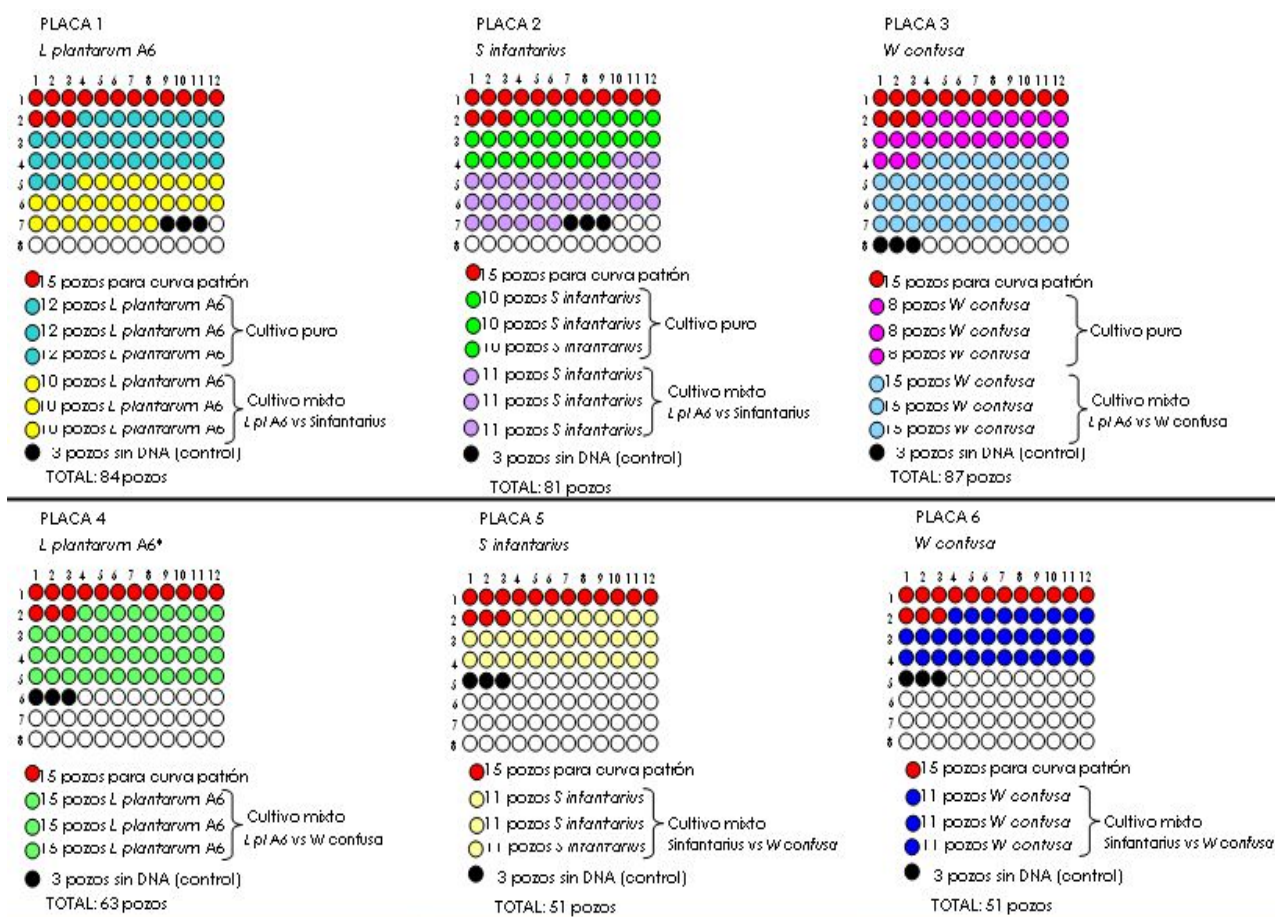


Figura 10. Diseño de experimento RT-qPCR para cuantificar el crecimiento de las bacterias en cultivo puro y en cultivo mixto.

Capítulo 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Cepas de trabajo

El resultado de la secuenciación (Instituto de Fisiología, UNAM) confirmó la identidad de *W. confusa* L17 y de *Lb. plantarum* A6 (Tabla 12), descartando sospechas de contaminación. Se realizó una nueva conservación de los cultivos puros en su medio de cultivo y en glicerol al 20%.

Tabla 12. Resultados de identificación de cepas por secuenciación del gen rRNA 16S.

Cepas	Resultados de secuenciación	% de identidad (comparación de secuencias)
<i>W. confusa</i> L17	<i>W. confusa</i>	99
<i>Lb plantarum</i> A6	<i>Lb plantarum</i> A6	100

3.2 Identificación de la cepa *Streptococcus bovis* 25124.

La secuencia resultante (IFC-UNAM) fue ingresada en el **NCBI** (<http://ncbi.nih.gov/>) para realizar el alineamiento local. Con los resultados obtenidos, usando los algoritmos blast y megablast (mayor astringencia) se elaboró un dendrograma con 18 secuencias de aproximadamente 360 pb y se encontró que la cepa 25124 se agrupó en el cluster de los *S. infantarius*-ssp. *infantarius* (Figura 11), notoriamente separada del grupo de los *S. bovis*, los cuales se agruparon en ramas diferentes.

En la Tabla 13 se muestran los códigos de acceso y el porcentaje de identidad obtenidos en el blast para las primeras 10 cepas. También se incluye el valor de E (estadístico que indica la probabilidad de que la similitud entre las secuencias comparadas haya sido resultado del azar. La tendencia del valor cero, afirma que la contribución del factor azar haya sido nula), así como el porcentaje de cobertura de las secuencias alineadas. Estos parámetros proporcionan información sólida para identificar a la cepa *Streptococcus* – 25124 como *Streptococcus infantarius*-ssp. *infantarius* con una similitud del 100% y con una E de 0.0.

A partir de su identificación, la cepa de trabajo será nombrada como Sii-25124. Se realizó una nueva conservación de Sii-25124 en MRS-A y en glicerol al 20%.

En un trabajo previo Díaz-Ruiz. *et al* (2003) usando como gen blanco al DNAr 16 S obtuvieron el mismo porcentaje de identidad para de la cepa *Streptococcus-25124*, con *S. bovis* y con *S. infantarius*.

Utilizando los oligonucleótidos degenerados para los dominios I y II (Poyart. *et al.*, 1995) de un fragmento interno del gen *sodA* (I: inosina; R: adenina o guanina; Y: citosina o timina) de 480 pb que codifica a la superóxido dismutasa dependiente de manganeso (SOD-Mn) en estreptococos, se obtuvo un resultado relevante para este trabajo y para investigaciones posteriores en el pozol debido a la presencia e importancia de *Sii* en todas las etapas de la fermentación del alimento.

Tabla 13. Alineamiento en el BLAST (<http://ncbi.nih.gov/>) de secuencias de un fragmento interno del gen *sodA* de *S. bovis* 25124(Poyart. *et al.*, 1995). Porcentaje de similitud con los parientes más cercanos.

No	No de acceso	Cepa	E-val	% ID
1	Sin número de acceso	<i>Streptococcus-25124</i>	0.0	100
2	AJ3059808.1	<i>Streptococcus infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i>	0.0	100
3	AJ439567.1	<i>Streptococcus infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i>	0.0	89
4	AJ306978.1	<i>Streptococcus infantarius</i> subsp. <i>coli</i>	0.0	89
5	AJ297212.1	<i>Streptococcus luteciae</i>	0.0	89
6	AJ297188.1	<i>Streptococcus luteciae</i>	0.0	89
7	AJ297205.1	<i>Streptococcus lutetiensis</i>	0.0	89
8	AJ297189.1	<i>Streptococcus lutetiensis</i>	0.0	89
9	AJ843135.1	<i>Streptococcus lutetiensis</i>	0.0	89
10	AY035713.1	<i>Streptococcus lutetiensis</i>	0.0	89
11	AY344535.1	<i>Streptococcus bovis</i>	0.0	89

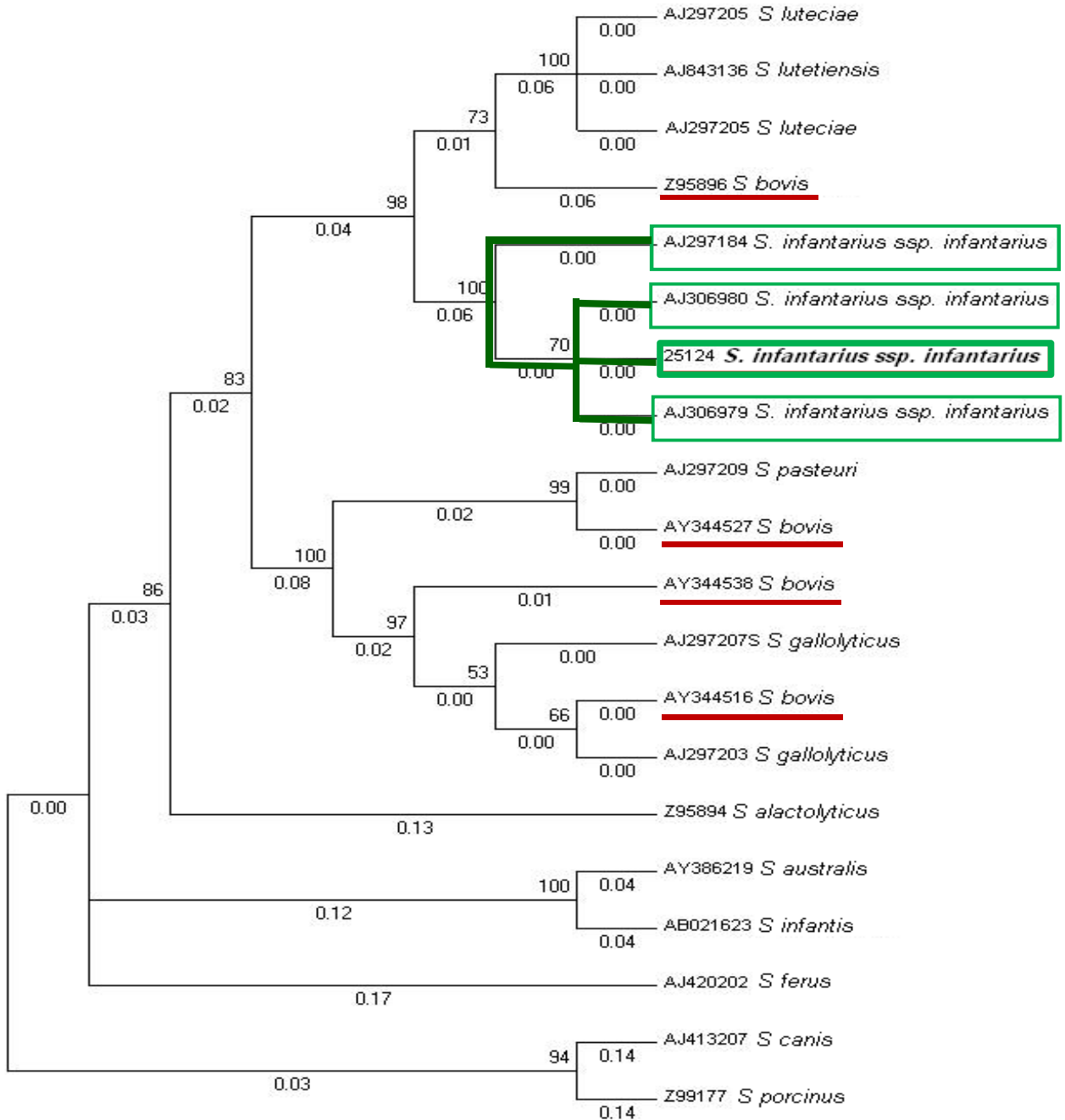


Figura. 11 Dendrograma elaborado con 18 secuencias de aproximadamente 360 pb de un fragmento interno del gen *sod A* (609 pb) que codifica a la Superóxido dismutasa dependiente de manganeso (SOD-Mn) en estreptococos. Se usó un par de primers degenerados para los dominios I y II; D1 CCITAYICITAYGAYGCIYTIGARCC, y D2 ARTARTAI GCR TGYTCCCAIACRTC (Poyart. *et al.*, 1995).

3.3 Montaje y validación de la técnica de qPCR

3.3.1 Diseño de oligonucleótidos específicos para *Sii-25124*, *W. confusa* L17 y *Lb. plantarum* A6

El proveedor Applied Biosystems diseñó los oligonucleótidos (Tabla 14) y la sonda TaqMan basados en la secuencia del gen RNAt que codifica para el aminoácido de fenilalanina. Se utilizó el software Primer Express 2.0 (Applied Biosystems). Estos oligonucleótidos se utilizaron para hacer las curvas estándar y la validación de la técnica.

Tabla 14. Oligonucleótidos diseñados por el proveedor Applied Biosystems. Secuencia y características.

>AM286879 <i>Sii-25125</i> pheS					
PRIMER	SEQUENCE	rating	tm	GC%	Product length 156
FORW	CTCACACAAGTCCAGTTCAAG	78.6	54	47.6	Product Ta opt 52,7
REV	CACCAACAACAAGACCTTCG	78.6	54.3	50	Pair quality BEST
>AM745649 <i>W. confusa</i> L17 pheS					
PRIMER	SEQUENCE	rating	tm	GC%	Product length 108
FORW	CGATGGGTGACTTGAAGGG	70	54.6	57.9	Product Ta opt 53.9
REV	CTGAAGGCTCCGTGAATGG	87.4	55	57.9	Pair quality BEST
>AM284213 <i>Lb. plantarum</i> A6 pheS					
PRIMER	SEQUENCE	rating	tm	GC%	Product length 146
FORW	GCTACTACGCACGCAGAC	99.2	54.9	61.1	Product Ta opt 54.4
REV	TTTGATGAAATTGATGTGAATGGG	68.2	54.3	33.3	Pair quality BEST

3.3.2 Validación de ensayos de RT-qPCR.

3.3.2.1 Curva estándar

Las curvas estándar de RT-qPCR para cada cepa, se realizaron a partir de una concentración de cDNA conocida y haciendo diluciones seriadas como se muestra en la Tabla 15. El intervalo lineal del ensayo comprendió las 6 primeras diluciones, con un valor R^2 igual a 0.99 para cada cepa. La eficiencia de la reacción de amplificación en la condición lineal del ensayo estuvo por arriba del 90%. Para la RT-PCR, la eficiencia es la capacidad de la reacción de duplicar el número de copias de las cadenas de cDNA en cada ciclo. Si la eficiencia está por debajo del 90%, los resultados serán falsos, aun cuando la correlación sea cercana a 1 (Bustin. *et al.*, 2005). Para las cepas en estudio, la eficiencia de la reacción estuvo por arriba del 91%, por lo tanto, las curvas se consideraron estándar para ser utilizada como

referencia en la validación de la RT-qPCR cuantitativo, se consideran adecuadas para obtener valores de cuantificación confiables.

Se ajustó el umbral (Figura 12) en un punto donde todas las muestras analizadas mostraron el incremento de fluorescencia similar, en la Tabla 15 se observa que el Treshold cycle (Ct), que es el número de ciclos necesarios para que la señal fluorescente alcance el valor umbral, para las tres bacterias, osciló en 0.30.

Tabla 15. Eficiencia y linealidad del ensayo de qPCR. Curvas de amplificación, valor de Cq, curva estándar con las 6 primeras diluciones (cuantificación absoluta).

Cepa	[DNA] inicial	Dilución	Temp. alineamiento	Slope	R ²	%E	Threshold Ct
Sii. -25124	230 ng/uL	10 ⁻¹ a 10 ⁻⁸	55 °C	4.3511	0.9963	92.29	0.3114
Lb. plantarum A6	300 ng/uL	10 ⁻¹ a 10 ⁻⁸	55 °C	4.3550	0.9983	91.08	0.3240
W. confusa L17	355 ng/uL	10 ⁻¹ a 10 ⁻⁸	55 °C	4.6202	0.9980	91.81	0.3426

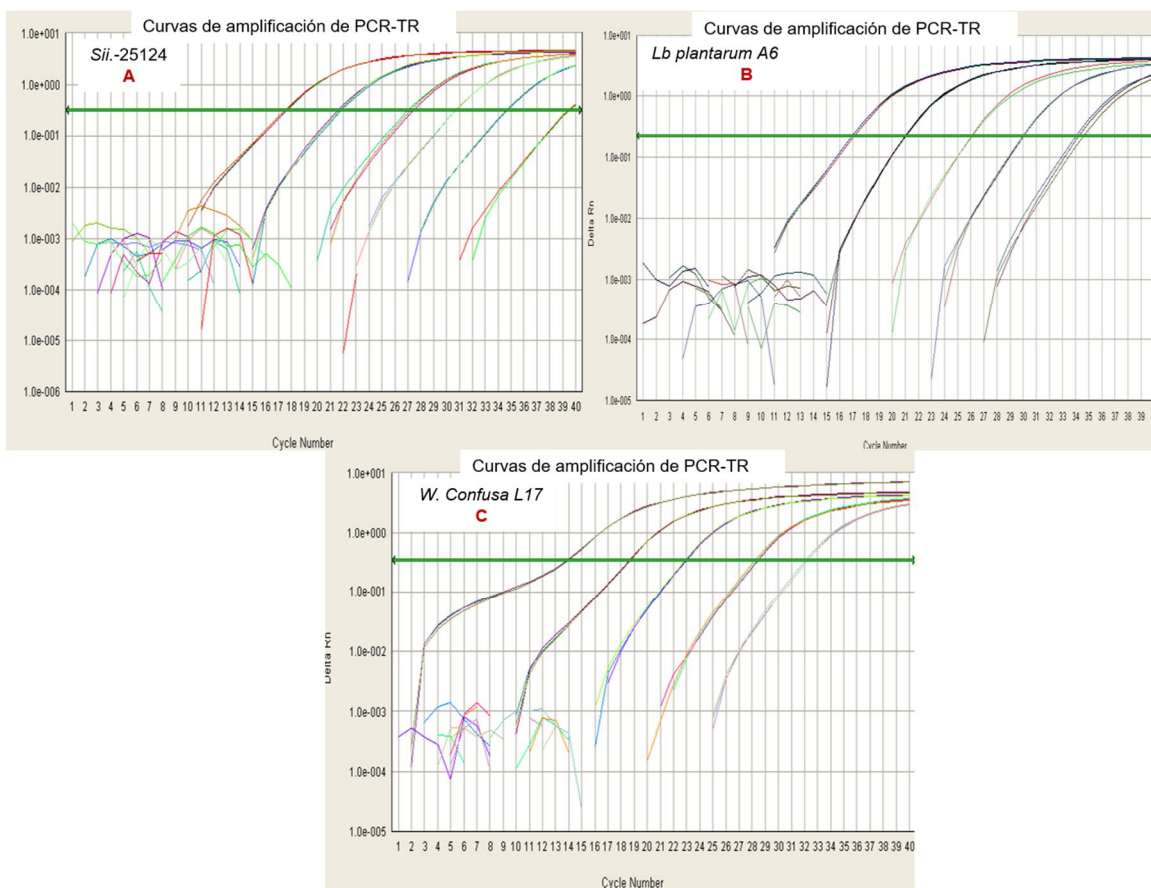


Figura 12. Curvas de amplificación obtenidas con la utilización de cada par de oligonucleótidos específicos para cada bacteria. **A.** Sii-25124; **B.** *Lb. plantarum* A6; **C.** *W. confusa* 17. Los valores de Ct se muestran en el eje X.

3.4 Fermentación del almidón en monocultivos y cocultivos.

Se estudió la fermentación del almidón en cultivos puros (monocultivos) y en cultivos mixtos (cocultivos) en un modelo líquido de MRS-almidón (Tabla 16).

Tabla 16. Cepas usadas en este estudio para los cultivos puros y los cultivos mixtos.

No	Cultivos Puros (monocultivos)	Interacción
1	<i>Sii-25124</i>	-----
2	<i>Lb. plantarum A6</i>	-----
3	<i>W. confusa L17</i>	-----
No	Cultivos Mixtos (cocultivos)	Interacción
4	<i>Sii-25124</i> + <i>Lb. plantarum A6</i>	BALA + BALA
5	<i>Sii-25124</i> + <i>W. confusa L17</i>	BALA + BAL
6	<i>Lb. plantarum A6</i> + <i>W. confusa L17</i>	BALA + BAL

3.4.1 Biomasa, pH, velocidad máxima de crecimiento (μ_{max}) y concentración de DNA en cultivos puros.

En las fermentaciones en cultivo puro las tres cepas tuvieron cinéticas de crecimiento cortas, no mayores a las 12 horas de fermentación.

Lb. plantarum A6 tuvo la concentración de biomasa mayor, a una velocidad específica de 0.44 hr^{-1} (Tabla 17), al ser una bacteria que soporta valores bajos de pH, fue la que mejor crecimiento tuvo, con una biomasa de 2.8 g/L (Figura 13) a pH de 4.5 a las 12 horas de fermentación (Figura 15). *Lb. plantarum A6* alcanzó una concentración de 7,500 ng/mL de DNA (Figura 14), siendo la máxima concentración reportada en este proyecto.

Lb. plantarum A6 se conoce como una cepa altamente amilolítica (Songré-Ovattara. *et al.*, 2010; Humblot. *et al.*, 2014; Mukisa. *et al.*, 2012), por lo que, su vasta producción de biomasa (3.8 g/L) pudo estar asociada a las actividades extracelulares de α -amilasa y neopululanasa (Humblot. *et al.*, 2014; Turpin. *et al.*, 2018) y la presencia de transportadores de maltodextrina (Turpin. *et al.*, 2018). Además, las enzimas amilopectin fosforilasa y α -glucosidasa, pudieran estar implicadas en la hidrólisis del almidón (Humblot. *et al.*, 2014).

Durante las primeras 7 horas de fermentación *Sii-25124* fue la bacteria que presentó un mayor crecimiento, con 1.018 g/L de biomasa (Figura 13) a una velocidad específica de 0.90 hr⁻¹ (Tabla 17) y a pH de 4.7 (Figura 15), alcanzando los 249 ng/mL de DNA (Figura 14). Su cinética fue corta y rápida, después de las 9 horas, el pH bajó a 4.5 y su crecimiento fue muy lento.

Díaz-Ruiz. *et al.*, (2003) reportaron que la capacidad que presenta *Sii-25124* para crecer muy rápido en presencia de almidón y la conversión eficiente de sustrato en biomasa; podría representar una ventaja ecológica. También reportaron que esta bacteria tiene una α -amilasa de alto peso molecular, asociada a la célula, con mayor actividad a valores de pH cercanos a la neutralidad y con inestabilidad a valores de pH bajos.

Se confirmó que *W. confusa* L17 no es amilolítica, al no registrar actividad. Registró un crecimiento de 0.1690 g/L de biomasa (Figura 13) a una velocidad específica de 0.23 hr⁻¹ (Tabla 17) y a pH de 6.05 (Figura 15). Se cuantificó una concentración de 49.25 ng/mL de DNA (Figura 14), lo que confirma su mínimo crecimiento en comparación con las otras bacterias.

Tabla 17. Velocidad específica máxima de crecimiento (μ) obtenida por la determinación de peso seco durante de la fermentación de MRS-almidón a 30°C, en cultivo puro y en cultivo mixto de *Lb plantarum* A6, *Sii-25124* y *W confusa* L17.

Cultivo puro	* μ max hr ⁻¹
<i>Sii-25124</i>	0.9098
<i>Lb plantarum</i> A6	0.4409
<i>W confusa</i>	0.2338
Cultivo mixto	
<i>Lb plantarum</i> A6 + <i>W confusa</i> L17	0.6934
<i>Lb plantarum</i> A6 + <i>Sii-25124</i>	0.3502
<i>Sii-25124</i> + <i>W confusa</i> L17	0.6774

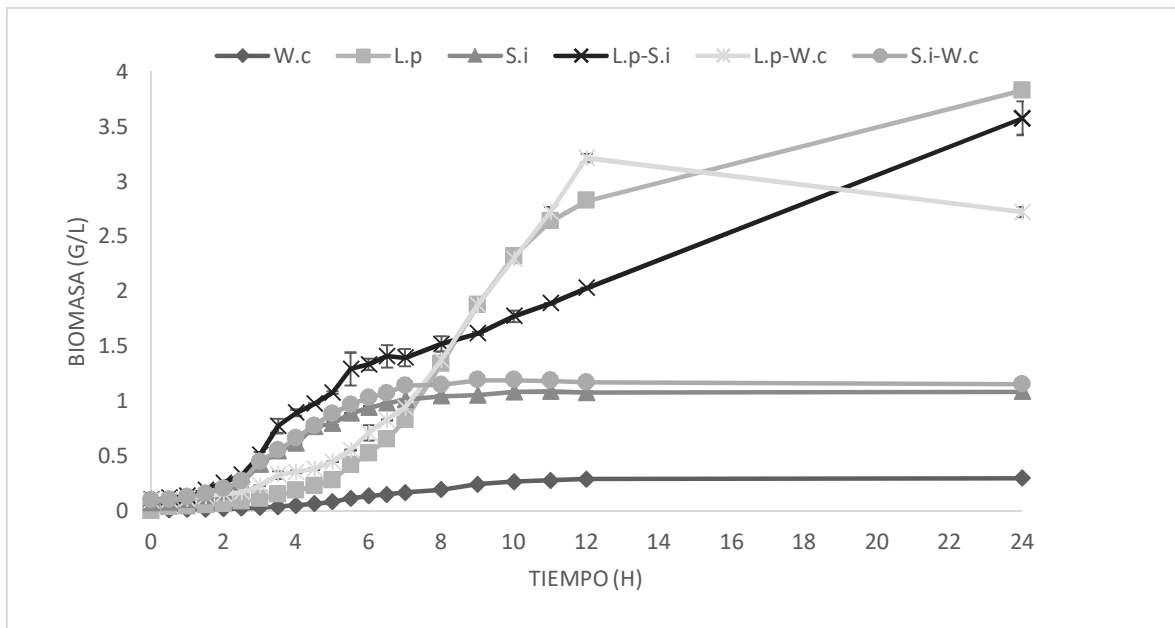


Figura 13. Concentración de biomasa durante la fermentación de caldo MRS-almidón a 30°C usando cultivos puros: *Lb. plantarum* A6 (Lp), *Sii-25124* (Sif) y *W. confusa* A17 (Wc); y cultivos mixtos: *L.p-Si*; *L.p-Wc*; *Si-Wc*. Cada punto de las gráficas representa la media \pm desviación estándar de tres repeticiones.

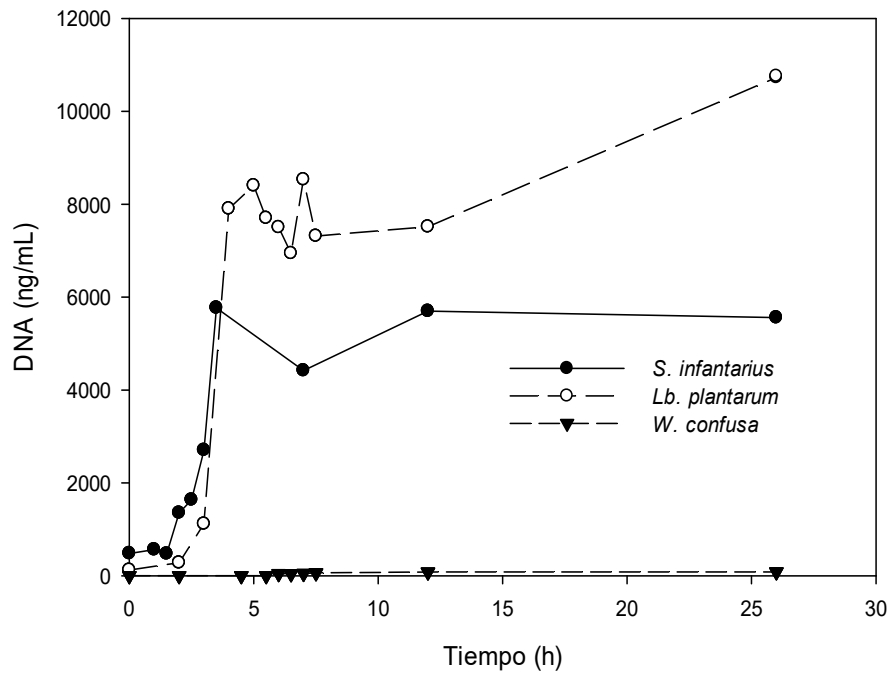


Figura 14. Crecimiento microbiano determinado por la concentración de DNA en cultivos puros de *Lb. plantarum* A6 (*Lb. plantarum*); *Sii-25124* (*S. infantarius*); y *W. confusa* 17 (*W.c*) en fermentaciones de caldo MRS-almidón. Cada punto de las gráficas representa la media \pm desviación estándar de tres repeticiones.

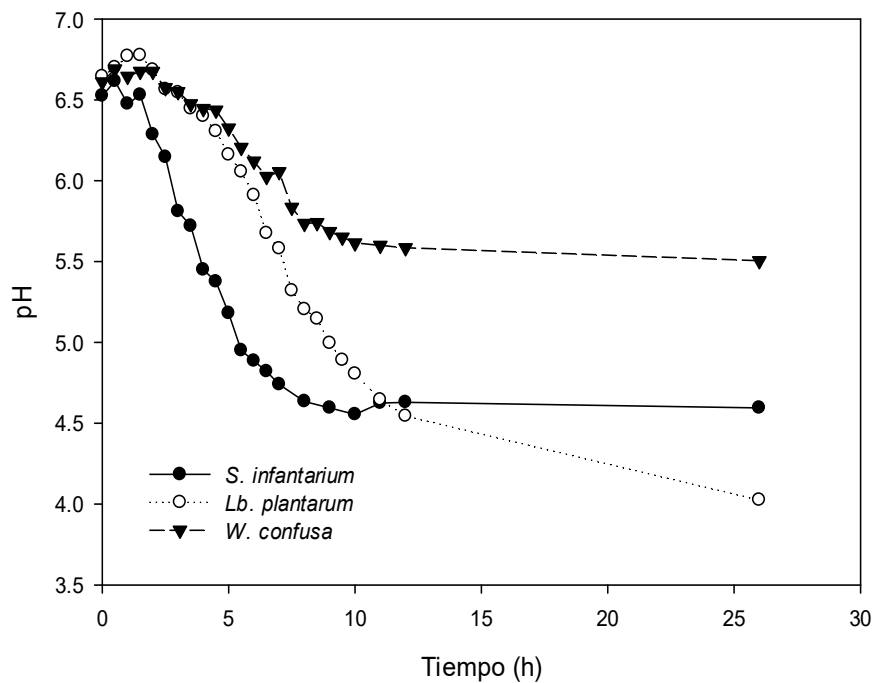


Figura 15. Valores de pH vs tiempo durante la fermentación en caldo MRS-Almidón a 30°C; durante 24 horas en cultivo puro de *Lb plantarum* A6, *Sii-25124* y *W confusa* L17. Cada punto de las gráficas representa la media \pm desviación estándar de tres repeticiones.

3.4.2. Fermentación del almidón, azúcares reductores, actividad amilolítica, producción de ácido láctico y productos de hidrólisis de almidón en cultivos puros

Lb. plantarum A6, hidrolizó casi en su totalidad el almidón disponible durante la fermentación, la residualidad fue del 1 % a partir de las 8.5 horas (Figura 16). Los resultados anteriores coinciden con la concentración de azúcares reductores totales (ART) en el medio, siendo la concentración más alta, de 4-7 g/L cuando en el medio había menor concentración de almidón derivado de la hidrólisis, la cual ocurrió alrededor de las 8 h de fermentación (Figura 17). Lo anterior se relacionó con el tiempo de mayor actividad amilolítica (5000 U/L) y a la acelerada hidrólisis de almidón. Produjo la mayor concentración de ácido láctico, 9 g/L a las 12 horas (Figura 19).

Lb. plantarum A6 produjo la mayor cantidad de maltooligosacáridos en el intervalo de 6 a 10 horas. Presentó un máximo pico de maltotriosa de 3.5 g/L a las 6 h y un máximo pico de glucosa de 4 g/L a las 10 h, en donde también se observó un máximo pico de maltosa de 3.2 g/L. Al final de la fermentación, se registró una tendencia a consumir los maltooligosacáridos previamente producidos (Figura 21-(B) *Lb. plantarum* A6).

W. confusa L17 no fermentó el almidón (Figura 16) y no produjo azúcares reductores (Figura 17). La concentración de biomasa y la velocidad específica de crecimiento se sustentan en la capacidad de esta bacteria para aprovechar los azúcares simples disponibles en el medio MRS-A. Se observó que la concentración de azúcares reductores se redujo de 16 g/L a 1 g/L después de 26 h de fermentación. Produjo una baja concentración de ácido láctico de 2 g/L a las 6 horas (Figura 19).

W. confusa L17 no produjo maltooligosacáridos. El perfil sugiere que se limitó a crecer con los componentes del medio de cultivo: como glucosa, maltosa, maltotriosa y dejando casi intactos los azúcares más grandes como maltotetraosa, maltopentaosa, maltohexaosa y maltoheptaosa (Figura 21 -(C) *W. confusa* 17).

Sii-25124 hidrolizó parcialmente el almidón en el medio, dejando un residuo de 4.8 g/L, después de las 24 h de fermentación (Figura 16) probablemente debido a los bajos valores de pH. Estos resultados se explican con la baja actividad amilolítica de 176 U/L (Figura 18). No obstante, del tiempo 3 a las 7 horas presentó la hidrólisis de almidón. El consumo de azúcares reductores y totales fue decreciente (Figura 17). La producción de ácido láctico fue intermedio en comparación con las otras bacterias (Figura 19), 1.7 g/L a las 3 horas y 8.39 g/L a las 12 horas de fermentación. *Sii-25124* produjo maltotriosa en una concentración de 4 g/L como principal maltooligosacárido durante la hidrólisis del almidón, presentando su mayor concentración a las 3 horas de la fermentación. También se observó un pico de glucosa de 2.3 g/L a las 3h (Figura 21-(A) *Sii-25124*).

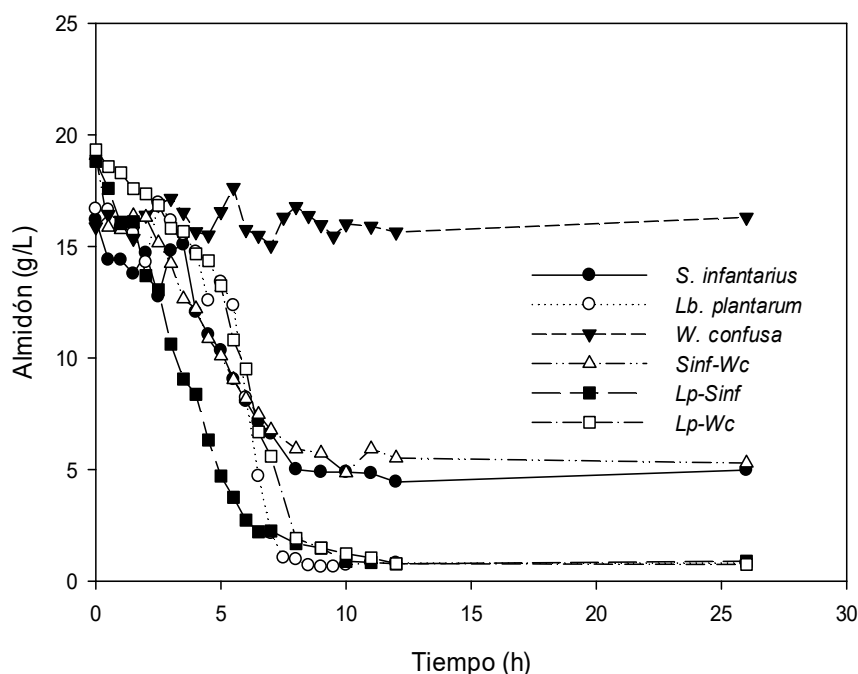


Figura 16. Cambio en la concentración de almidón durante la fermentación del caldo MRS-almidón a 30°C. En cultivos puros: *Lb. plantarum* A6 (Lp), *Sii-25124* (Sif) y *W. confusa* A17 (Wc); y cultivos mixtos: *Lb.p-Si*; *L.p-Wc*; *Si-Wc*. Cada punto de las gráficas representa la media \pm desviación estándar de tres repeticiones.

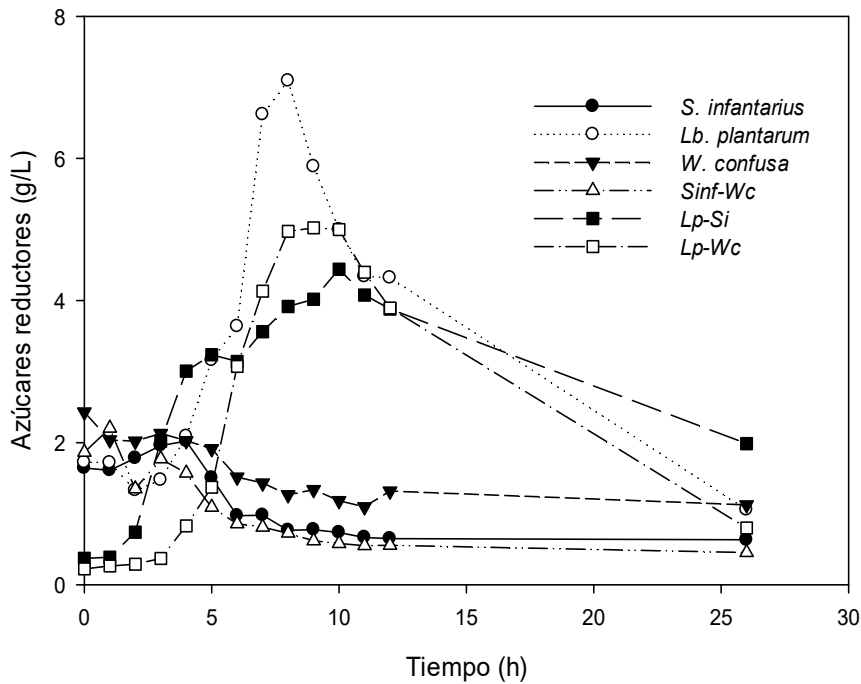


Figura 17. Cambio en la concentración de azúcares reductores durante la fermentación del caldo MRS-almidón. En cultivos puros: *Lb. plantarum* A6 (Lp), *Sii-25124* (Sif) y *W. confusa* A17 (Wc) y cultivos mixtos: L.p-Si; L.p-Wc; Si-Wc. Cada punto de las gráficas representa la media \pm desviación estándar de tres repeticiones.

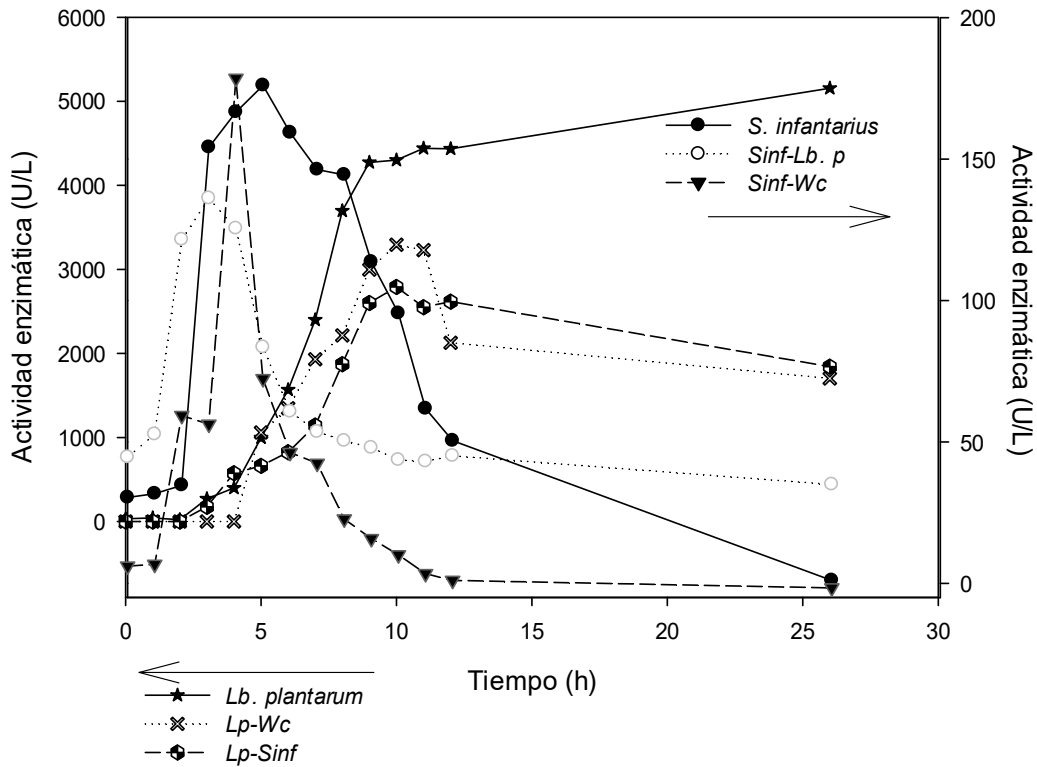


Figura 18. Actividad enzimática durante la fermentación del caldo MRS-almidón. En cultivos puros: *Lb. plantarum* A6 (Lp), *Sii-25124* (Sif) y *W. confusa* A17 (Wc); y cultivos mixtos: L.p-Si; L.p-Wc; Si-Wc. Cada punto de las gráficas representa la media \pm desviación estándar de tres repeticiones.

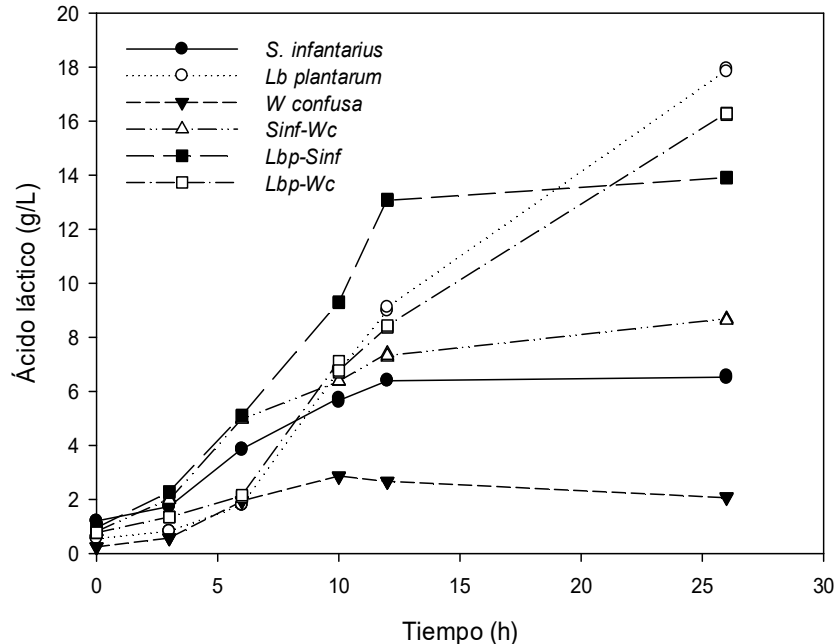


Figura 19. Producción de ácido láctico durante la fermentación de caldo MRS-almidón. En cultivos puros: *Lb. plantarum* A6 (Lp), *Sii-25124* (Sif) y *W. confusa* A17 (Wc); y cultivos mixtos: *L.p-Si*; *L.p-Wc*; *Si-Wc*. Cada punto de las gráficas representa la media \pm desviación estándar de tres repeticiones.

3.4.3. Biomasa, pH, velocidad máxima de crecimiento (μ_{max}) y concentración de DNA, fermentación del almidón, azúcares reductores, actividad amilolítica, Productos de hidrólisis de almidón y producción de ácido láctico en cultivos mixtos.

Lb plantarum A6 en cultivo con *W. confusa* L17 presentaron una velocidad máxima de crecimiento de 0.69 hr^{-1} (Tabla 17) siendo superior al presentado en cultivo puro: *Lb plantarum* A6 [$\mu = 0.44 \text{ hr}^{-1}$] y *W confusa* [$\mu = 0.23 \text{ hr}^{-1}$].

Lb plantarum A6 + *W. confusa* A17 registraron una acumulación temporal de azúcares reductores durante la fermentación (Figura 17), como está reportado en la literatura para algunos *Lactobacillus* amilolíticos. Tuvieron la mayor producción de ácido láctico, 2.12 g/L en cultivo mixto (Figura 19). La hidrólisis casi completa del almidón fue atribuida a *Lb plantarum* A6, a las 26 horas de fermentación había menos de 1 g/L (Figura 16).

A las nueve horas de fermentación, la actividad amilolítica alcanzó un valor de 4273 U/L. Transcurrido este tiempo, la actividad aumentó lentamente hasta 5155 U/L a

las 24 h (Figura 18). Estos resultados coinciden con los datos obtenidos a partir de la cuantificación de maltooligosacáridos. Se encontró que las concentraciones de maltosa, maltotriosa y glucosa aumentaron durante la tercera y 12 h de fermentación (Figura 21 [D y E]).

Sii-25124 en cultivo con *W. confusa* L17, la velocidad específica de crecimiento (μ) disminuye, de 0.9 hr^{-1} (valor de la cepa pura) a 0.67 hr^{-1} (Tabla 17). En la cuantificación de la actividad amilolítica para *Sii-25124*, se presentaron inconsistencias con la técnica, porque *W. confusa* L17 produjo xilano y éste interfirió en la cuantificación. En consecuencia, solo se logró obtener una curva de tendencia (Figura 18).

En el co-cultivo de *Sii-25124* con *W. confusa* 17, la concentración de ácido láctico aumentó a 8 g/L, en comparación con los 6.5 g/L producidos por *Sii-25124* como cultivo puro (Figura 19).

W. confusa 17, al no ser una bacteria amilolítica no creció como cultivo puro, pero tampoco en los cultivos mixtos con las dos cepas amilolíticas. Se ha reportado que esta especie es predominante en la fermentación del pozol. No obstante, en este modelo líquido con almidón soluble de papa, a las 12 horas de fermentación en cultivo puro, se cuantificó 80 ng/mL de DNA; en cocultivo con *Lb plantarum* A6 registró 0.52 ng/mL y 0.40 ng/mL en cultivo mixto con *Sii-25124* (Figura 20 [B y C]).

Se ha observado, sin embargo, que *W. confusa* no se encuentra presente durante todas las etapas de la fermentación de los alimentos y no es una especie dominante, predomina en etapas intermedias de la fermentación, por lo que se ha sugerido que existan factores u otras especies bacterianas que puedan inhibir su crecimiento (Björkroth. *et al.*, 2002).

Su presencia en el pozol, se sustenta con el hecho de que *W. confusa* puede crecer utilizando xilano y xilooligosacáridos como fuente de carbono (López-Hernández. *et al.*, 2018). También se ha reportado que tiene los genes necesarios para metabolizar residuos de sacarosa, celulosa, hemicelulosa y almidón, carbohidratos comunes en la masa de nixtamal (Hernández-Oaxaca. *et al.*, 2021). Sin embargo, los medios utilizados en este trabajo no contenían ninguno de estos carbohidratos.

Sii-25124 en cultivo con *Lb. plantarum* A6, presentaron una velocidad específica de crecimiento de 0.35 hr^{-1} (Tabla 17). Tuvieron una acumulación temporal de azúcares reductores durante la fermentación (Figura 17), como está reportado en la literatura para algunos *Lactobacillus* amilolíticos (Calderón. *et al.*, 2001). La velocidad de acidificación del medio fue similar a la que presentó *Sii-25124* en cultivo puro.

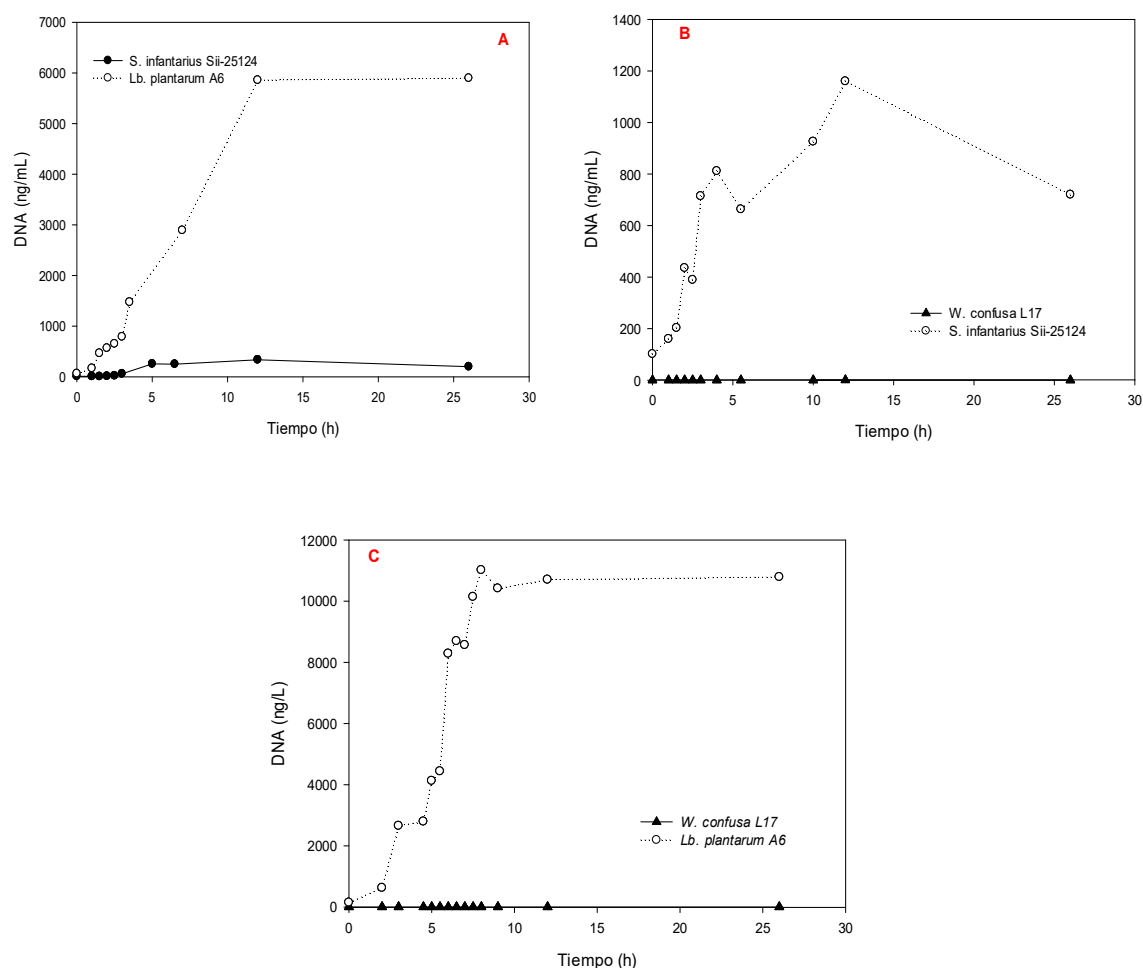


Figura 20. Crecimiento microbiano determinado por la concentración de DNA en cultivos mixtos de: (A), *Lb. plantarum* A6 + *Sii-25124*; (B) *Sii-25124* + *W. confusa* 17; (C), *Lb. plantarum* A6 + *W. confusa*, 17 en fermentaciones de caldo MRS-almidón. Cada punto de las gráficas representa la media \pm desviación estándar de tres repeticiones.

El pH final fue 4; similar al obtenido por *Lb. plantarum* A6 en cultivo puro (Figura 15).

La producción de ácido láctico fue de 2.12 g/L a las 6 horas y de 16.30 g/L a las 26 horas de fermentación. Muy similar a la obtenida por *Lb. plantarum* A6 en cultivo

puro (Figura 19). En las primeras horas de esta fermentación, la concentración de biomasa (1.52 g/L) que el resto de los cultivos en forma pura o mixta (Figura 10). De las 8 a las 12 h este cultivo mixto alcanzó una concentración de biomasa de 3.2 g/L que el co-cultivo de *Lb. plantarum* A6-Sii-25124 (2.04 g/L) y *Sii-25124-W. confusa* 17 (1.17 g/L; Figura 10). En la fermentación mixta entre estas bacterias, *Lb. plantarum* A6 alcanzó los ~6,000 ng/mL de DNA y la segunda solo llegó a ~300 ng/mL (Figura 20). Coexistieron, sin embargo, *Lb. plantarum* A6 dominó la fermentación.

Lb. plantarum A6 en cocultivo con *Sii-25124* produjeron la concentración más alta de ácido láctico (13.08 g/L) a las 12 h de fermentación (Figura 19), justo cuando la concentración de almidón en el medio de cultivo era menor a 1 g/L (Figura 18) y la actividad enzimática de 2616 U/L (Figura 16).

Sii-25124 ha sido reportada como una BALA predominante durante la fermentación del pozol, en estos experimentos en modelo líquido con almidón de papa soluble, su crecimiento fue menor que el de *Lb. plantarum* A6. Probablemente porque *Sii-25124* también está adaptado para metabolizar xilano y arabinoxilano, el segundo carbohidrato fermentable más grande en la masa de nixtamal, lo que contribuye en gran medida a su predominancia en el pozol (Cooper-Bribiesca. *et al.*, 2018).

También, se ha informado que *Streptococcus* produce una concentración de proteínas del 48% del metaproteoma total durante las primeras 9 h de fermentación de pozol, incluidas las enzimas para la hidrólisis del almidón (Rizo. *et al.*, 2021), lo cual podría explicar su mayor crecimiento durante las primeras horas de fermentación.

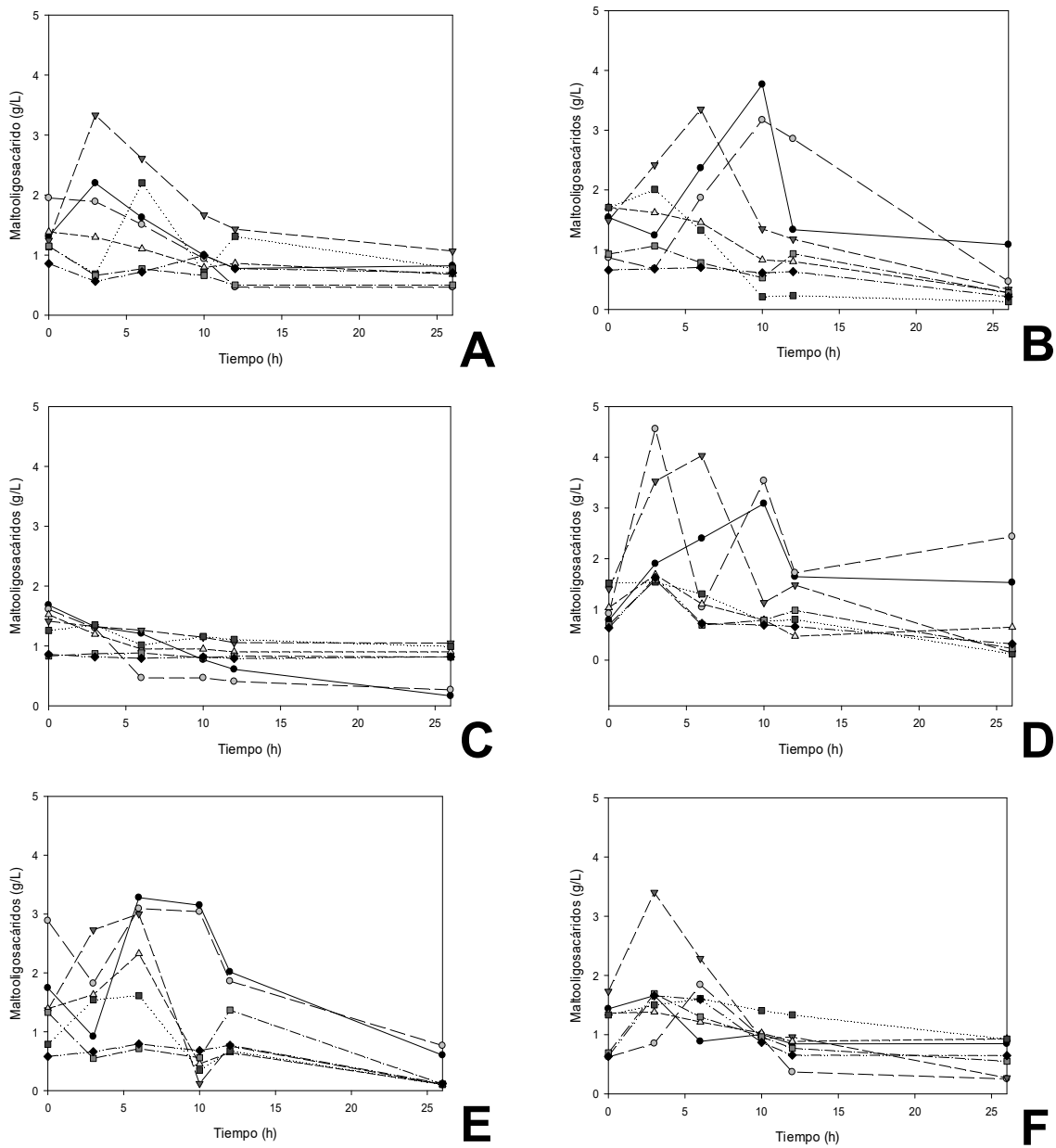


Figura 21. Productos de la hidrólisis del almidón durante la fermentación con (A) *Sii-25124*; (B) *L. plantarum* A6 (C) *W. confusa* 17; (D) *L. plantarum* A6-*Sii-25124*; (E) *L. plantarum* A6-*W. confusa* 17; (F) *Sii-25124*-*W. confusa* 17. Glucosa (●), maltosa (○), maltotriosa (▽), maltotetraosa (△), maltopentaosa (■), maltohexaosa (◼), maltoheptaosa (◆).

3.4.4 Eficiencia de la fermentación de cultivos puros y cultivos mixtos.

El rendimiento más alto de ácido láctico ($Y_{lac/s}$) fue producido por *Lb. plantarum* A6 (1.09 g/g), y el $Y_{lac/s}$ más bajo se obtuvo con *W. confusa* 17 (0.32 g/g). Estos resultados están directamente correlacionados con la producción de biomasa y actividad amilolítica presentada por cada especie de BAL en cultivos puros. *Lb. plantarum* A6 produjo una alta cantidad de biomasa (5155 U/L) y actividad amilolítica (3.8 g/L), lo que explica su mayor rendimiento de producción de ácido láctico con respecto al sustrato en comparación con los 0.32 g/g alcanzados por *W. confusa* 17 (Figura 22).

Los cultivos mixtos de *W. confusa* 17 y *Sii-25124* con *Lb. plantarum* A6 alcanzaron un valor de $Y_{lac/s}$ de 0.8 g/g, un valor más alto que como cultivos puros en donde *W. confusa* 17 alcanzó 0.32 g/g y *Sii-25124* 0.50 g/g. En general, los co-cultivos que incluyeron *Lb. plantarum* A6 mostraron valores altos de rendimiento de biomasa/sustrato, rendimiento de α -amilasa/biomasa, rendimiento de α -amilasa/sustrato y q_{amy} en comparación con *W. confusa* 17 y *Sii-25124*.

La velocidad específica de crecimiento (μ) fue mayor para *Lb. plantarum* A6 (0.43 h⁻¹) que *Sii-25124* (0.28 h⁻¹) y *W. confusa* 17 (0.27 h⁻¹ Tabla 5). El cultivo mixto de *Lb. plantarum* A6 y *Sii-25124* resultó en una disminución de la velocidad específica de crecimiento (0.11 h⁻¹) en comparación con los valores obtenidos como cultivo puro (Tabla 18). Por el contrario, el cultivo mixto de las BAL aisladas del pozol (*Sii-25124* y *W. confusa* 17) favoreció su crecimiento (valor de μ), aumentando un 18% con respecto al valor alcanzado como cultivos puros (Figura 22).

Los datos cinéticos de cultivos individuales de *Sii-25124*, *Lb. plantarum* A6 y *W. confusa* 17 fueron diferentes a los obtenidos con sus co-cultivos. Los resultados indican interacciones entre ellos. Sin embargo, aún se desconoce de qué tipo son estas interacciones.

Sii-25124 y *W. confusa* 17 *Lb.* tuvieron una influencia negativa sobre la actividad amilolítica, el rendimiento de ácido láctico ($Y_{lac/s}$), la tasa de crecimiento específico (μ) y la tasa específica de producción de amilasa (q_{amy}) en la fermentación con *plantarum* A6.

El análisis de qPCR mostró que cuando *W. confusa* 17 se co-inoculó con las otras dos BALA, no hay un aumento de su crecimiento.

Parámetros									
Inóculo	$Y_{x/s}$	$Y_{lac/s}$	$Y_{lac/x}$	$Y_{amy/x}$	$Y_{amy/s}$	μ	q_{lac}^a	q_s^b	q_{amy}^c
	g/g	g/g	g/g	U/g	U/g	h^{-1}			
<i>L. plantarum</i> A6	0.24±0.03 ^d	1.09±0.13 ^e	4.57±0.02 ^b	1348.53±20.40 ^c	323.39±40.82 ^{bc}	0.43±0.00 ^d	1.95±0.01 ^c	1.79±0.20 ^b	577.37±8.74 ^d
<i>Sii-25124</i>	0.09±0.00 ^b	0.50±0.00 ^b	5.27±0.03 ^c	200.74±3.15 ^b	18.73±0.50 ^a	0.28±0.02 ^b	1.49±0.07 ^b	2.96±0.04 ^d	56.75±0.89 ^a
<i>W. confusa</i> L17	0.027±0.00 ^a	0.32±0.02 ^a	10.21±0.05 ^f	nd	nd	0.27±0.01 ^b	2.71±0.13 ^e	9.70±0.16 ^e	nd
<i>L. plantarum</i> A6-S. <i>ii-25124</i>	0.22±0.01 ^d	0.82±0.00 ^{cd}	3.73±0.16 ^a	1668.66±2.11 ^d	334.21±1.05 ^c	0.11±0.01 ^a	0.4±0.02 ^a	0.48±0.02 ^a	177.89±0.22 ^b
<i>L. plantarum</i> A6- <i>W. confusa</i> 17	0.15±0.00 ^c	0.86±0.02 ^d	5.91±0.11 ^d	1232.33±173.22 ^c	280.71±14.62 ^b	0.33±0.01 ^c	1.94±0.03 ^c	2.26±0.02 ^c	404.00±56.85 ^c
<i>Sii-25124</i> - <i>W. confusa</i> L17	0.11±0.00 ^b	0.72±0.02 ^c	7.43±0.02 ^e	303.85±16.80 ^b	27.16±1.34 ^a	0.33±0.01 ^c	2.47±0.08 ^d	2.90±0.14 ^d	101.03±4.86 ^a

Figura 22. Parámetros cinéticos de la fermentación de almidón por cultivos puros y mixtos de BAL en caldo MRS almidón a 30°C durante 24 h.

- El rendimiento de biomasa ($Y_{x/s}$) se calculó como gramos de biomasa producida por gramo de azúcar utilizado.
- El rendimiento de ácido láctico ($Y_{lac/s}$) se calculó como gramos de ácido láctico producido por gramo de azúcar utilizado.
- El rendimiento de ácido láctico ($Y_{lac/x}$) se calculó como gramos de ácido láctico producido por gramo de peso seco celular.
- El rendimiento de amilasa ($Y_{amy/x}$) se calculó como unidades de amilasa producidas por gramo de peso seco celular.
- El rendimiento de amilasa ($Y_{amy/s}$) se calculó como unidades de amilasa producidas por gramo de azúcar utilizado;
- μ : tasa máxima de crecimiento específico.
- q_{lac} : tasa específica de producción de ácido láctico.
- q_s : tasa específica de consumo de sustrato.
- q_{amy} : tasa específica de producción de amilasa.
- a, g de ácido láctico/g de peso seco celular* h ; b, g de sustrato/g de peso seco celular* h ; c, U/g de peso seco celular* h ; nd, no determinado.
- Los valores son medias \pm desviación estándar de tres repeticiones. Diferentes letras minúsculas en la misma columna muestran diferencias significativas según el análisis de varianza a $p \leq 0.05$ (prueba LSD).

Los cocultivos se pueden utilizar para la conversión de sustrato y la optimización de bioprocesos. También se ha demostrado que cuanto más fuertes son las interacciones entre las bacterias, mayores son los productos metabólicos que producen; en cantidad y en variedad. Favoreciendo con ello, el crecimiento inclusive, de otros microorganismos. La combinación positiva de cepas microbianas parece deberse principalmente a las dependencias metabólicas entre los socios que interactúan. Los cocultivos artificiales de BAL podrían usarse para fermentar matrices que contengan diferentes tipos de recursos que han sido más o menos explotados hasta ahora. En un contexto de desarrollo de productos alimenticios más sostenibles y saludables, los cocultivos también sirven para crear modelos de interacción entre matrices complejas de alimentos (Wang. *et al.*, 2020).

Hoy en día el uso de nuevas herramientas moleculares, como lo son las ciencias ómicas, en particular, foodomics, generan buenas oportunidades de innovación para el estudio de comunidades microbianas de alimentos tradicionales, como el pozol. Permite realizar una caracterización completa de extractos e ingredientes bioactivos en muestras: composición de lípidos, azúcares, aminoácido, identificación y cuantificación de principios activo en extracto natural; Identificación taxonómica de especies biológicas: una determinación de perfiles genómicos para personalización de productos (Rizo. *et al.*, 2018).

CONCLUSIONES.

Se identificó a la cepa *Streptococcus bovis*-25124 como *Streptococcus infantarius* ssp. *infantarius* (Sii-25124) con un 100% de identidad, utilizando los oligonucleótidos degenerados para los dominios I y II (Poyart *et al.*, 1995). *Streptococcus infantarius* es la especie dominante entre las cepas lácticas amilolíticas del pozol.

Se validó la técnica de RT-qPCR como un método efectivo para cuantificar el crecimiento de las bacterias en cultivo puro, poder identificarlas y cuantificarlas en cultivo mixto.

Las bacterias lácticas amilolíticas (BALA): *Sii*-25124 y *Lb. plantarum* A6, no promovieron el desarrollo de *W. confusa* L17, cuando crecieron en un medio líquido con almidón soluble de papa, en cultivo mixto.

En este primer acercamiento a las relaciones entre BALA y BAL en un modelo líquido de almidón soluble de papa, no se encontró que las BALA hidrolizaran el almidón y promovieran el desarrollo de las BAL, para poderse aplicar como una tecnología simple y culturalmente aceptable, con la finalidad de reducir la viscosidad de los alimentos de destete elaborados a base de nixtamal.

La fermentación en modelo líquido utilizando almidón soluble de papa como sustrato, sirve para suponer cómo serán las interacciones de estas bacterias en un escenario de uno a uno.

Desde la estandarización de técnicas moleculares, hasta la identidad de bacterias, este proyecto constituye las bases para estudios futuros con relación al pozol y al estudio de las interacciones bacterianas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ampe F., N. ben Omar, C. Moizan, C. Wacher y J. P. Guyot. (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*. **12**:5464-5473.
2. Biliaderis, C. G. (1991) The structure and interactions of starch with food constituents. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* **69**: 60-78.
3. Björkroth, J.; Holzapfel, W. (2006) General *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella*, in *The Prokaryotes*, eds Dworking M.; Falkow, S.; Rosenberg, E.; Schleifer K.; Stackebrandt, E. Springer. 267-319.
4. Björkroth, J.; Schillinger, U.; Geisen, R.; Weiss, N.; Hoste, B.; Holzapfel, W.; Korkeala, H.; Vandamme, P. (2002) Taxonomic study of *Weissella confusa* and description of *Weissella cibaria* sp, detected in food and clinical samples. *International of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **52**:141-148.
5. Bolaños, S. (2004) Variabilidad en la microbiota de diferentes muestras de pozol, determinada mediante electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE). Tesis de Maestra en Ciencias (Bioquímica). Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 111 pp.
6. Bustin, S.A., Benes, V., Nolan, T. & Pfaffl, M.W. (2005) Quantitative realtime RT-PCR a perspective. *Journal of Molecular Endocrinology* **34**: 597- 601.
7. Cooper-Bribiesca, B., Navarro-Ocaña, A., Díaz-Ruiz, G., Aguilar-Osorio, G., Rodríguez-Sanoja, R., Wacher, C. (2018) Lactic Acid Fermentation of Arabinoxylan from Nejayote by *Streptococcus infantarius* ssp. *infantarius* 25124 Isolated from Pozol. *Front. Microbiol*, **9**:3061-3072.
8. Costa J. (2004) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enferm Infec Microbiol Clin*. **5**:299-305
9. Cripwell, R. A., van Zyl, W. H., & Viljoen-Bloom, M. (2020) Fungal Biotechnology: Fungal Amylases and Their Applications. Reference Module in Life Sciences. doi:10.1016/b978-0-12-809633-8.21082-0
10. Cruz, U., & Ulloa, M. (1973) Alimentos fermentados de maíz consumidos en México y otros países Latinoamericanos. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural*, **11**:423-457.
11. Díaz-Ruiz, J.P. Guyot, F. Ruiz-Teran, J. Morlon-Guyot y C. Wacher. (2003) Microbial and physiological characterization of weak amyolytic but fast growing lactic acid bacteria: a functional role in supporting microbial diversity in Pozol. *Appl. Env. Microbiol*. **8**: 4367-4374.
12. Dubois, M., A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers y F. Smith. (1956) Colorimetric method for determination of sugar relates substances. *Anal. Chem*. **28**: 350-356.

13. Escalante A., C. Wachter y A. Farrés. (2001) Lactic acid bacterial diversity in the traditional Mexican fermented dough pozol as determined by 16S rDNA sequence analysis. *Int. J. Food Microbiol.* **64**:21-31.
14. Flores-Espinosa, M.T. (1996) Caracterización Fisiológica de las Bacterias Lácticas Aisladas del Pozol. Bachelor's Thesis, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico.
15. Giraffa, G. (2004) Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation. *FEMS Microbiol. Rev.* **28**:251-260.
16. Giraud, E., A. Brauman, S. Keleke, B. Lelong y M. Raimbault. (1991) Isolation and physiological study of an amyolytic strain of *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **36**:379-383.
17. Guerrero I, García B, Wachter M, Regalado C. (2014) *Microbiología de los Alimentos. México.* LIMUSA. 672.
18. Hernández-Oaxaca, D., López-Sánchez, R., Lozano, L., Wachter-Rodarte, C., Segovia, L., Munguía, A.L. (2021) Corrigendum: Diversity of *Weissella confusa* in Pozol and Its Carbohydrate Metabolism. *Front. Microbiol.* **12**:683 695.
19. Higuchi R, Fokler C, Dollinger G, Watson R. (1993) Kinetic PCR analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/Technology*; **11**:1026-30.
20. Holzapfel, W. H., and Wood, B. J. B. (2014) *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy.* Chichester: John Wiley & Sons. Print ISBN:9781444333831 |Online ISBN:9781118655252 |DOI:10.1002/9781118655252. Copyright © 2014 John Wiley & Sons, Ltd. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9781118655252>
21. Horgan, R.; and L. Kenny. (2011) Omic' technologies: Genomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics. *The Obstetrician and Gynaecologist* **13**:189–195. doi:10.1576/toag.13.3.189.27672.
22. Humblot, C., Turpin, W., Chevalier, F., Picq, C., Rochette, I., Guyot, J.-P. (2014) Determination of expression and activity of genes involved in starch metabolism in *Lactobacillus plantarum* A6 during fermentation of a cereal-based gruel. *Int. J. Food Microbiol.* **185**:103–111.
23. López-Hernández, M., Alegria, M.E.R., Munguia, A.L., Wachter, C. (2018) Evaluation of xylan as carbon source for *Weissella* spp., a predominant strain in pozol fermentation. *LWT*, **89**:192–197.
24. Luallen, T.E. (1988) Structure, characteristics, and uses of some typical carbohydrate food ingredients. *Cereal Foods World.* **33**:924-927.
25. Mukisa, I.M.; Byaruhanga, Y.B.; Muyanja, C.M.B.K.; Aijuka, M.; Schüller, R.B.; Sahlstrøm, S.; Langsrud, T.; Narvhus, J.A. (2012) Influence of Cofermentation by Amyolytic *Lactobacillus plantarum* and *Lactococcus lactis* Strains on the

Fermentation Process and Rheology of Sorghum Porridge. *Appl. Environ. Microbiol.*, **78**:5220–5228.

26. Muyzer G., E. C. de Waal y A. G. Uitterlinder. (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes encoding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:695-700.
27. Nuraida L., C. Wachter y J. D. Owens. (1995) Microbiology of pozol, a mexican fermented maize dough. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **11**:567-571.
28. Olympia M., Fukuda H., Ono H., Kaneko Y., Takano M., (1995) Characterization of starch-hydrolyzing lactic acid bacteria isolated from a fermented fish and rice food, “burong isda”, and its amylolytic enzyme. *Journal of Fermentation and Bioengineering.* **80**:124–130. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(95\)93206-Y](https://doi.org/10.1016/0922-338X(95)93206-Y)
29. Petrova P., Petrov K., Stoyancheva G., (2013) Starch-modifying enzymes of lactic acid bacteria – structures, properties and applications. **65**:34–47. <https://doi.org/10.1002/star.201200192>.
30. Pfaffl, M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* **29**: e45.
31. Pinilla, G., Cubillos, K., & Rodríguez, M. (2008) Bodas de plata de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). *Nova*, 6(9). <https://doi.org/10.22490/24629448.397>
32. Poyart, C., P. Berche y P. Trieu-Cuot. (1995) Characterization of superoxide dismutase genes from gram-positive bacteria by polymerase chain reaction using degenerate primers. *FEMS Microbiol. Lett.* **131**:41-45.
33. Rio D. (1999). Etude de la production, de la distribution et de la consommation du pozol dans le sud –est du Mexique (Villahermosa, Tabasco). Mémoire pour l’obtention du Diplôme d’Etudes Supérieures Spécialisées (D.E.S.S.) Nutrition et Alimentation dans les Pays en Développement. Université de Montpellier II, Montpellier, France.
34. Rizo, J.; Guillén, D.; Farrés, A.; Díaz-Ruiz, G.; Sánchez, S.; Wachter, C.; Rodríguez-Sanoja, R. (2018) Omics in traditional vegetable fermented foods and beverages, *Crit Rev Food Sci Nutr.* **60**:791–809. doi: 10.1080/10408398.2018.1551189.
35. Rizo, J., Guillén, D., Díaz-Ruiz, G., Wachter, C., Encarnación, S., Sánchez, S., Rodríguez-Sanoja, R. (2021) Metaproteomic Insights Into the Microbial Community in Pozol. *Front. Nutr.* **8**, 714814.
36. Rodríguez Amor, D., & Dal Bello, M. (2019). Bottom-Up Approaches to Synthetic Cooperation in Microbial Communities. *Life*, **9**:1-22. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/life9010022>

37. Rodríguez-Saavedra, C.; Rodríguez-Sanoja, R.; Guillén, D.; Wacher, C.; Díaz-Ruiz, G. (2021) *Streptococcus infantarius* 25124 isolated from pozol produces a high molecular weight amylopullulanase, a key enzyme for niche colonization. *Amylase*, **5**:1–12.
38. Schelegel, L., Grimont, F. y Ageron, E. (2003) Reappraisal of the taxonomy of the *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex and related species: description of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* subsp. nov., *S. gallolyticus* subsp. *macedonicus* subsp. nov. and *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* subsp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**:631–645.
39. Songré-Ouattara, L.T.; Mouquet-Rivier, C.; Humblot, C.; Rochette, I.; Diawara, B.; Guyot, J.-P. (2010) Ability of Selected Lactic Acid Bacteria to Ferment a Pearl Millet-Soybean Slurry to Produce Gruels for Complementary Foods for Young Children. *J. Food Sci.* **75**:M261–M269.
40. Stiles M. E y W. H. Holzappel. (1997) Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. Review article. *Int. J. Food Microbiol.* **36**:1-29.
41. Torres-Caballero, A., Serrato, A., López-Santaella, T., Ortiz, R., Chico-Ponce de León, F., GonzálezCarranza, V., Hernández-Hernández, A. (2020) Evaluation of the melting temperature of TaqMan probes as a genotyping method for IDH1, IDH2, and H3F3A in pediatric astrocytomas. *Boletín médico del Hospital Infantil de México*, **6**:303-311. <https://doi.org/10.24875/bmhim.20000092>
42. Turpin, W., Weiman, M., Guyot, J.-P., Lajus, A., Cruveiller, S., Humblot, C. (2018) The genomic and transcriptomic basis of the potential of *Lactobacillus plantarum* A6 to improve the nutritional quality of a cereal based fermented food. *Int. J. Food Microbiol.* **266**:346–354.
43. Vargas, L.A., (1993) “La alimentación de los grupos indígenas de México”, en WACHER, C., Lappe, P. (compiladoras), *Alimentos fermentados indígenas de México*, pp. 39-45.
44. Vargas, L. (1999). “Bebidas mexicanas”. En *Cuadernos de Nutrición*. **3**:117-124.
45. Van de Guchte, M., Serror, P., Chervaux, C., Smokvina, T., Ehrlich, S. D., y Maguin, E. (2002) Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, **82**: 187–216.
46. Wacher, M. y Lappe, P. (1993) *Alimentos fermentados indígenas de México*. México: Universidad Nacional Autónoma de México. **9**:63-67.
47. Wacher, C. Nixtamalization, a Mesoamerican technology to process maize at small-scale with great potential for improving the nutritional quality of maize based foods. (2003) In *Proceedings of the Food-Based Approaches for a Healthy Nutrition, Ouagadougou, Burkina Faso*. 735–743.

48. Wang, R., Zhao, S., Wang, Z., and Koffas, M. A. (2020). Recent advances in modular co-culture engineering for synthesis of natural products. *Curr. Opin. Biotechnol.* **62**:65–71. doi: 10.1016/j.copbio.2019.09.004
49. West, S. A., Diggle, S. P., Buckling, A., Gardner, A., and Griffin, A. S. (2007) The social lives of microbes. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* **38**:53–77. doi: 10.1146/annurev.ecolsys.38.091206.095740
50. Zhang, L., García-Cano, I., & Jiménez-Flores, R. (2020) Characterization of adhesion between *Limosilactobacillus reuteri* and milk phospholipids by density gradient and gene expression. *JDS Communications*, **2**:29–35. <https://doi.org/10.3168/jdsc.2020-18939>

ANEXOS

ANEXO I. Curva de calibración entre la densidad óptica y el peso seco

Curvas de peso seco (PS), densidad óptica (DO) y PS vs DO

CURVAS PATRÓN PARA DENSIDAD ÓPTICA (D.O. 600NM)

Densidad Óptica

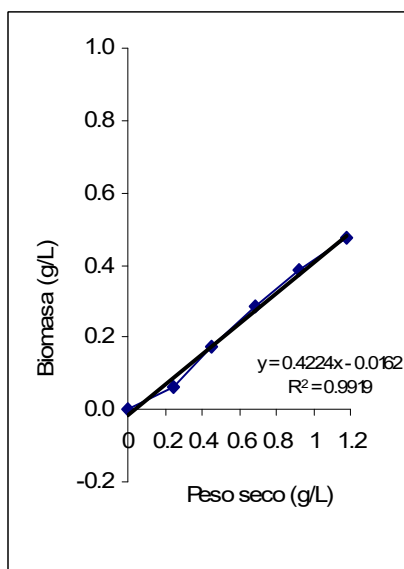
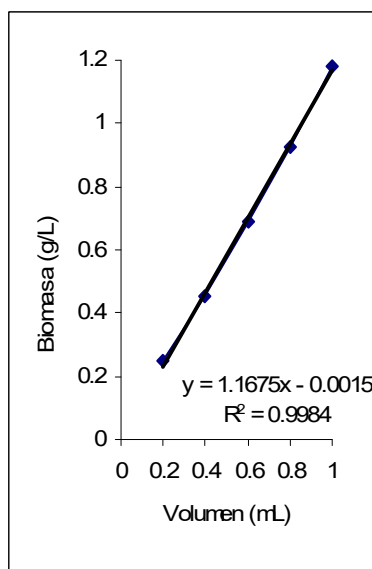
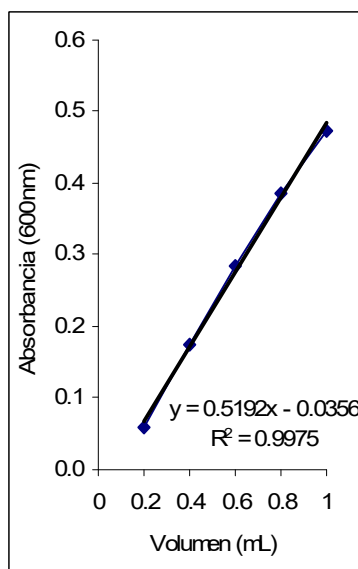
W. confusa

W. confusa CON MRS -A

[células]	Muestra 1	Muestra 2	Promedio	Valor real	vol. (ml)	Abs.	g/L	g/L
1	0.4119	0.3752	0.3652	3.652	1	0.3936	Peso seco	Absorbancias
0.8	0.3288	0.3268	0.3278	3.278	0.8	0.3278	1.03	0.3652
0.6	0.2452	0.2558	0.2505	2.505	0.6	0.2505	0.92	0.3278
0.4	0.22	0.2137	0.2169	2.169	0.4	0.2169	0.78	0.2505
0.2	0.1435	0.1533	0.1484	1.484	0.2	0.1684	0.65	0.2169

CURVAS PATRÓN PARA PESO SECO

PESO 1 (g)	PESO 2 (g)	DIF. DE PESO	PROMEDIO (g/mL)	Fact de concent Peso seco (g/mL)	Volumen (mL)	Peso seco(g/L)
0.1290	0.1382	0.0092	0.0103	0.00103	1	1.03
0.1243	0.1346	0.0103	0.0092	0.00092	0.8	0.92
0.1232	0.1341	0.0109	0.0078	0.00078	0.6	0.78
0.1256	0.1348	0.0092	0.0065	0.00065	0.4	0.65
0.1289	0.1388	0.0099	0.0053	0.00053	0.2	0.53
0.1255	0.1343	0.0088			0	
0.1272	0.1337	0.0065				
0.1255	0.1328	0.0073				



ANEXO II. Determinación de la actividad amilolítica por el método de extinción del complejo almidón-yodo.

Determinación de la actividad amilolítica por el método de extinción del complejo almidón-yodo.

La porción amilosa del almidón es responsable del color azul obtenido con yodo. Las unidades de glucosa en la cadena de amilosa están dispuestas en forma helicoidal de tal forma que 6 anillos piranosos forman una vuelta de la hélice. Las dimensiones internas de la espiral son tales que la interacción del yodo con la amilosa produce un complejo de inclusión helicoidal en el que la molécula del halógeno ocupa el centro de la cavidad de la estructura helicoidal (Fogarty, 1983). Se han propuesto diversas modificaciones al método original de Wohlgemuth reportado en 1908. Smith y Roe, en 1949, indicaron que bajo condiciones apropiadas de análisis se pueden obtener intensidades de color almidón-yodo proporcionales al tiempo de incubación y a la concentración de enzima utilizada.

La determinación de actividad amilolítica se realiza con la siguiente metodología:

ESTE METODO ES VALIDO PARA CELULAS Y SOBRENADANTES DE CULTIVOS OBTENIDOS CON CONCENTRACIONES DE ALMIDON ≤ 20 g/L.

- A) Precalentar un baño de agua a la temperatura adecuada.
- B) En los tubos de ensaye pequeños (en los que se efectuará la reacción enzimática) agregar 0.8 ml de solución amortiguada de almidón (ver anexo de reactivos). Dejar calentar a baño maría para equilibrar la temperatura (considerar el número de tubos necesarios incluyendo los controles o blancos). **EL ANÁLISIS SE REALIZARÁ SIEMPRE POR DUPLICADO.**
- C) Descongelar las muestras que se analizarán en el baño maría, de tal manera que alcancen la temperatura de la reacción enzimática.

OJO: Descongelar solo las muestras a analizar.

- D) **BLANCOS O CONTROLES:** Al inicio, para cada muestra a analizar preparar un blanco con duplicado, para lo cual se seguirá estrictamente el siguiente procedimiento en el orden descrito.
 - Agregar 0.1 ml de ácido sulfúrico 2N (ver anexo de reactivos) por cada tubo que contenga 0.8 ml de solución amortiguada de almidón
 - Mezclar y poner los tubos en un baño con hielo
 - Enseguida pasar a la etapa siguiente.

- E) **A To** agregar 0.1 ml de muestra al tubo respectivo, esto incluye a los controles que se colocaron en hielo, estos blancos o controles permitirán determinar la cantidad inicial de almidón (es decir aquella de la solución amortiguada de almidón + aquella aportada por la muestra). Los blancos tendrán que permanecer refrigerados durante la incubación de las muestras a la temperatura indicada.

Con el fin de respetar los tiempos de incubación de forma rigurosa cuando se evalúen un gran número de muestras, dejar 20 segundos entre cada muestra antes de agregar la siguiente.

- F) Después de 10 minutos de incubación parar la reacción adicionando 0.1 ml de ácido sulfúrico 2N, considerando los 20 segundos de diferencia entre las diferentes muestras.

Ojo: Dado que existe un periodo de 20 segundos entre cada muestra y que la incubación se efectúa durante 10 minutos (600 s), vigilar que no se realicen al mismo tiempo un gran número de muestras ya que se debe considerar en parar la reacción de la primera muestra después de 10 min de incubación.

Una vez concluida la reacción enzimática se determinará el almidón residual con el **método de extinción del complejo almidón-yodo**, de acuerdo con el siguiente protocolo:

- En una celda desechable del espectrofotómetro (o en un tubo de ensaye) agregar 2.4 ml de la solución yodo-yoduro al 4%.
- Agregar 0.1 ml de la muestra a analizar (mientras se encuentre en el rango de concentración de la curva estándar, diluir cuando sea necesario).
- Agitar bien.
- Leer la absorbancia a 620 nm

Se leyeron los valores de absorbancia a 620 nm y se relacionaron con una curva patrón de almidón (en todos los casos se utilizó almidón soluble de papa Prolabo-Merck Eurolab). Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar 10 mg de almidón en 30 minutos (Fórmula 1).

$$\text{Actividad amilolítica (U/mL)} = (A_{\text{blanco}} - A_{\text{muestra}}) \times 1/P \times 3 \dots\dots\dots(1)$$

Donde:

P = pendiente de la curva patrón de almidón (absorbancia a 620 nm vs. concentración de almidón en g/L).

Curva estándar de almidón:

Realizar una curva de calibración en el siguiente rango de concentraciones 0 – 5 g/L (almidón prolabo)

Realizar la determinación tal como se describió previamente (a 620 nm)

Graficar los datos de concentración de almidón vs las lecturas de absorbancia.

Preparar solución estándar de almidón de 7g/L (almidón soluble de papa Prolabo).

Tubo	Volumen de solución estandar (ml)	Volumen de agua destilada (ml)	Concentración de almidón g/L
blanco	-	1.0	0
1	0.2	0.8	1.4
2	0.4	0.6	2.8
3	0.6	0.4	4.2
4	0.8	0.2	5.6
5	1.0	-	7.0

REACTIVOS

Solución de almidón amortiguada. Agregar 0.7 g de almidón soluble Prolabo en 100 ml del buffer correspondiente (aquel para el cual la amilasa muestre mayor actividad). Agitar ligeramente (para que el almidón no se pegue en las paredes del matraz), calentar en el horno de microondas durante algunos segundos o minutos, hasta que llegue a ebullición y que la solución este totalmente soluble. (ojo: esta solución no se conserva, se tira después de los experimentos del día).

Solución concentrada de yodo-yoduro.

KI: 15 g

I₂: 1.5 g

Agua destilada: 500 ml

Conservar en un frasco ámbar en refrigeración.

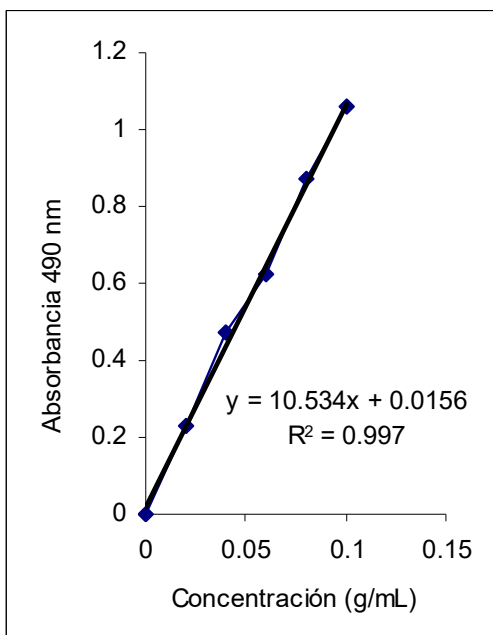
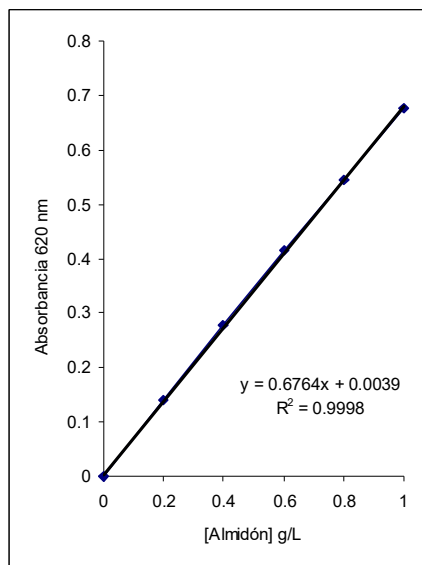
Solución yodo-yoduro al 4%: Previo a la realización de la prueba preparar a partir de la solución concentrada una solución diluida al 4% (v/v). Dicha solución no se conservará y se desechará después de realizar las determinaciones.

Solución de ácido sulfúrico 2N: 5.56 ml de H₂SO₄ al 96%, aforar a 100 ml con agua destilada.

Tratamiento de la muestra a analizar: Si se evalúa la actividad asociada a las células, un cultivo de 24h (o menos) se centrifuga (15,000 rpm, 15 min, 4°C), las células se lavan y se congelan hasta su análisis.

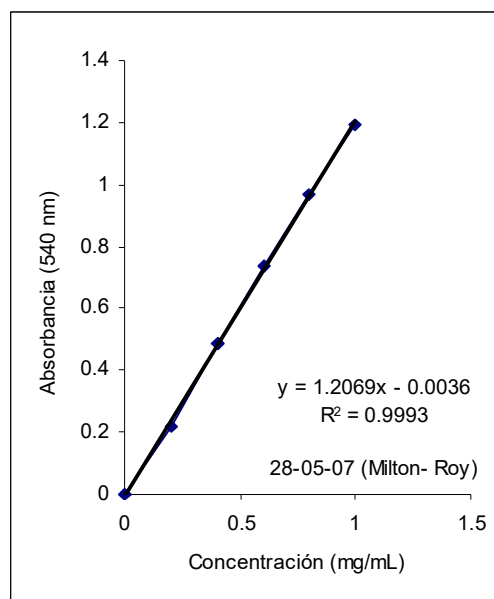
*Ejemplos de curvas patrón, hay que considerar que durante el proyecto se hicieron las necesarias cada vez que se terminaba el reactivo.

CURVA PATRÓN DE ALMIDÓN.				
Método de extinción del almidón.				
Concentración de 5g/L			Concentración	Absorbancia
Abs 1	Abs 2	PROMEDIO	0	0
0.136	0.143	0.1395	0.2	0.1395
0.275	0.28	0.2775	0.4	0.2775
0.414	0.415	0.4145	0.6	0.4145
0.542	0.547	0.5445	0.8	0.5445
0.67	0.683	0.6765	1	0.6765



Curva patrón de Azúcares totales				
Método fenol-sulfúrico				
Tubo	[$\mu\text{g/mL}$]	Abs1	Abs2	Promedio
Blanco	0.1	1.048	1.07	1.059
1	0.08	0.918	0.826	0.872
2	0.06	0.634	0.61	0.622
3	0.04	0.464	0.478	0.471
4	0.02	0.229	0.23	0.2295
5	0	0	0	0

Curva patrón de Azúcares reductores				
Método DNS				
Tubo	[mg/L]	Abs 1	Abs 2	Promedio
0	0	0	0	0
1	0.2	0.223	0.217	0.22
2	0.4	0.492	0.481	0.4865
3	0.6	0.734	0.734	0.734
4	0.8	0.962	0.97	0.966
5	1	1.2	1.185	1.1925



ANEXO III. A. Azúcares reductores (método de DNS) y B. Azúcares totales (método de fenol-sulfúrico)

A. Azúcares reductores (Método de DNS)

El método del ácido dinitrosalicílico (Miller.*et al.*, 1960) es utilizado para medir azúcares reductores presentes naturalmente en alimentos o liberados por enzimas. En esta reacción el ácido 3,5-dinitrosalicílico es reducido al derivado de monoamina rojizo

REACTIVOS	100mL
NaOH	1.4 g
3,5 ac. dinitrosalicílico	0.75g
Tartrato de Na y K	10.0 g
Fenol	0.54%
Metabisulfito de Na	0.59 g

- Disolver en este orden en agua destilada y dejar reposar 24 h antes de usarlo.
- Guardar en frasco Ámbar.

Procedimiento

0.5 mL de muestra

0.75 de DNS

Agitar, calentar en baño maría 5 min. Enfriar

Agregar 5 mL de agua destilada

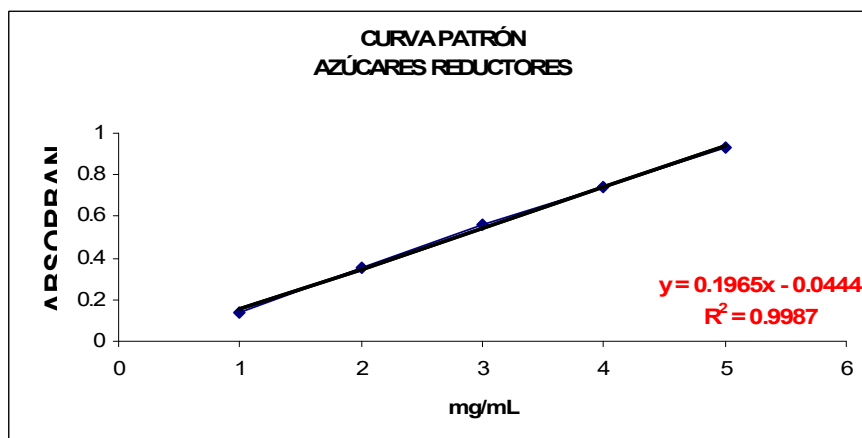
Leer a 540 nm

CURVA PATRÓN (glucosa)

Stock 1mg/mL

2. CURVA PATRÓN DE AZÚCARES REDUCTORES

	abs 1	abs 2	PROMEDIO
1	0.14	0.141	0.14
0.8	0.364	0.343	0.3535
0.6	0.56	0.564	0.56
0.4	0.744	0.754	0.744
0.2	0.927	0.899	0.927



B. Azúcares totales (Método de fenol-sulfúrico)

El método fenol-sulfúrico (Dubois, *et al.*, 1956) es un rápido y simple método calorimétrico para determinar los carbohidratos totales en una muestra. El método detecta toda clase de carbohidratos, incluyendo mono-, di-, oligo-, y polisacáridos. En este método, el ácido sulfúrico concentrado rompe todos los polisacáridos, oligosacáridos y disacáridos hasta convertirlos en monosacáridos. Las pentosas son deshidratadas a furfural, y las hexosas son transformadas a hydroxymetil furfural. Posteriormente estos compuestos reaccionan con el fenol y producen un color amarillo-oro. Para muestras ricas en hexosas, se recomienda hacer una curva patrón de glucosa (100µg/mL) y leer a 490 nm en un espectrofotómetro (Be Miller, 2003).

Los carbohidratos (azúcares simples, oligosacáridos, polisacáridos y sus derivados) reaccionan en presencia de ácido concentrado y calor para generar derivados de furano que se condensan con el fenol para formar los compuestos estables de color amarillo-oro que pueden ser medidos espectrofotométricamente (Nielsen, 2003).

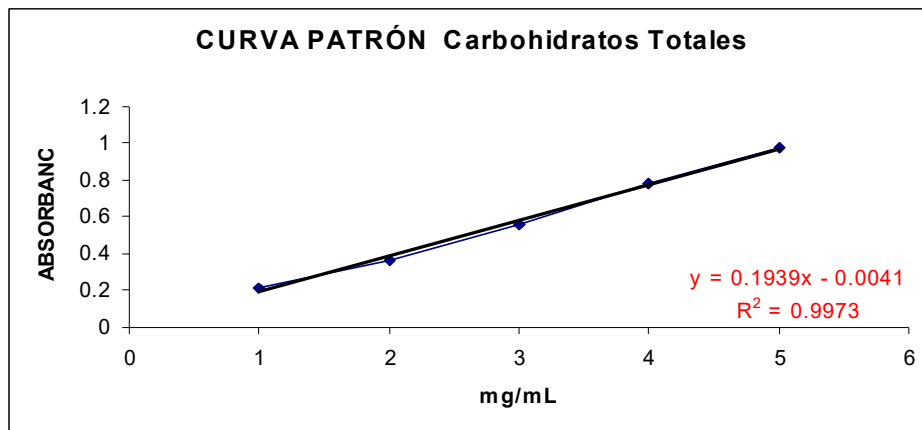
REACTIVOS	
Fenol	5%
H ₂ SO ₄	Concentrado

Procedimiento

0.5 mL de muestra
0.5 mL de fenol (5%)
Agitar, reposar 3 min. 2.5 mL de [H₂SO₄]
Agitar. Reposar 10 min
Leer a 490 nm

CURVA PATRÓN DE CARBOHIDRATOS TOTALES

[g/ml]	ABS 1	ABS 2	PROMEDIO
1	0.209	0.216	0.2125
0.8	0.327	0.367	0.367
0.6	0.545	0.561	0.561
0.4	0.784	0.773	0.7785
0.2	0.97	0.977	0.9735



ANEXO IV. Compilado de resultados de Cultivos puros

<i>Sii.-25124</i>		DO	pH	Almidón g/L	Amilolítica Actividad U/L	Azúcares Totales g/L	Azúcares Reductores g/L	Ácido láctico g/L	[DNA] ng/mL
Tiempo	BIOMASA g/L	Crecimiento							
0.0	0.072	0.1398	6.525	16.0052	31.74	19.4466	2.0664	1.20	10.86
0.5	0.081	0.1752							9.43
1.0	0.102	0.2645	6.475	14.5085	19.40	15.8202	1.9751		6.29
1.5	0.135	0.4057							10.93
2.0	0.179	0.5910	6.285	14.4346	34.65	12.6163	2.1793		19.86
2.5	0.260	0.9357							60.57
3.0	0.430	1.6535	5.810	14.2350	134.15	13.0672	1.9888	1.74	256.57
3.5	0.553	2.1760							
4.0	0.621	2.4610	5.450	12.1286	166.57	11.5958	1.7881		
4.5	0.762	3.060							
5.0	0.810	3.2620	5.180	10.4656	171.01	11.8568	1.6399		
5.5	0.886	3.5845							
6.0	0.953	3.8710	4.885	8.0636	154.38	10.2430	1.6364	3.88	
6.5	0.982	3.9920							
7.0	1.018	4.1445	4.740	6.6223	143.29	9.1039	1.5908		249.14
7.5									
8.0	1.055	4.3010	4.635	5.1072	139.41	9.7684	1.3548		
8.5									
9.0	1.057	4.3115	4.595	4.8854	113.64	9.1988	1.2875		
9.5									
10.0	1.087	4.4385	4.555	5.1072	104.49	8.4156	1.1312	5.75	
11.0	1.087	4.4345	4.625	5.0702	66.80	9.1039	1.1461		
12.0	1.070	4.3625	4.630	4.3681	50.44	9.0089	1.1837	8.39	337.43
26.0	1.087	4.4380	4.595	4.9963	0.55	8.7004	1.0548	6.53	201.14

W confusa L17		DO	pH	Almidón g/L	Amilolítica Actividad U/L	Azúcares Totales g/L	Azúcares Reductores g/L	Ácido láctico g/L	[DNA] ng/mL
Tiempo	BIOMASA g/L	Crecimiento							
0.0	0.011	0.1507	6.610	15.8758	0.0	17.9799	1.6729	0.2497	0.001
0.5	0.013	0.1676	6.690	16.4302	0.0				
1.0	0.015	0.1820	6.645	16.1715	0.0	13.0672	1.9101		
1.5	0.016	0.2007	6.675	15.3585	0.0				
2.0	0.020	0.2409	6.675	15.8389	0.0	12.7350	1.9672		0.095
2.5	0.025	0.2864	6.575	16.8736	0.0				
3.0	0.032	0.3561	6.550	17.1508	0.0	12.5926	1.8349	0.5745	
3.5	0.042	0.4524	6.475	16.5225	0.0				
4.0	0.051	0.5486	6.445	15.4693	0.0	12.5214	1.6182		
4.5	0.065	0.6911	6.435	14.8226	0.0				3.280
5.0	0.084	0.8752	6.325	16.5595	0.0	13.0909	1.4426		
5.5	0.118	1.2170	6.205	18.3740	0.0				2.925
6.0	0.136	1.3950	6.120	15.5285	0.0	11.8806	1.5042	1.9346	44.457
6.5	0.153	1.5645	6.025	15.1220	0.0				43.200
7.0	0.169	1.7235	6.055	14.3089	0.0	11.9992	1.5406		49.257
7.5				16.3045	0.0				62.971
8.0	0.195	2.4550	5.735	16.7849	0.0	12.2366	1.3924		
8.5				17.1175	0.0				
9.0	0.242	2.8600	5.685	15.9719	0.0	11.5009	1.1848		
9.5				14.7154	0.0				
10.0	0.269	3.0555	5.615	16.7480	0.0	11.2161	1.0229	2.8687	
11.0	0.282	3.3120	5.600	16.6371	0.0	11.1211	1.1529		
12.0	0.289	3.6525	5.585	16.0089	0.0	11.2635	1.0275	2.6623	80.000
26.0	0.302	5.3535	5.505	16.3045	0.0	10.4566	0.9864	2.0610	84.457

<i>Lb plantarum</i> A6		DO	pH	Almidón g/L	Amilolítica Actividad U/L	Azúcares Totales g/L	Azúcares Reductores g/L	Ácido láctico g/L	[DNA] ng/mL
Tiempo	BIOMASA g/L	Crecimiento							
0.0	-0.003	0.1354	6.645	16.6704	44.346	18.2488	1.5406	0.5648	124
0.5	0.033	0.1396	6.7	16.6334					
1.0	0.039	0.1604	6.77	15.8758	44.346	14.1114	1.5338		
1.5	0.048	0.1912	6.775	15.5802					
2.0	0.063	0.2420	6.685	14.2868	27.716	13.8267	1.3285		279
2.5	0.083	0.3140	6.565	16.9475					
3.0	0.110	0.4084	6.545	16.1530	321.508	13.4446	1.4722	0.8282	1116
3.5	0.149	0.5440	6.445	15.5248					
4.0	0.184	0.6648	6.4	14.7487	399.113	12.5451	1.9238		7900
4.5	0.227	0.8168	6.305	12.5684					
5.0	0.280	1.0008	6.16	13.3999	997.783	11.8331	3.1600		8400
5.5	0.416	1.4750	6.055	12.3503					7700
6.0	0.525	1.8575	5.91	8.2114	1618.625	10.9550	3.6367	1.7937	7500
6.5	0.651	2.2955	5.675	4.7007					6943
7.0	0.828	2.9145	5.58	2.1508	2400.222	10.6702	6.6200		8529
7.5		3.5955	5.32	1.3089					7314
8.0	1.339	4.6970	5.205	1.0170	3697.339	10.1718	7.0944		
8.5		5.7500	5.145	0.7288					
9.0	1.834	6.4250	4.995	0.6401	4273.836	8.8191	5.8879		
9.5		7.4400	4.89	0.6401					
10.0	2.306	8.0715	4.805	0.7324	4301.552	6.9916	4.9984	6.7881	
11.0	2.632	9.2110	4.645	0.7990	4440.133	6.8967	4.3392		
12.0	2.853	9.9815	4.545	0.8137	4434.590	6.2797	4.3210	9.0030	7514
26.0	3.814	13.3345	4.025	0.8174	5155.211	1.2958	1.0548	17.8913	10729

**ANEXO V. Compilado de resultados de Cultivos mixtos
Sii.-25124/ *Lb plantarum* A6**

	DO	pH	Almidón g/L	Actividad Amilolítica U/L	Actividad Amilolítica U/L	Totales g/L	Reductores g/L	Ácido láctico g/L	[DNA] ng/mL	DNA] ng/mL
tiempo	Crecimiento			<i>LbplA6- Sii-25124</i>	<i>LbplA6- Sii-25124</i>				<i>Sii-25124</i>	<i>LbplA6</i>
0.0	0.3824	6.510	18.255	0.000	44.624	20.1633	0.3220	0.9585	10.8571	62
0.5	0.4434	6.565								
1.0	0.5172	6.480	15.856	0.000	50.612	20.4006	0.3365		9.4286	167
1.5	0.6954	6.405							6.2929	466
2.0	0.9215	6.245	13.692	0.000	117.991	18.9766	0.8395		10.9286	567
2.5	1.1726	6.020							19.8571	651
3.0	1.8015	5.850	10.626	175.123	133.162	17.1730	2.0225	2.2750	60.5714	789
3.5	2.7240	5.525							256.5714	1474
4.0	3.1470	5.530	8.374	575.887	114.088	15.7490	3.0065			
4.5	3.4280	5.245								
5.0	3.7855	5.075	4.708	663.449	83.446	15.2269	3.2365			
5.5	4.5335	5.090								
6.0	4.6735	4.975	2.736	825.101	60.681	14.0403	3.3420	5.1212		
6.5	4.8875	4.955								
7.0	4.9375	4.850	2.130	1141.670	53.584	13.6131	3.7630		249.1429	2891
7.5										
8.0	5.3265	4.770	1.683	1872.474	49.592	13.0435	3.9160			
8.5										
9.0	5.6505	4.720	1.477	2599.910	45.511	12.1891	4.0175			
9.5										
10.0	6.2020	4.625	0.888	2791.872	43.648	11.9992	4.4400	9.3177		
11.0										
12.0	6.6055	4.580	0.836	2549.394	39.567	11.4771	4.0775			
26.0	7.0900	4.455	0.772	2616.749	41.519	10.3854	3.8810	13.117	337.4286	5857
26.0	12.4735	4.065	0.893	1842.164	33.180	4.4048	1.9855	13.910	201.1429	5897

Lplantarum A6 / W confusa L17

	DO	pH	Almidón	Actividad Amilolítica U/L	Totales	Reductores	Ácido láctico	DNA ng/mL	DNA ng/mL
tiempo	Crecimiento		g/L	<i>Lb plantarum A6</i>	g/L	g/L	g/L	<i>Lb plantarum A6</i>	<i>Wconfusa L17</i>
0.0	0.3765	6.625	20.0615	44.346	18.5669	0.173	0.7745	146	0.0014
0.5	0.3952	6.57	18.1027						
1.0	0.4112	6.505	17.5881	44.346	15.4405	0.262			
1.5	0.4992	6.475	17.5869						
2.0	0.5700	6.595	16.1734	27.716	14.8234	0.289		629	0.0008
2.5	0.6325	6.52	16.8394						
3.0	0.8315	6.49	15.8091	321.508	14.9658	0.32	1.3496	2657	0.0955
3.5	1.172	6.395	15.6671						
4.0	1.266	6.315	15.3016	399.113	14.4912	0.778			
4.5	1.365	6.205	14.3577					2794	0.0099
5.0	1.596	6.155	12.9454	997.783	15.0845	1.3725		4126	0.1102
5.5	1.961	5.825	11.9245					4440	0.1102
6.0	2.555	5.815	9.5103	1618.625	13.9928	3.071	2.1288	8286	0.2286
6.5	2.913	5.74	6.6891					8697	0.3074
7.0	3.295	5.66	5.5938	2400.222	12.1891	4.0815		8566	0.3040
7.5	4.110							10143	0.3794
8.0	4.813	5.115	1.9152	3697.339	12.0467	4.9725		11017	0.3886
8.5	5.683								
9.0	6.553	4.775	1.4833	4273.836	10.0057	5.022		10417	0.4000
9.5	7.181								
10.0	8.016	4.77	1.2252	4301.552	8.5817	4.7985	7.1174		
11.0	8.633								
12.0	9.501	4.58	1.0406	4440.133	7.8223	4.3965			
26.0	11.214	4.365	0.7825	4434.590	6.4102	3.8935	8.3822	10703	0.5234
26.0	15.980	3.99	0.7431	5155.211	1.0110	0.8835	16.2972	10789	0.6857

Sii.-25124/ W confusa L17

	DO			Actividad U/L	Totales	Reductores	Ácido Láctico	[DNA] ng/mL	[DNA] ng/mL
tiempo	Crecimiento	pH	Almidón	Sii.-25124	g/L	g/L	g/L	Sii.-25124	W. confusa L17
0.0	0.222	6.660	18.7066	6.0976	19.7361	1.6912	0.8109	101.43	0.0220
0.5	0.251	6.455	15.8610						
1.0	0.340	6.450	15.7502	7.2062	18.9292	1.7885		160.00	0.0434
1.5	0.484	6.420	16.2676					202.86	0.0609
2.0	0.677	6.330	16.3045	59.3126	16.4373	1.5969		435.43	0.0514
2.5	0.966	6.055	15.1589					389.14	0.0937
3.0	1.725	5.815	14.2350	71.2306	16.4135	2.0195	2.0317	714.29	0.1520
3.5	2.157	5.625	12.6460						
4.0	2.641	5.455	12.2025	178.4922	14.3725	1.6684		811.43	0.1617
4.5	3.110	5.260	10.9830						
5.0	3.587	5.030	10.0961	72.3392	12.9011	1.3391			
5.5	3.939	4.920	9.1353					662.86	0.1989
6.0	4.209	4.900	8.1744	29.1020	11.7619	0.8974	4.9895		
6.5	4.387	4.870	7.4723						
7.0	4.685	4.795	6.7701	42.4058	11.2161	0.8005			
7.5	4.629								
8.0	4.705	4.715	5.9202	22.7273	11.3585	0.6704			
8.5									
9.0	4.892	4.650	5.7354	10.8093	10.1718	0.6095			
9.5									
10.0	4.887	4.615	4.8485	34.0909	10.6465	0.5793	6.3717	925.71	0.3328
11.0									
12.0	4.863	4.630	5.9202	0.0000	10.6227	0.5904			
26.0	4.804	4.615	5.5100	0.0000	9.0801	0.5991	7.4113	1160.00	0.3897
26.0	4.730	4.570	5.2919	0.0000	8.3444	0.5360	8.6883	720.00	0.4160

Article

Microbial Interactions between Amylolytic and Non-Amylolytic Lactic Acid Bacteria Strains Isolated during the Fermentation of Pozol

Sandra Bolaños-Núñez ¹, Jorge A. Santiago-Urbina ², Jean-Pierre Guyot ³, Gloria Díaz-Ruiz ¹ and Carmen Wachter ^{1,*}

¹ Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 04510, Mexico; zandybn@gmail.com (S.B.-N.); gloriadr@unam.mx (G.D.-R.)

² División de Dirección de Carrera de Agricultura Sustentable y Protegida, Universidad Tecnológica de los Valles Centrales de Oaxaca, Zimatlán, Oaxaca 71270, Mexico; jorgesantiago.urбина@gmail.com

³ Institut de Recherche pour le Développement, UMR 204 Nutripass, 34394 Montpellier, France; nutripass@ird.fr

* Correspondence: wachter@unam.mx; Tel.: +52-55-5622-5315



Citation: Bolaños-Núñez, S.; Santiago-Urbina, J.A.; Guyot, J.-P.; Díaz-Ruiz, G.; Wachter, C. Microbial Interactions between Amylolytic and Non-Amylolytic Lactic Acid Bacteria Strains Isolated during the Fermentation of Pozol. *Foods* **2021**, *10*, 2607. <https://doi.org/10.3390/foods10112607>

Received: 11 August 2021
Accepted: 5 October 2021
Published: 26 October 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Pozol is a Mexican beverage prepared from fermented nixtamalized maize dough. To contribute to understanding its complex microbial ecology, the effect of inoculating on MRS-starch pure and mixed cultures of amylolytic *Sii-25124* and non-amylolytic *W. confusa* 17, isolated from pozol, were studied on their interactions and fermentation parameters. These were compared with *L. plantarum* A6, an amylolytic strain isolated from cassava. Microbial growth, kinetic parameters, amylolytic activity, lactic acid production, and hydrolysis products from starch fermentation were measured. The population dynamics were followed by qPCR. *L. plantarum* A6 showed higher enzymatic activity, lactic acid, biomass production, and kinetic parameters than pozol LAB in pure cultures. Mixed culture of each pozol LAB with *L. plantarum* A6 showed a significant decrease in amylolytic activity, lactic acid yield, specific growth rate, and specific rate of amylase production. The interaction between *Sii-25124* and *W. confusa* 17 increased the global maximum specific growth rate (μ), the lactic acid yield from starch ($Y_{lac/s}$), lactic acid yield from biomass ($Y_{lac/x}$), and specific rate of lactic acid production (q_{lac}) by 15, 30, 30, and 40%, respectively, compared with the pure culture of *Sii-25124*. Interactions between the two strains are essential for this fermentation.

Keywords: pozol; lactic acid bacteria; fermentation; starch; microbial dynamics

1. Introduction

Fermented cereals play an essential role in human nutrition in all parts of the world [1,2]. In Southeastern México, pozol, a traditional refreshing non-alcoholic beverage based on nixtamalized maize, is consumed [3]. It is a popular beverage that is part of the diet, especially in rural households and village communities. The process of production involves cooking maize in an alkaline solution containing 1% lime (CaO). These cooked corn grains (named nixtamal) are then washed with water and milled to make a dough called masa or nixtamal dough. It is shaped into balls, wrapped in banana plant leaves, and left at ambient temperature, usually 30–35 or even 40 °C, for 3 to 5 h, one week, one month, or more. It is consumed immediately after preparing it or after fermentation [4]. Pozol is suspended in water and consumed. A natural fermentation, without an intentional inoculum, but knowing that most microorganisms are introduced into the dough during the milling process, occurs [5]. Microbial groups, mainly lactic acid bacteria (LAB), enterobacteria, *Bacillus* spp., yeasts, and molds, have been detected [3,6–9]. This process is dominated by LAB, mainly *Streptococcus* genus [6,8]. The first day of fermentation is characterized by the presence of amylolytic lactic acid bacteria (ALAB), such as *Streptococcus bovis* [8,10], identified now as *Sii-25124* (*Streptococcus infantarius* ssp. *infantarius*);

smaller concentrations of *Lactobacillus fermentum* (new name *Limosilactobacillus fermentum*) [11], *Lactobacillus plantarum* (new name *Lactiplantibacillus plantarum*) [11], *Enterococcus*, *Leuconostoc*, and *Lactococcus* [8,9]. These LAB are essential microorganisms for pozol fermentation, as most of them can use starch [8,10], the most abundant constituent of maize.

LAB contributes to the stability of the product by inhibiting unwanted microorganisms [12]. They also develop characteristics such as texture and impact in the product's sensory attributes [13,14].

Sii-25124 produces two amylases to metabolize starch, a cytoplasmic α -amylase, and an extracellular amylopullulanase [15]. This extracellular enzyme hydrolyzes starch in the dough to produce oligosaccharides that allow the growth of other LAB species. Thus, it has been postulated that ALAB plays a vital role in making starch available for other microorganisms [6], as non-amyolytic LAB. In pozol, *Weissella confusa* is the most frequent non-amyolytic LAB reported [6,7,16]. Strains of these have been characterized by the gene needed to metabolize other carbohydrates different from the starch such as sucrose, hemicellulose, cellulose, and starch residues [16].

Streptococcus and *Weissella* have been detected in most of the samples of pozol that have been analyzed [6,8]. Pozol fermentation is a complex process, as it is based on a substrate that contains different kinds of compounds and a varied microbiota, which most likely interact.

This study aimed to determine the presence of bacterial interactions between amyolytic and non-amyolytic LAB. We aim to determine if growth in MRS-glucose or MRS-starch, and amyolytic activity of pure and mixed cultures of predominant bacterial species previously isolated from pozol: *Sii-25124* (amyolytic), *W. confusa* 17 (non-amyolytic), and *Lactobacillus plantarum* A6 (new name *Lactiplantibacillus plantarum*), a highly amyolytic strain isolated from cassava (as a control), depending on the use of pure and mixed cultures of these bacteria.

2. Materials and Methods

2.1. Bacterial Strains

Streptococcus infantarius ssp. *infantarius* 25124, an amyolytic LAB, and *Weissella confusa* 17, a non-amyolytic LAB isolated from pozol [8,17] were used. In addition, *Lactobacillus plantarum* A6 (new name *Lactiplantibacillus plantarum*), previously isolated during cassava retting [18] kindly provided by Dr. Jean-Pierre Guyot (Institut de Recherche pour le Développement, Montpellier, France), was used as a positive control for amyolytic activity. All strains were maintained in the stock culture collection of the laboratory and kept in 30% glycerol at $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.2. Inoculum Preparation

The strains were reactivated by streaking onto de Man Rogosa and Sharpe (MRS) agar (BD Difco, Sparks, MD, USA) and incubated at $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 48 h. Then, they were cultivated in 10 mL of appropriated culture media. *W. confusa* 17 was inoculated in MRS-glucose broth (MRS-G; BD Difco, Sparks, MD, USA); while *Sii-25124* and *L. plantarum* A6 were grown in modified-MRS-starch (tryptone (10 g/L; BD-Difco, Sparks, MD, USA), ammonium citrate (2.17 g/L; JT Baker, Phillipsburg, NJ, USA), sodium acetate (5 g/L; JT Baker, Phillipsburg, NJ, USA), magnesium sulphate heptahydrate (0.207 g/L; Sigma, St. Louis, MO, USA), manganese sulphate (0.056 g/L; Sigma, St. Louis, MO, USA), dipotassium phosphate (2.62 g/L; JT Baker, Phillipsburg, NJ, USA), meat extract (10 g/L; BD-Difco, Sparks, MD, USA), yeast extract (5 g/L; BD-Difco, Sparks, MD, USA), and starch (20 g/L; Prolabo-Merck Eurolab, France). All strains were incubated at $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 24 h. For the inoculum preparation, 10 mL of the previously activated strain were transferred to 100 mL of MRS-S or MRS-G according to the strain and incubated at $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ overnight. The cultures were used as starters for the following experiments.

2.3. Monoculture Fermentation

Fermentations of MRS-S broth using pure and mixed cultures were carried out in 1 L Erlenmeyer flasks containing 800 mL of culture medium at 30 °C for 24 h, statically. The sterilized medium was inoculated with the pure cultures grown overnight to start at a concentration of 1×10^6 UFC/mL, corresponding to an optical density of 0.1 at OD (600 nm). All experiments were performed in triplicate.

2.4. Mixed Culture Fermentations

Three different mixed cultures were performed for the assessment of bacterial interactions. The first mixed culture consisted of *Sii-25124* and *L. plantarum* A6, the second mix included *Sii-25124* and *W. confusa* 17, while the third involved *L. plantarum* A6 and *W. confusa* 17. Both strains were inoculated simultaneously to MRS-S broth in a ratio of 1:1 to achieve approximately 1×10^6 cells/mL. Fermentation was performed at 30 °C for 24 h, statically. All experiments were performed in triplicate.

2.5. Sample Collection and pH Determination

During the first seven h of fermentation, samples were collected every 30 min. After that, samples were taken every hour until 12 h after the fermentation had started, wherein a final sample was collected at 26 h of fermentation. The pH and biomass determination of each sample were recorded. The pH of the samples was measured in triplicates using a Jenway 3020 glass electrode pH meter standardized with pH buffer solutions.

2.6. Biomass Determination

A calibration curve of optical density at 600 nm (OD_{600}) and cell dry weight was established for each strain. Biomass concentration was determined by measuring the OD_{600} with Spectronic 21D spectrophotometer (Milton Roy) and related to dry weight measured after two washing and centrifugation cycles, followed by a drying step at 80 °C for 24 h. A calibration curve was previously performed between the optical density and the dry weight.

2.7. Determination of α -Amylase Activity

For determination of α -amylase activity, 10 mL of the fermented broth were centrifuged at 10,000 rpm, 4 °C for 15 min. To detect cell-bound amylase activity of *Sii-25124*, cell pellets were recovered, washed, and suspended in 0.1 M phosphate buffer (pH 6.8). Amylase activity was assayed at pH 6.8 and 37 °C by measuring the iodine-complexing ability of starch as described by Agati et al. [19]. To determine the amylase activity of *L. plantarum* A6, 10 mL of fermented broth was centrifuged at 10,000 rpm, 4 °C for 15 min, and the cell-free supernatant was recovered as a crude enzyme extract. Enzymatic activity was tested at pH 5.0 and 65 °C using the starch-iodine extinction method [20]. The lack of amylolytic activity of *W. confusa* 17, was proved on cells and on the supernatant.

2.8. HPLC Analysis

Samples were centrifuged at 10,000 rpm for 10 min, and supernatants were filtered through a 0.22 μ m Millipore membrane filter (EMD Millipore, Billerica, MA, USA). Lactic acid and starch hydrolysis products were determined with the liquid chromatography system (Perkin Elmer 250, Norwalk, CT, USA), equipped with a refractive index detector (Perkin-Elmer 30, Norwalk, CT, USA). Anion-exclusion aminex HPX-87H column (300 \times 7.8 mm; Bio-Rad, Hercules, CA, USA) was used. Sulfuric acid (0.01 N) was used as the mobile phase at a flow rate of 0.6 mL/min and a column temperature of 50 °C. L-Lactate (L-222; Sigma, Saint Louis, MO, USA) was used as standard. Analysis of hydrolysis products from starch fermentation was performed using high-performance liquid chromatography equipped with the refractive index detector and a Prodigy 5 ODS 2 C18 column (250 \times 4.6 mm; Phenomenex, Torrance, CA, USA). The products were eluted with water at a flow rate of 0.8 mL/min and a column temperature of 35 °C. Glucose,

maltose, maltotriose, maltotetraose, maltopentaose, maltohexaose, and maltoheptaose were identified by comparing their retention time with standards (Sigma, Saint Louis, MO, USA).

2.9. Sugars Quantification

Total and reducing sugars were determined using the Dubois et al. [21] and Miller methods [22].

2.10. Kinetic Parameters

The maximum specific growth rate, product and growth yields relative to the substrate ($Y_{lac/s}$ and $Y_{x/s}$, respectively), lactic acid and amylase yields from biomass ($Y_{lac/x}$ and $Y_{amy/x}$, respectively), specific rates of lactic acid or amylase production (q_{lac} and q_{amy} , respectively), and substrate consumption (q_s) were calculated as indicated by Díaz-Ruiz et al. [8].

Significant differences among the different cultures were determined for kinetic parameters by one-way analysis of variance (LSD, $\alpha = 0.05$). The statistical software Statgraphics Centurion XVI.I.

2.11. DNA Extraction

DNA from pure and mixed culture was extracted using the MagMax™ Nucleic Acid isolation kits (Ambion®, Thermo Fisher Scientific Baltics UAB, Vilnius, Lithuania). Twenty milliliters of each culture were centrifuged for 15 min at 10,000 rpm at 4 °C. Pellets were washed three times with sterile distilled water, and each sample was resuspended in 1 mL of sterile distilled water. Bacterial suspensions were stored at −21 °C or directly processed according to the manufacturer's instructions.

2.12. Real-Time PCR Primer Design and Assay Conditions

Primers for detecting phenylalanine transfer RNA (tRNA^{phe}) gene sequences of *S.ii* 25124, *L. plantarum* A6, and *W. confusa* 17 were designed by Applied Biosystems.

Real-time PCR assays were performed on an Applied Biosystems Prism 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems™, Foster City, CA, USA). qPCR was realized using HotStart-IT SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Scientific, Carlsbad, CA, USA). The 25 µL reaction volume consisted of 12.5 µL of 2X HotStart-IT SYBR Green qPCR Master Mix, 0.5 µM of forward and reverse primers, and 100 to 0.01 ng of DNA were mixed. PCR conditions were denaturation at 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of amplification: 15 s at 95 °C, 1 min at 60 °C, and 72 °C for 1 min. Fluorescence was detected at the end of the elongation phase for each cycle.

2.13. Calibration of Standards

Serial dilutions from 100 to 0.1 ng/µL of DNA from single strains samples (*Sii*-25124, *L. plantarum* A6, and *W. confusa* 17) were amplified using the primers and the abovementioned conditions. DNA was quantified with a nanodrop spectrophotometer (Agilent 8453). Each reaction was run in triplicate. Amplification efficiency was determined by plotting the threshold cycle for a 10-fold dilution series against the logarithm of the DNA concentration. Efficiency (E) of the qPCR assay was calculated using the equation $E = [10^{-(1/\text{slope})} - 1] \times 100$, where the slope refers to the slope of the standard curve for the dilutions series used in qPCR assay. DNA concentration of pure LAB was quantified using the mean values of CT obtained in three independent assays.

3. Results

3.1. Growth of Amylolytic and Non-Amylolytic-LAB in Pure and Mixed Culture

The ability of amylolytic and non-amylolytic LAB to grow on MRS-starch broth was evaluated in pure and mixed cultures during the first seven h of fermentation. As pure cultures, *Sii*-25124 presented a higher growth rate than that of *L. plantarum* A6 or *W.*

confusa 17 (Figure 1). After this time, these LAB (*Sii*-25124) remained in stationary phase, producing a maximum biomass concentration of 1.08 g/L, while that of *L. plantarum* A6 was 3.8 g/L after 24 h of fermentation. A similar biomass concentration (3.6 g/L) was produced with *L. plantarum* A6 and *Sii*-25124 co-culture. In the early stages of fermentation, this mixed culture showed the highest growth rate than those achieved by other pure or mixed culture fermentation (Figure 1). From 8 to 12 h of the experiment, *L. plantarum* A6 in co-fermentation with *W. confusa* 17 showed higher biomass concentration (3.2 g/L) than the co-culture *L. plantarum* A6-*Sii*-25124, and *Sii*-25124-*W. confusa* 17.

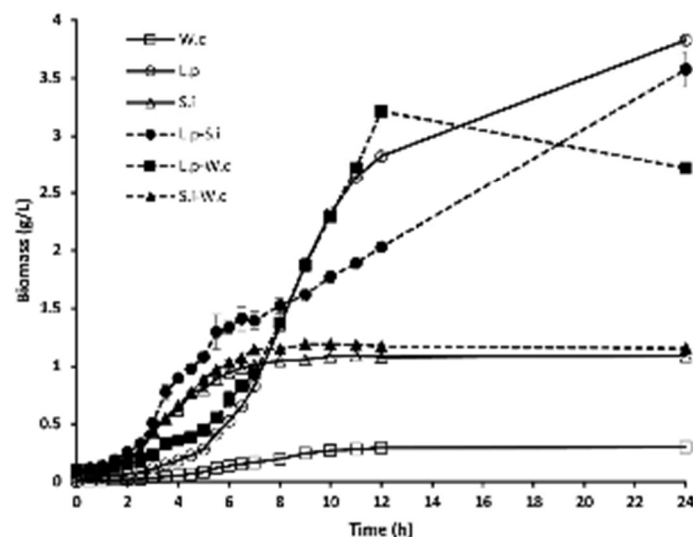


Figure 1. Biomass concentration during fermentation of MRS-starch broth at 30 °C using pure and mixed cultures of *L. plantarum* A6 (new name *Lactiplantibacillus plantarum*), *Sii*-25124, and *W. confusa* A17. Results are means of three independent fermentations. W.c, *W. confusa* 17; L.p, *L. plantarum* A6; S.i, *Sii*-25124. Vertical lines show standard deviations.

In previous experiments, biomass was measured as the dry weight of either single or mixed cultures. To detect the growth dynamics and effects of each of the inoculated LAB during MRS-starch broth fermentation, real-time PCR assay was also employed, using a specific probe for each strain. Findings were in accordance with the information obtained using biomass determination by dry weight. In pure culture, *L. plantarum* A6 reached the highest DNA concentration (~10,000 ng/mL), followed by *Sii*-25124 (Figure 2A), whereas *W. confusa* 17 did not grow. As shown in Figure 2B, in mixed fermentation with *L. plantarum* A6 and *Sii*-25124, the first species reached ~6000 ng/mL DNA, and the second one only increased to ~300 ng/mL. Thus, they coexisted, but *L. plantarum* A6 dominated the fermentation. However, in the mixed cultures of *W. confusa* 17 with *L. plantarum* A6 or with *Sii*-25124, *W. confusa* 17 was excluded from the fermentation, which *L. plantarum* A6 dominated, that reached ~10,500 ng/mL DNA (Figure 2C), a similar concentration as that obtained as a pure culture. In the mixed culture with *Sii*-25124 and *W. confusa* 17, starch fermentation was dominated by *Sii*-25124 (Figure 2D). However, the DNA concentration was only one sixth (~900 ng/mL) of the concentration reached as a pure culture (~6000 ng/mL, Figure 2A).

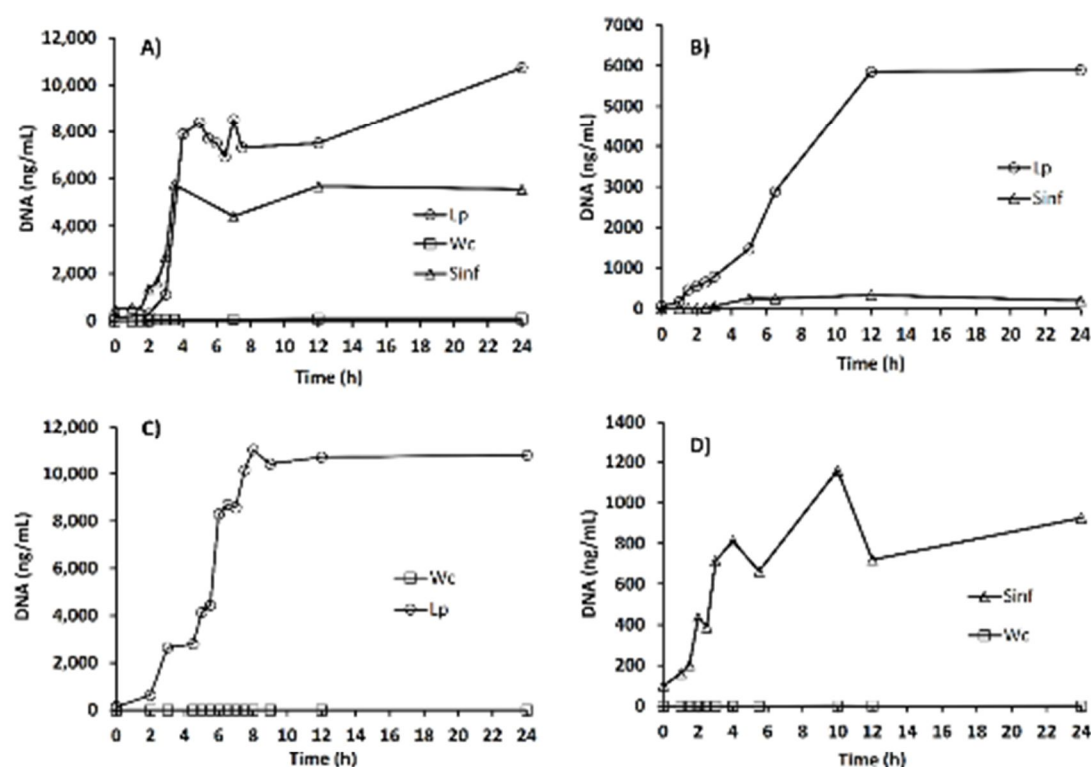


Figure 2. Growth, measured by DNA (Quantitative PCR) of *L. plantarum* A6 (new name *Lactiplantibacillus plantarum*), (Lp), *Sii-25124* (Sinf) and *W. confusa* 17 (Wc) DNA during the fermentation. (A) Fermentation performed by pure cultures; (B) fermentation performed by *L. plantarum* A6 and *Sii-25124*; (C) fermentation performed by *L. plantarum* A6 and *W. confusa* 17; (D) fermentation performed by *Sii-25124* and *W. confusa* 17.

3.2. Starch Hydrolysis

As expected, *Weissella confusa* 17 could not hydrolyze starch present in the medium (Figure 3A). However, from 2.5 to six h of fermentation, the mixed culture of *L. plantarum* A6 and *Sii-25124* presented the fastest starch hydrolysis. Whenever *L. plantarum* A6 was present, the starch was completely hydrolyzed (residual starch below 1 g/L) from 12 h of the assay. On the other hand, *Sii-25124* in monoculture and co-culture with *W. confusa* 17 could not hydrolyze starch completely (4.8 and 5.29 g/L of residual starch, respectively).

Reducing sugars were produced in concentrations of 4 to 7 g/L (Figure 3C). The maximum sugar concentration was in accordance with the lower starch concentration in the medium from 6 to 12 h of trial. In the case of *W. confusa* 17, *Sii-25124*, and their mixture, reducing sugar concentration did not increase (Figure 3C).

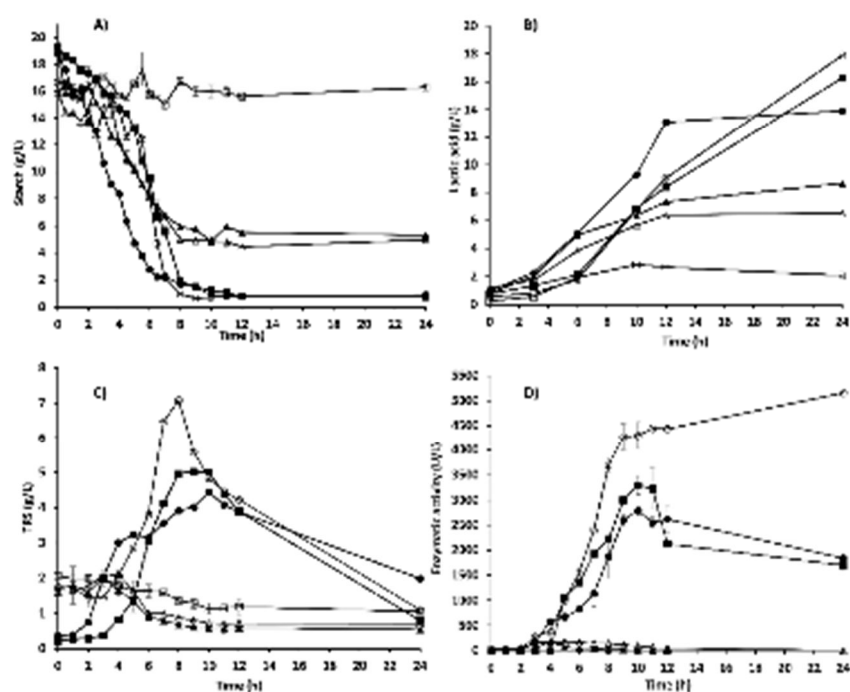


Figure 3. Changes in concentrations of (A) starch, (B) lactic acid, (C) total reducing sugar, and (D) enzymatic activity during MRS-starch broth fermentation. *L. plantarum* A6 (new name *Lactiplantibacillus plantarum*), (○); *Sii-25124* (△); *W. confusa* 17 (□); *L. plantarum* A6-*Sii-25124* (●); *L. plantarum* A6-*W. confusa* 17 (■); *Sii-25124*-*W. confusa* 17 (▲) at 30 °C. Results are means of three independent fermentations.

3.3. Amylolytic Activity and Starch Hydrolysis Products

In monoculture, *Sii-25124* showed low enzymatic activity during the first two hours of fermentation. After five h, this activity reached 176 U/L (Figure 3D), and then decreased to 1 U/L. Thus, during the first six h of fermentation, an increase in maltopentaose, maltotriose, and glucose concentration (starch hydrolysis products) were detected (Figure 4A). The amylolytic activity of the single and mixed cultures of *L. plantarum* A6 was higher than that of other cultures (Figure 3D). At nine h of fermentation, the amylolytic activity reached a value of 4273 U/L. After this time, the activity increased slowly until 5155 U/L at 24 h (Figure 3D). These results were in accord with the data obtained from the quantification of maltooligosaccharides. It was found that maltose, maltotriose, and glucose concentrations increased during the third and 12 h of fermentation (Figure 4B). In the mixed culture of *Sii-25124* and *W. confusa* 17, the maximum enzymatic activity (176 U/L) was reached at four h of fermentation. From this point, the amylolytic activity decreased rapidly to 72 U/L. In trials performed using co-culture of *L. plantarum* A6 and *W. confusa* 17, the amylase production was evident after five h of fermentation. This mixed culture showed a maximum activity (3293 U/L) at ten h of fermentation. This enzymatic activity was higher than that reached by the mixed culture of *L. plantarum* A6 and *Sii-25124* (2791 U/L). The α -amylase activity of *L. plantarum* A6 fermentation was the highest, while *W. confusa* 17 did not show activity. These results agree with the data obtained from the quantification of maltooligosaccharides, where an increase in starch hydrolysis products was not evident, as occurred with the cultures of *L. plantarum* A6 or *Sii-25124* (Figure 4A–C).

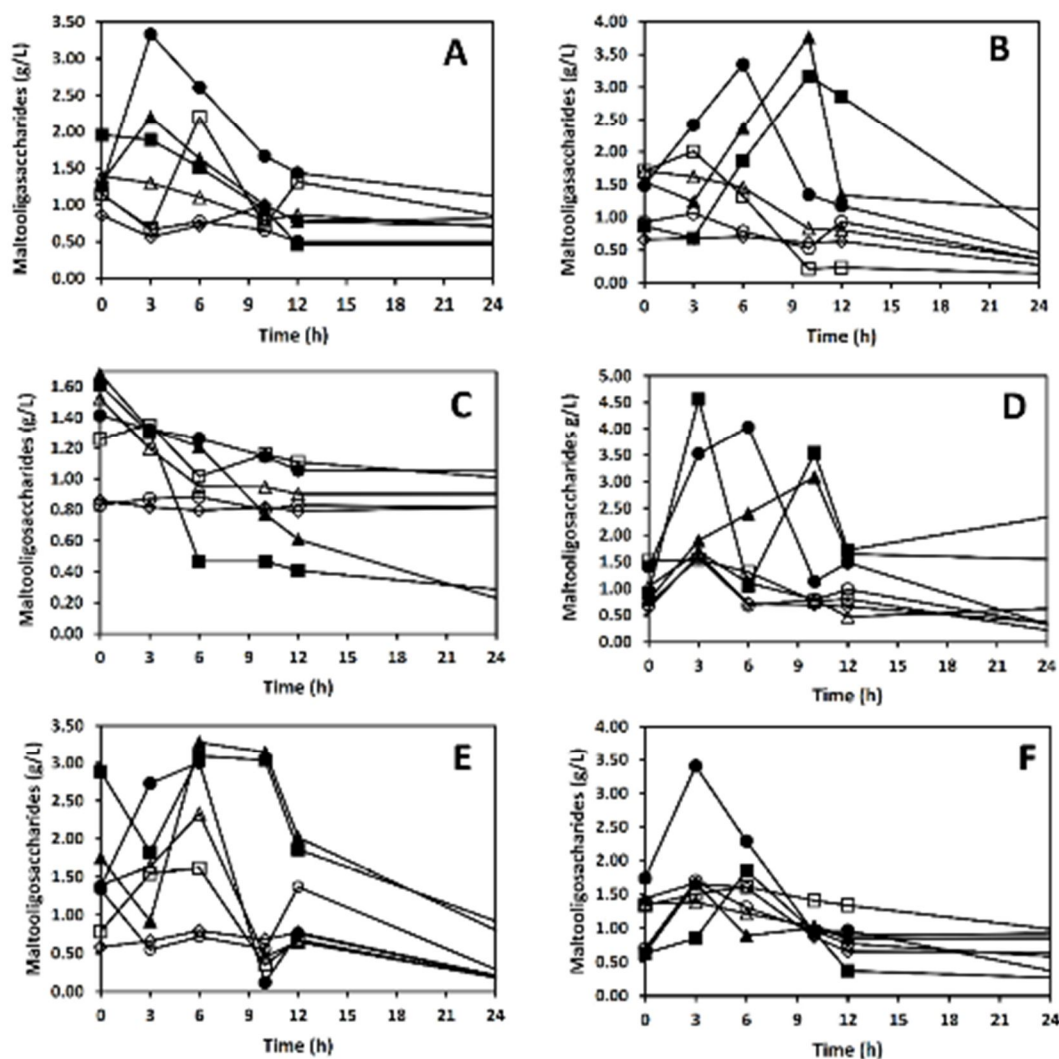


Figure 4. Hydrolysis products from starch fermentation using (A) *Sii-25124*; (B) *L. plantarum* A6 (new name *Lactiplantibacillus plantarum*); (C) *W. confusa* 17; (D) *L. plantarum* A6-*Sii-25124*; (E) *L. plantarum* A6-*W. confusa* 17; (F) *Sii-25124*-*W. confusa* 17. Glucose (▲), maltose (■), maltotriose (●), maltotetraose (△), maltopentaose (□), maltohexaose (○), maltoheptaose (◇).

3.4. Lactic Acid Production

The maximum lactic acid concentrations produced by *L. plantarum* A6, *Sii-25124*, and *W. confusa* 17 in pure culture were 17.90, 6.5, and 2 g/L, respectively. At 10 and 12 h of the assay, *L. plantarum* A6 in co-culture with *Sii-25124* produced the highest lactic acid concentration (Figure 3B). However, in the co-cultures of *L. plantarum* A6 and *Sii-25124* or *W. confusa* 17, the lactic acid concentration was lower than that reached as in pure culture, it was 17.90 g/L to 16 and 14 g/L, respectively (Figure 3B). On the contrary, in the co-culture of *Sii-25124* and *W. confusa* 17, the lactic acid concentration increased to 8 g/L, compared to 6.5 g/L produced by *Sii-25124* (Figure 3B).

3.5. Efficiency of Fermentation

As shown in Table 1, the highest lactic acid yield ($Y_{lac/s}$) was produced by *L. plantarum* A6 (1.09 g/g), and the lowest $Y_{lac/s}$ was obtained from the *W. confusa* 17 (0.32 g/g). Mixed cultures containing *L. plantarum* A6 reached $Y_{lac/s}$ 0.8 g/g. In general, mono and co-cultures including *L. plantarum* A6 showed high values for biomass/substrate yield, α -amylase/biomass yield, α -amylase/substrate yield, and q_{amy} compared to *W. confusa* 17 and *Sii*-25124. In addition, the maximum specific growth rate (μ) was higher for *L. plantarum* A6 than *Sii*-25124 and *W. confusa* 17 (Table 1). However, when *W. confusa* 17 and *Sii*-25124 were mixed, the μ value increased 18% (Table 1), compared to *Sii*-25124 as pure cultures.

Table 1. Kinetic parameters of starch fermentation by pure and mixed culture of LAB. Different lowercase letters in the same column show significant differences according to the analysis of variance at $p \leq 0.05$ (LSD test).

Inoculum	Parameters								
	$Y_{x/s}$ g/g	$Y_{lac/s}$ g/g	$Y_{lac/x}$ g/g	$Y_{amy/x}$ U/g	$Y_{amy/s}$ U/g	μ h ⁻¹	q_{lac} ^a	q_s ^b	q_{amy} ^c
<i>L. plantarum</i>	0.24 ± 0.03 ^d	1.09 ± 0.13 ^e	4.57 ± 0.02 ^b	1348.53 ± 20.40 ^c	323.39 ± 40.82 ^{bc}	0.43 ± 0.00 ^d	1.95 ± 0.01 ^c	1.79 ± 0.20 ^b	577.37 ± 8.74 ^d
<i>S. infantarius</i>	0.09 ± 0.00 ^b	0.50 ± 0.00 ^b	5.27 ± 0.03 ^c	200.74 ± 3.15 ^b	18.73 ± 0.50 ^a	0.28 ± 0.02 ^b	1.49 ± 0.07 ^b	2.96 ± 0.04 ^d	56.75 ± 0.89 ^a
<i>W. confusa</i>	0.027 ± 0.00 ^a	0.32 ± 0.02 ^a	10.21 ± 0.05 ^f	nd	nd	0.27 ± 0.01 ^b	2.71 ± 0.13 ^a	9.70 ± 0.16 ^e	nd
<i>L.p-S.i</i>	0.22 ± 0.01 ^d	0.82 ± 0.00 ^{cd}	3.73 ± 0.16 ^a	1668.66 ± 2.11 ^a	334.21 ± 1.05 ^c	0.11 ± 0.01 ^a	0.4 ± 0.02 ^a	0.48 ± 0.02 ^a	177.89 ± 0.22 ^b
<i>L.p-W.c</i>	0.15 ± 0.00 ^c	0.86 ± 0.02 ^d	5.91 ± 0.11 ^d	1232.33 ± 173.22 ^c	280.71 ± 14.62 ^b	0.33 ± 0.01 ^c	1.94 ± 0.03 ^c	2.26 ± 0.02 ^c	404.00 ± 56.85 ^c
<i>S.i-W.c</i>	0.11 ± 0.00 ^b	0.72 ± 0.02 ^c	7.43 ± 0.02 ^a	303.85 ± 16.80 ^b	27.16 ± 1.34 ^a	0.33 ± 0.01 ^c	2.47 ± 0.08 ^d	2.90 ± 0.14 ^d	101.03 ± 4.86 ^a

L.p., *Lactobacillus plantarum* A6 (new name *Lactiplantibacillus plantarum*); *S.i.*, *S. infantarius* 25124; *W.c.*, *Weissella confusa*. Biomass yield ($Y_{x/s}$) was calculated as grams of biomass produced per gram of utilized sugar; lactic acid yield ($Y_{lac/s}$) was calculated as grams of lactic acid produced per gram of utilized sugar; lactic acid yield ($Y_{lac/x}$) was calculated as grams of lactic acid produced per gram of dry cell weight; amylase yield ($Y_{amy/s}$) was calculated as units of amylase produced per gram of utilized sugar; amylase yield ($Y_{amy/x}$) was calculated as units of amylase produced per gram of dry cell weight; μ : maximum specific growth rate; q_{lac} , specific rate of lactic acid production; q_s , specific rate of substrate consumption; q_{amy} , specific rate of amylase production. a, g of lactic acid/g of cell dry wt^ah; b, g of substrate/g of cell dry wt^ah; c, U/g of cell dry wt^ah. nd, non-determined. These values are the mean ± standard deviation of three experiments. Different lowercase letters in the same column show significant differences according to the analysis of variance at $p \leq 0.05$ (LSD test).

4. Discussion

In pozol fermentation, starch from nixtamal has been reported to be the main carbon and energy source available to allow the development of microbiota [8,10]. Both amylolytic and non-amylolytic lactic acid bacteria have been identified [8,10]. It has been reported that after six h pozol fermentation, the concentration of non-amylolytic LAB is higher than that of ALAB [8] then ALAB should allow the growth of non-amylolytic LAB, as a result of starch degradation and maltodextrin and maltose production [10] which could act as substrate for non-LAB. In the present study, the effect of these bacteria in pure and mixed cultures on fermentation efficiency, α -amylase activity, dynamics, and microbial growth of pure and mixed cultures of amylolytic LAB and non-amylolytic LAB on MRS-starch broth were studied. MRS-starch broth was used due to the easiness of handling this as a model of starch fermentation instead of pozol nixtamal dough.

Results showed that the amylolytic strain *L. plantarum* A6 produced more biomass than *Sii-25124* and *W. confusa*. *L. plantarum* A6 is known as a highly amylolytic strain that has been used in different processes to produce pearl milled soybean fermented gruels [23], pearl milled-porridge [24], and sorghum porridge [25]. In this work, *L. plantarum* A6 showed higher microbial growth and α -amylase activity than *Sii-25124* and *W. confusa*. It is probably due to extracellular α -amylase and neopullulanase activities [24,26] and the presence of maltodextrin transporters in *L. plantarum* [26]. Also, amylopectin phosphorylase and α -glucosidase enzymes that could be involved in starch hydrolysis [24]. This is possibly why the mixed cultures that included *L. plantarum* A6 showed higher values of kinetic parameters of starch fermentation (Table 1), α -amylase activity, and microbial biomass (Figures 1 and 3D) than the rest of the cultures. On the other hand, *Sii-25124* growth was lower than that of *L. plantarum* A6. Therefore, it could be associated with the culture medium composition and bacteria adaptation. *Sii-25124* also is adapted to metabolize xylan and arabinoxylan, the second-largest fermentable carbohydrate in nixtamal dough, contributing greatly to their predominance in pozol [27]. However, its initial growth rate was the highest. It has been reported that *Streptococcus* produces a high protein concentration during the first 9 h of pozol fermentation including enzymes for starch hydrolysis [28]. This is an important trait, as the antimicrobial activity would be present earlier than that of the other strains, it could result in better food safety quality, eliminating pathogens earlier. In the same way, *W. confusa* 17, being non-amylolytic, did not grow as a pure culture, but neither in the mixed cultures with the two amylolytic strains. Indicating that it does not depend entirely on the amylolytic activity of the ALABs. It has been reported that *W. confusa* can grow using xylan and xylooligosaccharides as a carbon source [29], but also, it has the genes needed to metabolize sucrose, cellulose, hemicellulose, and starch residues, common carbohydrates in nixtamal dough [16]. This could be the reason for its predominance in pozol dough. However, the media used in this work did not contain any of these carbohydrates.

W. confusa 17 did not present growth nor amylolytic activity. However, the presence of this LAB in mixed culture with *Sii-25124* resulted in the increase of $Y_{lac/s}$ and q_{amy} values (Table 1) compared to A6 pure culture. This observation suggests that there is an interaction between both microbial populations when they coexist. Thus, lactic acid production from the mixed culture of these pozol LAB was higher than the one reached as monoculture. Humblot et al. [24] suggested that the expression of amylase genes varies depending on the starchy matrix. So, the enzymatic activity of these pozol strains could be higher in the dough than in MRS-starch broth. In this case, starch was not consumed completely, leaving approximately 30% of residual starch concentration, similarly to its concentration in pozol [10].

The amylolytic activity of *L. plantarum* A6 was higher than that of pozol LAB, possibly due to the higher biomass production in the medium. However, when this strain was inoculated in mixed culture with pozol LAB, its amylolytic activity, values of $Y_{lac/s}$ (from 1.09 g/g to 0.82 g/g), q_{amy} (from 577.37 to 177.89), and μ (from 0.43 h⁻¹ to 0.11 h⁻¹) decreased (Table 1). Diaz-Ruiz et al. [8] suggested that the predominance of the non-amylolytic LAB in pozol fermentation was due to the amylolytic activity of ALAB, which releases sugars. The results obtained in this study showed that *Weissella confusa* 17 grew neither in MRS-starch broth nor in the same medium in co-culture with each of the amylolytic strains, and this suggests it does not depend on the sugars released by these bacteria. As *W. confusa* 17 does not grow in the medium or becomes non-culturable. Instead, it depends, most likely, on other carbohydrates present in pozol dough, such as those reported by Cooper-Bribiesca et al. [27] and López-Hernández et al. [29]. Both authors have found that *Sii-25124* and *W. confusa* 17 can metabolize polysaccharides derived from hemicellulose, a carbohydrate present in the maize pericarp, and in nixtamal.

Single cultures kinetic data of *Sii-25124*, *L. plantarum* A6 y *W. confusa* 17 were different than those obtained with their co-cultures. Results indicate interactions among them. However, it is still unknown what kind these interactions are.

In combination with *L. plantarum* A6, both *Sii-25124* and *W. confusa* 17 had a negative influence on the amylolytic activity, lactic acid yield ($Y_{lac/s}$), specific growth rate (μ), and specific rate of amylase production (q_{amy}) in the fermentation. Nevertheless, RT-PCR analysis showed that when *W. confusa* 17 was co-inoculated with the other two ALAB, it does not significantly increase its growth. These results suggest that the growth of the non-ALAB in pozol does not entirely depend on the amylase activity of the ALABs. It could be associated with the protein from maize (α -amylase and β -glucosidase), which release simple sugars for growth of microorganisms in the early stage of the pozol fermentation [28].

5. Conclusions

Clear differences in growth and fermentation parameters were found among pure and mixed cultures of the three lactic acid bacteria. *L. plantarum* A6 dominated in all cases, and *W. confusa* 17 did not grow. *Sii-25124* dominated in co-culture with *W. confusa* 17 in MRS-starch broth. *L. plantarum* A6 fermentation parameters were higher than those of pozol LAB. However, growth rate of *Sii-25124* in the first hours of fermentation was higher than that of the other bacteria. The advantages of growing in mixed cultures were: In *L. plantarum* A6-*Sii-25124* mixed culture fermentation, the initial growth rate was higher than *L. plantarum* in pure culture, although biomass was lower. While *W. confusa* 17 affected the growth of *L. plantarum* A6, as more biomass was produced in its presence. Then, there are interactions among the strains studied, and the nature of these need to be investigated. Starch is essential for nixtamalization dough fermentation, but it is possible that the growth of microorganisms also depends on other carbon sources present in dough.

This work contributes to the understanding of the interactions of amylolytic and non-amylolytic LAB in pozol.

Author Contributions: Conceptualization, C.W. and S.B.-N.; methodology, C.W., S.B.-N. and G.D.-R.; formal analysis, C.W., S.B.-N. and J.-P.G.; investigation, S.B.-N.; writing—original draft preparation, C.W., S.B.-N. and J.A.S.-U.; writing—review and editing, C.W., S.B.-N., J.A.S.-U., J.-P.G. and G.D.-R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by CONACyT (National Science and Technology Council) project CB-2009-131615; PAPIIT/UNAM (Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, UNAM Universidad Nacional Autónoma de México) project IN223917 and CONACyT (National Science and Technology Council) grant for S.B.-N.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Brandt, M.J. Starter cultures for cereal based foods. *Food Microbiol.* **2014**, *37*, 41–43. [\[CrossRef\]](#)
- Marsh, A.J.; Hill, C.; Ross, R.; Cotter, P.D. Fermented beverages with health-promoting potential: Past and future perspectives. *Trends Food Sci. Technol.* **2014**, *38*, 113–124. [\[CrossRef\]](#)
- Wacher, C.; Cañas, A.; Bárzana, E.; Lappe, P.; Ulloa, M.; Owens, J. Microbiology of Indian and Mestizo pozol fermentations. *Food Microbiol.* **2000**, *17*, 251–256. [\[CrossRef\]](#)
- Cañas, A.; Bárzana, E.; Owens, J.D.; Wacher, C. La elaboración de pozol en los altos de Chiapas. *Ciencia* **1993**, *44*, 219–229.
- Wacher, C. Nixtamalization, a Mesoamerican technology to process maize at small-scale with great potential for improving the nutritional quality of maize based foods. In Proceedings of the Food-Based Approaches for a Healthy Nutrition, Ouagadougou, Burkina Faso, 23–28 November 2003; pp. 735–743.
- Ampe, F.; ben Omar, N.; Moizan, C.; Wacher, C.; Guyot, J.-P. 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. *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65*, 5464–5473. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Cárdenas, C.; Barkla, B.; Wacher, C.; Delgado-Olivares, L.; Rodríguez-Sanoja, R. Protein extraction method for the proteomic study of a Mexican traditional fermented starchy food. *J. Proteom.* **2014**, *111*, 139–147. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Díaz-Ruiz, G.; Guyot, J.P.; Ruiz-Teran, F.; Wacher, C. 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. *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, *69*, 4367–4374. [\[CrossRef\]](#)
- Escalante, A.; Wacher, C.; Farrés, A. Lactic acid bacterial diversity in the traditional Mexican fermented dough pozol as determined by 16S rDNA sequence analysis. *Int. J. Food Microbiol.* **2001**, *64*, 21–31. [\[CrossRef\]](#)

10. ben Omar, N.; Ampe, F. Microbial Community Dynamics during Production of the Mexican Fermented Maize Dough Pozol. *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, *66*, 3664–3673. [\[CrossRef\]](#)
11. Zheng, J.; Wittouck, S.; Salvetti, E.; Franz, C.M.; Harris, H.M.; Mattarelli, P.; O'Toole, P.W.; Pot, B.; Vandamme, P.; Walter, J.; et al. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2020**, *70*, 2782–2858. [\[CrossRef\]](#)
12. Settanni, L.; Corsetti, A. Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.* **2008**, *121*, 123–138. [\[CrossRef\]](#)
13. Londoño-Zapata, A.F.; Durango-Zuleta, M.M.; Sepúlveda-Valencia, J.U.; Herrera, C.X.M. Characterization of lactic acid bacterial communities associated with a traditional Colombian cheese: Double cream cheese. *LWT* **2017**, *82*, 39–48. [\[CrossRef\]](#)
14. Londoño-Zapata, S.A.H.F.; Durango-Zuleta, M.M.; Sepúlveda-Valencia, J.U.; Herrera, C.X.M. Chamyolyracterization of lactic acid bacterial communities associated with a traditional Colombian food fermentations. In *Fermented Foods Part I: Biocheese: Double Creamistry and Biotechnology*, 1st ed.; Montet, D., Ray, R.C., Eds.; LW Taylor and Francis Group: New York, NY, USA, 2016.
15. Rodríguez-Saavedra, C.; Rodríguez-Sanoja, R.; Guillén, D.; Wachter, C.; Díaz-Ruiz, G. *Streptococcus infantarius* 25124 isolated from pozol produces a high molecular weight amylopullulanase, a key enzyme for niche colonization. *Amylase* **2021**, *5*, 1–12. [\[CrossRef\]](#)
16. Hernández-Oaxaca, D.; López-Sánchez, R.; Lozano, L.; Wachter-Rodarte, C.; Segovia, L.; Munguía, A.L. Corrigendum: Diversity of *Weissella confusa* in Pozol and Its Carbohydrate Metabolism. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 683050. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
17. Flores-Espinosa, M.T. Caracterización Fisiológica de las Bacterias Lácticas Aisladas del Pozol. Bachelor's Thesis, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico, 1996.
18. Giraud, E.; Brauman, A.; Keleke, S.; Lelong, B.; Raimbault, M. Isolation and physiological study of an amyolytic strain of *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1991**, *36*, 379–383. [\[CrossRef\]](#)
19. Agati, V.; Guyot, J.; Talamond, P.; Hounhouigan, D. Isolation and characterization of new amyolytic strains of *Lactobacillus fermentum* from fermented maize doughs (mawè and ogi) from Benin. *J. Appl. Microbiol.* **1998**, *85*, 512–520. [\[CrossRef\]](#)
20. Giraud, E.; Gosselin, L.; Raimbault, M. Production of a *Lactobacillus plantarum* starter with linamarase and amylase activities for cassava fermentation. *J. Sci. Food Agric.* **1993**, *62*, 77–82. [\[CrossRef\]](#)
21. Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A.; Smith, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal. Chem.* **1956**, *28*, 350–356. [\[CrossRef\]](#)
22. Miller, G.L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.* **1959**, *31*, 426–428. [\[CrossRef\]](#)
23. Songré-Ouattara, L.T.; Mouquet-Rivier, C.; Humblot, C.; Rochette, I.; Diawara, B.; Guyot, J.-P. Ability of Selected Lactic Acid Bacteria to Ferment a Pearl Millet-Soybean Slurry to Produce Gruels for Complementary Foods for Young Children. *J. Food Sci.* **2010**, *75*, M261–M269. [\[CrossRef\]](#)
24. Humblot, C.; Turpin, W.; Chevalier, F.; Picq, C.; Rochette, I.; Guyot, J.-P. Determination of expression and activity of genes involved in starch metabolism in *Lactobacillus plantarum* A6 during fermentation of a cereal-based gruel. *Int. J. Food Microbiol.* **2014**, *185*, 103–111. [\[CrossRef\]](#)
25. Mukisa, I.M.; Byaruhanga, Y.B.; Muyanja, C.M.B.K.; Aijuka, M.; Schüller, R.B.; Sahlström, S.; Langsrud, T.; Narvhus, J.A. Influence of Cofermentation by Amyolytic *Lactobacillus plantarum* and *Lactococcus lactis* Strains on the Fermentation Process and Rheology of Sorghum Porridge. *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, *78*, 5220–5228. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Turpin, W.; Weiman, M.; Guyot, J.-P.; Lajus, A.; Cruveiller, S.; Humblot, C. The genomic and transcriptomic basis of the potential of *Lactobacillus plantarum* A6 to improve the nutritional quality of a cereal based fermented food. *Int. J. Food Microbiol.* **2018**, *266*, 346–354. [\[CrossRef\]](#)
27. Cooper-Bribiesca, B.; Navarro-Ocaña, A.; Díaz-Ruiz, G.; Aguilar-Osorio, G.; Rodríguez-Sanoja, R.; Wachter, C. Lactic Acid Fermentation of Arabinoxylan From Nejayote by *Streptococcus infantarius* ssp. *infantarius* 25124 Isolated from Pozol. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 3061. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
28. Rizo, J.; Guillén, D.; Díaz-Ruiz, G.; Wachter, C.; Encarnación, S.; Sánchez, S.; Rodríguez-Sanoja, R. Metaproteomic Insights Into the Microbial Community in Pozol. *Front. Nutr.* **2021**, *8*, 714814. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
29. López-Hernández, M.; Alegria, M.E.R.; Munguía, A.L.; Wachter, C. Evaluation of xylan as carbon source for *Weissella* spp., a predominant strain in pozol fermentation. *LWT* **2018**, *89*, 192–197. [\[CrossRef\]](#)