



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
Biología Experimental

Estudio proteómico de las hidrolasas del pozol

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

JOCELIN MARARI RIZO VILLAGRANA

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:

Dra. Romina María de la Paz Rodríguez Sanoja
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

COMITÉ TUTOR:

Dra. María del Carmen Wachter Rodarte
Facultad de Química, UNAM
Dra. Gloria Díaz Ruiz
Facultad de Química, UNAM

MÉXICO, D.F. JUNIO, 2015.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM.
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 13 de abril del 2015, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **RIZO VILLAGRANA JOCELIN MARARI** con número de cuenta **302179295** con la tesis titulada "**ESTUDIO PROTEÓMICO DE LAS HIDROLASAS DEL POZOL**", realizada bajo la dirección de la **DRA. ROMINA MARÍA DE LA PAZ RODRÍGUEZ SANOJA**:

Presidente:	Dra. Rosario Vera Estrella
Vocal:	Dra. Maricarmen Quirasco Baruch
Secretario:	Dra. Gloria Díaz Ruiz
Suplente:	Dra. María del Carmen Wachter Rodarte
Suplente:	Dr. Javier Ambrosio Hernández

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 25 de mayo del 2015.

M. del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



Agradecimientos

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

A CONACYT por la beca de maestría 480538 y por el apoyo de CONACYT 49687-Z y DGAPA-UNAM IN218714 para el desarrollo de este proyecto

Esta tesis se realizó bajo la dirección de la Dra. Romina María de la Paz Rodríguez Sanoja con el apoyo de los miembros de mi comité tutor Dra. María del Carmen Wachter Rodarte y Dra. Gloria Díaz Ruiz a quienes agradezco su apoyo, asesoría y sus pertinentes sugerencias.

Agradecimientos a título personal

Agradezco a la M. en C. María Catalina Cárdenas Ascención y al Dr. Daniel Alejandro Guillen Santos por su ayuda y sus valiosas discusiones durante el desarrollo de esta tesis.

Agradezco al Dr. Sergio Sánchez Esquivel por sus aportaciones durante los seminarios y por el apoyo brindado.

Al Q.F.B Agustín Reyó Herrera por su apoyo técnico y las facilidades otorgadas para trabajar en el laboratorio de alimentos en la Facultad de Química, UNAM.

ÍNDICE

CONTENIDO	PÁGINA
Resumen.....	1
Abstract.....	2
Introducción.....	3
Objetivos.....	5
Estrategia Experimental.....	6
Antecedentes.....	7
Materiales y métodos.....	25
Resultados.....	32
Discusión general.....	50
Conclusiones.....	58
Perspectivas.....	59
Literatura citada.....	60
Apéndice I.....	65
Apéndice II.....	71

He aquí, pues, el principio de cuando se dispuso hacer al hombre, y cuando se buscó lo que debía entrar en la carne del hombre.

Y dijeron los progenitores, los Creadores y Formadores, que se llaman Tepeu y Gucumatz: “Ha llegado el tiempo del amanecer, de que se termine la obra y que aparezcan los que nos han de sustentar y nutrir, los hijos esclarecidos, los vasallos civilizados; que aparezca el hombre, la humanidad, sobre la superficie de la tierra”. Así dijeron.

Se juntaron, llegaron y celebraron consejo en la oscuridad y en la noche; luego buscaron y discutieron, y aquí reflexionaron y pensaron. De esta manera salieron a luz claramente sus decisiones y encontraron y descubrieron lo que debía entrar en la carne del hombre.

Poco faltaba para que el sol, la luna y las estrellas aparecieran sobre los Creadores y Formadores. De Paxil, de Cayalá, así llamados, vinieron las mazorcas amarillas y las mazorcas blancas.

Éstos son los nombres de los animales que trajeron la comida: Yac (el gato del monte), Utiú (el coyote), Quel (una cotorra), y Hoh (el cuervo). Estos cuatro animales les dieron la noticia de las mazorcas amarillas y las mazorcas blancas, les dijeron que fueran a Paxil y les enseñaron el camino de Paxil.

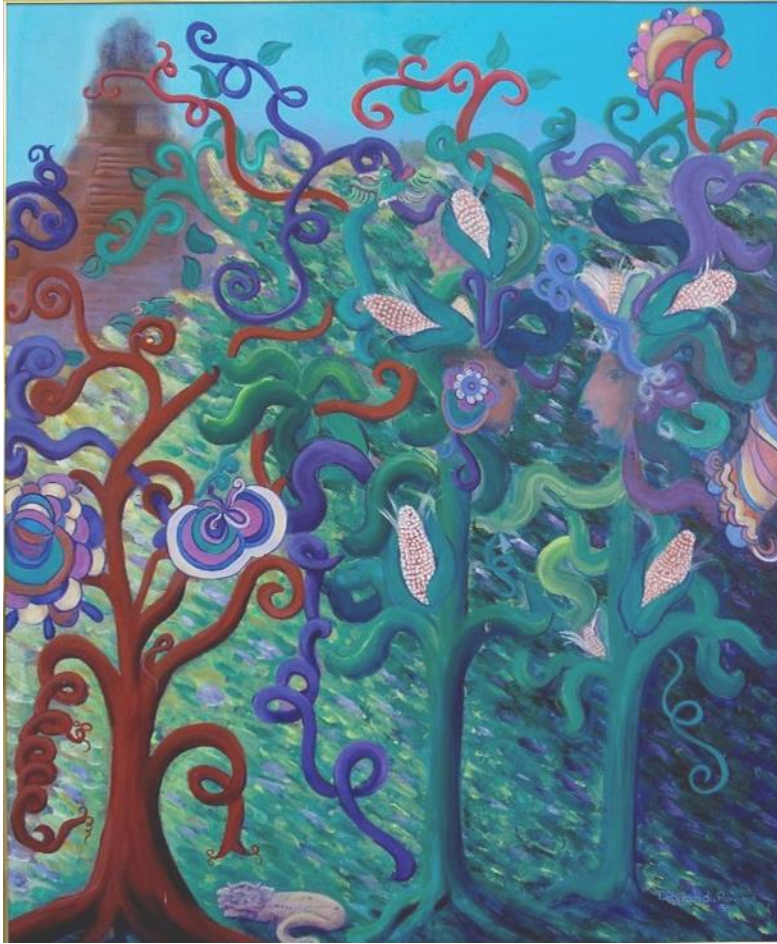
Y así encontraron la comida y ésta fue la que entró en la carne del hombre creado, del hombre formado; ésta fue su sangre, de ésta se hizo la sangre del hombre. Así entró el maíz en la formación del hombre por obra de los Progenitores.

Y de esta manera se llenaron de alegría, porque habían descubierto una hermosa tierra, llena de deleites, abundante en mazorcas amarillas y mazorcas blancas y abundante también en pataxte y cacao, y en innumerables zapotes, anonas, jocotes, nances, matasanos y miel.

Abundancia de sabrosos alimentos había en aquel pueblo llamado de Paxil y Cayalá.

Había alimentos de todas clases, alimentos pequeños y grandes, plantas pequeñas y plantas grandes. Los animales enseñaron el camino, y moliendo entonces las mazorcas amarillas y las mazorcas blancas, hizo Ixmucané nueva bebida, y de este alimento provinieron la fuerza y la gordura y con él crearon los músculos y el vigor del hombre. Esto hicieron los Progenitores, Tepeu y Gucumatz, así llamados.

A continuación entraron en pláticas acerca de la creación y la formación de nuestra primera madre y padre, de maíz amarillo y de maíz blanco se hizo su carne; de masa de maíz se hicieron los brazos y las piernas del hombre. Únicamente masa de maíz entró en la carne de nuestros padres, los cuatro hombres que fueron creados.



La leyenda de los hombres del maíz. Artista Deborah DuFlon

RESUMEN

El pozol es una bebida de origen maya, ácida, refrescante y no alcohólica, elaborada con maíz nixtamalizado y fermentada de forma natural por una microbiota muy diversa y abundante. Estudios previos reportaron que un beneficio de la fermentación era un aumento considerable en el contenido de proteína cruda, soluble y nitrógeno total en comparación con los granos de maíz utilizados en su preparación. De manera paralela otros estudios reportaron la presencia de bacterias proteolíticas y fijadoras de nitrógeno (*Agrobacterium azotophilum*). Considerando lo poco que se sabe de la utilización de nitrógeno durante la fermentación del pozol, el objetivo de este trabajo es establecer si la fuente de nitrógeno que permite el crecimiento de los microorganismos durante la fermentación del pozol está dada únicamente por la reutilización de proteínas o si existe también el aprovechamiento de nitrógeno atmosférico.

Al evaluar el contenido de proteína cruda y nitrógeno, se observó un incremento a partir de las 24 horas de fermentación, se alcanzó un máximo a las 72 h (29.43%). La búsqueda de proteasas a los diferentes tiempos de fermentación mediante zimogramas, permitió la detección de dos proteasas activas, una aminopeptidasa C de 42 KDa desde el tiempo cero y otra de 21 KDa a partir de las 9 h de fermentación.

El análisis del metaproteoma a diferentes tiempos de fermentación permitió la identificación de varias proteínas de bacterias y hongos. Las proteínas mayormente representadas en bacterias pertenecen a las ácido lácticas, principalmente de los géneros *Streptococcus*, *Lactococcus* y *Lactobacillus*. Los hongos están principalmente representados por *Schizosaccharomyces* y *Aspergillus*. Se identificaron proteínas involucradas en biosíntesis y transporte de aminoácidos y péptidos, degradación de proteínas y la proteína hierro del complejo enzimático nitrogenasa.

ABSTRACT

Pozol is an acidic, refreshing and non-alcoholic beverage of Maya origin. It is a natural fermentation of nixtamal (cooked and alkali treated maize) and possess an abundant and diverse microbiota. Previous studies reported that one of the fermentation benefits was a considerable increase in the content of total nitrogen, crude and soluble protein in comparison with the maize grains used in their elaboration. In addition, others works reported the presence of proteolytic bacteria and nitrogen-fixing bacteria (*Agrobacterium azotophilium*). For a comprehensive study of the pozol it is necessary to elucidate the source of nitrogen that allows the microbiota development during fermentation, however there is a lack of information about these phenomena. The aim of this work is to investigate whether the nitrogen source that allows the growth of microorganisms during fermentation is given only by protein reusing or also by the use of atmospheric nitrogen.

Results showed an increase of crude protein and nitrogen as earlier as 24 hours of fermentation reaching its maximum at 72 hours (29.43%). The protease activity was search at different fermentation times by zymogram that allow us to detect two active proteases; an aminopeptidase C of high molecular weight (42 KDa) from time zero and another of low molecular weight (21 KDa) at 9 hours of fermentation time.

Several proteins of bacteria, yeast and molds were identified through the metaproteomic analysis at different times of fermentation. The most represented bacteria proteins belong to lactic acid bacteria, with the genus more represented were *Streptococcus* sp., *Lactococcus* sp. and *Lactobacillus* sp. Fungi are mainly represented by *Schizosaccharomyces* sp. and *Aspergillus* sp. Nitrogenase iron protein and proteins involved in degradation, biosynthesis, transport of proteins, amino acids and peptides were also identified.

INTRODUCCIÓN

El pozol es una bebida de origen maya, ácida, refrescante y no alcohólica hecha a base de maíz nixtamalizado, consumido por varios grupos étnicos del sur y sureste de México. Además de su uso como alimento, es utilizado en la medicina tradicional y como elemento ceremonial (Cañas *et al.*, 1993).

La fermentación se lleva a cabo por una microbiota natural constituida por bacterias, hongos y levaduras, que resulta de la contaminación del nixtamal durante el remojo y la molienda, principalmente (Wacher *et al.*, 1993). Las bacterias ácido lácticas son el grupo predominante durante la fermentación y entre ellas, los géneros más abundantes son: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Weisella* (Ampe *et al.*, 1999; Escalante *et al.*, 2001; Ben y Ampe, 2000).

Dado que durante la nixtamalización (cocción de los granos en hidróxido de calcio), se reduce la concentración de mono- y disacáridos, dejando al almidón como el principal carbohidrato disponible para la fermentación, la mayoría de los estudios realizados se han centrado en la caracterización de microorganismos amilolíticos. Las bacterias ácido lácticas aisladas e identificadas mediante técnicas tradicionales de cultivo por Nuraida y colaboradores (1995) de muestras de pozol indígena y mestizo (2-9 días de fermentación) incluyen a *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus confusus*, *Lactococcus lactis* y *Lactococcus raffinolactis*. Al evaluar la capacidad de hidrolizar almidón en medio sólido, la mayoría puede hacerlo en condiciones anaerobias mientras que el 50% de las levaduras hidrolizaron el almidón en medio sólido y en menor proporción en medio líquido.

Díaz-Ruiz y colaboradores (2003), encontraron que la cuenta inicial de bacterias lácticas amilolíticas es alta (4.5 log ufc/g de masa seca) y que aumenta hasta 8.4 log ufc/g de masa seca durante las primeras 24 horas manteniéndose constante hasta las 72 horas (8.7 log ufc/g masa seca), corroborándose su importancia en la fermentación del pozol, principalmente en las primeras 24 horas, cuando se presenta un mayor número de estas bacterias. En este estudio se aislaron un total de 257 colonias de las cuales se caracterizaron 40 cepas por ser las que presentaban mayor actividad amilolítica. Se seleccionaron cuatro especies como las más amilolíticas: *Streptococcus bovis* (actualmente clasificado como *S. infantarius*), que además se encontró como la especie predominante durante la fermentación, *Streptococcus macedonicus*, *Lactococcus lactis* y *Enterococcus sulfureus*.

Sin embargo, los microorganismos también requieren para su crecimiento de una fuente de nitrógeno que les permita sintetizar aminoácidos, ácidos nucleicos y otras biomoléculas, siendo la forma en que lo obtienen mediante la fijación de nitrógeno atmosférico y/o la hidrólisis de proteínas. En el pozol, se ha reportado la presencia de bacterias proteolíticas a partir de las 4 u 8 horas de fermentación, alcanzando su máximo a las 30 horas (aproximadamente 10^8 UFC/g) (Loaeza, 1991). Sin embargo, no existen estudios detallados sobre estas bacterias, no se sabe cuántas especies fueron aisladas como “bacterias proteolíticas” y no hay ningún reporte de las proteasas presentes en el pozol.

A pesar de que durante la fermentación del pozol se ha reportado un incremento en el contenido de nitrógeno total (10-9%-69.5%) (Loaeza, 1991; Cravioto *et al.*, 1955; Ulloa *et al.*, 1971) lo que sugería la fijación de nitrógeno atmosférico y que estudios posteriores sobre los microorganismos responsables de este aumento dio como resultado el aislamiento e identificación de *Agrobacterium azotophilum* como única bacteria fijadora de nitrógeno, no fue posible continuar con los estudios para demostrar que este fenómeno ocurre en un alimento fermentado.

Así, el objetivo general fue establecer si la fuente de nitrógeno que permite el crecimiento de los microorganismos durante la fermentación del pozol está dada únicamente por la reutilización de proteínas o si existe también el aprovechamiento de nitrógeno atmosférico.

Para ello se cuantificó el contenido de proteína cruda y nitrógeno total a los diferentes tiempos de fermentación para determinar si había un incremento. De manera simultánea, se estandarizó y optimizó un método de extracción de proteínas, para la identificación *in situ* de las proteasas activas presentes a lo largo de la fermentación, lo que permitió establecer el origen de dichas proteínas mediante su secuenciación.

Por último, el análisis del metaproteoma permitió la identificación de proteínas involucradas en el metabolismo de nitrógeno orgánico e inorgánico.

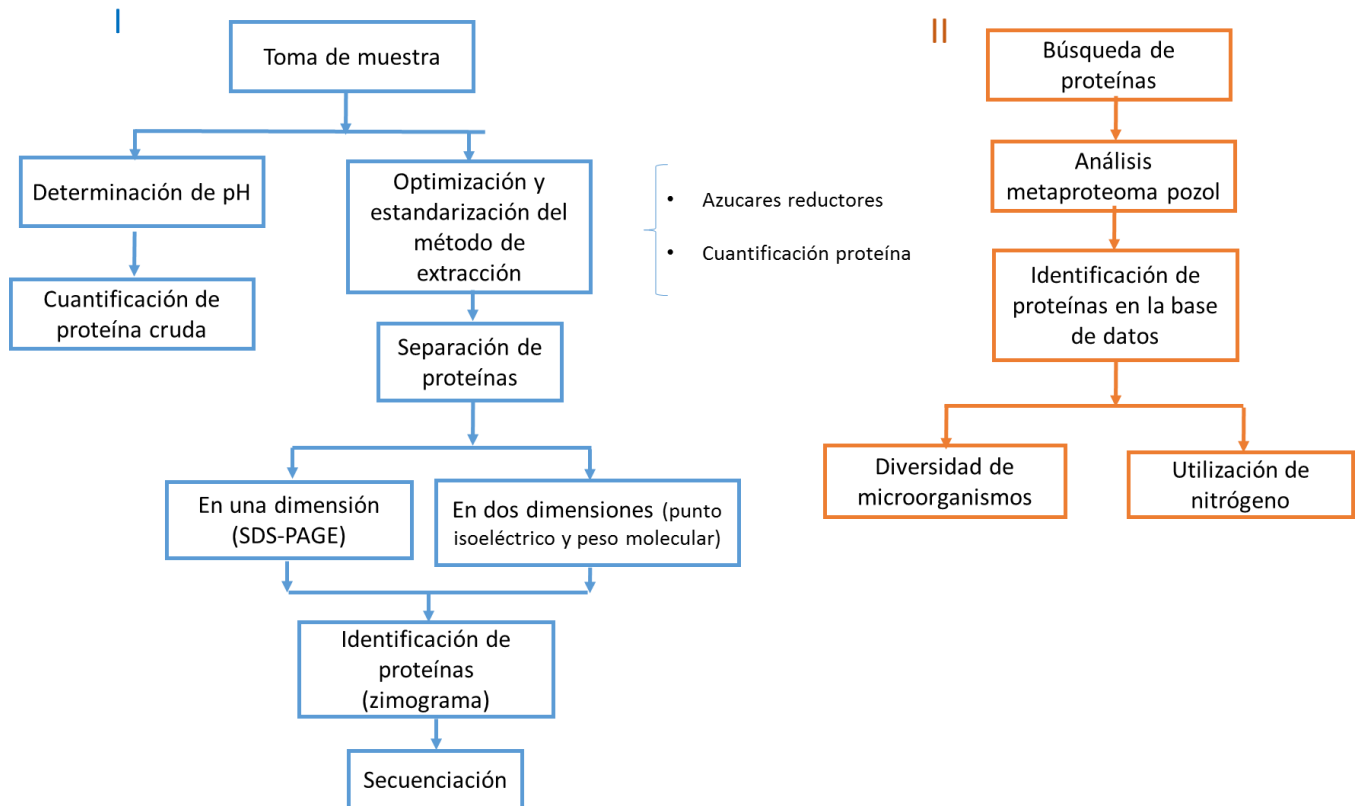
OBJETIVO

General

Establecer si la fuente de nitrógeno que permite el crecimiento de los microorganismos durante la fermentación del pozol está dada únicamente por la reutilización de proteínas o si existe también el aprovechamiento de nitrógeno atmosférico.

Particulares

- Determinar si hay diferencias en el contenido de nitrógeno total durante la fermentación del pozol.
- Estandarización y optimización del método de extracción de proteínas del pozol a los diferentes tiempos de fermentación.
- Determinar si hay actividad proteolítica durante la fermentación del pozol mediante la identificación *in situ* de las proteasas.
- Secuenciación de las proteínas con actividad proteolítica para establecer su origen.
- Búsqueda de las proteínas involucradas en el metabolismo de fijación y utilización de nitrógeno en el metaproteoma del pozol.



ANTECEDENTES

1. Alimentos fermentados

El origen de la fermentación de los alimentos se asocia a las primeras culturas y surge probablemente de manera espontánea. La fermentación es una forma natural de aumentar el tiempo de conservación del alimento, incrementar el valor nutritivo a través de la síntesis de aminoácidos esenciales y vitaminas, además, permite mejorar las características organolépticas, aumentar la digestibilidad del sustrato, eliminar sabores y texturas desagradables (Kabak y Dobson, 2011).

Los principales tipos de fermentación son: alcohólica, ácido láctica, ácido acético y alcalina. En la primera, las levaduras son los microorganismos predominantes y el producto principal de la fermentación es etanol. La fermentación ácido láctica (leches fermentadas, vegetales) es llevada a cabo por bacterias ácido lácticas, las cuales pueden ser heterofermentativas u homofermentativas, los productos finales de la fermentación son, en el caso de las heterofermentativas, una mezcla de ácido láctico, CO₂ y acetato o etanol y en el caso de las homofermentativas, ácido láctico mayoritariamente.

En la fermentación ácido acético el ácido es obtenido a partir de etanol y es realizada por bacterias ácido acéticas donde destacan las del género *Acetobacter*. Por otro lado en la fermentación alcalina los géneros de *Bacillus* (*Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* y *Bacillus pumilus*) hidrolizan proteínas a aminoácidos y péptidos con liberación de amonio, lo que aumenta la alcalinidad del alimento en el que se encuentran (FAO, 1993; Blandino *et al.*, 2003).

2. Alimentos fermentados tradicionales de México

El maíz es originario de Mesoamérica, su cultivo debe haberse iniciado hace aproximadamente 7000 años y constituía la base de la alimentación de indígenas mesoamericanos y sudamericanos. La forma de consumirlo variaba desde tostado, hervido o reventado hasta en forma de tortillas, sopes, gorditas y bebidas, entre otras (Cañas *et al.*, 1993).

En México existen una gran variedad de alimentos fermentados preparados con este cereal. Ejemplos de estos son: pozol, tesgüino, agua agria, cuaruapa, charanga, ostoche, quebrantahuesos y sendechó. Su uso no solo se restringe a la alimentación, sino también son empleados con fines medicinales y religiosos (Cañas *et al.*, 1993), pero de los más de 200 alimentos y bebidas fermentadas autóctonas conocidas, sólo se tiene información completa de alrededor de una docena.

3. Pozol

3.1 Descripción

El pozol del náhuatl *pozolli* que significa espumoso, es una bebida de origen maya, ácida, refrescante y no alcohólica hecha a base de maíz nixtamalizado. Es consumido por varios grupos étnicos del sur y sureste de México, como los Chontales y Choles de Tabasco; los Mayas de Campeche, Yucatán y Quintana Roo; los Lacandones, Tzotziles o Chamulas y Mames de Chiapas, y los Zapotecos de Oaxaca (Ulloa *et al.* 1987).

3.2 Elaboración del pozol

Para la elaboración del pozol, se pueden utilizar tres tipos de maíz: blanco, amarillo y negro. Generalmente debe ser maduro ya que el uso de un maíz tierno requiere mayor cantidad de cal para eliminar la cascarilla durante la cocción, lo cual modifica el sabor y resulta desfavorable desde el punto de vista económico (Cañas *et al.*, 1993).

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

Nixtamalización: Del náhuatl *nextli* (“cenizas de cal”) y *tamalli* (masa de maíz cocido) consiste en la cocción de los granos de maíz en cal (hidróxido de calcio al 1%). Tiene como finalidad separar el hollejo (o cascarilla) del grano y termina cuando éste se puede eliminar fácilmente al frotar el grano con los dedos. El tiempo de cocción varía entre 60 y 120 minutos.

Lavado: El maíz nixtamalizado es lavado con agua de pozo, río o potable, con el fin de eliminar la cal y la cascarilla, hasta que el agua de lavado quede libre de turbiedad.

Después del lavado, se puede proceder de dos maneras dependiendo de la variante que se esté elaborando: pozol indígena o mestizo. Siendo la principal diferencia entre estos dos tipos la segunda cocción o “reventado” que llevan a cabo los productores mestizos. Esta operación consiste en cocer el nixtamal en agua hasta que el grano de maíz revienta, el tiempo de cocción varía entre 3 y 8 horas y el grado de reventado determina la consistencia final del pozol, por lo general el proceso consiste en una ebullición vigorosa durante la primera hora, seguida de un hervor lento el resto del tiempo y tiene como finalidad reducir la cantidad de sedimentos sólidos presentes en la bebida cuando la masa es suspendida en agua (Wacher *et al.*, 2000).

Remojo: El maíz nixtamalizado se deja remojando toda la noche regularmente en el agua del último lavado, a temperatura ambiente. La finalidad de este paso es aumentar la retención de humedad del nixtamal, para evitar que el maíz se seque durante la molienda. Cabe aclarar que actualmente algunos productores en el estado de Villahermosa no se realizan este paso o es de corta duración.

Molienda: Los granos son sometidos a una molienda gruesa para reducir su tamaño. Los indígenas la llevan a cabo siempre en molino de mano, pero también se puede utilizar molinos comerciales los cuales pueden ser de discos de piedra o de metal. La masa resultante de la molienda consiste de fragmentos de germen, residuos de pericarpio y endospermo.

En este punto, es importante señalar que el molino se usa durante todo el día para moler varios lotes de granos, lo que provoca que una cantidad importante de masa se quede en las muescas del molino. Al final del día, el molino sólo se cepilla para remover los restos secos de la masa.

Elaboración de la bola y envoltura: La masa obtenida de los pasos anteriores se moldea en forma de bolas que pueden pesar desde 15 gramos hasta un 1kg y se envuelve en hojas de plátano en el proceso tradicional, aunque actualmente se ha observado el uso de bolsas de plástico.

Fermentación: Se lleva a cabo a temperatura ambiente y en función del gusto del consumidor puede durar horas o hasta semanas. Una vez que la masa ha fermentado se suspende en agua y se obtiene la bebida, a la cual se le puede adicionar sal, azúcar, canela, miel, cacao o chiles secos (Paredes *et al.*, 2008; Cañas *et al.*, 1993).

Al final de la fermentación el contenido de proteína cruda, niacina, riboflavina y triptófano es mayor que el que se encuentra en el maíz empleado para su elaboración. Se ha especulado que el aumento en proteína cruda en el sistema podría deberse a la fijación de nitrógeno atmosférico ya que se han aislado microorganismos fijadores de nitrógeno (Cravioto *et al.*, 1951; Taboada *et al.*, 1971).

3.3 Maíz y sus modificaciones durante la elaboración del pozol

El maíz, palabra de origen prehispánico que significa “lo que sustenta la vida”, es una forma doméstica de una cepa de teosinte, que pertenece a la familia de *Poaceae* y cuyo nombre científico es *Zea mays*. Originario de Mesoamérica, junto con el trigo y el arroz es uno de los cereales más importantes en el mundo como base para la elaboración de una gran cantidad de alimentos (Paredes *et al.*, 2008; Benítez *et al.*, 2006).

El grano de maíz consta de manera general de cuatro estructuras: pericarpio o cáscara, germen o embrión, endospermo y la pilorriza (Paredes *et al.*, 2008; Benítez *et al.*, 2006). Aunque la composición química del maíz depende de la variedad, el ambiente y las condiciones de siembra de

manera general es un alimento con bajo contenido de proteínas y alto contenido de carbohidratos (Tabla 1).

Tabla 1. Composición química del grano de maíz

Tipo de maíz	Proteínas (g/100g)	Lípidos (g/100g)	Fibra (g/100g)	Carbohidratos (g/100g)	Humedad (g/100g)
Maíz blanco	7.9	4.7	12.2	73.0	10.6
Maíz amarillo	8.3	4.8	12.2	69.6	13.8

Datos en base húmeda FAO, 1993.

El pericarpio o cáscara se caracteriza por un elevado contenido de fibra cruda que es aproximadamente de 87%; está constituida fundamentalmente por hemicelulosa y celulosa. El resto son minerales, proteínas y azúcares en menor proporción.

El endospermo provee los nutrientes para el germinado de la semilla, por lo que cuenta con un alto contenido de almidón (87%) y aproximadamente 8% de proteínas. Por su parte, el germen o embrión, estructura a partir de la cual se desarrolla la nueva planta, se caracteriza por un elevado contenido de minerales 76%, proteínas 10% y lípidos 5%. Finalmente, la piloriza es una estructura cónica de tejido inerte que une el grano y el carozo (comúnmente conocido como olote) y al igual que el pericarpio, está compuesta principalmente de celulosa y hemicelulosa (Benítez y Perea, 2006).

En cuanto a las proteínas del maíz, éstas se clasifican en cuatro tipos de acuerdo a su solubilidad: albúminas (solubles en agua), globulinas (solubles en soluciones de sales), prolaminas o zeinas (solubles en soluciones alcohólicas) y gluteínas (solubles en soluciones alcalinas o ácidas diluidas). Las gluteínas y las prolaminas se encuentran principalmente en el endospermo; ambas proteínas constituyen cerca del 90% de las proteínas del grano de maíz completo. Por otro lado, las albúminas y las globulinas componen casi en su totalidad al germen (Paredes *et al.*, 2008; Benítez y Perea, 2006).

El grano de maíz también contiene lípidos de los cuales los ácidos grasos saturados, como el palmítico y el esteárico, se encuentran en baja proporción en comparación con los ácidos grasos no saturados, como el oleico y el linoleico, que representan la mayoría de los lípidos.

En relación a los carbohidratos, el más abundante es el almidón (72%) formado por amilosa y amilopectina en una relación 70:30 y prácticamente todo está presente en las células del endospermo (Paredes *et al.*, 2008; Benítez *et al.*, 2006).

Durante la nixtamalización, la temperatura relativamente elevada (80-85°C) y el pH alcalino (≈ 12) producen diversas transformaciones en el grano como: reducción considerable en la concentración de mono y disacáridos, principalmente sacarosa, fructosa y glucosa, que baja de 1 a 0.1-0.7 g/100g de masa seca; cambios estructurales del almidón (gelatinización, retrogradación y entrecruzamiento) y liberación de pericarpio por lo que hay pérdida de celulosa y hemicelulosa.

En cuanto al contenido de proteína se ha observado un ligero incremento de 8.14 a 8.88%, mientras que, los lípidos del grano de maíz disminuyen hasta 3.4% (Sefa-Dedeh *et al.*, 2004; Paredes *et al.*, 2008; FAO, 2013).

3.4 Utilización de nitrógeno por los microorganismos

El nitrógeno (N) es un componente esencial para los microorganismos ya que permite sintetizar aminoácidos, ácidos nucleicos y otras biomoléculas. El contenido de nitrógeno en la mayoría de los microorganismos es alrededor del 15% (Jørgensen, 2009).

Los microorganismos tienen la capacidad de metabolizarlo de forma inorgánica como: nitrógeno molecular (N_2), amoníaco (NH_3), amonio (NH_4^+) y nitrato (NO_3^-) o a partir de moléculas más grandes como proteínas, ácidos nucleicos y componentes de la pared celular (quitina y peptidoglicano) (Jeannotte, 1999).

3.5 Fijación de nitrógeno en el pozol

Al analizar y comparar el pozol contra los granos de maíz utilizados en su preparación se observó un aumento del 44.5% en el nitrógeno total (Cravioto *et al.*, 1955). Dicho incremento sugería la fijación de nitrógeno atmosférico durante la fermentación del pozol, por lo que Ulloa y colaboradores (1971) evaluaron el contenido de nitrógeno total en masa de maíz sometida a diferentes tratamientos: masa de maíz recién preparada (sin tratamiento), masa de maíz fermentada a 26°C durante 5 y 10 días, masa de maíz inoculada con pozol natural en una proporción de 90:10, respectivamente sin fermentar y fermentada durante 5 y 10 días a 26°C y en pozol natural proveniente del estado de Chiapas.

Los resultados mostraron que en todos los casos en donde se efectuó una fermentación, hubo incremento en el contenido de nitrógeno total, siendo mayor en la masa de maíz inoculada con pozol natural; sin embargo, este incremento no igualó al observado en el pozol natural (Tabla 2).

Tabla 2. Contenido de nitrógeno en masa de maíz sometida a diferentes tratamientos (Ulloa *et al.*, 1971)

Tratamiento ^a	N total mg/mL ^b	N proteico mg/mL ^c	% de aumento con respecto a 1
1. Masa	11.8	73.7	---
2. Masa incubada 5 días a 26°C	14.2	88.7	20.4
3. Masa incubada 10 días a 26°C	14.2	88.7	20.4
4. Masa inoculada con pozol natural	14.7	91.8	24.6
5. Masa inoculada con pozol natural incubada 5 días a 26°C	17.0	106.2	44.1
6. Masa inoculado con pozol natural e incubada 10 días a 26°C	17.0	106.2	44.1
7. Pozol natural ^d	20.0	125.0	69.5

^a En todos los casos, las muestras para el análisis de nitrógeno fueron secadas de 85-90°C durante 24 horas.

^b Promedio de los análisis. Determinado por el método de micro-Kjeldahl en muestras de 100 mg (peso seco).

^c % de nitrógeno x 6.25

^d Pozol proveniente de Tapachula, Chiapas; las muestras de los tratamientos del 1-6 corresponden a la masa comprada en un molino de maíz en México, D.F.

En el mismo trabajo se aislaron e identificaron 8 microorganismos capaces de crecer en medios de cultivo carentes de nitrógeno y con distintas fuentes de carbono: *Achromobacter* sp. A y B, *Cladosporium herbarum*, *Candida krusei*, *Geotrichum candidum*, *Trichosporon cutaneum*, *Paecilomyces fumosoroseus* y *Torulopsis* sp.

Sin embargo, esta prueba no indica que todos tienen la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico o que son igualmente eficaces para llevar a cabo esta función. Además, no existen reportes sobre la capacidad de fijación de nitrógeno por hongos.

Al evaluar la capacidad de incrementar el nitrógeno de cada uno de los microorganismos, inoculándolos independientemente y mezclados en masa de maíz previamente esterilizada, los resultados observados tampoco fueron concluyentes por lo que se evaluó la capacidad de fijar nitrógeno mediante la prueba de reducción de acetileno a etileno tanto en condiciones aerobias como anaerobias de los microorganismos aislados. Se observó que la reducción es mayor en condiciones anaerobias y el único microorganismo que redujo acetileno fue *Agrobacterium azotophilum* (previamente nombrada como *Achromobacter* sp. A). La mayor reducción se logró en masa de maíz en comparación con los otros medios, debido a que este es el medio natural de *Agrobacterium azotophilum*. Resultados similares han sido reportados para ciertas cepas de *Micrococcus*, *Mycobacteria* y *Pseudomonas*, que fijan más nitrógeno en su medio natural que en medios artificiales (Ulloa *et al.*, 1971; Taboada *et al.*, 1971).

La fijación de nitrógeno de *Agrobacterium azotophilum* se vio favorecida por la presencia de isoleucina, D-metionina, ácido glutámico y ácido aspártico a concentraciones de 0.002 mM y 0.001 mM, respectivamente. Concentraciones mayores de estos dos aminoácidos y la presencia de sales nitrogenadas o glicina en el medio de cultivo inhiben la fijación (Taboada *et al.*, 1971).

4. Fijación de nitrógeno

4.1 Generalidades

El nitrógeno (N₂) constituye el 78.6% del aire, en donde se encuentra en forma de gas diatómico; sin embargo, debido a la estabilidad que le proporciona su triple enlace $N \equiv N$, el N₂ es inerte y su activación es un proceso que requiere mucha energía. La reducción de N₂ a amoníaco, compuesto básico para la síntesis de aminoácidos y otros compuestos biológicos nitrogenados, se conoce como fijación de nitrógeno.

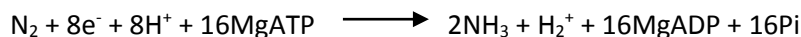
Las dos terceras partes de la fijación de nitrógeno en la naturaleza se efectúan mediante un proceso exclusivo de bacterias y arqueas (fijación biológica), revelando una considerable biodiversidad dentro de los organismos diazótrofos.

En bacterias, la capacidad para fijar nitrógeno está presente en muchos grupos filogenéticos, incluyendo bacterias verdes del azufre, firmibacterias, actinomicetos y cianobacterias. En arquea, la fijación de nitrógeno está restringida a metanógenas (Dixon y Kahn, 2004).

Los diazótrofos están distribuidos en una amplia variedad de hábitats, se pueden encontrar de vida libre en suelo y agua, en asociación simbiótica con diferentes plantas, hongos y líquenes y en los intestinos de las termitas, entre otras. Pueden ser: heterótrofos aerobios (*Azotobacter*) o anaerobios (*Clostridium*), fotosintéticos anoxigénicos (*Rhodobacter*) u oxigénicos (*Anabaena*), fotótrofos y quimiolitótrofos (*Leptospirillum ferrooxidans*) (Dixon y Kahn, 2004).

4.2 Mecanismo enzimático

La estequiometría general de la reducción de nitrógeno molecular bajo condiciones de presión y temperatura fisiológicas es:



El mecanismo enzimático requiere la reducción de la proteína Fe por un donador de electrones como la ferredoxina y flavodoxina, que transfieren un solo electrón de la proteína-Fe a la proteína-MoFe (la cual es dependiente de la hidrólisis de ATP) y finalmente, la transferencia interna del electrón en la proteína MoFe por el cluster P al sitio de unión del sustrato, que es el cofactor FeMo. Cada paso de transferencia de electrón requiere un ciclo obligatorio de asociación de la proteína Fe y de la proteína MoFe para formar un complejo, después estos dos componentes se disocian (Figura 1).

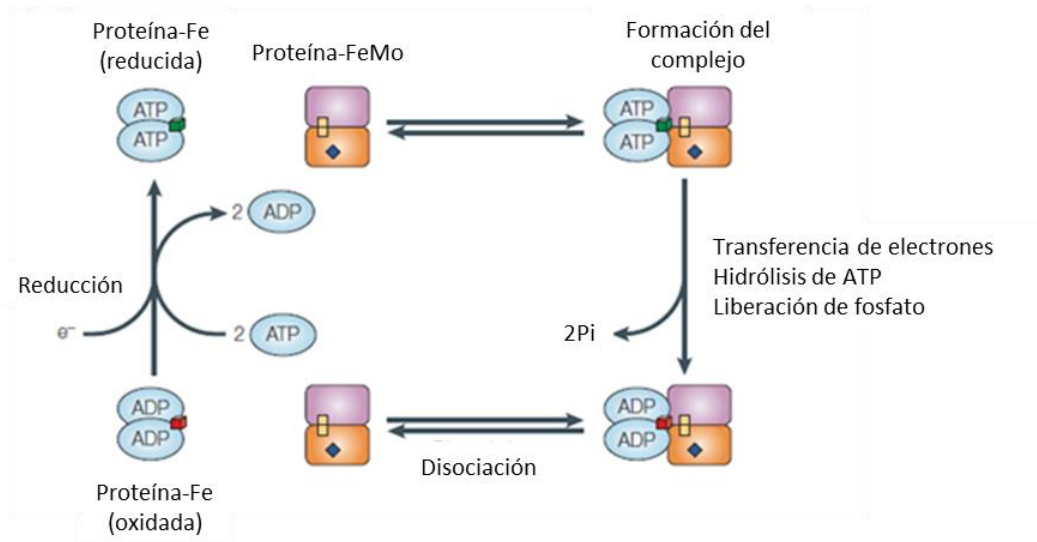


Figura 1. Representación esquemática del ciclo de la proteína Fe de la nitrogenasa. El dímero de la proteína Fe se muestra en azul claro con el cluster [4Fe-4S] simbolizado en forma de cubo, verde la forma reducida y en rojo la forma oxidada. Las subunidades α y β de la proteína Fe-Mo están representadas en color anaranjado y rosa, respectivamente, los cuadrados amarillos representan el cluster P y el rombo azul el cofactor FeMo (Adaptada de Dixon y Kahn, 2004).

4.4 Fisiología de la fijación de nitrógeno

El complejo enzimático nitrogenasa, cataliza la reducción biológica de nitrógeno molecular a amonio, es un complejo metalo-enzimático que conserva características estructurales y mecanismo de acción entre los diazótrofos.

Esta enzima contiene dos componentes y solo cuando están juntos se lleva a cabo la reacción:

1. Proteína- Fe

Es un dímero de subunidades idénticas con un peso molecular de 60 KDa, contiene un centro redox 4Fe-4S, unido por puentes disulfuro entre las cisteínas de las subunidades y puede ser oxidado y reducido por un electrón proveniente de la ferredoxina o flavodoxina (Bazhenova y Shilov, 1995; Barrett *et al.* 1994; Leningher, 1983).

La principal función de la proteína, es activar la transferencia de un electrón a la proteína Mo-Fe. Para poder transferir los electrones es necesario que la proteína forme un complejo con el ATP (Yates, 1976; Bazhenova y Shilov, 1995).

2. Proteína molibdeno-Mo-Fe

Es un heterotetrámero de dos tipos de subunidades, $\alpha_2\beta_2$, con un peso molecular de 220 KDa. Cada molécula de la proteína contiene dos átomos de molibdeno, 32 átomos de hierro, 30 átomos de azufre y el sitio catalítico de la enzima.

Todos los metales de transición en la proteína están organizados en dos tipos de centros redox:

- Cerca de la mitad de los átomos de hierro están presentes como dos pares de centros Fe-S [4Fe-4S], llamados centros P.
- El resto de los átomos de hierro junto con el molibdeno están en centros M, también llamados cofactor Fe-Mo (Figura 2) (Leningher, 1983; Yates, 1979; Bazhenova y Shilov, 1995).

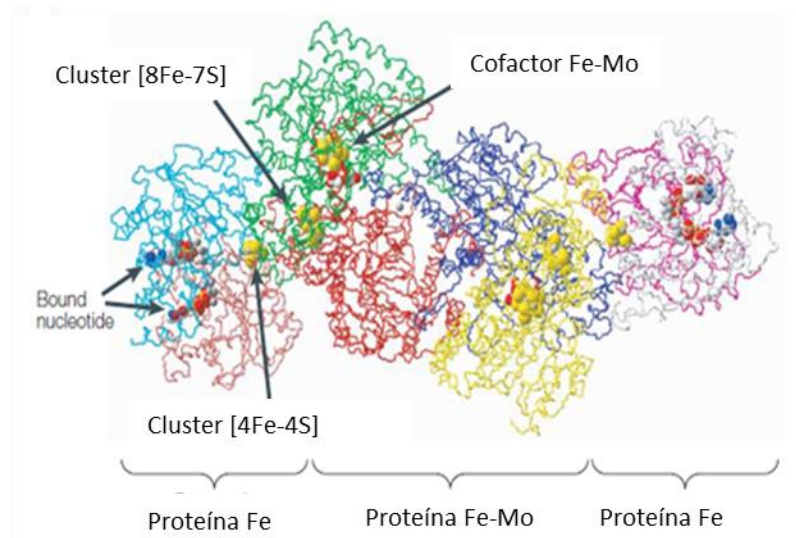


Figura 2. Estructura del complejo que se forma entre la proteína Fe y la proteína MoFe de la nitrogenasa de *Azotobacter vinelandii* (Adaptada de Dixon y Kahn, 2004).

Todos los diazótrofos tienen el sistema nitrogenasa molibdeno-hierro, pero en condiciones de ausencia de molibdeno se induce un sistema alternativo de nitrogenasa, el cual contiene los cofactores vanadio-hierro o hierro-hierro (por ejemplo en *Azotobacter vinelandii* y *Rhodobacter capsulatus*).

Ambos componentes de la nitrogenasa son extremadamente sensibles al oxígeno, por lo que la fijación de nitrógeno en presencia de O_2 , la nitrogenasa se protege de la inactivación por medio de la respiración, produciendo capas mucosas, mediante la compartimentalización de la nitrogenasa

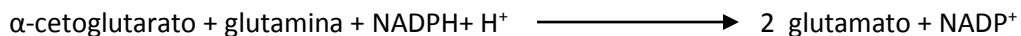
en un tipo especial de célula (heterocisto) o mediante la formación de complejos con una proteína específica. Este proceso se conoce como protección conformacional (Dixon y Kahn, 2004).

5. Asimilación de nitrógeno

Una vez fijado el nitrógeno, el siguiente paso es su asimilación, la cual consiste en la incorporación del NH_4^+ a moléculas orgánicas, a través de reacciones que conducen a glutamato, glutamina, asparagina y carbamoil fosfato (Mathews *et al.* 2002).

El grupo α -amino de la mayoría de los aminoácidos procede del grupo α -amino del glutamato, por transaminación. Este se sintetiza a partir de NH_4^+ y α -cetoglutarato, un intermediario del ciclo del ácido cítrico, por acción de la glutamato deshidrogenasa presente en todos los organismos.

La glutamato sintasa (GOGAT), cataliza una reacción comparable a la llevada a cabo por la glutamato deshidrogenasa, pero ésta actúa fundamentalmente en la biosíntesis de glutamato:



El amoníaco se incorpora a la glutamina por acción de la glutamina sintasa (GS) sobre el glutamato en una reacción que requiere ATP. Posteriormente el grupo amida de la glutamina es transferido por la glutamato sintasa al α -cetoglutarato para dar dos moléculas de glutamato. Un glutamato es aceptor del NH_4^+ cerrándose así el ciclo GS/GOGAT mientras que el otro glutamato se usa para la síntesis de aminoácidos por reacciones de transaminación catalizadas por enzimas llamadas aminotransferasas (AT) (Figura 3) (Stryer, 1990).

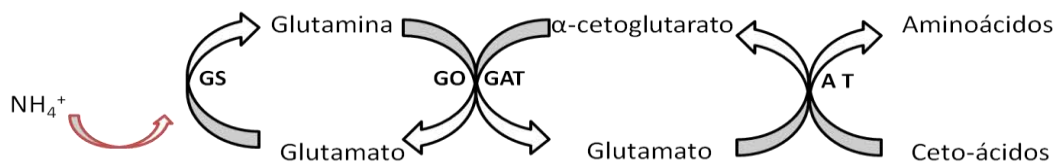


Figura 3. Esquema de la asimilación de NH_4^+ por el ciclo GS/GOGAT

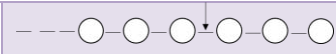


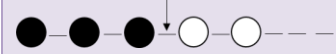
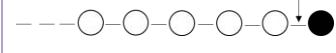
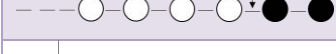

Por otro lado, la asparagina sintetasa, utiliza amoníaco a glutamina para catalizar la conversión de aspartato en asparagina. Esta enzima contribuye poco en la asimilación del nitrógeno.

6.1 Clasificación

De acuerdo con el Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (NC-IUBMB por sus singlas en inglés), las proteasas se encuentran en el subgrupo 3 de las hidrolasas. Sin embargo, las proteasas no cumplen fácilmente con el sistema general de nomenclatura de las enzimas puesto que su especificidad depende de la naturaleza de varios residuos de aminoácidos alrededor del enlace peptídico a ser hidrolizado y de la conformación de la cadena del polipéptido (NC-IUBMB, 2015).

De forma general, las proteasas se subdividen en dos grandes grupos: endoproteasas, que hidrolizan enlaces peptídicos al interior de la cadena de aminoácidos y exoproteasas, que tienen preferencia por los extremos amino- (aminopeptidasas) o carboxilo- (carboxipeptidasas) (Tabla 3) (Rao *et al.*, 1998).

Tabla 3. Clasificación de proteasas

<i>Proteasa</i>	<i>Modo de acción</i>	<i>EC no.</i>
<i>Endoproteasas</i>		3.4.21 - 3.4.34
<i>Serina proteasa</i>		3.4.21
<i>Cisteína proteasa</i>		3.4.22
<i>Aspártico proteasa</i>		3.4.23
<i>Metaloproteasa</i>		3.4.24
<i>Exoproteasa</i>		
<i>Aminoproteasa</i>		3.4.11
<i>Dipeptidil proteasa</i>		3.4.14
<i>Tripeptidil proteasa</i>		3.4.14
<i>Carboxipeptidasa</i>		3.416 - 3.418
<i>Peptidil dipeptidasa</i>		3.4.15
<i>Dipeptidasa</i>		3.4.13

Los círculos blancos representan cualquier residuo de aminoácido de la cadena polipeptídica, los círculos negros representan los aminoácidos terminales. Mientras que las flechas muestran los sitios de acción de la enzima (Tomado y modificado de Rao *et al.*, 1998).

- Endoproteasas

Se caracterizan por su acción preferencial en los enlaces peptídicos en las regiones interiores de la cadena polipeptídica. La presencia del grupo amino o carboxilo tienen influencia negativa sobre la actividad enzimática.

Basándose en su mecanismo catalítico se dividen en subgrupos: (i) serina proteasas, (ii) aspártico proteasas, (iii) cistein proteasas y (iv) metaloproteasas. Y su especificidad se utiliza sólo para identificar enzimas individuales.

Serin proteasas: Se caracterizan por la presencia de una serina en su sitio activo (Neitzel, 2010). Son numerosas y se encuentran ampliamente distribuidas (virus, bacterias y hongos). Sus similitudes estructurales sugieren una relación evolutiva ya que poseen una triada de aspartato, histidina y serina en el sitio activo (Rao *et al.*, 1998). Son activas a pH neutro y alcalino, con puntos isoeléctricos entre 4 y 6. Los pesos moleculares de estas enzimas son entre 18 y 35 KDa y tienen una amplia especificidad.

Aspártico proteasa: También llamadas proteasas ácidas, dependen de residuos de ácido aspártico para su actividad catalítica. Pueden ser intracelulares o extracelulares, son activas en condiciones ácidas (pH 2-5), su punto isoeléctrico en el rango de 3.9-4.9 y pesos moleculares en un rango de 35-50 KDa (Rao *et al.*, 1998).

Estas proteasas son monómeros y tienen una estructura bilobular, con la hendidura del sitio activo situado en el espacio donde los dos lóbulos se unen. Cada lóbulo contribuye con un ácido aspártico en el sitio activo. Escinden péptidos hidrofóbicos de al menos 6 residuos de largo (Reid *et al.*, 2012). Actúan preferencialmente en las regiones interiores del enlace peptídico, la presencia de grupos amino o carboxilo tiene una influencia negativa en la actividad de la enzima. Las oligopeptidasas son un subconjunto de las aspártico proteasas que se limitan a la acción en oligopéptidos o polipéptidos, sustratos más pequeños que las proteínas (Barrett, 1994).

Cisteína proteasas: La actividad de estas proteasas depende de una díada catalítica que consiste en cisteína e histidina. Generalmente, son activas sólo en presencia de agentes reductores y su actividad óptima es a pH neutral (Rao *et al.*, 1998).

Metaloproteasas: Se caracterizan por requerir un ion metálico divalente para su actividad. Basado en su especificidad se clasifican en cuatro grupos: (i) neutro, (ii) alcalino, (iii) *Myxobacter* I y (iv) *Myxobacter* II. Las primeras tienen especificidad por aminoácidos hidrofóbicos mientras que las alcalinas muestran una especificidad muy amplia. Por otro lado, *Myxobacter* I y II tienen

especificidad por residuos de aminoácidos pequeños en ambos extremos y residuos de lisina en el lado amino del enlace peptídico, respectivamente (Rao *et al.*, 1998).

- Exoproteasas

Sólo actúan cerca de los extremos de las cadenas de polipéptidos. Basado en su sitio de acción en el extremo N o C terminal, se clasifican como amino y carboxipeptidasas, respectivamente.

En general, las aminopeptidasas son enzimas intracelulares. Liberan un residuo de aminoácido, un dipéptido o un tripéptido y se producen en una amplia variedad de especies microbianas, incluyendo bacterias y hongo.

Las carboxipeptidasas actúan en el C terminal de la cadena polipeptídica y liberan un único aminoácido o un dipéptido (NC-IUBMB, 2015).

Además, pueden clasificarse tomando en cuenta tres criterios adicionales: (i) tipo de reacción que catalizan, (ii) naturaleza química del sitio catalítico, y (iii) relación evolutiva con referencia a la estructura (Rao *et al.*, 1998).

7. Proteómica

Las proteínas son la moléculas biológicas más abundantes y diversas en cuanto a propiedades, composición y estructura. Al igual que otras macromoléculas, como los ácidos nucleicos y los polisacáridos, son esenciales para el funcionamiento celular.

Existen muchas clases de proteínas, cada una de ellas especializadas en una función biológica diferente: reacciones catalíticas vitales para el metabolismo celular, transporte de moléculas y transducción de señales, entre otras.

El término proteoma fue introducido en 1994 para definir a todas las proteínas que son expresadas por un genoma en una célula u organismo en un punto particular en el tiempo. A diferencia del genoma, el proteoma es altamente dinámico, ya que sus componentes varían dependiendo del tejido, célula, organismo o compartimiento subcelular que se estudie y estos, a su vez, pueden cambiar debido a alteraciones en su ambiente: situaciones de estrés, estado fisiológico o patológico, administración de drogas, señales bioquímicas, estado metabólico entre otras interacciones (Pando y Ferreira, 2007; Pischetsrieder y Baeuerlein, 2009; Kvasnicka, 2003; Carbonaro, 2004).

Los estudios proteómicos, junto con otras metodologías permiten la identificación de conjuntos de proteínas que se expresan en un organismo (o parte del mismo) y permiten hacer el análisis simultáneo de una mezcla compleja de proteínas para establecer sus propiedades funcionales y

estructurales. Además, hacen posible conocer su localización, proporcionan información detallada sobre su abundancia, localización, estabilidad, modificaciones, interacciones, actividades y función (Martins-de-Souza *et al.*, 2007).

La constante elucidación de nuevas proteínas, el desarrollo de nuevas tecnologías y el análisis de grandes cantidades de datos gracias a diferentes softwares desarrollados ha permitido el crecimiento exponencial de estos estudios.

A diferencia de las técnicas clásicas utilizadas en bioquímica, la proteómica se basa en la separación y la identificación de muchas proteínas simultáneamente (en el orden de mil o más) (Castellanos *et al.*, 2004). Esta incluye diversos campos de investigación:

- Proteómica estructural o descriptiva
- Proteómica comparativa
- Proteómica funcional
- Elaboración de mapas moleculares de la célula (Identificación de proteínas que forman un organelo)

7.1 Herramientas de la proteómica

Debido a la diversidad estructural y propiedades fisicoquímicas de las proteínas, su estudio requiere técnicas especializadas que permitan separarlas, identificarlas y cuantificarlas. Actualmente no existe un protocolo único para el análisis proteómico de una muestra, los parámetros que determinan la estrategia a seguir están estrechamente relacionados a la pregunta que se pretenda abordar y a las diferentes variables como complejidad, método de separación, concentración y estabilidad de las proteínas (Pando y Ferreira, 2007). A continuación, se describe de forma general la metodología para el análisis proteómico:

1. Obtención de extractos proteicos

Muchos protocolos han sido estandarizados y publicados para la extracción de proteínas, es necesario tomar en cuenta que éstos deben ser adaptados y optimizados para cada tipo de muestra que va a ser analizada (células de bacterias, levaduras, mamíferos, tejidos), al igual que para el tipo de proteína de interés (proteínas del citosol, de membrana, solubles o insolubles). Los tres pasos fundamentales en la preparación de la muestra son ruptura celular, inactivación o remoción de sustancias que pueden interferir en el análisis y solubilización de las proteínas (Görg *et al.*, 2004).

Las proteínas en su estado nativo son a menudo insolubles, la ruptura de las interacciones involucradas en la agregación de las proteínas (puentes de hidrógeno, disulfuro, fuerzas de van der Waals, interacciones hidrofóbicas e iónicas), permiten la disgregación de éstas en polipéptidos individuales lo que promueve su solubilización en la solución (Chavalier, 2010; Westernmeier y Naven, 2002).

Antes del análisis proteómico es deseable reducir la complejidad de la muestra por “perfeccionamiento” o por “enriquecimiento” con las proteínas de interés. La idea fundamental del perfeccionamiento es separar la muestra en fracciones distinguibles que contengan un cierto número de moléculas. Las muestras pueden ser fraccionadas usando una variedad de métodos: precipitación, centrifugación, cromatografía líquida, filtración y sedimentación. La selección de la técnica depende de la naturaleza de la muestra que será analizada y del objetivo del estudio.

El enriquecimiento permite el incremento de la concentración de las proteínas de interés. Esto es de gran importancia en el estudio proteómico debido a que usualmente las proteínas de baja abundancia son las responsables de los procesos que se llevan a cabo en la célula (Chavalier, 2010).

2. Separación de proteínas

La separación de proteínas generalmente se realiza mediante técnicas cromatográficas y/o electroforéticas. Las más utilizadas son: electroforesis unidimensional (SDS-PAGE) y bidimensional (2-D PAGE), electroforesis capilar, cromatografía de alta resolución (HPLC), cromatografía de afinidad, de exclusión molecular y de intercambio iónico. Idealmente, la electroforesis en dos dimensiones permite la separación de hasta 2000 proteínas en un solo gel mientras que la electroforesis unidimensional solamente 100. La combinación de estas técnicas, ha permitido la separación de mezclas complejas de péptidos y su análisis simultáneo por espectrometría de masas (Chavalier, 2010).

Después de la separación, las proteínas deben visualizarse por métodos específicos o universales de tinción. Las tinciones más utilizadas son: azul de Coomassie, azul de Coomassie coloidal y nitrato de plata, cada una con diferente sensibilidad: 50, 10 y 0.5 ng de proteína respectivamente. Las propiedades más importantes de estos métodos son su alta sensibilidad (bajo límite de detección), reproducibilidad, compatibilidad con espectrometría de masas y baja toxicidad (Görg *et al.*, 2004; Friedman *et al.*, 2009).

3. Procesamiento de la muestra y análisis por espectrometría de masas

Para el análisis de las proteínas por espectrometría de masas (EM) es necesario digerir las proteínas hasta péptidos. La reducción de los puentes disulfuro y la alquilación de las cisteínas permiten desnaturalizarlas para que los sitios de corte enzimático se expongan evitando la formación de dímeros, posteriormente las proteínas se digieren generalmente con tripsina.

El análisis por espectrometría de masas es un procedimiento que involucra la ionización de los componentes de la muestra en fase gaseosa. Los espectrómetros de masa poseen tres componentes: un sistema de ionización, un analizador de masas y un detector de iones. La información que se obtiene es una relación carga/masa (Z/m) de cada uno de los péptidos, que da como resultado un espectro de masas (MS) denominado “huella peptídica” (Villegas, 2003).

El espectro de masas evidencia el número de componentes en la muestra y el peso molecular de cada componente (Pando y Ferreira, 2007).

4. Análisis de los datos

Finalmente los valores de Z/m obtenidos se comparan con diferentes proteínas de las bases de datos, las cuales son digeridas *in silico*, generando una lista de masas teóricas. La comparación entre el listado de masas experimentales y teóricas es evaluada por algoritmos específicos y a cada comparación se le asigna un número (calificación). La identificación depende de si el genoma es conocido, de no ser así la comparación se hace con genomas conocidos procedentes de especies cercanas (Castellanos *et al.*, 2004; Pando y Ferreira, 2007).

Además de la tripsina las proteínas pueden ser digeridas con endoproteasas para la generación de uno o más péptidos, lo que permite obtener datos de secuencia de forma que la identificación de la proteína es inequívoca (Pando y Ferreira, 2007).

MATERIALES Y MÉTODOS

Tratamiento de la muestra de pozol

Se adquirió masa de maíz nixtamalizada y hojas de plátano en el mercado de Pino Suárez en la ciudad de Villahermosa, Tabasco.

Con la finalidad de estandarizar el tiempo cero, el maíz nixtamalizado se molió en un molino manual en el momento de la compra e inmediatamente se enfrió para retardar el inicio de la fermentación. Para el seguimiento de la fermentación, la masa se dividió en porciones de 250 g que se moldearon en forma de bolas y se envolvieron en hojas de plátano para su posterior fermentación en el laboratorio a 37°C para las muestras adquiridas el 27/Enero/2012 (A) y a 29°C para las muestras del 30/Noviembre/2013 (B).

Toma de muestra

Se siguió la fermentación por 15 días para las muestras incubadas a 37°C, se muestrearon los tiempos 0, 24, 73 y 360 horas. En el caso de la muestra incubada a 29°C, los tiempos de muestreo se hicieron cada 3 horas por 48 horas (0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 24 y 48 horas). Trascurrido el tiempo de fermentación, la masa se extendió en bolsas de plástico con cierre hermético y se almacenaron a -70°C hasta su uso.

Extracción de proteína

Para la extracción de proteína total se utilizó el protocolo de extracción descrito por Cárdenas *et al.*, (2014) (Método I). Además se desarrolló un método para la extracción de proteína soluble activa (Método II), para identificar *in situ* a las proteasas presentes en la fermentación. En la Figura 5 se muestra la estrategia general y en la Tabla 4 los buffers utilizados.

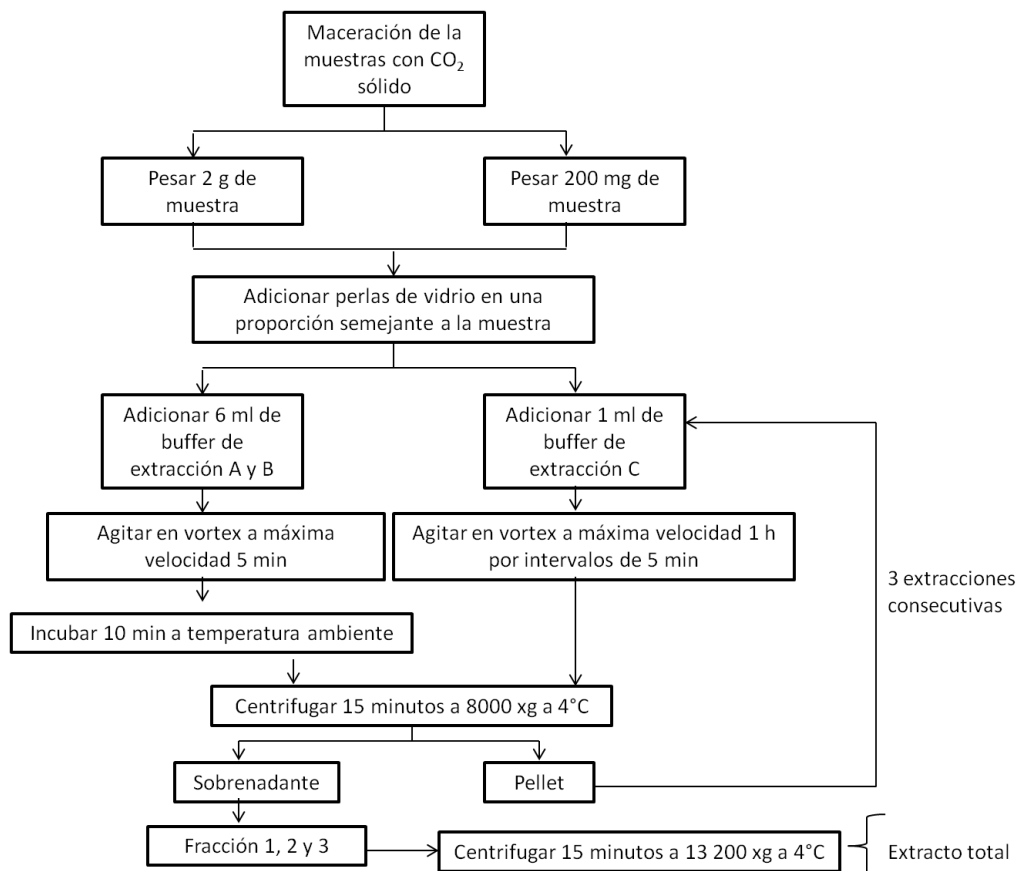


Figura 5. Esquema para la extracción de proteínas del pozo

Buffer	Composición
A	Citrato-fosfato 0.1 M pH 5 (Método II)
B	Citrato-fosfato 0.1 M pH 5, 0.05gm/mL de α -amilasa de <i>B. subtilis</i> (Método II)
C	7 M Urea, 2 M tiourea, 2% CHAPS, 2% ASB-14 en buffer 30 mM Tris-HCl pH 8.5 (Método I)

Tabla 4. Soluciones utilizadas para la extracción de proteínas

Análisis químicos

1. pH

Se suspendieron 2 g de la masa de maíz macerada con CO₂ en 5 mL de agua destilada. La medición de pH se hizo a temperatura ambiente con un potenciómetro de electrodo de vidrio (Corning 130) previamente calibrado con soluciones de pH 4, 7 y 10.

2. Cuantificación de proteína cruda

Se determinó la concentración de proteína cruda por el método de Kjeldahl (AOAC 2001.11), el cual consta de dos pasos consecutivos: a) descomposición de la materia orgánica bajo calentamiento en presencia de ácido sulfúrico concentrado y b) cuantificación de la cantidad de amoníaco obtenido en la muestra.

El método de Kjeldahl consta de las siguientes etapas:

1. Digestión $\text{Proteína} + \text{H}_2\text{SO}_4 \rightarrow \text{CO}_2 + (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + \text{SO}_2$
2. Destilación $\text{NH}_3 + \text{H}_3\text{BO}_3 \rightarrow \text{NH}_4\text{H}_2\text{BO}_3$
3. Titulación $\text{NH}_4\text{H}_2\text{BO}_3 + \text{HCl} \rightarrow \text{H}_3\text{BO}_3 + \text{NH}_4\text{Cl}$

Para convertir el nitrógeno a proteína se emplea un factor que considera la cantidad de nitrógeno que tienen las proteínas en los alimentos Tabla 5.

Para este estudio el factor utilizado fue 5.65.

$$\text{Factor} = \frac{\text{g proteína alimento}}{\text{g nitrógeno alimento}}$$

Tabla 5. Factores de conversión de nitrógeno a proteína para algunos alimentos.

Alimento	% N en proteína	Factor
Huevo o carne	16	6.25
Leche	15.7	6.38
Trigo	18.76	5.33
Maíz	17.70	5.65
Avena	18.66	5.36
Soya	18.12	5.52
Arroz	19.34	5.17

3. Cuantificación de proteína soluble

Para determinar la concentración de proteína presente en las muestras obtenidas se utilizó el método de microensayo de Bradford (Bio-Rad, México) usando como referencia albúmina sérica bovina (BSA). Este ensayo involucra la unión del colorante azul de Coomassie brillante G-250, provocando un cambio en el máximo de absorción de 465 a 595nm. El complejo proteína-colorante es proporcional a la concentración de proteína en la muestra.

4. Determinación de azúcares reductores por el método de Miller

Permite medir el incremento de los azúcares reductores que se forman por la hidrólisis enzimática del almidón. Los azúcares liberados se cuantificaron según el método de Miller (1959), el cual se basa en la reducción del ácido 3,5-dinitrosalicílico a 3-amino-5-nitrosalicilato cuando la temperatura se eleva en medio básico. El producto de la reacción es de color naranja-amarillento y posee un máximo de absorbancia a 575 nm.

Análisis de los extractos proteicos

1. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)

La separación de las proteínas se hizo de acuerdo al método descrito por Laemmli (1970).

En este sistema las proteínas se solubilizan en el buffer de carga (H₂O bidestilada, 10% Glicerol, 10% SDS, 5% 2-Mercaptoetanol y 0.01% azul de bromofenol), el detergente SDS se une a las proteínas proporcionándoles carga negativa, por lo cual migran del polo negativo que se encuentra en la superficie del buffer al polo positivo, en la parte inferior del sistema, evitando la formación de interacciones hidrofóbicas entre las proteínas. El 2-Mercaptoetanol (2-ME) presente reduce los puentes disulfuro. La mezcla se lleva a ebullición a 95°C durante 5 minutos para permitir la completa desnaturalización de las proteínas.

Las muestras se cargaron en un gel de poliacrilamida al 10% y para la electroforesis se corrió a 20 mA hasta que el frente llegó al final del gel.

2. Electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida (2D-PAGE)

100 μ L del extracto de 0 y 48 h de fermentación se precipitaron con Etanol/acetona 1:1 y se disolvieron en buffer de hidratación (7 M urea, 2 M tiourea, 2% CHAPS, 2% ASB-14, 50 mM DTT y 0.5% anfolitos) para tener una concentración final de proteína de 100 μ g. Con las disoluciones se hidrataron tiras IPG de 7 cm con una escala de pH de 3-10 (Bio-Rad, México) a 20°C y 50 V por 12 horas. Las proteínas se focalizaron a 20°C en la cámara de isoelectroenfoque Protean IEF Cell (Bio-Rad) siguiendo un protocolo de cuatro pasos: 250 Vh por 15 minutos, luego 4000 V por 2 h, seguido de 4000 V por 20,000 Vh y finalmente 500 V por aproximadamente 2 h. Después de la focalización las tiras fueron equilibradas en el buffer de equilibrio I (6 M urea, 2% SDS, 0.05 M Tris-HCl pH 8.8 y 2% DDT) por 10 minutos, seguido de agitación en el buffer de equilibrio II (6 M urea, 2% SDS, 0.05 M Tris-HCl pH 8.8 y 2.5% de iodoacetamida) por 10 minutos. Las tiras se colocaron horizontalmente sobre un gel de poliacrilamida 10% (SDS-PAGE) en una cámara de electroforesis (Bio-Rad, México) a temperatura ambiente. La electroforesis se corrió durante una hora a 5 mA para permitir la entrada de las proteínas al gel concentrador y se continuó a 15 mA hasta que el frente llegó al final del gel.

Identificación de la actividad proteolítica in situ

Para ambos casos se realizó un zimograma de actividad proteolítica, adicionando caseína sin vitaminas (Sigma-Aldrich) al 0.05% en el gel separador. Después de la separación, los geles se incubaron con Tritón X-100 al 2.5% en agitación constante por 15 minutos, posteriormente se dejaron toda la noche a 4°C en un buffer Tris 0.04 M pH 7.6, 2 mM CaCl₂ y 2 mM de MgCl₂. Finalmente para visualizar las bandas de digestión de caseína en el gel, se realizó una tinción del gel con azul de Coomassie 0.2%, etanol 90% y ácido acético 20%. La actividad se observa como bandas o puntos translúcidos sobre un fondo azul.

Secuenciación de proteínas

Las proteínas que presentaron actividad proteolítica fueron escindidas en 1mm de un gel sin caseína y secuenciadas en el IRCM-Montreal (Institut De Recherche Clinique De Montreal).

1. Digestión de proteínas

El protocolo de la digestión en gel aplicado en el IRCM se basa en los resultados obtenidos por Havlis *et al.* (2003), que permite la digestión de las proteínas en 6 horas. Los geles se lavaron con agua durante 5 minutos y se destiñeron dos veces con buffer de destinción (tiosulfato de sodio 100 mM, ferricianuro de potasio 30 mM) durante 15 minutos. Se realizó un lavado adicional de 5 minutos con buffer bicarbonato de amonio 50 mM.

Las piezas del gel fueron deshidratadas con acetonitrilo durante 30 min a 40°C, posteriormente se alquilaron con la adición de buffer de alquilación (yodoacetamida 55 mM y bicarbonato de amonio 100 mM) durante 20 minutos a 40°C. Después se secaron a 40°C durante 5 min y se rehidrataron a 4°C durante 40 minutos con la solución de tripsina (6 ng/L de tripsina de grado de secuenciación de Promega y bicarbonato de amonio 25 mM). La digestión de proteínas se realizó a 58 ° C durante 1 hora y se detuvo con 15 µL de 1% de ácido fórmico/2% de acetonitrilo. El sobrenadante se transfirió a una placa de 96 pocillos y se realizó la extracción de los péptidos a 30 minutos a temperatura ambiente utilizando buffer de extracción (1% de ácido fórmico/50% ACN). Todos los extractos de péptidos se combinaron en la placa de 96 pocillos y luego se secaron completamente en una centrifuga de vacío. La placa se selló y se almacenó a -20 ° C hasta el análisis LC-MS/MS.

2. Identificación de proteínas en la base de datos

Para la obtención de las secuencias de los péptidos, los espectros obtenidos experimentalmente por espectrometría de masas (MS/MS) se compararon con los espectros de fragmentación teóricos de péptidos contenidos en Mascot (Matriz de Ciencias, Londres, Reino Unido; versión 2.3.02), los parámetros utilizados para la asignación fueron: una tolerancia de masas de fragmentos de iones de 0,60 Da y una tolerancia del ion primario de 10,0 PPM.

La búsqueda de proteínas se realizó una vez identificados los péptidos en dos bases de datos NCBI y UniProtKB/Swiss-Prot para bacterias, hongos y plantas.

Análisis del metaproteoma del pozol (criterios de identificación)

Se utilizó el programa Scaffold (versión Scaffold_4.0.7, Proteoma Software Inc., Portland, OR) para validar los péptidos y proteínas identificadas por MS/MS. Dado que el principal desafío es controlar la identificación incorrecta de proteínas, principalmente cuando se tienen conjuntos de bases de datos grandes, fue necesario establecer los criterios de identificación.

Para la descripción de la diversidad de microorganismos y secuenciación de las proteínas con actividad proteolítica se tomaron como válidos 2 péptidos únicos, mientras que la identificación de las proteínas del metabolismo del nitrógeno se aceptó un péptido único. En todos los casos se tomaron como válidas probabilidades mayores para péptidos y proteínas de 70% y 95.0%, respectivamente.

Los métodos completos se describen en el apéndice I.

RESULTADOS

Al seguir la fermentación de dos muestras de maíz nixtamalizado, adquiridas en el mercado de Villahermosa, Tabasco durante 15 días, se observó que durante los primeros dos días de fermentación el pH disminuyó drásticamente de 7.7 a 4.7 y llegó hasta 3.8 a las 360 horas de fermentación (Figura 6, panel izquierdo). Tomando en cuenta que son las primeras 24 horas donde se puede apreciar un cambio significativo en los valores de pH, se decidió seguir la fermentación por periodos de tiempo más cortos (cada 3 horas). La mayor disminución se observó entre las 6 y 9 horas de fermentación, una unidad de pH en sólo 3 horas y continuó disminuyendo hasta las 24 horas, alcanzándose un pH final de 4.65 (Figura 6, panel derecho).

Siendo la elaboración del pozol un proceso artesanal, no es posible controlar lo que realizan los productores. Se ha observado que en algunos casos el grano se muele prácticamente después de la cocción, los lavados son superficiales y/o el remojo se ha casi eliminado, por lo que puede haber remantes de hidróxido de calcio en los granos. Esto provoca que el pH inicial de las muestras fermentadas a 37°C y 29°C sea diferente; sin embargo, al cabo de 24 h la fermentación alcanza el mismo pH.

Se ha reportado que durante la fermentación del pozol, la actividad metabólica de las bacterias ácido lácticas se ve reflejada en la producción de ácido láctico (150 a 200 $\mu\text{mol/g}$ de peso húmedo) como producto principal y ácido acético (30.4 $\mu\text{mol/g}$ de peso húmedo) como productos secundarios, lo que provoca la reducción de pH (Ampe *et al.*, 1999; Ben Omar, 2000).

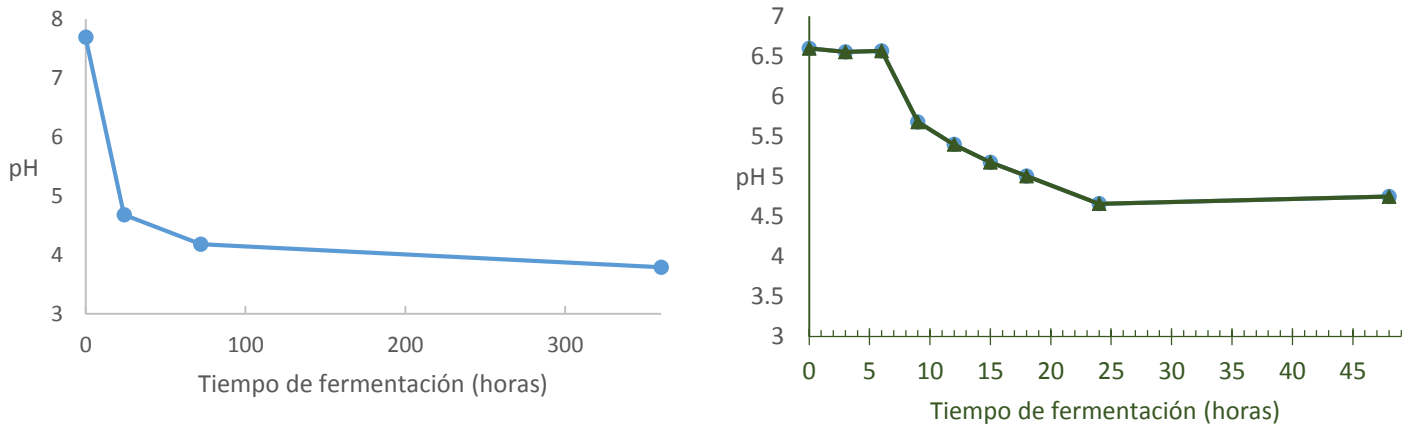


Figura 6. Valores promedio de pH de las muestras de pozol fermentadas. Panel izquierdo muestras fermentadas a 37°C, panel derecho muestras fermentadas a 29°C.

El contenido de nitrógeno total y protéico en las muestras de pozol se muestra en las Figuras 7 y 8. Nuevamente se analizó la fermentación a 37°C y se observó un incremento significativo ($p < 0.05$) a partir de las 24 horas de fermentación, el máximo contenido de nitrógeno total y proteico se vio a las 72 horas (29.43%) y se mantuvo prácticamente constante hasta las 360 horas (Figura 7).

En la fermentación a 29°C, no se encontró diferencia significativa en el contenido de nitrógeno total y proteico en las primeras 9 horas de fermentación ($p > 0.05$), sin embargo, a partir de las 24 horas hay un incremento significativo ($p < 0.001$) de hasta 15.91% a las 48 horas de fermentación (Figura 8).

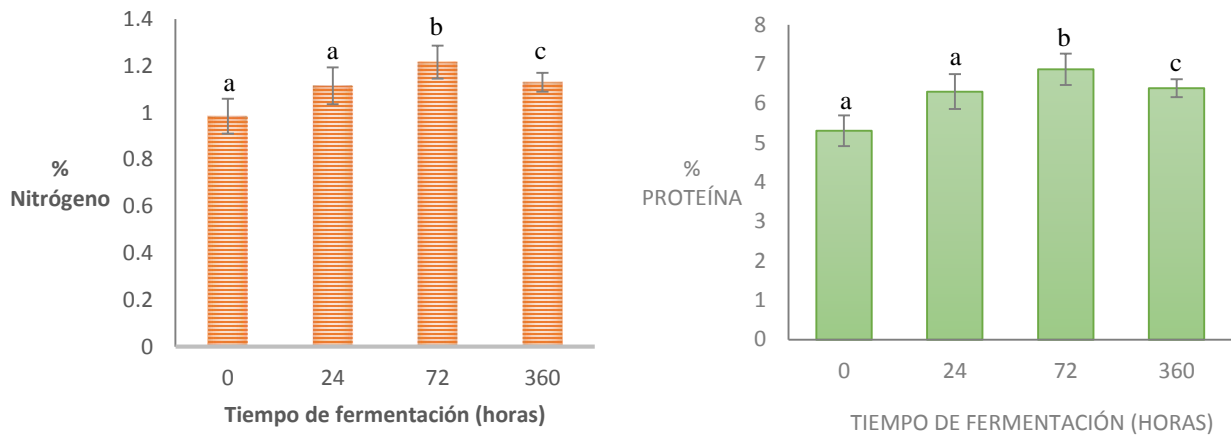


Figura 7. Contenido de nitrógeno total y protéico en muestras de pozol fermentadas a 37°C. Grupos donde no hubo diferencia significativa ($p>0.05$) se señalan con letras iguales. Grupos donde hubo diferencia significativa ($p<0.05$) se señalan con letras diferentes.

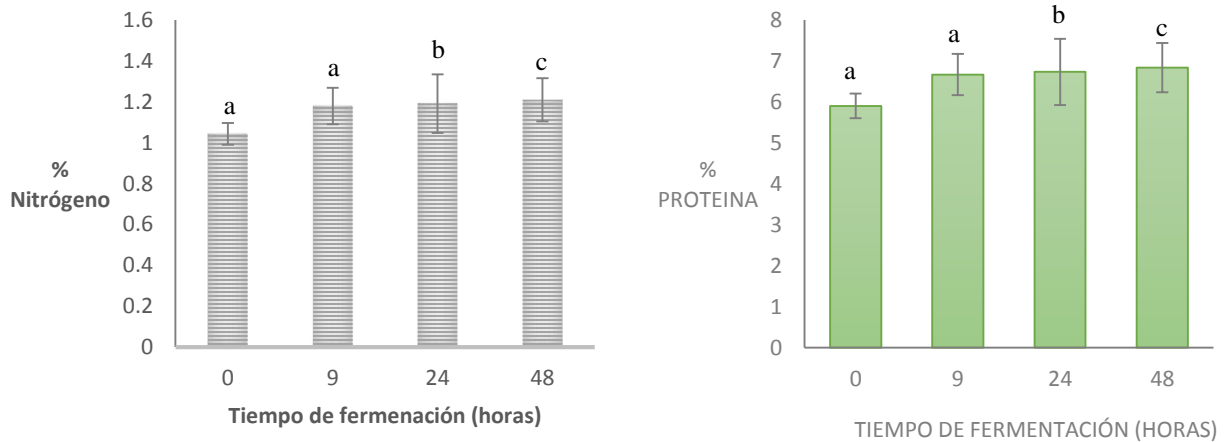


Figura 8. Contenido de nitrógeno total y protéico en muestras de pozol fermentadas a 37°C. Grupos donde no hubo diferencia significativa ($p>0.05$) se señalan con letras iguales. Grupos donde hubo diferencia significativa ($p<0.001$) se señalan con letras diferentes.

Identificación de la actividad proteolítica *in situ*

La electroforesis en una y dos dimensiones son herramientas eficaces para analizar mezclas complejas de proteínas expresadas en un organismo bajo determinadas condiciones (temperatura, pH, entre otras). Sin embargo, la extracción de proteínas sigue siendo un paso restrictivo, puesto que para la selección del método es necesario tomar en cuenta las características físicas y químicas de la muestra (Martins-de-Souza *et al.*, 2007).

En los granos de maíz, como muchas otras semillas, se acumulan cantidades importantes de compuestos de reserva: lípidos, carbohidratos (almidón principalmente 75%) y proteínas (50%). El almidón, sufre cambios estructurales durante la nixtamalización del maíz incluyendo: la gelatinización parcial, retrogradación y entrecruzamiento. Lo que interfiere con la detección de las proteínas de los microorganismos que fermentan el pozol. A pesar de la complejidad del sistema Cárdenas *et al.*, (2014) desarrolló y optimizó un protocolo para la recuperación de proteínas.

Este método se utilizó para la extracción de las proteínas totales e incluyó la maceración del pozol con CO₂ para disminuir el tamaño de partícula lo que favoreció la interacción del buffer de extracción con los gránulos de almidón insoluble. Además, fue necesario el uso de agentes caotrópicos (Urea y Tiourea) y detergentes no iónicos (ASB-14 y CHAPS) para una eficiente extracción de proteínas (ver Método I).

Adicionalmente se diseñó una metodología para la obtención de proteínas activas (Método II), es decir bajo una condición suave que no inactivara las enzimas. Para ello el almidón fue inicialmente hidrolizado con una alfa-amilasa comercial de *B. subtilis* (Sigma-Aldrich) en el amortiguador de citrato-fosfato 0.1 M, pH 5.

El primer paso fue establecer la concentración de enzima, para ello se realizó la extracción secuencial (Ver materiales y métodos) sin enzima y con diferentes concentraciones de enzima en una muestra de pozol fermentada por 24 horas. Los extractos obtenidos se analizaron en geles SDS-PAGE para la detección de actividad proteolítica. Adicionalmente se midieron azúcares reductores para comprobar si el almidón estaba siendo hidrolizado.

En todos los casos se observó una banda de actividad proteolítica de 48 KDa, sin embargo, al comparar las muestras donde la enzima fue utilizada se parecía otra banda de actividad de menor peso molecular (21 KDa) (Figura 9). Lo que sugiere que la enzima ayuda a liberar proteínas por la hidrólisis del almidón.

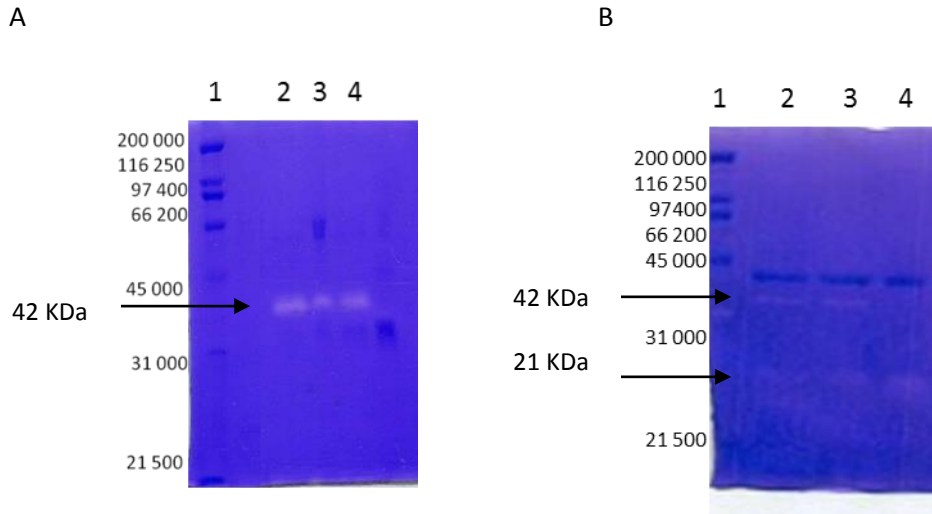


Figura 9. Zimograma con 0.05% de caseína para una muestra fermentada por 24 horas. (A) Método II sin enzima. (B) Método II con diferentes concentraciones de enzima. Carriles: 1) Marcador de Peso molecular, 2) 48.9 U de alfa-amilasa de *B. subtilis*/mL, 3) 24.4 U de alfa-amilasa de *B. subtilis*/mL y 4) 12.2 U de alfa-amilasa de *B. subtilis*/mL.

En cuanto a la cuantificación de azúcares reductores, se observó una mayor liberación en todos los casos donde se utilizó la enzima. Si bien hay una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre la concentración 1 (C_1) y la concentración 2 (C_2), el uso de concentraciones mayores a 24.4 U de alfa-amilasa de *B. subtilis*/mL no se ve reflejado en una mayor liberación de azúcares (Tabla 6).

Tabla 6. Concentración de azúcares reductores liberados después de la extracción con los diferentes métodos.

Concentración de enzima (U de alfa-amilasa de <i>B. subtilis</i> /mL)	mg de glucosa/g muestra
Sin enzima	1.46 ± 0.38 ^a
12.2 (C_1)	52.01 ± 1.72 ^b
24.4 (C_2)	64.79 ± 1.32 ^c
48.9 (C_3)	65.19 ± 1.69 ^c

Grupos donde no hubo diferencia significativa ($p > 0.05$) se señalan con letras iguales. Grupos donde hubo diferencia significativa ($p < 0.001$) se señalan con letras diferentes.

Al evaluar el rendimiento de proteína en cada uno de los métodos se observó que la mayor recuperación se logra con el método I, arriba de 16 mg proteína/ g muestra. Mientras que con el método II, la recuperación de proteína es muy baja y no se observan diferencias significativas por la adición de la amilasa ($p < 0.05$) (Tabla 7).

Resultados similares han sido reportados en la extracción de proteínas para una muestra de pozol fermentada por 360 h, en donde el uso de soluciones que contenían agentes caotrópicos y detergentes no iónicos dio rendimientos veinte veces mayores en comparación con soluciones amortiguadoras (Cárdenas *et al.*, 2014). En general, la composición del buffer que se utiliza determina el grado de recuperación de proteínas durante la extracción.

Tabla 7. Rendimiento de extracción de proteínas con los diferentes métodos en una muestra de pozol a diferentes tiempos de fermentación.

Tiempo de fermentación (horas)	Método de extracción		
	I	II sin amilasa	II con amilasa
	Cantidad de proteína (mg proteína/g muestra)		
0	16.13 ± 0.839	1.74 ± 0.762	1.28 ± 0.0569
24	18.58 ± 1.168	0.78 ± 0.051	0.71 ± 0.033
72	25.92 ± 0.894	0.47 ± 0.157	0.62 ± 0.0584
360	29.67 ± 0.986	0.51 ± 0.194	0.53 ± 0.0566

Los extractos obtenidos de ambos métodos se concentraron por ultracentrifugación para su posterior análisis en geles SDS-PAGE para la detección de actividad proteolítica a dos pH de renaturalización (6 y 7.6).

Si bien la metodología I permite una mayor extracción de proteínas, no es ideal para la identificación *in situ* de las proteasas activas presentes en la fermentación del pozol ya que el uso de agentes caotrópicos y detergentes ocasionan la desnaturalización y por lo tanto la pérdida de actividad de las enzimas presentes en la masa (Figura 10).

Por otro lado, la metodología II permitió la extracción de una banda de actividad con un peso molecular de aproximadamente 42 KDa en los tiempos de fermentación de 24 y 72 horas. Cuando la amilasa es incluida durante la extracción aparece una banda adicional, con un peso molecular de

aproximadamente 21 KDa en todos los tiempos de fermentación, incluido del tiempo cero en el cual aún no hay un crecimiento apreciable de microorganismos.

La incubación de los geles para la renaturalización de las enzimas se hizo a dos pH (6 y 7.6), los resultados no mostraron ningún cambio en el patrón de bandas obtenido.

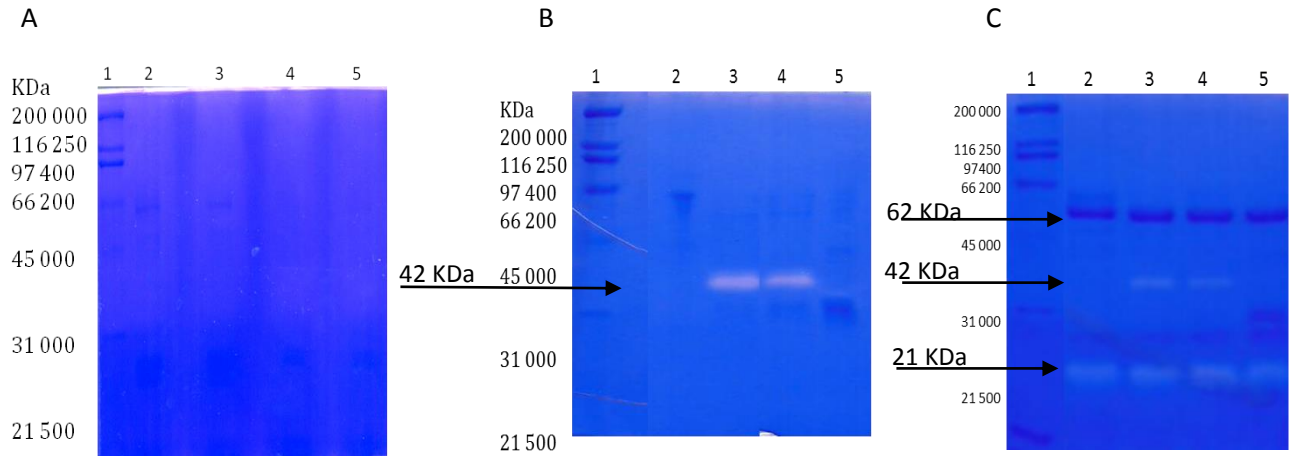


Figura 10. Zimograma con 0.05% de caseína (A) Método I, (B) Método II sin enzima y (C) Método II con enzima.

1) Marcador de peso molecular, 2) muestra sin fermentar, 3) Pozol fermentado 24 horas, 4) Pozol fermentado 72 horas y 5) Pozol fermentado 360 horas. La banda de proteína de 62 KDa que se observa en C corresponde a la alfa-amilasa de *Bacillus subtilis* (Sigma-Aldrich).

Este mismo patrón de bandas se observó al analizar la muestra B, con el método II con amilasa. La banda de mayor peso molecular (42 KDa) aparece en etapas tempranas de la fermentación (9 horas) (Figura 11)

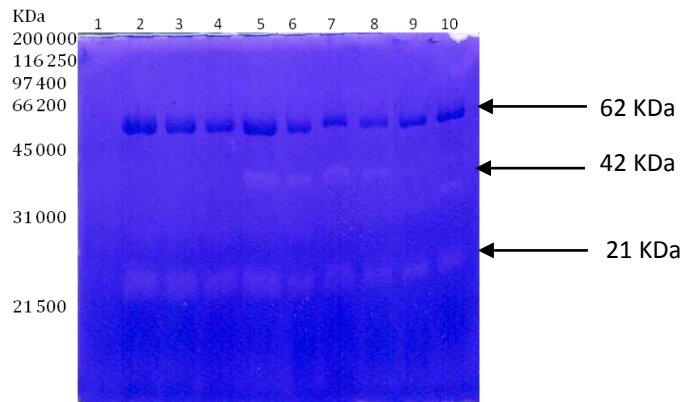


Figura 11. Zimograma con 0.05% de caseína. 1) Marcador de peso molecular, 2) muestra sin fermentar, 3) Pozol fermentado 3 horas, 4) Pozol fermentado 6 horas, 5) Pozol fermentado 9 horas, 6) Pozol fermentado 12 horas, 7) Pozol fermentado 15 horas, 8) Pozol fermentado 18 horas, 9) Pozol fermentado 24 horas y 10) Pozol fermentado por 48 horas.

El método final incluye la extracción de las proteínas con 24.4 U de alfa-amilasa de *B. subtilis*/mL en buffer citrato-fosfato 0.1 M pH5 como se esquematiza en la sección de materiales y métodos (Figura 5).

Posteriormente los extractos de la muestra de pozol sin fermentar y fermentada por 48 horas se analizaron en geles bidimensionales (2D-PAGE). La separación de las proteínas se realizó por punto isoeléctrico en una tira IPG de 7 cm con una escala de pH de 3-10 y posteriormente por peso molecular.

Se lograron detectar puntos con actividad, cuyos pesos moleculares coinciden con los encontrados para los geles SDS-PAGE (21 KDa y 42 KDa), con un punto isoeléctrico de aproximadamente 6.6 y 7.7, respectivamente (Figura 12).

Tanto en los geles SDS-PAGE como en los geles 2D-PAGE se logra apreciar la alfa-amilasa de *B. subtilis* con un peso molecular de 62 KDa (Sigma-Aldrich).

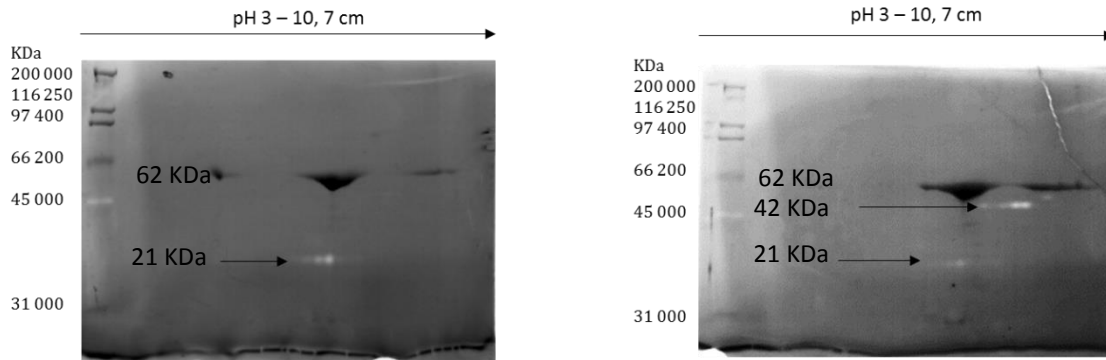


Figura 12. Zimograma con 0.05% de caseína. Panel derecho muestra sin fermentar, panel izquierdo muestra fermentada por 48 horas.

Identificación de las proteínas con actividad proteolítica

Para determinar el tipo de proteasas activas durante la fermentación del pozol, las bandas del gel SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie para los tiempos de fermentación de cero y 48 horas, se secuenciaron por espectrometría de masas en tándem (MS^2). Se logró identificar 1 proteasa de bacteria, la aminopeptidasa C de la bacteria *Streptococcus thermophilus*, correspondiente a la muestra de 48 horas de fermentación (Tabla 8).

Tabla 8. Resultados de las secuencia de la muestra de 48 h de fermentación.

Nombre	Fuente	Peso molecular (KDa)	Número de péptidos identificados	Porcentaje de cobertura (%)
Aminopeptidasa C	<i>Streptococcus thermophilus</i>	50	4	11

La aminopetidasa C es importante en la hidrólisis de péptidos, cataliza la hidrólisis de residuos de aminoácidos del extremo N-terminal en las cadenas polipeptídicas. Su especificidad varía dependiendo de la fuente, pero tiene preferencia por metionina, leucina y alanina. Es una enzima importante para el desarrollo de sabores, acelera la maduración del queso y ayuda a la reducción del sabor amargo (Fernández, 2000). Es importante señalar que esta aminopeptidasa identificada

pertenece a la especie *S. thermophilus*, bacteria que no ha sido reportada en el pozol por lo que esta enzima podría pertenecer a la bacteria predominante en la fermentación *S. infantarium*, de la cual no hay genoma disponible para su asignación. La banda de 42 KDa aparece desde las 9 horas de fermentación, que corresponde al tiempo en donde se observa un cambio importante de pH.

También se encontraron péptidos de proteínas del metabolismo de aminoácidos (Tabla 9).

Tabla 9. Resultados de las secuencia de la muestra de 48 h de fermentación.

<i>Proteína</i>	<i>Especie</i>	<i>Peso molecular (KDa)</i>	<i>Número de péptidos (identificados)</i>	<i>Porcentaje de cobertura (%)</i>
<i>Arginina deiminasa</i>	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	46	18	58
<i>Arginina deiminasa</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	47	8	20

No se identificó alguna proteasa correspondiente a la banda de 21 KDa, probablemente debido a que su abundancia relativa es muy baja en relación a otras proteínas que migran en la misma banda.

Análisis del metaproteoma del pozol

- Diversidad de microorganismos en el pozol

Los alimentos son matrices complejas cuyo estudio a través de herramientas proteómicas ha permitido la identificación de compuestos bioactivos funcionales, evaluación de la seguridad de los ingredientes alimentarios, detección y control deterioro de alimentos o microorganismos patógenos, entre otros. La complejidad de este tipo de estudios se incrementa cuando el alimento no proviene de un solo organismo, sino de mezclas complejas de estos como en los alimentos fermentados.

La metaproteómica (estudios de los proteomas derivados de todo un conjunto de organismos de un mismo ecosistema) fue desarrollada recientemente para el estudio fisiológico de comunidades microbianas. A diferencia de los estudios proteómicos clásicos esta nueva tecnología ha permitido: i) mayor cobertura del proteoma para la identificación y cuantificación de miles de proteínas de una

sola muestra o de un conjunto de muestras, ii) identificación de péptidos usando mediciones de masa de alta precisión, iii) detección de abundancia de péptidos, y iv) resolución de péptidos similares en muestras complejas (Muller y Pan, 2013).

Un avance importante en la investigación metaproteómica, ha sido la aparición de técnicas de ionización suaves (por electrospray), que ha permitido el análisis directo de muestras de proteínas y péptidos mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa en tándem (LC-MS/MS) denominado “shotgun” (Muller y Pan, 2013).

Si bien el pozol es un sistema complejo, se ha desarrollado y optimizado una metodología de extracción para la obtención del metaproteoma a diferentes tiempos de fermentación (0, 24, 72 y 360 horas) (Cárdenas *et al.*, 2014).

En este trabajo, al analizar el metaproteoma a los diferentes tiempos de fermentación, se lograron identificar un total de 985 proteínas de bacterias y 996 proteínas de hongos, las cuales incluyen un importante número de proteínas de microorganismos que no habían sido descritos en el sistema.

Las proteínas mayormente representadas en bacterias pertenecen al grupo de las bacteria ácido lácticas, principalmente del género *Streptococcus*, el cual está presente desde las 24 horas de fermentación (14.63%) y es más abundante a las 72 horas (60.37%), seguido de *Lactococcus* y *Lactobacillus* siendo más abundante este último al final de la fermentación (26.56%). También se identificaron géneros de bacterias que hasta el momento no se han descrito en el sistema como: *Synechococcus*, *Rhizobium*, *Rickettsia* y *Actinobacillus* todos ellos presentes desde el tiempo cero de fermentación con una abundancia similar (4.54%) (Figura 13).

En el caso de una muestra de pozol fermentada por 15 días, los géneros más representados fueron *Lactobacillus* (22%) bacteria ácido láctica y *Acetobacter* (14%) (Cárdenas *et al.*, 2014).

En relación a los hongos, se puede observar que están presentes desde el inicio de la fermentación. En comparación con las bacterias hay una menor diversidad de géneros y las proteínas predominantes pertenecen a *Aspergillus* y *Schizosaccharomyces* con más del 7.69% de abundancia relativa (Figura 14).

Las proteínas identificadas para bacterias y hongos fueron categorizadas de acuerdo con términos de Ontología Génica (COG), como se puede ver en las Figuras 15 y 16, los procesos biológicos principalmente representados fueron procesos anabólicos y catabólicos (procesos metabólicos) y aquellos que se llevan a cabo a nivel celular, por ejemplo, comunicación celular (procesos celulares). Esto indica que desde el inicio de la fermentación no sólo las bacterias están metabólicamente activas sino también los hongos. Resultados que coinciden con los análisis microbiológicos que reportan que desde el inicio de la fermentación están presentes tanto bacterias como hongos pero en diferentes concentraciones, 10^9 ufc/ g de masa seca y 10^2 ufc/g de masa seca, respectivamente (Díaz-Ruiz *et al.*, 2003).

- Utilización de nitrógeno en el pozol

El nitrógeno junto con el carbono, oxígeno e hidrógeno, es un elemento esencial para el crecimiento de los microorganismos. Forma parte de moléculas importantes para la actividad biológica como son proteínas, ácidos nucleicos, coenzimas, fosfolípidos, entre otros.

La contribución de nitrógeno inorgánico y orgánico para satisfacer estos requerimientos en los microorganismos que crecen en el pozol es completamente desconocida. Sin embargo, se ha observado la presencia de microorganismos proteolíticos a las 20 horas (6×10^6 ufc/g) y un importante incremento de nitrógeno durante la fermentación (Loeza, 1991). Por lo que se decidió realizar en el metaproteoma del pozol la búsqueda de proteínas involucradas en la utilización de nitrógeno durante la fermentación.

La búsqueda de proteínas se hizo en dos bases de datos NCBI y UniProtKB/Swiss-Prot para bacterias, hongos y plantas. A diferencia de NCBI, UniProtKB/Swiss-Prot es un repositorio de datos solo para proteínas con información extraída de la literatura y análisis computacional. No solo proporciona el nombre de la proteína, también da información sobre su función, localización y proceso biológico.

A pesar de que NCBI incluye una colección de secuencias de varias fuentes, el número total de proteínas identificadas fue mayor con UniProt. Estas proteínas se clasificaron de acuerdo a su término GO por función biológica y proceso metabólico en:

- I. Biosíntesis de aminoácidos
- II. Degradación de aminoácidos
- III. Transporte de aminoácidos, péptidos y amoniaco.
- IV. Procesamiento de proteínas (proteasas)
- V. Metabolismo de nitrógeno
- VI. Fijación de nitrógeno

La mayoría de las proteínas identificadas tanto en bacterias, hongos y plantas están involucradas en la degradación de proteínas (como son la Aminopeptidasa M1-A, Aminopeptidasa N, Dipeptidil peptidasa IV, entre otras). Además, algunas están involucradas en la degradación de proteínas mal plegadas o innecesarias (subunidad 26S del proteosoma, Clp proteasa dependiente de ATP, peptidasa S16 dependiente de ATP, Lon peptidasa, entre otras), las cuales pueden ser degradadas hasta péptidos pequeños para su reutilización en la síntesis de proteínas. Adicionalmente, se encontraron proteínas involucradas en la biosíntesis, degradación y transporte de aminoácidos.

Como se esperaba, se encontraron proteínas del metabolismo de nitrógeno inorgánico para bacterias y plantas y la proteína-hierro del complejo enzimático nitrogenasa necesaria para la fijación de nitrógeno atmosférico en bacterias.

En relación con el tiempo de fermentación no se observó ningún cambio en cuanto al número de proteínas encontradas por dominio, función y proceso metabólico (Figura 17).

La información completa de las proteínas identificadas se encuentra en el apéndice II.

Bacterias

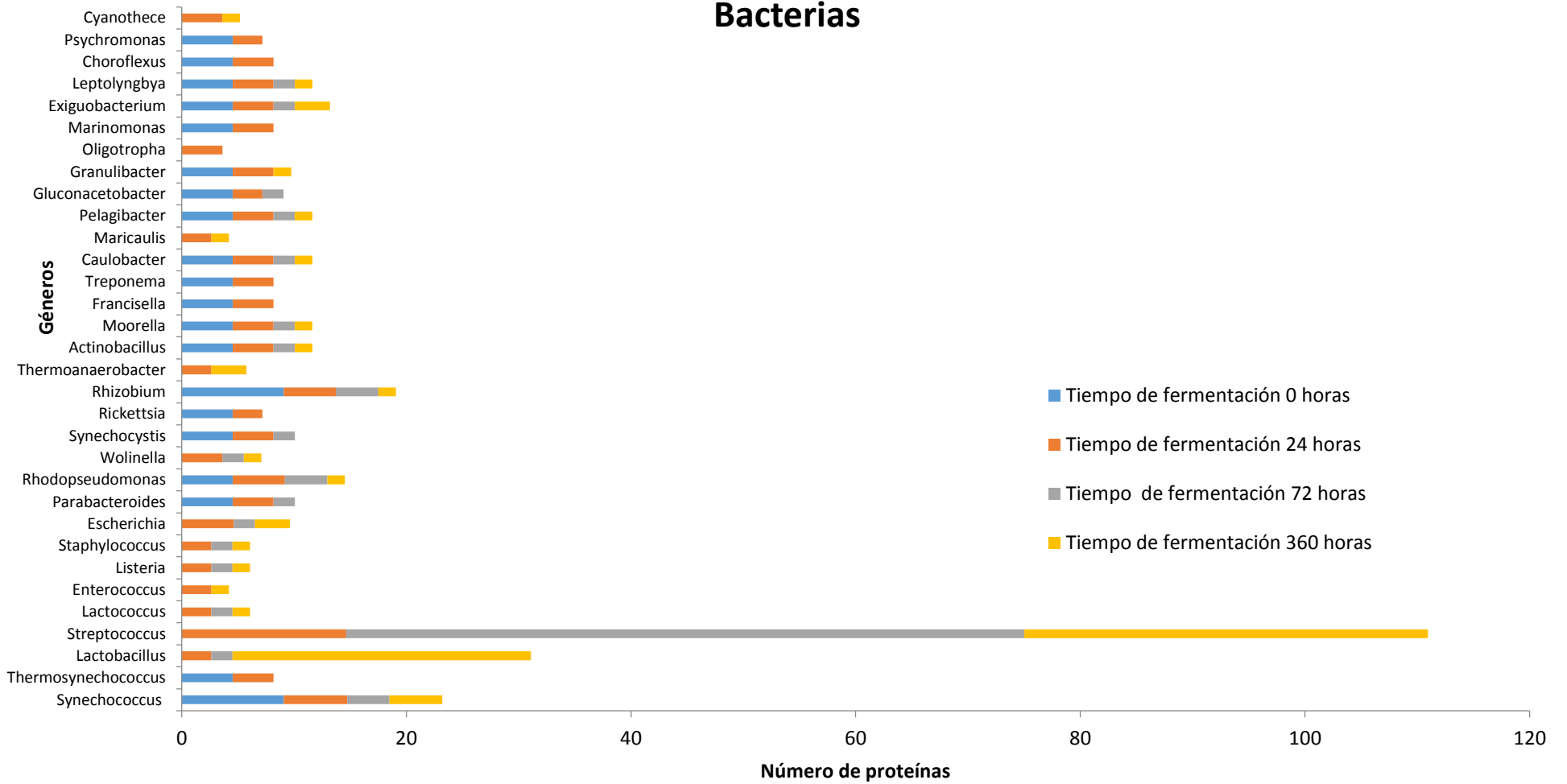


Figura 13. Distribución de géneros de bacterias identificada con más de un péptido por LC-MS/MS a diferentes tiempos de fermentación.

Hongos

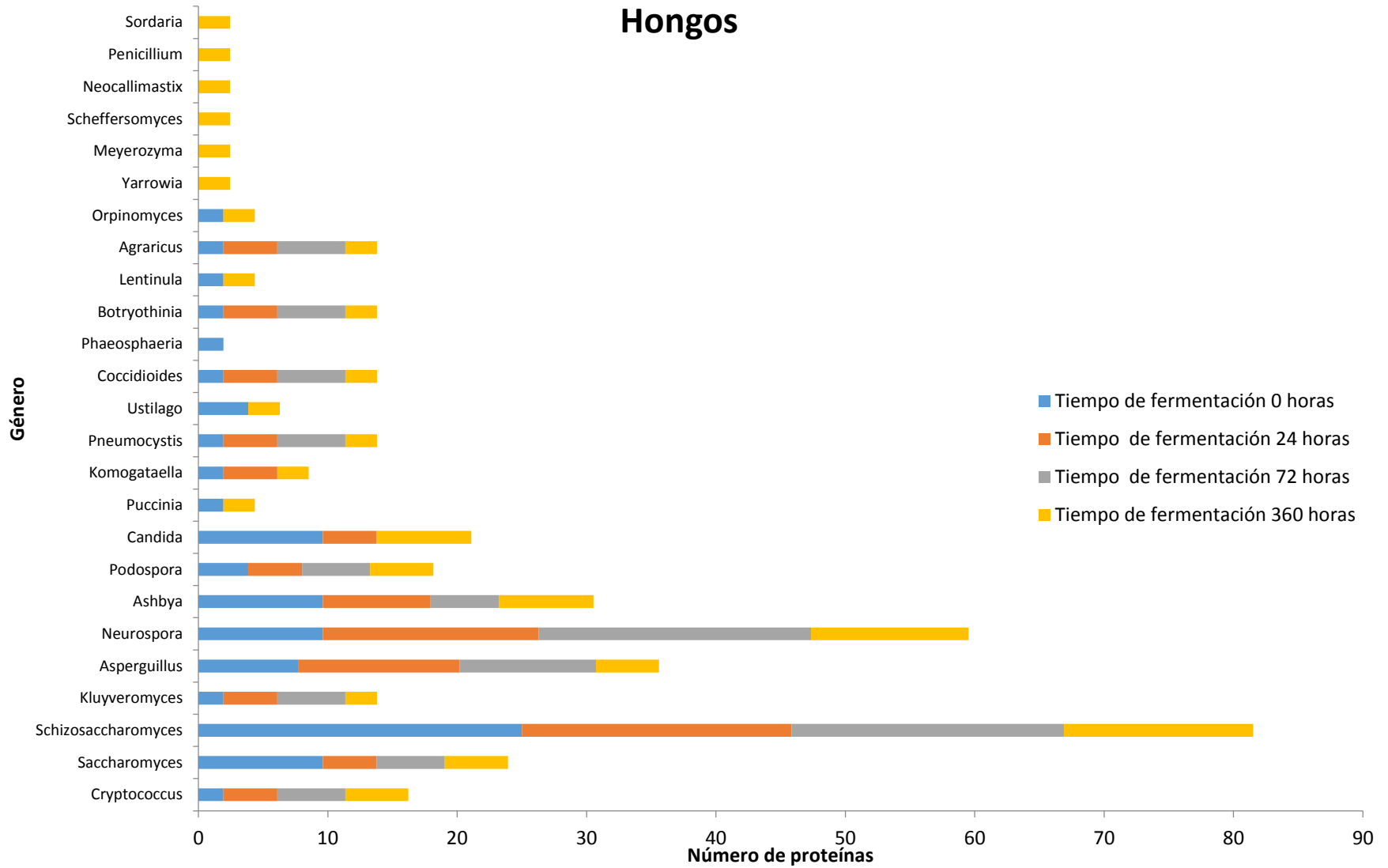


Figura 14. Distribución de géneros de hongos identificada con más de un péptido por LC-MS/MS a diferentes tiempos de fermentación.

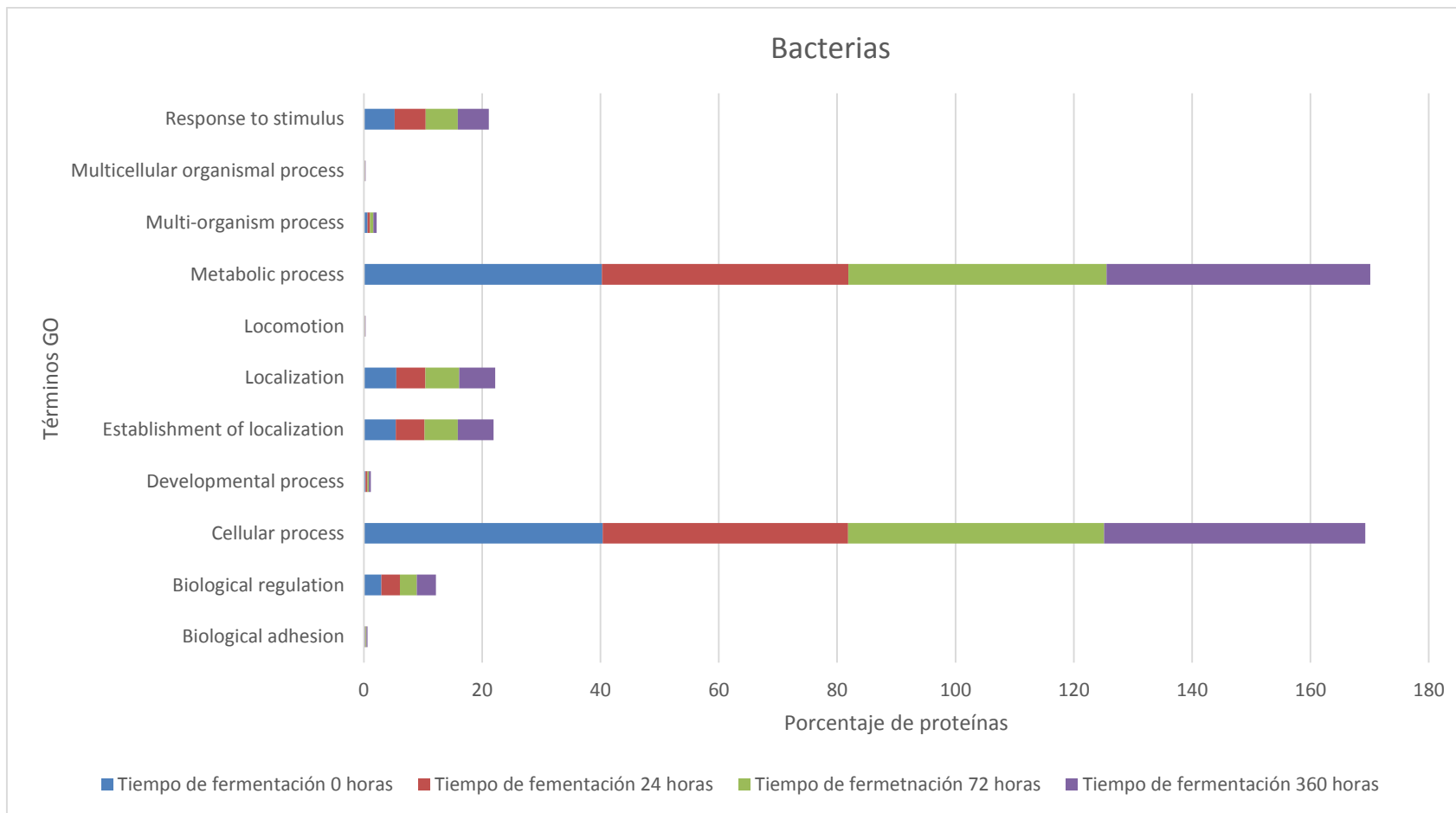


Figura 15. Distribución de proteínas de bacterias por proceso biológico de acuerdo a los términos GO.

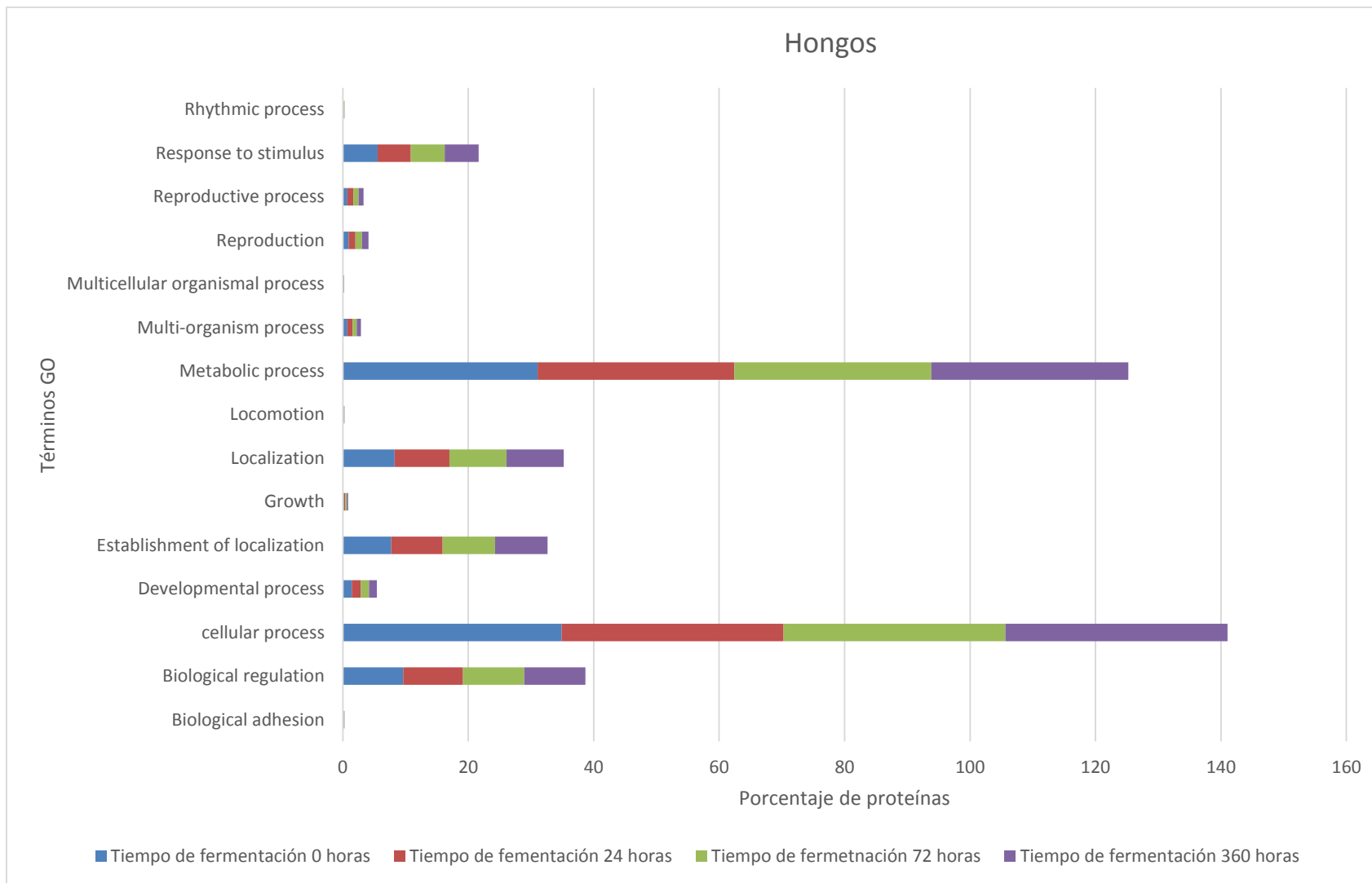


Figura 16. Distribución de proteínas de hongos por proceso biológico de acuerdo a los términos GO.

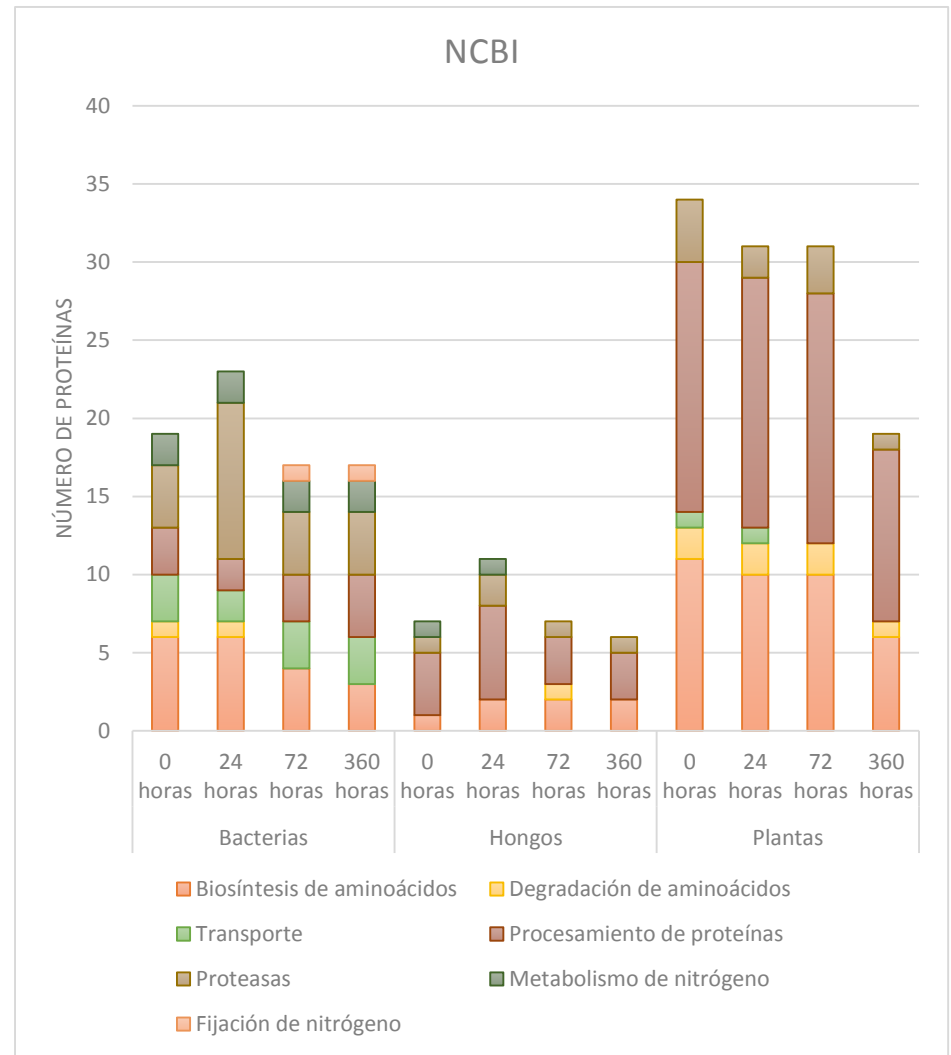
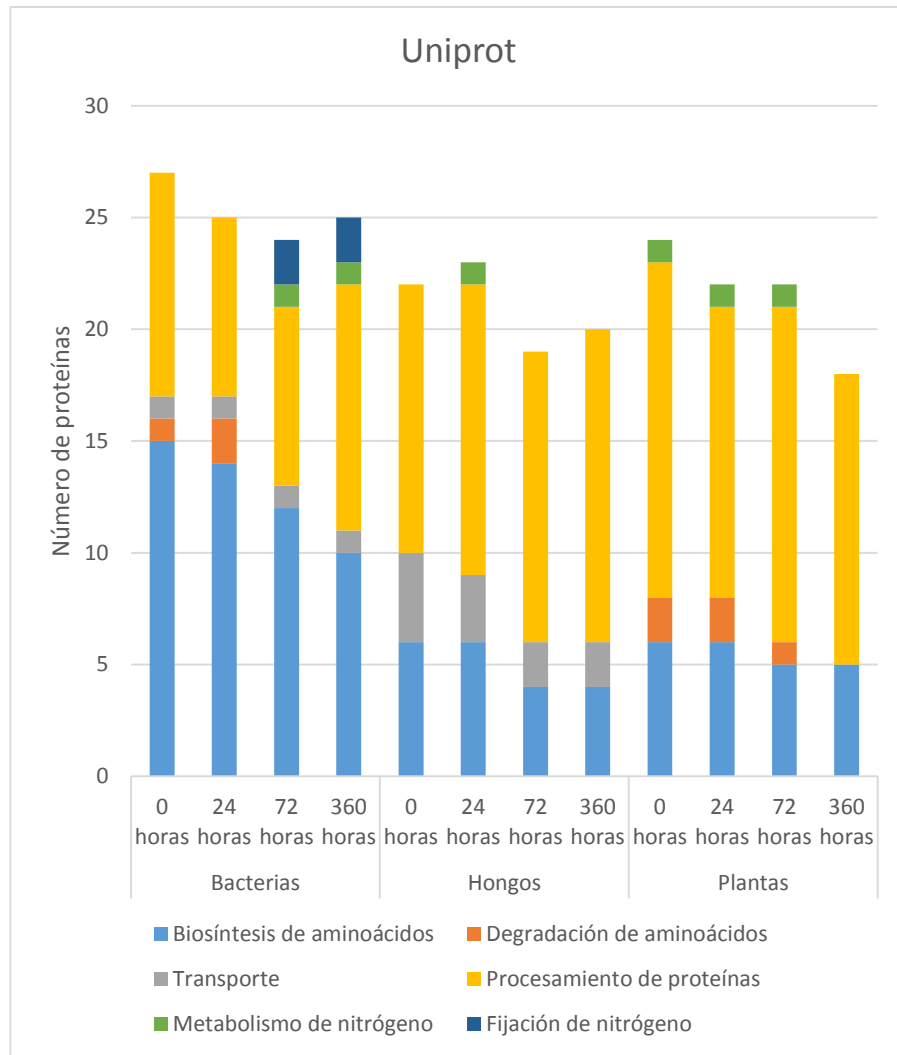


Figura 17. Proteínas identificadas en la base de datos UniProtKB/Swiss-Prot y NCBI.

DISCUSIÓN

El pozol constituye un alimento básico para la población indígena y mestiza del sureste; es consumido en ocasiones como único alimento durante las jornadas de trabajo y también es utilizado como alimento de sustitución. La masa fermentada contiene proteína de mejor calidad, mayor cantidad de aminoácidos (lisina y triptófano, entre otros) y vitaminas (niacina y riboflavina) respecto al maíz. Además, se ha reportado que durante la fermentación hay un incremento en el contenido de nitrógeno total (44.5%-68.5%) con respecto a la masa no fermentada (Cravioto *et al.*, 1951; Ulloa *et al.*, 1971).

Con el fin de comprobar si la fermentación es la responsable del incremento de nitrógeno, en este trabajo se evaluó el contenido de nitrógeno total y proteico en distintas etapas de la fermentación. Se observó que en las muestras sin fermentar, el contenido promedio de proteína es menor (5.59%) al reportado en maíz sin nixtamalizar 8.14% (Paredes *et al.*, 2008). Esta diferencia puede estar relacionada a posibles pérdidas de proteína durante la eliminación del pericarpio.

A diferencia de estudios previos que han reportado una máxima concentración de proteína a los 10 días de fermentación (Aguilera, 1989; Loaeza, 1991), en este trabajo se observó en etapas tempranas (3 días de fermentación) (Figura 7 y 8). El incremento en el contenido proteico puede relacionarse con la presencia de bacterias fijadoras de nitrógeno, las cuales alcanzan su máximo desarrollo a las 80 horas (7.5×10^7 ufc/g muestra). Mientras que la disminución observada a partir de los 15 días de fermentación coincidió con la fase de declive de estas bacterias (después de las 250 horas de fermentación) (Loaeza, 1991).

En África, donde también es común el uso de cereales para la preparación de alimentos fermentados, se elabora el togwa que es un alimento producido en Tanzania a partir de maíz y/o sorgo remojado, molido y cernido en forma húmeda, el cual se deja sedimentar y fermentar. Se ha reportado que durante la fermentación de este alimento se desarrolla una gran abundancia de microorganismos, sin embargo, este crecimiento no está acompañado de un incremento significativo de proteína (Mugula *et al.*, 2002). Contrario a esto, en este estudio se encontró que la fermentación del pozol si incremento de forma significativa ($p < 0.05$) el contenido de nitrógeno total y proteico a partir de las 24 horas (Figura 7 y 8). Lo que sugiere que durante la fermentación hay fijación de nitrógeno.

El hecho de haber identificado enzimas proteolíticas, puede indicar que durante la fermentación del pozol hay degradación de proteínas para la generación de péptidos y aminoácidos indispensables para el crecimiento de los microorganismos. Si bien en este estudio no se evaluaron los productos de degradación, si se ha reportado que en fermentaciones amiláceas, la presencia y actividad de las enzimas proteolíticas de bacterias ácido lácticas como, *L. brevis*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *W. confusa*, entre otras, incrementa ligeramente el contenido de proteína soluble al igual que lo observado durante la fermentación del pozol (incremento de hasta 3.8%) (Loeza, 1991); sin embargo, la concentración de la mayoría de los aminoácidos se reduce lo que implica un mayor aprovechamiento de estos para el metabolismo microbiano (Mugula *et al.*, 2001).

Por otro lado, la secuenciación por espectrometría de masas (LC MS/MS) de las proteínas detectadas *in situ* permitió la identificación de la aminopeptidasa C de *Streptococcus thermophilus* de 50 KDa con 4 péptidos únicos. Como se mencionó en la parte de resultados, esta bacteria no ha sido identificada en el pozol y dado que *S. infantarium* es la bacteria predominante se decidió hacer una comparación de las secuencias de aminoácidos para esta proteína (ClustalW2).

El porcentaje de identidad entre la secuencia completa de ambas aminopeptidasas fue de 82.47%. Al realizar la comparación con las secuencias de los péptidos únicos, se observó que en dos de ellas hay un aminoácido diferente (treonina por valina y serina por alanina) (Figura 18). En este punto es importante señalar que la secuencia de la Aminopeptidasa C de *S. infantarium* se obtuvo a partir del “draft” que se tiene de su genoma, por lo que existía la posibilidad de que este cambio en los aminoácidos se debiera a que el genoma aún no está bien armando. Para tener una mejor idea acerca de si el cambio en los aminoácidos es algo presente en otras peptidasas o si puede estar relacionado con una mala anotación en el genoma de *S. infantarium*, se realizó un alineamiento con las secuencias de otras aminopeptidasas del género *Streptococcus* encontrándose que el cambio en los aminoácidos está presente en varias de estas enzimas (Figura 19).

<i>S. infantarium</i>	MSELSTFTDKLFDADQADSKLRAVENAVTHNGLLKSLETRQSEMENYHAFSIDLTKDKV	60
<i>S. thermophilus</i>	MTSLSTDFTEKLFADYEANAKYGAIENAVTHNGLLKSLETRQSEVENDFVFSIDLTKDEV	60
<i>S. infantarium</i>	ANQKASGR CWMFAALNTFR HKMISDLNLENFELSQAHTFFWDKYEKSNWFLEQVIATADQ	120
<i>S. thermophilus</i>	SNQKASGR CWMFAALNTFR HKLI SDFKLESFELSQAHTFFWDKYEKSNWFLEQI IATADQ	120
<i>S. infantarium</i>	ELGSRKVK FLLD V PQQDGGQWDMVV ALFEK YGVVPKDAYPESISSNSR ELNQYLNKLLR	180
<i>S. thermophilus</i>	EIGSRKVK FLLD V PQQDGGQWDMVV SLFEK YGVVPKSVYEPESVASSNSR ELNQYLNKLLR	180
<i>S. infantarium</i>	QDAQILR EAI AAGADDKAVQTKKEALLQEVFNFLAINLGLPPRTFFDFAYRDKDNNYHSDK	240
<i>S. thermophilus</i>	QDAQILR DLIASGADQA AVQAKKEEFLQEIFNYLAMTLGLPPRQDFDFAYRDKDNNYRSEK	240

Figura 18. Alineamiento de la aminopeptidasa C de *S. thermophilus* con *S. infantarium*. En sombreado amarillo se indican los péptidos únicos y en color rojo los aminoácidos diferentes.

<i>S. pneumoniae</i>	VTNQKASGR CWMFAALNTFR HKLISQYKLENFELSQAHTFFWDKYEKSNWFLEQVIATSD	119
<i>S. mitis</i>	VTNQKASGR CWMFAALNTFR HKLISQYKLENFELSQAHTFFWDKYEKSNWFLEQVIATAD	119
<i>S. gordonii</i>	VSDQKASGR CWMFAALNTFR HKMIAGFQLEDFELSQAHTFFWDKYEKSNWFLEQMLATAD	119
<i>S. sp.</i>	VANQKASGR CWMFAALNTFR HKMISDLNLENFELSQAHTFFWDKYEKSNWFLEQVIATAD	119
<i>S. infantarium</i>	VANQKASGR CWMFAALNTFR HKMISDLNLENFELSQAHTFFWDKYEKSNWFLEQVIATAD	119
<i>S. mutans</i>	VSNQKASGR CWMFAALNTFR HKLISDFKLENFELSQAHTFFWDKYEKSNWFLEQVIATAD	119
<i>S. equi</i>	VSNQKASGR CWMFAALNTFR HKLISEFKLEDFELSQAHTFFWDKYEKSNWFMEQVIATAD	119
<i>S. pyogenes</i>	VSNQKASGR CWMFAALNTFR HKLITEFKLENFELSQAHTFFWDKYEKANWFMEQVIATAD	119
<i>S. thermophilus</i>	VSNQKASGR CWMFAALNTFR HKLISDFKLESFELSQAHTFFWDKYEKSNWFLEQI IATAD	119
<i>S. agalactiae</i>	VSNQKQSGR CWMFAALNTFR HKLISDFKLENFELSQAHTFFWDKYEKSNWFMEQI IATAN	119
<i>S. suis</i>	VSNQKASGR CWMFAALNTFR HKLISDFKLENFELSQAHTFFWDKYEKSNWFLEQI IATAD	119
<i>S. moniliformis</i>	VSNQKSSGR CWIF AALNTLRHKMNKEYNLENFELSQT YTFWWDKLEKSNFFLDAI IKTHK	112
<i>S. pneumoniae</i>	QELTSRKVK FLLQ V PQQDGGQWDMVV SLFEK YGVVPKSVYEPESVSSSSSR ELNAILNKLL	179
<i>S. mitis</i>	QDLTSRKVK FLLQ V PQQDGGQWDMVV SLFEK YGVVPKSVYEPESVSSSSSR ELNAILNKLL	179
<i>S. gordonii</i>	QELTSRKVK FLLD V PQQDGGQWDMVV SLFEK YGVVPKSVYEPESISSGNSR ELNQILNKLL	179
<i>S. sp.</i>	QELGSRKVK FLLD V PQQDGGQWDMVV SLFEK YGVVPKDAYPESISSNSR ELNQYLNKLL	179
<i>S. infantarium</i>	QELGSRKVK FLLD V PQQDGGQWDMVV ALFEK YGVVPKDAYPESISSNSR ELNQYLNKLL	179
<i>S. mutans</i>	EELASRKVK FLLD V PQQDGGQWDMVV ALFEK YGVVPKSVYEPESISSASR ELNQYLNKLL	179
<i>S. equi</i>	QALTSRRVK FLLD V PQQDGGQWDMVV ALFEK YGVVPKSVYEPESVSSNSR ELNQYLNKLL	179
<i>S. pyogenes</i>	QELTSRKVK FLLD V PQQDGGQWDMVV SLFEK YGVVPKSVYEPESISSNSR ELNQYLNKLL	179
<i>S. thermophilus</i>	QEIGSRKVK FLLD V PQQDGGQWDMVV SLFEK YGVVPKSVYEPESVASSNSR ELNQYLNKLL	179
<i>S. agalactiae</i>	QELSSRKVK FLLD V PQQDGGQWDMVV ALFEK YGVVPKTVYEPESVSSASR ELNQYLNKLL	179
<i>S. suis</i>	QEIGSRKVK FLLD V PQQDGGQWDMVV ALFEK YGVVPKSVYEPESISSASR ELNQYLNKLL	179
<i>S. moniliformis</i>	EDIDSRIVHLLSIPQQDGGQWDMVSLIQKYGVVPKSVMPVYHSSNSAMLNTLLNKLL	172
<i>S. pneumoniae</i>	RQDAQILR DLVSGADQATVQAKKEDLQEIFNFLAMSLGLPPRKFDFAYRDKDNNYKSE	239
<i>S. mitis</i>	RQDAQILR DLVSGADQATVQAKKEDLQEIFNFLAMSLGLPPRQDFDFAYRDKDNNYQSE	239
<i>S. gordonii</i>	RQDAQILR ELVAEGANS AELQAKKEELLQEVFNFLAMNLGLPPRQDFDFAYRDKDNNFHSE	239
<i>S. sp.</i>	RQDAQILR EAI AAGADDKAVQTKKEALLQEVFNFLAINLGLPPRTFFDFAYRDKDNNYHSD	239
<i>S. infantarium</i>	RQDAQILR EAI AAGADDKAVQTKKEALLQEVFNFLAINLGLPPRTFFDFAYRDKDNNYHSD	239
<i>S. mutans</i>	RQDAQILR QILAAGADSKAVQAKKEELLQEIFNFLAMNLGLPPRHDFDFAYRDKDNNYQSE	239
<i>S. equi</i>	RQDAQILR DVISAGADHQAVQAKKEELLQEIFNFLAMNLGLPPRQDFDFAYRDKDNNYHAD	239
<i>S. pyogenes</i>	RQDAQILR DLIASGAKAQVEDRKAELLQEIFNFLAMTLGLPPRHDFDFAYRDKDNNYHVE	239
<i>S. thermophilus</i>	RQDAQILR DLIASGADQA AVQAKKEEFLQEIFNYLAMTLGLPPRQDFDFAYRDKDNNYQSE	239
<i>S. agalactiae</i>	RQDAQILR ELIAQGADGATVQNKKEELLQEIFNFLAMNLGLPPQSFDFAYRDKDNNYQSD	239
<i>S. suis</i>	RQDAQILR DLLAKGASPEEVQTKENLLQEIFNFLAVNLGLPPRSDFDFAYRDKDNNYHRD	239
<i>S. moniliformis</i>	RLNAEILRN ---SDLDEKGLYDLKETMIEEYAFLCVMLGVPKPTFNFYDYDKDKKPHRD	229

Figura 19. Alineamiento de la aminopeptidasa C de diferentes *Streptococcus*. En sombreado amarillo se indican los péptidos únicos y en color rojo los aminoácidos diferentes.

La Aminopeptidasa C forma parte del sistema proteolítico de bacterias ácido lácticas y desempeña un papel clave en fermentaciones lácteas fermentados ya que no solo ayuda a la degradación de oligopéptidos necesario para el crecimiento sino también contribuye de forma importante en la generación de sabores. Esta peptidasa está presente en microorganismos tales como *L. lactis*, *L. helveticus*, *S. thermophilus* y *L. delbrueckii*, su pH óptimo es entre 6.5-7.5, sin embargo, se debe tomar en cuenta que los estudios realizados hasta el momento se han centrado en alimentos como yogurt y queso (Savijoki *et al.*, 2001).

En la banda de menor peso molecular (21 KDa) se identificaron varias proteínas pero ninguna de ellas con la actividad buscada, es posible que la peptidasa responsable de la actividad en el zimograma no se detectó en el análisis proteómico porque la abundancia relativa de esta proteína es menor en comparación con las otras proteínas identificadas en la banda de este mismo peso molecular, o quizá se deba a que en el gel SDD-PAGE esta proteína no migro de la misma manera que la migración del zimograma.

Se hizo la comparación de las proteínas identificadas a partir de los geles SDS-PAGE con los resultados del metaproteoma. Las comparaciones se hicieron solo para las proteínas identificadas para bacterias en la base de datos UniProtKB/Swiss-Prot, con un peso molecular entre 45-50 KDa e involucradas en el metabolismo de aminoácidos. De las 13 proteínas seleccionadas ninguna fue identificada en ambos casos, lo que indica que el método de extracción introduce un sesgo en el tipo de proteínas que se obtienen y por lo tanto en su identificación. En muestras de biofilm marino se ha observado que el uso de distintos métodos de extracción da como resultado la identificación de diferentes metaproteomas para una misma muestra (Leary *et al.*, 2013).

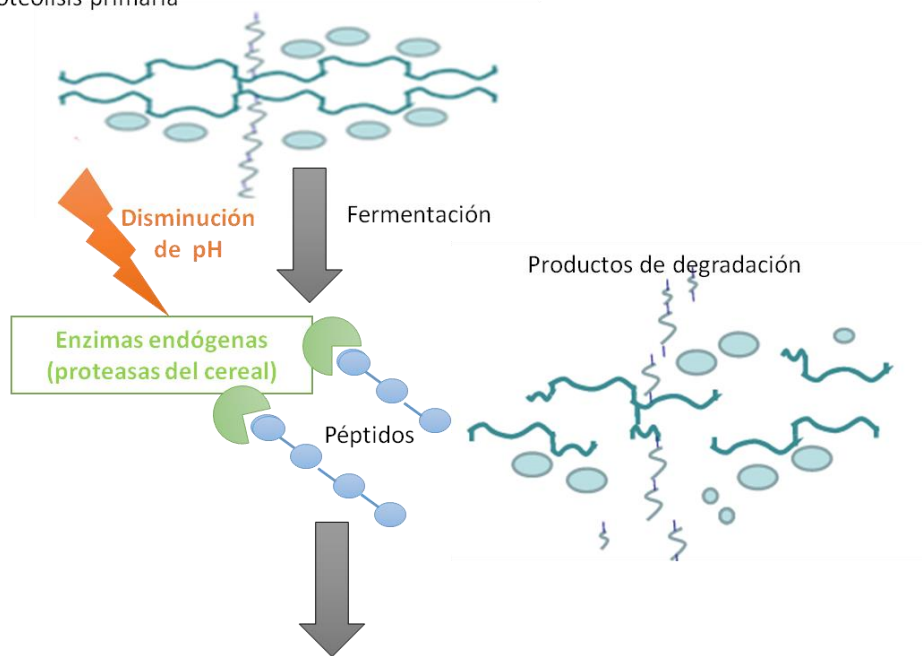
El análisis del metaproteoma del pozol indicó una mayor abundancia de la cisteína y aspartato proteasa de cereales. En cuanto al análisis de la presencia de especies de hongos y bacterias, se encontraron proteínas involucradas en la degradación y transporte de proteínas, oligopéptidos y péptidos, además se lograron identificar enzimas proteolíticas *in situ*.

En el trigo se ha descrito que la reducción de pH durante la fermentación promueve la actividad de las proteasas de este cereal, lo que provoca la liberación de péptidos de varios tamaños. Adicionalmente, la actividad proteolítica de las bacterias y hongos pueden contribuir a esta proteólisis (proteólisis primaria) (Gänzel *et al.*, 2008; Mugula *et al.*, 2003).

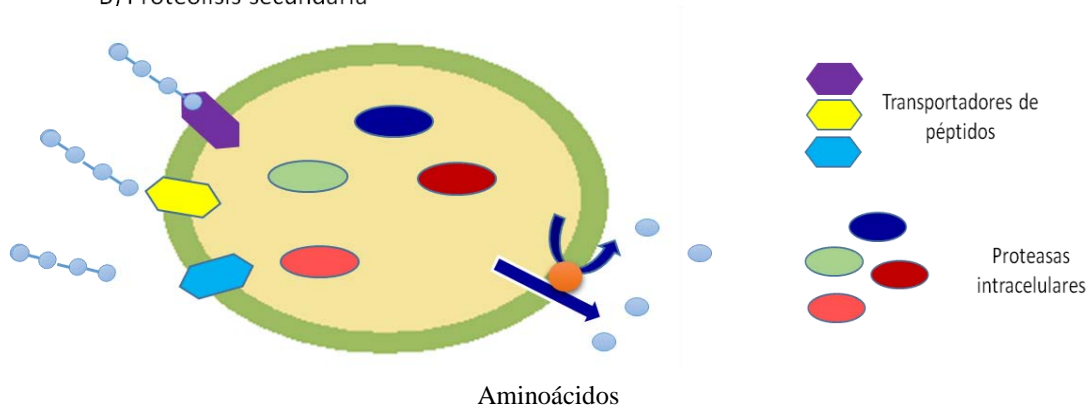
Los péptidos generados son transportados por sistemas de transporte específicos dentro de la célula y degradados por proteasas intracelulares para su completa degradación y posterior son liberados los aminoácidos producidos por este proceso (proteólisis secundaria) para su utilización en diversas reacciones catabólicas por bacterias y hongos presentes en la fermentación (Figura 20) (Gänzel *et al.*, 2008). Además, la actividad de estas proteínas durante la fermentación no solo permite la generación de péptidos y aminoácidos necesarios para el crecimiento de los microorganismos, sino también, contribuyen de forma importante en la generación de sabores, acidificación de los alimentos fermentados e incremento de la cantidad de proteína soluble (3.8%) (Kabak *et al.*, 2011; Battcock *et al.*, 1998; Loaeza, 1991).

En relación con la fijación de nitrógeno se encontraron las proteínas necesarias del complejo enzimático nitrogenasa, las cuales pertenecen a bacterias que no han sido identificadas en el pozol. Además, se identificaron proteínas de microorganismos fijadores de nitrógeno como *Rhizobium*, *Paenibacillus* y *Nostoc* lo que podría indicar que este proceso no es exclusivo de *Agrobacterium* como se había reportado anteriormente (Ulloa *et al.*, 1971).

A) Proteólisis primaria



B) Proteólisis secundaria



C) Degradación de aminoácidos libres

- Desaminación oxidativa
- Transaminación
- Descarboxilación

Figura 20. Representación de los eventos proteolíticos durante la fermentación. Las proteínas son degradadas por proteasas endógenas del cereal (proteólisis primaria). Los péptidos generados son transportados dentro de la célula para ser degradados por diferentes proteasas (Adaptada de Michael G. Gänzle *et al.* 2008).

Respecto al estudio microbiológico del pozol, el enfoque que se ha llevado a cabo es mediante la detección de ciertos grupos de microorganismos con técnicas tradicionales de cultivo y moleculares. Sin embargo, se debe tomar en cuenta que existen ciertas limitaciones ya que más del 90% de los microorganismos no pueden ser cultivados; bien sea por que las condiciones de cultivo en el laboratorio no son las adecuadas o porque su crecimiento depende de la interacción con otros microorganismos (Díaz-Ruiz y Wachter, 2003). Por lo cual se planteó el uso de la proteómica para el estudio de todo el conjunto de proteínas de los microorganismos presentes en el sistema en un punto particular de tiempo y bajo determinadas condiciones.

Si bien las principales aplicaciones de la proteómica se han centrado en el análisis y en algunos casos la cuantificación del proteoma de un organismo, de una célula o tejido en particular también se ha visto que puede ser exitoso para el análisis de proteomas derivados de todo un conjunto de organismos de un mismo ecosistema, lo cual se conoce como “estudio metaproteómico” (Nesvizhskii *et al.*, 2007).

En el análisis del metaproteoma del pozol se observó una gran diversidad de proteínas de bacterias, hongos y levaduras. De este análisis se pudieron identificar los diferentes microorganismos que se encuentran en el pozol durante su fermentación. De las bacterias, el grupo predominante fueron las ácido lácticas principalmente del género *Streptococcus* durante las primeras 24 horas de fermentación y *Lactobacillus* y *Lactococcus* al final de la fermentación (a partir de las 72 horas) (Figura 13 y 14). Resultados que coinciden con los análisis de la microbiota por métodos microbiológicos que reportan que las bacterias ácido lácticas *Streptococcus*, *Lactococcus* y *Leuconostoc* parecen ser dominantes en las primeras etapas de fermentación (12 horas), mientras que el género *Lactobacillus* predomina a los 5 días (Ampe *et al.*, 1999). Cabe mencionar que no se lograron identificar proteínas del género *Weisella*, del cual se sabe se encuentra de forma abundante y activa durante la fermentación.

Se encontraron proteínas características desde el tiempo cero de *Schizosaccharomyces* y *Aspergillus* este último recientemente identificado en una muestra fermentada por 15 días (Cárdenas *et al.*, 2014). Estos resultados sugieren que no solo las bacterias son las responsables de iniciar la fermentación, como se había reportado previamente (Díaz-Ruiz *et al.*, 2003).

Finalmente, es muy importante considerar que los estudios proteómicos a menudo se ven sesgados hacia la identificación de las proteínas más abundantes de las poblaciones dominantes (Mueller y Pan, 2013). Además, en la identificación de proteínas por espectrometría de masas un paso fundamental es la correcta asignación de los espectros a las secuencias de péptidos, la cual está determinada por la calidad de los espectros obtenidos, por la presencia de péptidos homólogos y debido a sus propiedades fisicoquímicas algunos péptidos no pueden ser ionizados eficientemente o su fragmentación se da de manera atípica (Nesvizhskii *et al.*, 2007; Nesvizhskii *et al.*, 2006). También, la búsqueda de datos puede estar restringida ya que en algunos casos la secuencia del péptido no está en la base de datos utilizada, sobre todo si los organismos en estudio no están totalmente secuenciados.

CONCLUSIONES

- La extracción de proteínas de los microorganismos que fermentan la masa se ve afectada por los cambios estructurales que sufre el almidón (gelatinización, retrogradación y entrecruzamiento con proteínas), por lo que fue necesario la extracción con agentes caotrópicos y detergentes, logrando un rendimiento de >16 mg proteína/ g muestra, sin embargo, esta metodología no permitió la recuperación de la actividad proteolítica *in situ*. Por lo que se optimizó con el uso de una enzima comercial (α -amilasa) para la hidrólisis del almidón y liberación de proteínas, lo que permitió la identificación de dos proteasas activas a diferentes tiempos de fermentación. Los métodos fueron reproducibles en relación con la concentración de proteína extraída.
- Existen diferencias significativas en el contenido proteico y nitrógeno total a partir de las 24 horas de fermentación, lo que indica fijación de nitrógeno atmosférico.
- A pesar de las limitaciones que presenta el uso de la proteómica como herramienta para el análisis de matrices complejas, su aplicación al estudio del pozol permitió la identificación de proteínas relacionadas con el metabolismo de nitrógeno, entre otras. Los resultados muestran que la fuente de nitrógeno que permite el crecimiento de los microorganismos durante la fermentación del pozol está dada por la re-utilización de proteínas y por el aprovechamiento de nitrógeno atmosférico cuando la fermentación se deja por más de 3 días.

PERSPECTIVAS

- Hacer pruebas de reducción de acetileno en masa de maíz nixtamalizada fermentada por más de tres días (48, 72 y 360 horas) para demostrar si hay fijación de nitrógeno atmosférico.
- Estudio metaproteómico enfocado a la búsqueda de proteínas involucradas en degradación de carbohidratos y lípidos lo que permitirá no solo elucidar las distintas fuentes que puede ser utilizadas durante la fermentación del pozol si no también, permitirá proponer un modelo de la dinámica de fermentación.

LITERATURA CITADA

- Ampe, F., Ben Omar, N., Guyot, J.P., (1999). Culture-independent quantification of physiologically-active microbial groups in fermented foods using rRNA-targeted oligonucleotide probes: application to pozol, a Mexican lactic acid fermented maize dough. *Journal of Applied Microbiology*. 87:131–40.
- Barrett Alan J., (1994). Classification of Peptidases. *Methods in Enzymology*. 244:1–15.
- Battcock M., Azam-Ali S., (1998). Bacterial fermentation. FAO, Rome, Italy.
- Bazhenova T.A., S.A., (1995). Nitrogen fixation in solution. *Coordination Chemistry Reviews*. 144:69–145.
- Ben Omar N., Ampe F., (2000). Microbial community dynamics during production of the Mexican fermented maize dough pozol. *Applied and Environmental Microbiology*. 66:3664–3673.
- Benítez C.G., Perea H.P., (2006). El maíz: origen, composición química y morfológica. *Materiales Avanzados*. 7:pp.15–20.
- Blandino A., Al-Aseeri M.E., Pandiella S.S., Cantero D., Webb C., (2003). Cereal-based fermented foods and beverages. *Food Research International*. 36(6):527–543.
- Bodzon-Kulakowska, A., Bierczynska-Krzysik A. Dylag T., Drabik A., Suder P., Noga M., Jarzebinska J., Silberring J., (2006). Methods for samples preparation in proteomic research. *Journal of Chromatography. B*. 849: 1–31.
- Cañas A., Barzana E., Owens J.D., Wachter C., (1993). La elaboración de pozol en Los Altos de Chiapas. *Ciencia - Academia de la Investigación Científica*. 44:pp.219–229.
- Carbonaro M., (2004). Proteomics: present and future in food quality evaluation. *Trends in Food Science & Technology*. 15:209–216.
- Cárdenas C., Barkla BJ, Wachter C., Delgado-Olivares L., Rodríguez-Sanoja R., (2014). Protein extraction method for the proteomic study of a Mexican traditional fermented starchy food. *Journal of Proteomics*. 111:139–47.

- Castellanos L.G., González J.L., Padrón .G., (2004). PROTEÓMICA. In: *Combinatoria molecular*. Ed. Elfos Scientiae. La Habana. pp. 367–403.
- Chevalier F., (2010). Highlights on the capacities of “Gel-based” proteomics. *Proteome Science*. 8:1-10.
- Cravioto R.O., Cravioto O.Y., Massieu H.G., Guzmán J., (1951). “El pozol” forma indígena de consumir el maíz en el sureste de México y su aporte de nutrientes a la dieta. *Ciencia*. 64:58–64.
- Díaz-Ruiz G., Guyot J.P., Ruiz-Teran F., Morlon-Guyot J., Wachter C., (2003). Microbial and physiological characterization of weakly amylolytic but fast-growing lactic acid bacteria: a functional role in supporting microbial diversity in pozol, a Mexican fermented maize beverage. *Applied and Environmental Microbiology*. 69:4367–4374.
- Dixon R., Kahn D., (2004). Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nature Reviews*. 2:621–631.
- Escalante A., Wachter C., Farrés A., (2001). Lactic acid bacterial diversity in the traditional mexican fermented dough pozol as determined by 16S rDNA sequence analysis. *International Journal of Food Microbiology*. 64:21–31.
- Fernández L., Bhowmik T., Steele J.L., (1994). Characterization of the *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 pepC gene. *Applied and Environmental Microbiology*. 60:333–336.
- Friedman D.B., Hoving S., Westermeier R., (2009). Isoelectric focusing and two-dimensional gel electrophoresis. *Methods in Enzymology*. 463:515–40.
- Gänzle M.G., (2014). Enzymatic and bacterial conversions during sourdough fermentation. *Food Microbiology*. 37:2–10.
- Gänzle M.G., Loponen J., Gobbetti M., (2008). Proteolysis in sourdough fermentations: mechanisms and potential for improved bread quality. *Trends in Food Science & Technology*. 19:513–521.
- Görg A., Weiss W., Dunn M.J., (2004). Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*. 4:3665–85.
- Havlis J. Thomas H, Sebela M., Shevchenko A., (2003). Fast-response proteomics by accelerated in-gel digestion of proteins. *Analytical Chemistry*. 75:1300–1306.
- Jeannotte R., (1999). Nitrogen Metabolism. *Encyclopedia of Food Microbiology*. 2:544–560.
- Jørgensen N. G., (2009). Organic Nitrogen. *Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences*. 832–851.

- Kabak B., Dobson A.D., (2011). An Introduction to the Traditional Fermented Foods and Beverages of Turkey. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 51:248–260.
- Kvasnicka F., (2003). Proteomics: general strategies and application to nutritionally relevant proteins. *Journal of Chromatography B*. 787:77–89.
- Lacks S.A., Springhorn S.S., (1980). Renaturation of enzymes after polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate. *The Journal of Biological Chemistry*. 255:7467–73.
- Laemmli U.K., (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 227:680–685.
- Lehninger A. L., (1983). Bioquímica. Séptima edición. Ed. Omega. Barcelona.
- Loaeza Chávez Norma Angelia (1991). Efecto de la nixtamalización en la fermentación del pozol. UNAM, México D.F.
- Martins-de-Souza D., Menezes O., Farias A. S., Horiuchu R. S. O., Domingues C. C., Paula E., Marangoni S., Gattaz W.F., Dias-Neto E., Camillo J., (2007). The use of ASB-14 in combination with CHAPS is the best for solubilization of human brain proteins for two-dimensional gel electrophoresis. *Briefings in Functional Genomics & Proteomics*. 6:70–75.
- Mathews C.K., van Holde K.E., K.G., (2002). Metabolismo de los compuestos nitrogenados: principios de la biosíntesis, la utilización y el recambio. *Bioquímica*. Ed. Wesley. Madrid España. pp. 798–813.
- Miller L.G., (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 31:426–428.
- Mueller R.S., Pan C., (2013). Sample handling and mass spectrometry for microbial metaproteomic analyses. *Methods in Enzymology*. 531:289–303.
- Mugula J.K., Sørhaug T., Stepaniak L., (2003). Proteolytic activities in togwa, a Tanzanian fermented food. *International Journal of Food Microbiology*. 84:1–12.
- Muñoz D., Viniegra G., (1981). Fijación de nitrógeno atmosférico por cultivo mixto de una bacteria láctica y *Azotobacter chrocococcum*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 23:213–217.
- Neitzel James J., (2010). Serine Protease. Enzyme Catalysis. *Nature Education*. 3:21.
- Nesvizhskii Al., Roos F.F., Grossmann J., Vogelzang M., Eddes J.S., Gruissem W., Baginsky S., Aebersold R., (2006). Dynamic spectrum quality assessment and iterative computational analysis of shotgun proteomic data: toward more efficient identification of post-translational

- modifications, sequence polymorphisms, and novel peptides. *Molecular & Cellular Proteomics*. 5:652–70.
- Nesvizhskii A.I., Vitek O., Aebersold R., (2007). Analysis and validation of proteomic data generated by tandem mass spectrometry. *Nature Methods*. 4:787–97.
 - Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB). EC3 Introduction. [En línea]. (Actualizado el 30 de Abril de 2015). Disponible en: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/>.
 - Nuraida L., Wachter C., Owens J.D., (1995). Microbiology of pozol, a Mexican fermented maize dough. *World Journal of Microbiology Biotechnology*. 11:567-571.
 - Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, (FAO). Composición química y valor nutritivo del maíz. *El maíz en la nutrición humana*. Roma. [En línea] (Actualizado 1993). Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/t0395s/t0395s03.htm>
 - Pando R.V., Batista F.C., (2007). Proteómica: hacia el entendimiento del lenguaje de las proteínas. *Biotecnología*. 14:77–89.
 - Pando R. V., Ferrerira B. C. (2007). Proteómica: hacia el entendimiento del lenguaje de las proteínas. *Biotecnología*. 14:77-89.
 - Paredes O., Guevara L.P., Bello P.L., (2008). La nixtamalización y el valor nutritivo del maíz. *Ciencias*, 92, pp.60–70.
 - Pischetsrieder M., Baeuerlein R., (2009). Proteome research in food science. *Chemical Society Reviews*. 38: 2600–2608.
 - Poutanen K., Flander L., Katina K., (2009). Sourdough and cereal fermentation in a nutritional perspective. *Food Microbiology*. 26:693–699.
 - Rao M.B., Tanksale A.M., Ghatge M.S., Deshpande V.V., (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*. 62:597–635.
 - Reid V.J., Theron L.W., du Toit M., Divol B., (2012). Identification and Partial Characterization of Extracellular Aspartic Protease Genes from *Metschnikowia pulcherrima* IWBT Y1123 and *Candida apicola* IWBT Y1384. *Applied and Environmental Microbiology*. 78:6838–6849.
 - Sefa-Dedeh S., Cornelius B., Sakyi-Dawson., Afoakwa E.O., (2004). Effect of nixtamalization on the chemical and functional properties of maize. *Food Chemistry*. 86:317–324.
 - Savijoki K., Ingmer H., Varmanen P., (2006). Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 71:394–406.

- Stryer Lubert (1990). Capítulo 24. Biosíntesis de aminoácidos y del grupo hemo. *Bioquímica*. Tercera edición. Ed. Revertés, S.A. Barcelona, España. Pp: 582-598
- Taboada J., Teófilo H., Ulloa M., (1971). Prueba de la reducción de acetileno para la determinación de microorganismos fijadores de nitrógeno aislados del pozol. *Revista Latinoamericana de Química*. 2:188–191.
- Ulloa M., Herrera T., Lappe P., (1987). Fermentaciones tradicionales indígenas de México. Serie de Investigaciones Sociales. *Instituto Nacional Indigenista*. 16:13-20.
- Ulloa M., Teófilo H., de la Lanza G., (1971). Fijación de nitrógeno atmosférico por microorganismos del pozol. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 13:113-124.
- Villegas A., (2003). Cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado a masas (HPLC-MS) como herramienta para la identificación de proteínas. UNAM, México D.F.
- Wachter C., Cañas A., Barzana E., Lappe P., Ulloa M., Owens J.D., (1993). Sources of microorganism in pozol, a traditional Mexican fermented maize dough. *World Journal of Microbiology Biotechnology*. 9:269-274.
- Wachter C., Cañas A., Bárzana E., Lappe P., Ulloa M., Owens J.D., (2000). Microbiology of Indian and Mestizo pozol fermentations. *Food Microbiology*. 17:251–256.
- Westermeier R., Tom N., (2002). *Proteomics in Practice: A Laboratory Manual of Proteome Analysis*. Tercera edición. Ed. Wiley-VCH Verlag GmbH. República Federal de Alemania.
- Yates M.G., (1976). Nitrogen fixation. *Trends in Biochemical Sciences*. 1:17–20.

APENDICE I

Extracción de proteínas

1. Las muestras se encuentran almacenadas en bolsas de cierre hermético a -70°C , estas se colocaron en hielo seco para evitar que se hidrate. Posteriormente se maceraron hasta la obtención de partículas finas, las cuales se pesaron.
2. La muestra se colocó en un tubo Falcon de 50 mL el cual contenía perlas de vidrio (Sigma-Aldrich, México), se adicionó el buffer de extracción y se agitó 5 minutos en el vortex a máxima velocidad.
3. Para la obtención de proteína soluble las muestras se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente, mientras que para la obtención de proteína total las muestras se agitaron cada 5 minutos durante 1 hora.
4. Se centrifugaron a $800 \times g$ a 4°C durante 10 minutos y el sobrenadante obtenido se juntó en tubos Eppendorf de 1.5 mL.
5. Al pellet obtenido se le adicionó buffer y se repitió desde el paso 3, hasta la obtención de tres fracciones.
5. Las fracciones colectadas se centrifugaron $13\ 200 \times g$ a 4°C por 20 minutos obteniéndose el pellet y el sobrenadante. El sobrenadante se precipitó con 4 volúmenes de etanol-acetona 1:1 durante toda la noche a -20°C .
6. El sobrenadante precipitado se centrifugó a $13\ 200 \times g$ a 4°C durante 20 minutos.

Cuantificación de proteína cruda

Digestión. Se pesaron de 0.1-0.2 g de muestra de pozol y se colocaron en tubos, se añadieron 0.15 g de sulfato de cobre pentahidratado, 2.5 g de sulfato de potasio y 10 mL de ácido sulfúrico concentrado. Se procedió a la digestión a 360°C con extracción de gases hasta la destrucción total de la materia orgánica, es decir, hasta que el líquido quedo transparente.

Finalizada la digestión, los tubos se dejaron enfriar.

- I. Destilación. A un matraz Erlenmeyer de 250 mL se le adicionaron 50 mL de ácido bórico al 4% con una mezcla de fenoltaleína al 0.1%, rojo de metilo 0.066% con verde de bromocresol al 0.033%.

A cada muestra se le adicionaron 10 mL de agua destilada, se colocaron uno por uno los tubos en el equipo de destilación cuidando de introducir la manguera hasta el fondo de la solución. Posteriormente se añadieron aproximadamente 40 mL de sosa al 36%. Se encendió el equipo de destilación hasta alcanzar un volumen de destilado en el matraz Erlenmeyer de 100-150 mL.

- II. Titulación. Se tituló el exceso de ácido con una solución valorada de HCl 0.1 N hasta el vire del indicador.

Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)

La electroforesis es usada para separar mezclas complejas de proteínas, identificar subunidades y verificar la homogeneidad de muestras de proteínas. Este fenómeno ocurre cuando una molécula que posee carga neta se desplaza en respuesta a la aplicación de un campo eléctrico. En geles de poliacrilamida las proteínas migran en respuesta de un campo eléctrico a través de poros en la matriz del gel. Esta migración depende de la intensidad de dicho campo, la carga neta, tamaño del poro del gel el cual disminuye con altas concentraciones de acrilamida, tamaño y forma de las proteínas, viscosidad y temperatura del medio en el cual las moléculas se están moviendo.

La electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida puede llevarse a cabo en condiciones nativas (ND-PAGE) o desnaturalizantes (SDS-PAGE), en este sistema las proteínas se solubilizan por ebullición en presencia del detergente (SDS), éste se une a las proteínas proporcionándoles carga negativa lo que hace que migren del polo negativo que se encuentra en la superficie del tampón al polo positivo sujeto a la parte inferior del sistema. 2-Mercaptoetanol (2-ME) o ditioneitol (DTT) se agregan durante la solubilización para reducir los puentes disulfuro.

- Procedimiento

a. Preparación del gel de 7cm

1. Se ensamblaron las placas de vidrio de 0.75 mm en un soporte para formar el gel y se comprobó que no hubiera fugas.
2. Se preparó el gel separador y el gel concentrador al mismo tiempo al porcentaje deseado de acrilamida. Primero se depositó el gel separador dentro de las placas aproximadamente abarcando 5 cm de altura.
3. Para evitar que no hubiera uniformidad en la superficie del gel se colocó isopropanol.
4. Después de la polimerización, se removió el isopropanol de las placas y se colocaron los peines que dieron lugar a la formación de los pozos.

5. Posteriormente se vació en las placas el gel concentrador, evitando que se formaran burbujas entre un gel y otro.
6. Los geles se pre-corrieron una vez polimerizados 15 minutos a 20 mA, después del tiempo transcurrido se colocaron las muestras.

b. Preparación de las muestras

Las muestras fueron colocadas en tubos Eppendorf, éstas se disolvieron en buffer de carga a una concentración final de 4x, las muestras con tratamiento térmico se hirvieron durante 5 minutos, se centrifugaron a 13200 xg durante 5 minutos y se colocaron en hielo mientras fueron cargadas en el gel, mientras que las muestras sin tratamiento térmico fueron cargadas en el gel directamente.

c. Condiciones de migración

Cada gel se corrió a 20 mA hasta observar que las muestras llegaron al final de este, en la cámara de electroforesis Bio-Rad con un buffer de migración al 1x.

Tabla 10. Componentes del buffer de carga 4x

Componentes	Cantidad mL
H ₂ O bidestilada	8.5
Tris-HCl 0.5 M pH 6.8	2.5
Glicerol	2
SDS 10%	4
2-β mercaptoetanol	1
Azul de bromofenol	0.5

Tabla 11. Componentes del buffer de migración SDS-PAGE 5x pH 8.3

Componentes	Cantidad g/L
Tris base	15
Glicina	72
SDS	5

Tabla 12. Pasos y soluciones para el revelado de geles de poliacrilamida con azul de Coomassie.

Solución stock I	0.2% Azul de Coomassie		
	90% Etanol		
Solución stock II	20% Ácido acético		
1. Fijación	Etanol	40%	30 minutos
	Ácido acético glacial	10%	
2. Tinción	Stock I	50%	20 minutos
	Stock II	50%	
3. Desteñir I	Solución de fijación		30 segundos
4. Desteñir II	Etanol	20%	Inspección visual
	Ácido acético glacial	10%	

Electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida (2D-PAGE)

La electroforesis bidimensional combina dos diferentes técnicas de separación electroforética en direcciones perpendiculares para una separación mayor de mezclas de proteínas complejas que cualquiera de los procedimientos individuales. La técnica más común utiliza como primer paso el isoelectroenfoque (IEF) en una tira de gel, seguido de la electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de sodio dodecil sulfato (SDS-PAGE). Después de la tinción, las proteínas aparecen en el gel final de dos dimensiones como manchas redondas o elípticas en lugar de las bandas rectangulares que se observan en geles de una dimensión.

El procedimiento de isoelectroenfoque más común se basa en el uso de anfólitos solubles, que son moléculas orgánicas relativamente pequeña con varios puntos isoeléctricos. El gradiente de pH de los geles de IEF se produce cuando los anfólitos solubles migran en el gel de la matriz hasta que alcanzan su punto isoeléctrico.

- Procedimiento

a. Tratamiento previo de la muestra

1. Las muestras se precipitó con 3 volúmenes de etanol/acetona 1:1 fría y se dejó toda la noche a -20°C.
2. Se decantó el etanol/acetona y el resto se evaporo por vacío.
3. El precipitado se resuspendió en buffer de rehidratación, se agregaron los anfólitos a una concentración final de 0.5%, tomando en cuenta que el volumen final de esta mezcla fue de 130 µl.

b. Hidratación de las tiras y focalización

1. De cada muestra se tomaron 125 μ l y se colocaron en los carriles correspondientes, con la ayuda de las pinzas se removió cuidadosamente la cubierta protectora de las tiras IPG de 7 cm con una escala de pH de 3-10 (Bio-Rad, México), las cuales se colocaron encima de las soluciones con la poliacrilamida hacia abajo.
2. Encima de cada tira se colocó aceite mineral hasta cubrirlas.
3. La hidratación se hizo a 20°C por 15 horas a 50 V.
4. Las tiras con las muestras fueron enfocadas a 20°C aplicando un voltaje de 250 V durante 15 minutos, lo que permitió remover la mayor cantidad de contaminantes y sales. Posteriormente se incrementó a 4 000 V durante dos horas, una vez alcanzado este voltaje se dejaron las tiras a 500 V hasta que se detuvo la corrida (paso de sostenimiento).

c. Equilibrio

1. Las tiras con las proteínas focalizadas se enjugaron en 15 mL de agua bidestilada durante 10 segundos, para quitar el exceso de aceite mineral.
2. Se colocaron en 2.5 mL de buffer de equilibrio I contenido en un tubo cónico para centrifuga de 15 mL, con agitación constante durante 10 minutos. Al transcurrir el tiempo se quitó el exceso de buffer con la ayuda de una sanita.
3. Posteriormente se pusieron en un tubo cónico para centrifuga que contenía 2.5 mL de buffer de equilibrio II, y se agitaron durante 10 minutos.

d. Segunda dimensión

1. Se preparó el gel de poliacrilamida como se describió previamente (Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes).
2. A cada gel se le agregó agarosa de bajo punto de fusión lo que permitió que las tiras se deslizaran fácilmente.

e. Condiciones de migración

El gel se corrió a temperatura ambiente a 5 mA por gel durante una hora y a 15 mA por gel el resto de la corrida en la cámara de electroforesis Bio-Rad con un buffer de migración al 1x.

Tabla 13. Componentes del buffer de rehidratación

7 M urea
2 M tiourea
2% CHAPS
2% ASB-14
50 mM de DTT
0.5% Anfólitos

Tabla 15. Componentes del buffer de migración

SDS-PAGE 5x pH 8.3

Componentes	Cantidad g/l
Tris base	15
Glicina	72
SDS	5

Tabla 14. Componentes de buffer de equilibrio

Buffer de equilibrio I	Buffer de equilibrio II
6 M urea	6 M urea
2% SDS	2% SDS
0.05 M Tris-HCl pH 8.8	0.05 M Tris-HCl pH 8.8
20% Glicerol	20% Glicerol
2% DDT	2.5% iodoacetamida

Zimograma realizado a partir de geles SDS-PAGE y 2D

1. Los geles se lavaron 1 vez con buffer Tris 0.04 M pH 6 y 7.6 con 2.5% de Tritón x-100 por 15 minutos a temperatura. Posteriormente se hicieron lavados de 15 minutos con buffer Tris 0.04 M pH 6 y 7.6 a temperatura ambiente.
2. Los geles se incubaron toda la noche en buffer Tris 0.04 Mm, CaCl₂ y MgCl₂ 2mM a 4°C.
3. Por último el gel se tiñó con solución de tinción durante 30 minutos con agitación a temperatura ambiente. Desteñir el gel con solución de destinción hasta la aparición de bandas.

APÉNDICE II

Proteínas identificadas de Bacterias (NCBI)

Tiempo de fermentación (horas)	Nombre de la proteína y origen	Número de acceso de la proteína	Peso molecular (KDa)	Péptidos únicos exclusivos
Procesamiento de proteínas				
Todos los tiempo de fermentación	ATP-dependent Clp protease, ATP-binding subunit ClpB [<i>Methylococcus capsulatus</i> str. Bath]	gi 53802726	95	1
0 y 24	ATP-dependent Clp protease, Hsp 100, ATP-binding subunit ClpB [<i>Prochlorococcus marinus</i> str. MIT 9211]	gi 159903614	98	1
72	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit [<i>Lactobacillus fermentum</i> 28-3-CHN]	gi 260662570	77	1
360				8

360	ATP-dependent Clp protease, ATP-binding subunit ClpL [<i>Lactobacillus brevis</i> subsp. <i>gravesensis</i> ATCC 27305]	gi 227510823	78	3
0, 72 Y 360	26S proteasome regulatory subunit 8 [<i>Encephalitozoon intestinalis</i> ATCC 50506]	gi 303390889	44	1
Todos los tiempo de fermentación	Leucyl aminopeptidase [<i>Prochlorococcus marinus</i> str. NATL1A]	gi 124026464	54	2
0 y 24	Serine/threonine protein kinase [<i>Myxococcus xanthus</i> DK 1622]	gi 108762243	70	1
Todos los tiempos de fermentación	Serine phosphatase [<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> subsp. <i>desulfuricans</i> str. G20]	gi 78358087	65	1
0 y 24	ATP-dependent protease La [<i>Dictyoglomus thermophilum</i> H-6-12]	gi 206900151	89	1
24	Peptidase S16, ATP-dependent protease La [<i>Beggiatoa</i> sp. PS]	gi 153874545	59	1

Transporte de aminoácidos y amoniaco				
0,24 y 360	Aromatic amino acid aminotransferase [<i>Waddlia chondrophila</i> WSU 86-1044]	gi 297620323	45	1
Todos los tiempos de fermentación	ABC transporter periplasmic protein [<i>Streptococcus suis</i> 05ZYH33]	gi 146318737	36	1
24	ABC-type transport system periplasmic substrate-binding protein [<i>Halomonas elongata</i> DSM 2581]	gi 307545175	59	1
24 y 72	ABC transporter related [<i>Acidothermus cellulolyticus</i> 11B]	gi 117928361	31	1
0	ABC transporter related protein [<i>Stackebrandtia nassauensis</i> DSM 44728]	gi 291298064	60	1
0	ABC transporter related [<i>Thermosipho melanesiensis</i> BI429]	gi 150020768	25	1
Todos los tiempo de fermentación	ABC transporter related [<i>Sphingopyxis alaskensis</i> RB2256]	gi 103487892	27	1

72	ABC transporter, CydDC cysteine exporter (CydDC- E) family, permease/ATP-binding protein CydD [<i>Jonesia denitrificans</i> DSM 20603]	gi 256832880		1
0	ABC transporter permease protein [<i>Streptomyces avermitilis</i> MA-4680]	gi 29829118	39	1
24 y 360	ABC transporter, permease protein [<i>Propionibacterium acnes</i> HL037PA2]	gi 313836343	33	1
72 y 360	ABC transporter permease [<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UCBPP-PA14]	gi 116052535	32	1
Todos los tiempos de fermentación	ABC superfamily ATP binding cassette transporter, ABC protein [<i>Eubacterium yurii</i> subs. <i>margaretiae</i> ATCC43715]	gi 306821701	52	1
72	ABC transporter related protein [<i>Eubacterium limosum</i> KIST612]	gi 310829029	83	1
360	ABC transporter, ATP-binding protein [<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ATCC 11842]	gi 104773731	28	1
72			33	1

	Oligopeptide ABC transporter, permease protein [<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ND02]	gi 313124073		
72	Oligopeptide ABC superfamily ATP binding cassette transporter, binding protein [<i>Streptococcus mitis</i> ATCC 6249]	gi 306830184	73	1
360	Oligopeptide ABC superfamily ATP binding cassette transporter, binding protein [<i>Streptococcus bovis</i> ATCC 700338]	gi 312277591	28	1
360	Oligopeptide ABC superfamily ATP binding cassette transporter, binding protein [<i>Streptococcus bovis</i> ATCC 700338]	gi 306832772	60	1
24	Periplasmic substrate-binding component of ABC- type dipeptide/oligopeptide transport system [<i>Amycolatopsis mediterranei</i> U32]	gi 300785359	54	1
24	Extracellular solute-binding protein family 1 [<i>Kribbella flavida</i> DSM 17836]	gi 284029026	50	1
Todos los tiempos de fermentación	Extracellular solute-binding protein [<i>Frankia</i> sp. EAN1pec]	gi 158314797	56	1
0		gi 260778506	115	1

	Extracellular solute-binding protein, family 3 [<i>Vibrio coralliilyticus</i> ATCC BAA-450]			
0	Ammonium/methylammonium permease [<i>Lyngbya</i> sp. PCC 8106]	gi 119484446	97	1
Metabolismo del nitrógeno				
24	Nitrilase [<i>Rhizobium etli</i> CIAT 894]	gi 218682538	35	1
0	Nitrite reductase [uncultured bacterium]	gi 46850270	16	1
Todos los tiempos de fermentación	Nitroreductase family protein [<i>Burkholderia thailandensis</i> TXDOH]	gi 167578684		1
72 y 360	Nitrate reductase electron transfer subunit [<i>Serratia odorifera</i> DSM 4582]	gi 293395632		1
Fijación de nitrógeno				

24	Ferredoxin-like protein [<i>Haliangium ochraceum</i> DSM 14365]	gi 262198531	14	1
360	Nitrogen fixation protein nifu [<i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>capri</i> str. GM12]	gi 256383990	16	1
Biosíntesis de aminoácidos				
0 y 24	Aspartate transaminase [<i>Actinomyces urogenitalis</i> DSM 15434]	gi 227497151	43	1
0 y 24	Aspartate-semialdehyde dehydrogenase [<i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i> CLso-ZC1]	gi 313495671	38	1
360	Serine--pyruvate transaminase [<i>Psychromonas ingrahamii</i> 37]	gi 119946075	45	1
0 y 24	Aminotransferase, classes I and II [<i>Carboxydotherrmus hydrogenoformans</i> Z-2901]	gi 78044747	43	1
24	L-glutamine synthetase [<i>Frankia</i> sp. Ccl3]	gi 86739031	55	1

360	Glutamine synthetase [<i>Streptococcus bovis</i> ATCC 700338]	gi 306834346	50	1
72	Glutamine synthetase [<i>Streptococcus bovis</i> ATCC 700338]	gi 306834346	50	1
0	3-phosphoserine/phosphohydroxythreonine aminotransferase [<i>Haemophilus parainfluenzae</i> T3T1]	gi 301155992	40	1
0 24 y 360 72	S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase [<i>Caulobacter crescentus</i> CB15]	gi 16124512	51	2 1 2
72	S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase [<i>Agrobacterium vitis</i> S4]	gi 222147057	55	1
0 y 24	S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase [<i>Saccharopolyspora erythraea</i> NRRL 2338]	gi 134102884	54	1
72	S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase [<i>Maricaulis maris</i> MCS10]	gi 114570990	52	1

Degradación de aminoácidos				
0	Asparaginase family protein [<i>Escherichia coli</i> SMS-3-5]	gi 170682695	36	1
24	Glycine cleavage T protein/aminomethyl transferase [<i>Moraxella catarrhalis</i> RH4]	gi 296112437	26	1
Enzimas proteolíticas				
24	Alpha/beta hydrolase fold [<i>Roseiflexus</i> sp. RS-1]	gi 14865503	31	1
24, 72 y 360	Alpha/beta hydrolase fold protein [<i>Oscillochloris trichoides</i> DG6]	gi 309729619	31	1
Todos los tiempos de fermentación	Leucyl aminopeptidase [<i>Prochlorococcus marinus</i> str. NATL1A]	gi 124026464	54	2
0, 24 y 72	Leucyl aminopeptidase [<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> 168]	gi 312601415	51	2
360				1

24	Aminopeptidase N [<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i> JDM301]	gi 312601415	97	1
24	Aminopeptidase N [<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i> JDM301]	gi 296453656	97	1
0	Dipeptidyl peptidase IV [<i>Bacteroides</i> sp. 3_2_5]	gi 253564518	81	1
24	Cytosol aminopeptidase [<i>Burkholderia rhizoxinica</i> HKI 454]	gi 303389371	53	1

Proteínas identificadas de Hongos (NCBI)

Tiempo de fermentación (horas)	Nombre de la proteína y origen	Número de acceso de la proteína	Peso molecular (KDa)	Péptidos únicos exclusivos
Procesamiento de proteínas				
Todos los tiempos de fermentación	20S proteasome component alpha 5, Pup2 (predicted) [<i>Schizosaccharomyces pombe</i> 972h-]	gi 19115284	28	2

24	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1 [<i>Puccinia graminis</i> f. sp. <i>tritici</i> CRL 75-36-700-3]	gi 309304700	114	1
Todos los tiempos de fermentación	20S proteasome subunit [<i>Laccaria bicolor</i> S238N-H82]	gi 170094152	30	2
0 y 24	19S proteasome regulatory subunit Rpt3 [<i>Schizosaccharomyces japonicus</i> yFS275]	gi 213409608	44	1
0 y 24	26S protease regulatory subunit 6B [<i>Aspergillus terreus</i> NIH2624]	gi 115396426	45	1
0 y 72	Proteasome component, putative [<i>Candida dubliniensis</i> CD36]	gi 241953791	204	1
24	19S/PA700 proteasome regulatory particle subunit Rpt5p/S6' [<i>Enterocytozoon bieneusi</i> H348]	gi 269860541	45	1
360	Ubiquitin homeostasis protein lub1 [<i>Verticillium albo-atrum</i> VaMs.102]	gi 302419715	83	1
24	26S protease regulatory subunit 6A	gi 154284456	52	1

	[<i>Ajellomyces capsulatus</i> NAM1]			
Metabolismo del nitrógeno				
0	Nitrilase family protein (Nit3) [<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293]	gi 70992703	31	1
24	Nitroreductase family protein, putative [<i>Talaromyces stipitatus</i> ATCC 10500]	gi 242807110	32	1
Biosíntesis de aminoácidos				
24, 72 y 360	L-aminoadipate-semialdehyde dehydrogenase large subunit [<i>Uncinocarpus reesii</i> 1704]	gi 258567346	189	1
0, 72 y 360	Threonine ammonia-lyase [<i>Schizosaccharomyces pombe</i> 972h-]	gi 19113433	67	1
24				3
Degradación de aminoácidos				
72	Aminomethyl transferase	gi 70997319	49	1

	[<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293]			
Enzimas proteolíticas				
0	Endopeptidase [<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> JEC21]	gi 58260138	45	2
72 y 360				1
24	TPA: Dipeptidyl aminopeptidase [<i>Aspergillus nidulans</i> FGSC A4]	gi 259486112	102	
24	Methionine aminopeptidase, type II, putative [<i>Aspergillus clavatus</i> NRRL 1]	gi 121706646	47	1

Proteínas identificadas de plantas (NCBI)

Tiempo de fermentación (horas)	Nombre de la proteína y origen	Número de acceso de la proteína	Peso molecular (KDa)	Péptidos únicos exclusivos
Procesamiento de proteínas				
Todos los tiempos de fermentación	Proteasome subunit alpha type 2 [<i>Zea mays</i>]	gi 195623644	26	8

0	Proteasome subunit alpha type 5 [<i>Zea mays</i>]	gi 226530826	26	9
24				8
72				6
360				6
0, 24 y 72	Proteasome subunit alpha type 5 [<i>Zea mays</i>]	gi 226499840	26	2
360				1
0, 72 y 360	Proteasome component 2 [<i>Zea mays</i>]	gi 226532014	23	2
24				3
0 y 72	Proteasome subunit beta type 1 [<i>Zea mays</i>]	gi 226531171	24	6
24				7
360				2
0 y 72	Proteasome subunit alpha type 3 [<i>Zea mays</i>]	gi 195628706	27	4
24 y 360				3
0	Proteasome subunit alpha type 1 [<i>Zea mays</i>]	gi 226531007	30	5
24				4
0, 72 y 360	Proteasome subunit beta type 7-A precursor [<i>Zea mays</i>]	gi 195642050	29	1
24				2
24	Proteasome subunit alpha type 7 [<i>Zea mays</i>]	gi 195635203	27	1
72 y 360	Proteasome subunit beta type 4 precursor [<i>Zea mays</i>]	gi 195639560	29	1

0, 72 y 360	Putative beta 4 proteasome subunit [<i>Zea mays</i>]	gi 162458463	23	2
24				3
0	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 6 [<i>Zea mays</i>]	gi 226503485	44	3
24				3
72				2
360				5
0, 24 y 72	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 11 [<i>Zea mays</i>]	gi 195620064	48	1
0, 24 y 72	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 9 [<i>Zea mays</i>]	gi 195638118	23	1
0, 72 y 360	Putative 20S proteasome beta subunit PBC2; 7006-8626 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	gi 12323391	21	1
0 y 24	Ubiquitin family protein [<i>Zea mays</i>]	gi 226507310	97	6
72				1
0	Ubiquitin-conjugating enzyme [<i>Capsicum annuum</i>]	gi 115371812	21	1
24				1
24			21	1

	Ubiquitin-conjugating enzyme E2-21 kDa 1 [<i>Zea mays</i>]	gi 195605092		
0	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L3 [<i>Zea mays</i>]	gi 195637170	25	1
Reparación de proteínas				
72	Protein-L-isoaspartate O-methyltransferase [<i>Zea mays</i>]	gi 195648767	30	1
Transporte de aminoácidos				
0 y 24	Amino acid selective channel protein [<i>Zea mays</i>]	gi 226491624	15	2
Biosíntesis de aminoácidos				
0	Alanine aminotransferase [<i>Zea mays</i>]	gi 3694807	53	6
24				3
72				2
72	Alanine aminotransferase [<i>Hordeum vulgare</i>]	gi 1703227	53	1

0 y 24	Methionine synthase protein [<i>Sorghum bicolor</i>]	gi 18483235	84	2
72				1
360				2
0	Serine hydroxymethyltransferase [<i>Zea mays</i>]	gi 195622500	52	7
24				6
72				3
360				1
0	Phosphoserine aminotransferase 1 [<i>Zea mays</i>]	gi 226531900	45	1
0	Aspartate aminotransferase [<i>Zea mays</i>]	gi 226508814	50	6
24				3
72				2
360				1
0	Aspartate-semialdehyde dehydrogenase [<i>Zea mays</i>]	gi 195644252	41	5
24				4
72 y 360				1
0	Transaminase/ transferase, transferring nitrogenous groups [<i>Zea mays</i>]	gi 195637964	44	6
24 y 360				1
0	Cysteine synthase [<i>Zea mays</i>]	gi 195625588	41	1
24				1
0	Aspartate aminotransferase [<i>Zea mays</i>]	gi 226508814	50	6
24				3
72				2
360				1

0	Aspartate-semialdehyde dehydrogenase [<i>Zea mays</i>]	gi 195644252	41	5
24				4
72 y 360				1
1	Acetolactate synthase/ amino acid binding protein [<i>Zea mays</i>]	gi 226494640	52	1
0 y 24	Glutamine synthetase root isozyme 3 [<i>Zea mays</i>]	gi 162463755	39	1
72				1
0	Tryptophan synthase alpha [<i>Zea mays</i>]	gi 194306601	33	1
0	Tryptophan aminotransferase [<i>Zea mays</i>]	gi 195931957	47	1
0, 24 y 72	S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase [<i>Chrysanthemum x morifolium</i>]	gi 146289939	53	1
24	S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase [<i>Caragana jubata</i>]	gi 112791581	21	1
Degradación de aminoácidos				
0 y 360	Aminomethyltransferase [<i>Zea mays</i>]	gi 226530732	44	4
24				5
72				3
			53	

0	Alanine aminotransferase [<i>Zea mays</i>]	gi 3694807		6
24				3
72				2
Enzimas proteolíticas				
0	Serine carboxypeptidase F13S12.6 [<i>Zea mays</i>]	gi 226493991	53	1
0	Protease PrIC candidate1 [<i>Zea mays</i>]	gi 226530645	79	5
24 y 72				1
0	Aspartic proteinase oryzasin-1 [<i>Zea mays</i>]	gi 226506070	55	2
24, 72 y 360				1
0	Aspartic protease [<i>Oryza sativa</i>]	gi 1030715	54	1

Proteínas identificadas de Bacterias (UniProtKB/Swiss-Prot)

Tiempo de fermentación (horas)	Nombre de la proteína y origen	Número de acceso de la proteína	Peso molecular (KDa)	Péptidos únicos exclusivos
Biosíntesis de aminoácidos				
Todos los tiempos de fermentación	Alanine racemase OS= <i>Desulfococcus oleovorans</i> (strain DSM 6200 / Hxd3) GN=alr PE=3 SV=1	ALR_DESOH	41	1
0 24 72 360	Adenosylhomocysteinase OS= <i>Caulobacter crescentus</i> (strain ATCC 19089 / CB15) GN=ahcY PE=3 SV=1	SAHH_CAUCR	51	4 2 2 2
24, 72 y 360	Argininosuccinate lyase OS= <i>Thermus thermophilus</i> (strain HB27 / ATCC BAA-163 / DSM 7039) GN=argH PE=3 SV=1	ARLY_THET2	52	1
0	Ornithine carbamoyltransferase OS= <i>Thermotoga maritima</i> (strain ATCC 43589 / MSB8 / DSM 3109 / JCM 10099) GN=argF PE=1 SV=2	OTC_THEMA	35	1
Todos los tiempos de fermentación	Adenosylhomocysteinase OS= <i>Acidovorax ebreus</i> (strain TPSY) GN=ahcY PE=3 SV=1	SAHH_ACIET	52	1

24	L-cysteine:1D-myo-inositol 2-amino-2-deoxy-alpha-D-glucopyranoside ligase OS= <i>Stackebrandtia nassauensis</i> (strain DSM 44728 / NRRL B-16338 / NBRC 102104 / LLR-40K-21) GN=mshC PE=3 SV=1	MSHC_STANL	47	1
0, 24 y 72	LL-diaminopimelate aminotransferase OS= <i>Synechococcus</i> sp. (strain JA-3-3Ab) GN=dapL PE=3 SV=1	DAPAT_SYNJA	45	1
Todos los tiempos de fermentación	Homoserine O-succinyltransferase OS= <i>Streptococcus thermophilus</i> (strain CNRZ 1066) GN=metA PE=3 SV=1	META_STRT1	37	1
Todos los tiempos de fermentación	Homoserine kinase OS= <i>Brucella abortus</i> (strain S19) GN=thrB PE=3 SV=1	KHSE_BRUA1	37	1
0, 24 y 360	Argininosuccinate synthase OS= <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> (strain G20) GN=argG PE=3 SV=1	ASSY_DESDG	44	1
72	Argininosuccinate synthase OS= <i>Wolinella succinogenes</i> (strain ATCC 29543 / DSM 1740 / LMG 7466 / NCTC 11488 / FDC 602W) GN=argG PE=3 SV=1	ASSY_WOLSU	45	1

Todos los tiempos de fermentación	Adenosylhomocysteinase OS= <i>Maricaulis maris</i> (strain MCS10)	SAHH_MARMM	52	1
0	Adenosylhomocysteinase OS= <i>Nitrosomonas eutropha</i> (strain C91) GN=ahcY PE=3 SV=1	SAHH_NITEC	53	1
Todos los tiempos de fermentación	Alanine racemase OS= <i>Desulfococcus oleovorans</i> (strain DSM 6200 / Hxd3) GN=alr PE=3 SV=1	ALR_DESOH	41	1
0	Glutamate 5-kinase 1 OS= <i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i> (strain TAC 125) GN=proB1 PE=3 SV=1	PROB1_PSEHT	40	1
24 y 72	Glutamate 5-kinase OS= <i>Carboxydotherrmus hydrogenoformans</i> (strain Z-2901 / DSM 6008) GN=proB PE=3 SV=1	PROB_CARHZ	40	1
0	Serine hydroxymethyltransferase OS= <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> (strain NCPBPB 382) GN=glyA PE=3 SV=1	GLYA_CLAM3	45	1
0 y 24		GLYA_MYCMO	46	1

	Serine hydroxymethyltransferase OS= <i>Mycoplasma mobile</i> (strain ATCC 43663 / 163K / NCTC 11711) GN=glyA PE=3 SV=1			
0 y 360	Serine hydroxymethyltransferase OS= <i>Thermomicrobium roseum</i> (strain ATCC 27502 / DSM 5159 / P-2) GN=glyA PE=3 SV=1	GLYA_THERP	46	1
24	Tryptophan synthase alpha chain OS= <i>Pseudomonas putida</i> (strain KT2440) GN=trpA PE=3 SV=1	TRPA_PSEPK	28	1
72	Tryptophan synthase alpha chain OS= <i>Ruegeria pomeroyi</i> (strain ATCC 700808 / DSM 15171 / DSS-3) GN=trpA PE=3 SV=1	TRPA_RUEPO	27	1
Degradación de aminoácidos				
0 y 24	Glutamine amidotransferase subunit PdxT OS= <i>Mycobacterium abscessus</i> (strain ATCC 19977 / DSM 44196) GN=pdxT PE=3 SV=1	PDXT_MYCA9	21	1
24	Tryptophanase OS= <i>Escherichia coli</i> O139:H28 (strain E24377A / ETEC) GN=tnaA PE=3 SV=1	TNAA_ECO24	53	1

Transporte de aminoácidos, péptidos y amoniaco				
0 24 72 360	Oligopeptide-binding protein AliA OS= <i>Streptococcus pneumoniae</i> serotype 4 (strain ATCC BAA-334 / TIGR4) GN=aliA PE=3 SV=4	ALIA_STRPN	37	1 1 2 2
Procesamiento de proteínas				
0, 24 y 72	Probable cytosol aminopeptidase OS= <i>Pelobacter carbinolicus</i> (strain DSM 2380 / Gra Bd 1) GN=pepA PE=3 SV=1	AMPA_PELCD	53	1
0	Probable cytosol aminopeptidase OS= <i>Cupriavidus necator</i> (strain ATCC 17699 / H16 / DSM 428 / Stanier 337) GN=pepA PE=3 SV=1	AMPA_CUPNH	54	1
Todos los tiempos de fermentación	ATP-dependent zinc metalloprotease FtsH OS= <i>Propionibacterium acnes</i> (strain SK137) GN=ftsH PE=3 SV=1	FTSH_PROAS	77	1
Todos los tiempos de fermentación	Probable cytosol aminopeptidase OS= <i>Synechococcus elongatus</i> (strain PCC 7942) GN=pepA PE=3 SV=2	AMPA_SYNE7	51	2
0 y 24		LON_ELUMP	92	1

	Lon protease OS= <i>Elusimicrobium minutum</i> (strain Pei191) GN=lon PE=3 SV=1			
Todos los tiempos de fermentación	Lon protease OS= <i>Thermotoga lettingae</i> (strain ATCC BAA-301 / DSM 14385 / TMO) GN=lon PE=3 SV=1	SAHH_ACIET	52	1
360	Lon protease OS= <i>Clostridium difficile</i> (strain 630) GN=lon PE=3 SV=2	LON_CLOD6	89	1
72	Lon protease OS= <i>Coprothermobacter proteolyticus</i> (strain ATCC 35245 / DSM 5265 / BT) GN=lon PE=3 SV=1	LON_COPPD	86	1
0, 72 y 360	Lon protease OS= <i>Dictyoglomus thermophilum</i> (strain ATCC 35947 / DSM 3960 / H-6-12) GN=lon PE=3 SV=1	LON_DICT6	89	1
360	Aminopeptidase C OS= <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> (strain IL1403) GN=pepC PE=3 SV=3	PEPC_LACLA	50	1
Todos los tiempos de fermentación	ATP-dependent zinc metalloprotease FtsH OS= <i>Propionibacterium acnes</i> (strain SK137) GN=ftsH PE=3 SV=1	FTSH_PROAS	77	1
0 y 24		CLPA_ECO57	84	1

	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpA OS= <i>Escherichia coli</i> O157:H7 GN=clpA PE=3 SV=1			
24	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpC1 OS= <i>Mycobacterium smegmatis</i> (strain ATCC 700084 / mc(2)155) GN=clpC1 PE=3 SV=1	CLPC1_MYCS2	72	1
360	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpL OS= <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> GN=clpL PE=3 SV=1	CLPL_LACLL	86	1
72 y 360	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpL OS= <i>Staphylococcus aureus</i> (strain USA300) GN=clpL PE=3 SV=1	CLPL_STAA3	78	1
24	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpX 3 OS= <i>Methylococcus capsulatus</i> (strain ATCC 33009 / NCIMB 11132 / Bath) GN=clpX3 PE=3 SV=2	CLPX3_METCA	48	1
0 y 360	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpX OS= <i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>equi</i> (strain 4047) GN=clpX PE=3 SV=1	CLPX_STRE4	45	1

Metabolismo de nitrógeno				
72	Nitrite reductase (NADH) large subunit OS= <i>Escherichia coli</i> (strain K12) GN=nirB PE=3 SV=4	NIRB_ECOLI	93	1
360	Anaerobic nitric oxide reductase flavorubredoxin OS= <i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i> (strain ATCC 7966 / NCIB 9240) GN=norV PE=3 SV=1	NORV_AERHH	58	1
Fijación de nitrógeno				
360	Nitrogenase iron protein 2 OS= <i>Paenibacillus durus</i> GN=nifH2 PE=3 SV=1	NIFH2_PAEDU	31	1
72	Nitrogenase iron protein OS= <i>Nostoc commune</i> GN=nifH PE=3 SV=2	COAE_THETN	33	1

Proteínas identificadas de Hongos (UniProtKB/Swiss-Prot)

Tiempo de fermentación (horas)	Nombre de la proteína y origen	Número de acceso de la proteína	Peso molecular (KDa)	Péptidos únicos exclusivos
Biosíntesis de aminoácidos				
0 24 72 360	Adenosylhomocysteinase OS= <i>Candida albicans</i> (strain SC5314 / ATCC MYA-2876) GN=SAH1 PE=1 SV=2	SAHH_CANAL	49	3 2 2 2
0 y 24	Amino-acid acetyltransferase, mitochondrial OS= <i>Komagataella pastoris</i> GN=ARG2 PE=3 SV=1	NAGS_PICPA	68	1
0 y 24	Amino-acid acetyltransferase, mitochondrial OS= <i>Pyrenophora tritici-repentis</i> (strain Pt-1C-BFP) GN=arg2 PE=3 SV=1	NAGS_PYRTR	79	1
Todos los tiempos de fermentación	Aspartate aminotransferase, mitochondrial OS= <i>Schizosaccharomyces pombe</i> (strain 972 / ATCC 24843) GN=SPBC725.01 PE=3 SV=1	AATM_SCHPO	48	1

24	Homoserine O-acetyltransferase OS= <i>Ascobolus immersus</i> GN=MET2 PE=3 SV=1	MET2_ASCIM	58	1
72 y 360	Threonine dehydratase, mitochondrial OS= <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (strain ATCC 204508 / S288c) GN=ILV1 PE=1 SV=2	THDH_YEAST	64	1
Todos los tiempos de fermentación	Threonine dehydratase, mitochondrial OS= <i>Schizosaccharomyces pombe</i> (strain 972 / ATCC 24843) GN=SPBC1677.03c PE=3 SV=1	THDH_SCHPO	67	1
0	Tryptophan synthase OS= <i>Neurospora crassa</i> (strain ATCC 24698 / 74-OR23-1A / CBS 708.71 / DSM 1257 / FGSC 987) GN=trp-3 PE=1 SV=1	TRP_NEUCR	76	1
Transporte de aminoácidos, péptidos y amoniaco				
Todos los tiempos de fermentación	Probable protein transport protein Sec61 subunit gamma OS= <i>Neurospora crassa</i> (strain ATCC 24698 / 74-OR23-1A / CBS 708.71 / DSM 1257 / FGSC 987) GN=9G6.310 PE=3 SV=2	SC61G_NEUCR	8	1
0	Protein transport protein SEC13 OS= <i>Yarrowia lipolytica</i> (strain CLIB 122 / E 150) GN=SEC13 PE=3 SV=1	SEC13_YARLI	33	1

0	Protein transport protein SEC31 OS= <i>Candida albicans</i> (strain SC5314 / ATCC MYA-2876) GN=SEC31 PE=3 SV=1	SEC31_CANAL	136	1
Todos los tiempos de fermentación	Protein transport protein SEC31 OS= <i>Magnaporthe oryzae</i> (strain 70-15 / ATCC MYA-4617 / FGSC 8958) GN=SEC31 PE=3 SV=1	SEC31_MAGO7	135	1
24	Protein transport protein sec73 OS= <i>Schizosaccharomyces pombe</i> (strain 972 / ATCC 24843) GN=sec73 PE=3 SV=2	SEC7C_SCHPO	123	1
Procesamiento de proteínas				
24, 72 y 360	Cysteine protease ATG4 OS= <i>Magnaporthe oryzae</i> (strain 70-15 / ATCC MYA-4617 / FGSC 8958) GN=ATG4 PE=1 SV=2	ATG4_MAGO7	54	1
24	Dipeptidyl aminopeptidase B OS= <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (strain ATCC 204508 / S288c) GN=DAP2 PE=1 SV=2	DAP2_YEAST	93	1

0 y 24	Extracellular metalloproteinase mep OS= <i>Aspergillus clavatus</i> (strain ATCC 1007 / CBS 513.65 / DSM 816 / NCTC 3887 / NRRL 1) GN=mep PE=3 SV=1	MEP_ASPCL	69	1
24	Lon protease homolog 2, peroxisomal OS= <i>Kluyveromyces lactis</i> (strain ATCC 8585 / CBS 2359 / DSM 70799 / NBRC 1267 / NRRL Y-1140 / WM37) GN=KLLA0B01892g PE=3 SV=1	LONP2_KLULA	113	1
0, 72 y 360	Methionine aminopeptidase 2-1 OS= <i>Neosartorya fumigata</i> (strain ATCC MYA-4609 / Af293 / CBS 101355 / FGSC A1100) GN=AFUA_8G00410 PE=3 SV=2	MAP21_ASPFU	49	1
0 24 72 360	Methionine aminopeptidase 2-2 OS= <i>Aspergillus clavatus</i> (strain ATCC 1007 / CBS 513.65 / DSM 816 / NCTC 3887 / NRRL 1) GN=ACLA_046220 PE=3 SV=1	MAP22_ASPCL	48	2 2 1 1
24	Neutral protease 2 homolog AFLA_065450 OS= <i>Aspergillus flavus</i> (strain ATCC 200026 / FGSC A1120 / NRRL 3357 / JCM 12722 / SRRCL 167) GN=AFLA_065450 PE=3 SV=1	NPIIA_ASPFN	43	1

Todos los tiempos de fermentación	Neutral protease 2 homolog AN3393 OS= <i>Emericella nidulans</i> (strain FGSC A4 / ATCC 38163 / CBS 112.46 / NRRL 194 / M139) GN=AN3393 PE=3 SV=1	NPIIB_EMENI	38	1
0	Probable 26S protease subunit rpt4 OS= <i>Schizosaccharomyces pombe</i> (strain 972 / ATCC 24843) GN=rpt4 PE=3 SV=2	PRS10_SCHPO	44	1
Todos los tiempos de fermentación	Probable dipeptidyl-aminopeptidase B OS= <i>Arthroderma gypseum</i> (strain ATCC MYA-4604 / CBS 118893) GN=DAPB PE=3 SV=1	DAPB_ARTGP	130	1
72 y 360	Probable metalloprotease ARX1 OS= <i>Candida albicans</i> (strain SC5314 / ATCC MYA-2876) GN=ARX1 PE=3 SV=1	ARX1_CANAL	62	1
Todos los tiempos de fermentación	Probable proteasome subunit alpha type-3 OS= <i>Schizosaccharomyces pombe</i> (strain 972 / ATCC 24843) GN=SPAC13C5.01c PE=3 SV=1	PSA3_SCHPO	28	1
Todos los tiempos de fermentación	Probable proteasome subunit alpha type-5 OS= <i>Schizosaccharomyces pombe</i> (strain 972 / ATCC 24843) GN=pup2 PE=1 SV=1	PSA5_SCHPO	28	2
0, 72 y 360		AMPP2_ASPTN	55	1

	Probable Xaa-Pro aminopeptidase ATEG_00858 OS= <i>Aspergillus terreus</i> (strain NIH 2624 / FGSC A1156) GN=ATEG_00858 PE=3 SV=1			
72 y 360	Probable Xaa-Pro aminopeptidase BC1G_13431 OS= <i>Botryotinia fuckeliana</i> (strain B05.10) GN=BC1G_13431 PE=3 SV=1	AMPP2_BOTFB	62	1
72 y 360	Probable zinc metalloprotease HCBG_06910 OS= <i>Ajellomyces capsulatus</i> (strain G186AR / H82 / ATCC MYA-2454 / RMSCC 2432) GN=HCBG_06910 PE=3 SV=1	M28P1_AJECG	109	1
0 y 24	Probable zinc metalloprotease SS1G_12596 OS= <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (strain ATCC 18683 / 1980 / Ss-1) GN=SS1G_12596 PE=3 SV=1	M28P1_SCLS1	120	1
Todos los tiempos de fermentación	Proteasome subunit alpha type-1 OS= <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (strain ATCC 204508 / S288c) GN=SCL1 PE=1 SV=1	PSA1_YEAST	28	2
0, 72 y 260	Proteasome subunit alpha type-2 OS= <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (strain ATCC 204508 / S288c) GN=PRE8 PE=1 SV=1	PSA2_NEUCR	27	1
72 y360		PSA4_YEAST	28	1

	Proteasome subunit alpha type-4 OS= <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (strain ATCC 204508 / S288c) GN=PRE6 PE=1 SV=1			
Metabolismo de nitrógeno				
24	Nitrate reductase [NADPH] OS= <i>Emericella nidulans</i> (strain FGSC A4 / ATCC 38163 / CBS 112.46 / NRRL 194 / M139) GN=niaD PE=3 SV=1	NIA_EMENI	98	1

Proteínas identificadas de Plantas (UniProtKB/Swiss-Prot)

Tiempo de fermentación (horas)	Nombre de la proteína y origen	Número de acceso de la proteína	Peso molecular (KDa)	Péptidos únicos exclusivos
Biosíntesis de aminoácidos				
Todos los tiempos de fermentación	1,2-dihydroxy-3-keto-5-methylthiopentene dioxygenase 2 OS= <i>Oryza sativa</i>	MTND2_ORYSI	23	2
Todos los tiempos de fermentación	1,2-dihydroxy-3-keto-5-methylthiopentene dioxygenase homolog 2 OS= <i>Sorghum bicolor</i> GN=Sb01g046360 PE=3 SV=1	MTND2_SORBI	21	2
Todos los tiempos de fermentación	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase	METE1_ORYSJ	85	18 15 15

				17
Todos los tiempos de fermentación	Adenosylhomocysteinase OS=Triticum aestivum GN=SAHH PE=2 SV=1	SAHH_WHEAT	53	14
				12
				8
				8
0 24	Cysteine synthase OS=Oryza sativa subsp. japonica GN=RCS1 PE=2 SV=2	CYSK1_ORYSJ	34	1 1
0 24 72 360	Cysteine synthase OS=Zea mays PE=1 SV=2	CYSK_MAIZE	34	20 19 13 9
Degradación de aminoácidos				
0 24	Alanine aminotransferase 2 OS=Hordeum vulgare PE=1 SV=1	ALA2_HORVU	53	3 1
0 24 72	Alanine aminotransferase 2 OS=Panicum miliaceum PE=1 SV=1	ALA2_PANMI	53	2 1 1
Procesamiento de proteínas				
Todos los tiempos de fermentación	Aminopeptidase M1-A OS=Oryza sativa subsp. japonica GN=Os02g0218200 PE=2 SV=1	APM1A_ORYSJ	98	6
				6
				4
				2
0 72	Cysteine proteinase 1 OS=Zea mays GN=CCP1 PE=2 SV=1	CYSP1_MAIZE	40	2 1

0 72 360	Proline iminopeptidase OS=Arabidopsis thaliana GN=PIP PE=2 SV=3	PIP_ARATH	43	2 1 1
0 24 72	Proteasome subunit alpha type-1 OS=Oryza sativa subsp. japonica GN=PAF1 PE=2 SV=1	PSA1_ORYSJ	30	3 2 1
0 24 72 360	Proteasome subunit alpha type-2 OS=Oryza sativa subsp. indica GN=PAB1 PE=2 SV=2	PSA2_ORYSI	26	8 7 8 8
0 24 72 360	Proteasome subunit alpha type-3 OS=Oryza sativa subsp. japonica GN=PAG1 PE=2 SV=1	PSA3_ORYSJ	27	4 3 4 2
0 24 72 360	Proteasome subunit alpha type-4-1 OS=Oryza sativa subsp. indica GN=OsI_021120 PE=1 SV=2	PSA4A_ORYSI	27	2 2 4 1
0 24 72 360	Proteasome subunit alpha type-5 OS=Oryza sativa subsp. japonica GN=PAE1 PE=2 SV=1	PSA5_ORYSJ	26	11 9 7 7
0 24 72 360	Proteasome subunit alpha type-6 OS=Oryza sativa subsp. japonica GN=PAA1 PE=2 SV=1	PSA6_ORYSJ	28	8 7 6 5
0 24 72 360	Proteasome subunit alpha type-7-A OS=Oryza sativa subsp. indica GN=OsI_029135 PE=2 SV=2	PSA7A_ORYSI	27	7 7 7 4

0 24 72 360	Proteasome subunit beta type-1 OS= <i>Oryza sativa</i> subsp. japonica GN=PBF1 PE=2 SV=1	PSB1_ORYSJ	24	4 5 4 3
0 24 72 360	Proteasome subunit beta type-2 OS= <i>Oryza sativa</i> subsp. japonica GN=PBD1 PE=2 SV=2	PSB2_ORYSJ	23	1 2 1 1
0 24 72 360	Proteasome subunit beta type-3-A OS= <i>Arabidopsis thaliana</i> GN=PBC1 PE=1 SV=2	PSB3A_ARATH	23	2 3 2 1
0 24 72 360	Proteasome subunit beta type-6 OS= <i>Nicotiana tabacum</i> PE=2 SV=1	PSB6_TOBAC	25	5 5 4 4
0 24 72 360	Proteasome subunit beta type-7-B OS= <i>Arabidopsis thaliana</i> GN=PBB2 PE=1 SV=2	PSB7B_ARATH	30	1 2 1 2
Metabolismo de nitrógeno				
0 24 72	Arginase 1, mitochondrial OS= <i>Oryza sativa</i> subsp. indica GN=B0616E02-H0507E05.7 PE=1 SV=1	ARGI1_ORYSI	37	3 3 2