



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

APROXIMACIÓN PROTEÓMICA A LA FERMENTACIÓN DEL POZOL

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias**

PRESENTA:

Q.A. CYNTHIA TERESA LEYVA ARGUELLES

TUTOR PRINCIPAL:

Dra. Romina Rodríguez Sanoja
Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dra. Rosario Vera Estrella
Instituto de Biotecnología, UNAM
Dra. María del Carmen Wachter Rodarte
Facultad de Química, UNAM

Ciudad de México, enero, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Romina Rodríguez Sanoja por darme la oportunidad de unirme a su grupo de trabajo, por todo el apoyo, la confianza y las enseñanzas recibidas.

Al comité tutorial integrado por la Dra. María del Carmen Wachter Rodarte y la Dra. Rosario Vera Estrella a quienes agradezco profundamente su apoyo, asesoría y sugerencias en la realización de este trabajo.

Al H. Jurado revisor de esta tesis por todas sus aportaciones para la mejora de este trabajo.

Agradezco a la Dra. Gloria Díaz Ruiz y a la Biól. Ma. Teresa Flores Espinoza por su apoyo en la realización de los análisis microbiológicos que complementaron esta investigación.

Agradezco al Dr. Daniel Alejandro Guillén Santos por su apoyo en la estandarización de técnicas bioquímicas y por sus comentarios al escrito.

A la Dra. Beatriz Ruiz Villafán por el apoyo metodológico y sus observaciones al escrito.

A la Dra. Silvia Andrea Moreno Mendieta por su ayuda en la revisión de este escrito.

Al Dr. Luis Delgado Olivares por su ayuda con el software utilizado en el análisis de geles 2D.

Agradezco a la M. en C. María Catalina Cárdenas Ascención por introducirme al mundo de la Proteómica.

A la M. en C. Jocelin Marari Rizo Villagrana por su enseñanza de las técnicas de Proteómica.

Agradezco al Dr. Sergio Sánchez Esquivel por sus valiosas observaciones.

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM, mi *Alma Mater*, por ser pilar de mi crecimiento humano y profesional.

Al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, UNAM y al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por el apoyo para la asistencia a congresos.

A CONACYT por la beca de maestría número 488522.

A CONACYT y DGAPA por el apoyo recibido para la realización de este trabajo mediante los proyectos 131615 (CONACYT), IN 218714 e IN 223917 (DGAPA-UNAM).

DEDICATORIA

A mis padres y mi hermano por todo su amor

CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	i
ÍNDICE DE TABLAS.....	ii
Resumen.....	iii
1 Introducción.....	1
2 Antecedentes.....	3
2.1 Pozol.....	3
2.2 Elaboración del pozol.....	3
2.3 Composición del maíz.....	5
2.4 Modificaciones producidas al maíz durante la elaboración del pozol.....	8
Fuente: Cravioto <i>et al.</i> (1955).....	9
2.5 Microbiología de la fermentación del pozol.....	9
2.6 Proteómica.....	14
3 Justificación.....	17
4 Objetivos.....	18
4.1 Objetivo general.....	18
4.2 Objetivos particulares.....	18
5 Estrategia experimental.....	18
6 Materiales y Métodos.....	19
6.1 Muestras de pozol.....	19
6.2 Análisis microbiológicos.....	19
6.2.1 Cuantificación de bacterias lácticas y bacterias lácticas amilolíticas.....	20
6.2.2 Cuantificación de otros grupos microbianos.....	20
6.3 Análisis químicos.....	20
6.3.1 Medición del pH.....	20
6.3.2 Análisis proximal.....	20
6.3.3 Determinación de carbohidratos solubles totales.....	21
6.3.4 Determinación de azúcares solubles reductores.....	22
6.4 Análisis Proteómico.....	22
6.4.1 Extracción de proteínas (Método A).....	22
6.4.2 Extracción de proteínas (Método B).....	23
6.4.3 Revelado de los geles y obtención de imágenes.....	25

6.4.4	Análisis de los geles	25
6.4.5	Identificación de proteínas	26
6.4.6	Análisis del metaproteoma del pozol (criterios de identificación).....	27
7	Resultados y Discusión.....	28
7.1	Análisis microbiológico	28
7.2	Análisis químicos	30
7.2.1	Medición del pH.....	30
7.2.2	Análisis proximal.....	32
7.2.3	Determinación de carbohidratos solubles totales y reductores	35
7.3	Análisis proteómico.....	37
7.3.1	Métodos de extracción de proteínas	38
7.3.2	Análisis de los geles de dos dimensiones.....	41
7.3.3	Análisis MS/MS y bioinformático de las proteínas relacionadas con el catabolismo de carbohidratos identificadas del metaproteoma del pozol	45
8	Conclusiones	60
9	Perspectivas	60
10	Bibliografía	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1	Partes principales del grano de maíz	6
Figura 7.1	Cuantificación de grupos microbianos durante la fermentación del pozol	30
Figura 7.2	Comparación del pH en los diferentes muestreos	31
Figura 7.3	Cuantificación de la humedad en el análisis proximal	33
Figura 7.4	Cuantificación de proteína cruda, lípidos, cenizas, fibra cruda y ELN (carbohidratos) en el análisis proximal	34
Figura 7.5	Cuantificación de los azúcares solubles en cada muestra	37
Figura 7.6	SDS-PAGE con la proteína obtenida a diferentes tiempos de fermentación	38
Figura 7.7	Comparación entre los métodos de extracción de las proteínas de la masa del pozol	39
Figura 7.8	Comparación de los geles 2D con los diferentes métodos de extracción	40
Figura 7.9	Conteo de puntos de los geles 2D utilizando el software Image MAster 2D	42
Figura 7.10	Porcentajes de coincidencia obtenidos con los triplicados del gel 2D de N-9 con el método A	43
Figura 7.11	Porcentajes de coincidencia obtenidos con los triplicados del gel 2D de N-9 con el método B	44
Figura 7.12	Porcentaje de coincidencia obtenido comparando el gel de referencia de cada método (A y B).	45
Figura 7.13	Cortes de los fragmentos enviados a secuenciación	47
Figura 7.14	Número de proteínas identificadas en la base de datos de bacterias con el método de extracción A	55
Figura 7.15	Número de proteínas identificadas en la base de datos de bacterias con el método de extracción B	56
Figura 7.16	Número de proteínas identificadas en la base de datos de hongos y levaduras con el método de extracción A	58
Figura 7.17	Número de proteínas identificadas en la base de datos de hongos y levaduras con el método de extracción B	59

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1	Análisis químico proximal del grano de maíz	6
Tabla 2.2	Principales carbohidratos del grano de maíz en peso seco	7
Tabla 2.3	Análisis del pozol y del maíz utilizado en su preparación	9
Tabla 2.4	Microorganismos aislados del pozol	10
Tabla 2.5	Comparación de los rendimientos metabólicos de diferentes BAL amilolíticas	13
Tabla 7.1	Comparación del análisis proximal del pozol y del maíz utilizado en su preparación	34
Tabla 7.2	Proteínas de hongos y levaduras identificadas en la base de datos Uniprot relacionadas con la degradación de polisacáridos	48

Resumen

El pozol es una bebida tradicional de origen maya que se obtiene de la fermentación natural de la masa de maíz nixtamalizado. Durante el proceso de nixtamalización, la concentración de mono y disacáridos del maíz se reduce, dejando al almidón como el principal carbohidrato disponible para la fermentación láctica; sin embargo, no se ha encontrado la actividad amilolítica en este alimento y las bacterias lácticas presentes en esta fermentación son débilmente amilolíticas, al compararlas con bacterias lácticas presentes en otros alimentos amiláceos (Díaz *et al.* 2003).

Así, este trabajo se centró en buscar dentro del metaproteoma del pozol las enzimas relacionadas con la utilización de azúcares para inferir los carbohidratos que se están utilizando durante el proceso de fermentación de este alimento.

Se estudiaron las variaciones del pH, de la composición de la muestra, de los azúcares solubles totales y reductores a lo largo de las primeras 48 horas de fermentación. También, se identificaron las proteínas de bacterias, hongos y levaduras presentes en el pozol mediante el análisis del metaproteoma. Se identificaron enzimas relacionadas con la utilización de polisacáridos. Los resultados obtenidos sugieren que además del almidón, los microorganismos están utilizando fuentes alternativas de carbono como celulosa y hemicelulosa, polisacáridos que están presentes en el pericarpio del grano de maíz.

1 Introducción

Los alimentos y bebidas fermentados juegan un papel muy importante en la alimentación a nivel mundial. Son el resultado de la transformación de un sustrato, que mediante la actividad metabólica de diversos microorganismos conduce a la obtención de un producto apto para el consumo humano, el cual presenta características sensoriales y nutrimentales distintas a las del sustrato inicial correspondiente, lo que proporciona un alimento con mayor valor agregado (Steinkraus 1983).

En la actualidad existe una gran variedad de este tipo de alimentos y bebidas, algunos han sido ampliamente consumidos a lo largo de la historia y por ello existen numerosos estudios sobre su elaboración y proceso de fermentación, algunos ejemplos de estos alimentos y bebidas son la cerveza (Colgrave *et al.* 2013, Livens 2016), el vino (Giribaldi y Giuffrida 2010, Jackson 2016, Pozo-Bayón y Moreno-Arribas 2016), el vinagre (Di Girolamo *et al.* 2011, Ozturka *et al.* 2015), los quesos (Jardin *et al.* 2012, Jerónimo y Malcata 2016) y el pan (Collar 2016, Guo *et al.* 2012); sin embargo, el estudio de alimentos y bebidas fermentados tradicionales que se producen y consumen de forma regional son muy escasos (Coda *et al.* 2014, Wachter 1993).

De manera particular, en México existe una gran variedad de alimentos y bebidas fermentados tradicionales, por ejemplo el agua agria, atole agrio, pozol, cuarapa, charagua, quebranta huesos, sendechó, ostoche, colonche, tepache, tesgüino, pulque, etc. Todos estos alimentos fermentados han sido de gran importancia en la vida diaria y ceremonial de muchos grupos étnicos, y forman parte importante de su dieta desde tiempos inmemoriales (Wachter 1993). Dentro de esta gran variedad de alimentos fermentados, el pozol destaca por su alto valor nutrimental y su elevado consumo en la región sureste de México (Cravioto *et al.* 1955). Es un producto alimenticio de origen maya, que se prepara con masa de maíz nixtamalizado que se deja fermentar de manera natural (Ulloa *et al.* 1987).

Al igual que en otros alimentos de este tipo, la fermentación es la etapa más importante en la elaboración del pozol; debido a que es la responsable de otorgar las características sensoriales del producto final, del aumento del valor nutricional del mismo

y de su potencial de ser conservado por varios días (Díaz *et al.* 2003, Ulloa *et al.* 1987, Wachter *et al.* 2000).

En el pozol se desarrolla una fermentación natural, ya que no se añade intencionalmente ningún inóculo, y es llevada a cabo en estado semisólido por una microbiota muy diversa, compuesta de mohos, levaduras, mesófilos aerobios, enterobacterias y bacterias ácido lácticas [BAL]; siendo estas últimas la microbiota predominante en la masa fermentada de maíz (Fernández *et al.* 2013, Giraud *et al.* 1994, Wachter *et al.* 1993).

Se sabe que durante la nixtamalización se reduce la concentración de mono y disacáridos presentes en el grano de maíz, dejando al almidón como el principal carbohidrato disponible para el desarrollo de la fermentación (Santillana 1995); sin embargo, se han llevado a cabo diversos estudios encaminados a encontrar la actividad amilolítica microbiana en este alimento y no se ha encontrado (Ben Omar y Ampe 2000, Rizo 2012), además los resultados muestran que las bacterias lácticas presentes en esta fermentación son débilmente amilolíticas, al compararse con bacterias lácticas presentes en otros alimentos amiláceos (Díaz *et al.* 2003).

Para explicar cómo un contenido tan bajo de azúcares simples y una baja actividad amilolítica pueden mantener una microbiota tan diversa y abundante en el pozol, se decidió buscar, mediante una aproximación proteómica, las enzimas relacionadas con la degradación de polisacáridos, y de esta manera poder inferir qué carbohidratos se están utilizando de manera preferencial durante el proceso de fermentación del pozol.

2 Antecedentes

2.1 Pozol

El pozol es una bebida tradicional de origen maya, ácida, refrescante y no alcohólica que se obtiene de la fermentación de la masa de maíz nixtamalizado. Se consume suspendido en agua de manera natural, y frecuentemente se le adiciona cacao, azúcar, miel, sal, chiles u otros ingredientes como saborizantes (Nuraida *et al.* 1995, Wachter *et al.* 2000).

A lo largo de la historia el pozol ha tenido usos medicinales, de alimento básico y de bebida refrescante. Este alimento ha sido consumido desde la época prehispánica, como ofrenda en ceremonias relacionadas con el cultivo y la cosecha del maíz (Ulloa *et al.* 1987). Entre sus usos medicinales, se sabe que los lacandones utilizan el pozol mezclado con miel para disminuir la fiebre y controlar diarreas, así como para curar o prevenir infecciones. Diversas comunidades indígenas, desde la antigüedad, preparaban pozol enmohecido y lo usaban como cataplasma para curar infecciones superficiales. Además, debido a su alto grado de conservación, este alimento se usa como provisión en largas caminatas o travesías por la selva (Flores-Ramírez 2008, Herrera y Ulloa 1975).

Hoy en día, esta bebida es preparada y consumida como parte de la dieta cotidiana en diversas regiones del sur y sureste de México, principalmente en los estados de Chiapas, Tabasco, Campeche, Yucatán, Quintana Roo y Oaxaca.

2.2 Elaboración del pozol

Para iniciar el proceso de elaboración del pozol es necesario tener un grano de maíz limpio. Es decir, a los granos de maíz se les retira el polvo, cascarillas, granos en mal estado, otros granos o cualquier agente extraño. Partiendo de estos granos de maíz limpios continúan cuatro etapas para la elaboración del pozol:

- *Nixtamalización:* En este proceso los granos de maíz se cuecen utilizando una solución de hidróxido de calcio entre el 1-3% durante 20 a 40 minutos (Cañas *et al.* 1993, Badui 2006). Esta etapa produce un incremento de su digestibilidad, un mejoramiento del balance isoleucina-leucina (favoreciendo así un mayor aprovechamiento de las proteínas), la liberación de niacina y el aumento del contenido de calcio. La nixtamalización data de la época prehispánica y produce importantes cambios tanto físicos como químicos en el grano de maíz, lo que da como resultado una masa apta para elaborar diversos productos, como tortillas, tamales, atole, etc. Este proceso finaliza cuando se logra separar fácilmente el pericarpio del grano de maíz (Paredes *et al.* 2008).
- *Lavado y remojo:* Al terminar el proceso de nixtamalización del maíz se procede a lavar el nixtamal con agua, con el fin de eliminar la cal y el hollejo (Cañas *et al.* 1993, Loaeza 1991, Wacher 1999). De manera tradicional los granos se dejan remojando con el agua del último lavado del nixtamal. Esto se hace durante toda la noche (aproximadamente 12 horas) con el fin de facilitar la remoción del pericarpio de los granos e incrementar su humedad hasta 48-51%, además el pH alcalino y la cocción debilitan las paredes celulares por la solubilización parcial de la hemicelulosa; así se suaviza la estructura del grano, debido al hinchamiento, a la destrucción parcial de los gránulos de almidón y a su baja gelatinización (Wacher *et al.* 2000).
- *Molienda:* Tras el remojo, los granos son sometidos a una molienda gruesa con el fin de reducir el tamaño de los mismos. La molienda se lleva a cabo generalmente en un pequeño molino comercial, el cual es usado y reusado durante todo el día sin que se lave entre lote y lote. Se ha descrito que esta costumbre provoca que una cantidad importante de masa se quede en los recovecos del molino por muchas horas, lo que induce la proliferación de diversos microorganismos (Wacher *et al.* 1993).
- *Fermentación:* Posterior a la molienda se lleva a cabo un amasado en el que se forman bolas de masa, las cuales son envueltas en hojas de árbol de plátano y se dejan reposar a temperatura ambiente para permitir la fermentación durante algunas horas, varios días e incluso semanas (Mendez-Albores 2004).

Como resultado de este proceso, se obtiene un producto con características sensoriales únicas, debido a los atributos que otorga el proceso de fermentación; asimismo, permite su conservación por varios días y otorga un aumento en su valor nutritivo. Una vez que la masa se ha fermentado se suspende en agua y finalmente se obtiene la bebida, a la cual se le suele adicionar sal, azúcar, canela, miel, cacao o chiles secos dependiendo del gusto del consumidor (Wacher *et al.* 2000).

2.3 Composición del maíz

El maíz (*Zea mays*) es el cereal de mayor consumo en México y en general de toda América Latina (Paredes *et al.* 2008). El grano de maíz está formado de tres partes principales que se muestran en la figura 2.1 y que se describen a continuación:

- *Pericarpio*: capa de células fibrosas que comprende el 5% del peso del grano y que está cubierta por una capa impermeable cerosa denominada cutícula que recubre al grano.
- *Endospermo*: comprende aproximadamente el 80% del peso del grano. Presenta un alto contenido de almidón y es el segundo tejido de reserva, la capa exterior del endospermo o aleurona contiene células con gránulos ricos en proteínas y minerales así como pigmentos que hacen que los granos de ciertas variedades presenten un color azul, negro, rojo o púrpura. En la parte inferior del grano, a los lados del germen, presenta dos zonas ricas en proteínas que contienen además pequeños gránulos de almidón.
- *Germen*: representa el 15% del peso del grano maduro, es considerado el primer tejido de reserva ya que almacena una gran cantidad de nutrientes que son utilizados durante la germinación, además de contener la mayoría de los lípidos origina el tallo y las raíces (Zhou *et al.* 2013).

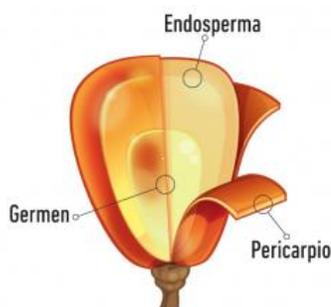


Figura 2.1 Partes principales del grano de maíz. Esquema representativo del grano de maíz mostrando las partes principales en las que se divide: germen, endospermo y pericarpio.

Fuente: <http://maiz.dacsa.com/spa/mundo-maiz/caracteristicas-y-tipos-de-maiz/el-grano-del-maiz.html>

La composición química del maíz depende tanto de la variedad, como del ambiente y las condiciones en que se haya sembrado (Paredes *et al.* 2008). En la Tabla 2.1 se muestra la composición química promedio para el grano de maíz; es un alimento con bajo contenido de proteína y alto en carbohidratos, esto lo convierte en una de las principales fuentes de energía para las poblaciones que lo consumen (Badui 2006).

Tabla 2.1. Análisis químico proximal del grano de maíz

	Proteína	Lípidos	Fibra	Cenizas	Carbohidratos
Maíz	11.0%	5.1%	2.3%	1.7%	~ 80%

Datos en base seca.

Fuente: Badui 2006.

a) Carbohidratos

En el maíz los carbohidratos se encuentran principalmente en el endospermo como tejido de almacenamiento. El carbohidrato más abundante en el grano maduro es el almidón, y representa en promedio el 72% del peso seco, mientras que los azúcares simples (como glucosa y fructosa) llegan a ser sólo el 2% del peso seco del grano (Loaeza 1991). La Tabla 2.2 muestra los diferentes tipos de carbohidratos presentes en el maíz.

Tabla 2.2 Principales carbohidratos del grano de maíz en peso seco

Tipo de carbohidrato	Porcentaje
Monosacáridos	Glucosa y fructosa (1-3%)
Di y trisacáridos	Sacarosa (4-8%), maltosa, rafinosa, maltotriosa (0.4%)
Azúcar-alcohol	Sorbitol, fitato (0.9%)
Polisacáridos	Almidón (61-78%), hemicelulosa (7%), celulosa (3%), lignina (0.2%)

Fuente: Loaeza, 1991.

Los diferentes polisacáridos juegan un papel importante en la estructura de los granos de maíz, éstos pueden clasificarse como sustancias pécticas, hemicelulosas y celulosas. El pericarpio del maíz está compuesto de 70% de hemicelulosa, 23% de celulosa y 0.1% de lignina en peso seco. Las pentosas xilosa y arabinosa son constituyentes muy importantes de los xilanos de la pared celular, los cuales constituyen entre el 90 y 95% de la hemicelulosa de la semilla de maíz. La hemicelulosa del pericarpio de maíz contiene 54% de xilosa, 33% de arabinosa, 11% de galactosa y 3% de ácido glucurónico (Boyer y Shannon 1987).

b) Proteínas

El contenido de proteína del maíz es de aproximadamente un 10% y la mayor cantidad se encuentra en el germen del grano. No obstante, el endospermo llega a tener hasta 7% de proteínas clasificadas en cuatro tipos de acuerdo con su solubilidad: albúminas (solubles en agua), globulinas (solubles en soluciones salinas), prolaminas (solubles en soluciones alcohólicas) y glutelinas (solubles en soluciones alcalinas o ácidas diluidas) (Paredes *et al.* 2008, Zhou *et al.* 2013).

En el maíz, las prolaminas se encuentran principalmente en el endospermo y han recibido el nombre de zeínas, mientras que las glutelinas se encuentran en la matriz proteica de esta misma estructura; ambas proteínas constituyen cerca de 90% de las proteínas del grano completo. Por el contrario las del germen son casi en su totalidad albúminas y globulinas (Paredes *et al.* 2008).

c) Lípidos

Los lípidos que contiene el maíz oscilan alrededor del 5%, y se encuentran principalmente en el germen. El contenido de ácidos grasos saturados, como el palmítico y el esteárico, es relativamente bajo en comparación con los ácidos grasos no saturados, como el oleico y el linoleico, los cuales representan la mayoría del total de los lípidos contenidos en el grano de maíz (Paredes *et al.* 2008).

2.4 Modificaciones producidas al maíz durante la elaboración del pozol

Durante la nixtamalización se producen diversas transformaciones en el grano de maíz. Se sabe que durante este proceso la concentración de los carbohidratos presentes disminuye, esto debido a la pérdida de azúcares del maíz en las aguas de cocción y lavados del nixtamal, la concentración de mono y disacáridos (principalmente sacarosa, fructosa y glucosa) baja hasta 0.1-0.7 g/100g de masa seca. Se producen además cambios estructurales en el almidón (gelatinización parcial, retrogradación y entrecruzamiento) y la eliminación del pericarpio conduce a una pérdida importante de celulosa y hemicelulosa (Díaz *et al.* 2003, Santillana 1995).

En un estudio llevado a cabo por Cravioto *et al.* (1955), analizaron y compararon el pozol con los granos de maíz utilizados en su preparación (Tabla 2.3). Encontraron que durante el proceso de fermentación hubo un aumento en el nitrógeno proteico total, así como en algunos aminoácidos, como la lisina y el triptófano; y en algunas vitaminas, como la niacina y la riboflavina.

Además, por medio de bioensayos establecieron que la proteína del pozol era de mejor calidad que la del maíz nutrimentalmente hablando; sin embargo, debido al tratamiento de los granos de maíz con agua y calor para obtener el nixtamal, algunos componentes disminuyeron, como la tiamina y el fósforo. Cabe aclarar que el estudio no especifica el tiempo de fermentación del pozol.

Tabla 2.3 Análisis del pozol y del maíz utilizado en su preparación

Constituyentes	Maíz (g/100g)	Pozol (g/100g)	Diferencia en porcentaje entre maíz y pozol
Humedad	11.20	61.2	+ 546.42
Cenizas	1.69	1.65	- 2.40
Nitrógeno	1.68	2.43	+ 44.00
Proteína	10.50	15.18	+ 44.00
Extracto etéreo	4.73	8.60	+ 81.00
Fibra cruda	2.55	1.51	- 40.70
	mg/100g	mg/100g	
Calcio	28.00	249.00	+ 889.20
Fósforo	438.00	4.52	- 99.00
Tiamina	0.40	0.27	- 32.50
Riboflavina	0.15	0.78	+ 420.00
Niacina	3.26	9.84	+ 201.00
Aminoácidos esenciales			
Arginina	3.08	3.34	+ 8.40
Histidina	2.54	2.07	- 18.51
Lisina	3.05	3.36	+ 29.80
Leucina	12.95	10.02	- 22.70
Isoleucina	5.00	5.16	+ 3.20
Treonina	5.05	5.69	+ 12.66
Valina	4.51	4.53	+ 0.40
Triptófano	0.46	0.71	+ 54.34
Metionina	1.54	1.48	- 0.38
Fenilalanina	5.34	4.30	-19.47

Fuente: Cravioto *et al.* (1955)

2.5 Microbiología de la fermentación del pozol

El pozol es obtenido mediante una fermentación natural, es decir, no se añade intencionalmente ningún inóculo a la masa, sino que actúan los microorganismos que se encuentran naturalmente en ella y los obtenidos a través del proceso de elaboración. Es

ANTECEDENTES

sobre todo durante la molienda, el amasado y el moldeado donde se inoculan grandes cantidades de microorganismos a la masa (Nuraida *et al.* 1995).

Estudios realizados con técnicas de cultivo tradicional, indican que la microbiota del pozol está conformada por diversos grupos, entre los que destacan los hongos, levaduras, mesófilos aerobios y bacterias ácido lácticas [BAL] (Nuraida *et al.* 1995, Wacher *et al.* 1993). En la Tabla 2.4 se enlistan algunos de los microorganismos aislados del pozol.

Tabla 2.4 Microorganismos aislados del pozol

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

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

Ben Omar y Ampe (2000) estudiaron la dinámica de la comunidad microbiana con muestras de 4, 24, 48, 72 y 96 horas de fermentación. La concentración total de microorganismos inicial fue de 10^9 a 10^{10} UFC/g, e incrementó durante la fermentación observándose un comportamiento similar con las levaduras y los hongos, que alcanzaron una concentración máxima de 10^8 UFC/g a las 24 horas y a las 48 horas, respectivamente.

Ulloa y Kurtzman (1975) estudiaron la sucesión de la microbiota en muestras de pozol de Tabasco, aislando e identificando mohos y levaduras presentes en cada etapa de la elaboración y fermentación del pozol. Se observó que los mohos presentes en los granos de maíz eran destruidos por el proceso de nixtamalización, y que la inoculación de la masa se realizaba durante la molienda del nixtamal y la formación de las bolas de masa; sin embargo, existen varias especies de levaduras y mohos que están presentes en todas las muestras de pozol, lo que indica una relación con el tipo de sustrato y con las condiciones ambientales que prevalecen en los lugares donde se prepara la bebida.

En el mismo trabajo se describieron como especies más frecuentes las levaduras del género *Candida*, y las levaduras filamentosas *Trichosporon cutaneum* y *Geotrichum candidum*, las cuales fueron asociadas a las primeras horas de fermentación del pozol. Además, se encontró que algunos mohos de la superficie resultaron ser amilolíticos, mientras que ninguna de las levaduras presentó dicha propiedad (Nuraida *et al.* 1995, Ulloa *et al.* 1987, Ulloa y Kurtzman 1975); sin embargo, esta actividad amilolítica no fue caracterizada en pruebas bioquímicas *in vitro*.

En investigaciones en donde se usaron principalmente técnicas moleculares, se encontró que las BAL constituyen la microbiota predominante del pozol donde *Streptococcus*, *Lactococcus* y *Leuconostoc* parecen ser dominantes en las primeras 12 horas de fermentación, mientras que el género *Lactobacillus* predomina a partir de las 72 horas (Cárdenas, *et al.*, 2014, López 2006, Ampe *et al.* 1999a, Ampe *et al.* 1999b).

Posteriormente se encontró que el pozol es fundamentalmente una fermentación láctica de maíz, ya que las bacterias ácido lácticas son responsables del 90 al 97% de la actividad microbiana en este proceso. En la fermentación del pozol se han encontrado mediante métodos tradicionales de cultivo especies como *Leuconostoc mesenteroides*,

Lactobacillus plantarum, *Lactobacillus confusus*, *Lactococcus lactis* y *Lactococcus raffinolactis* (Ampe et al. 1999b).

En un estudio realizado en 2003, Díaz et al. encontraron que la cuenta inicial de bacterias lácticas amilolíticas fue de 4.5 log UFC/g de masa seca y que esta 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).

En el estudio antes mencionado se aislaron, por su capacidad de crecer en almidón, un total de 257 colonias de las cuales sólo 40 presentaron halo de actividad amilolítica. Estas cepas fueron caracterizadas por métodos moleculares y fenotípicos. Se reportaron cuatro especies como las de mayor actividad amilolítica: *Streptococcus bovis* (actualmente clasificado como *S. infantarium*), que además se encontró como la especie predominante en la fermentación, *Streptococcus macedonicus*, *Lactococcus lactis* y *Enterococcus sulfureus* (Díaz et al. 2003).

S. bovis (*S. infantarium*) se cultivó en frascos con 800 mL de medio MRS con almidón de papa soluble en lugar de glucosa (20 g/L, Prolabo-Merck Eurolab), inoculados con 25 mL de cultivos preenriquecidos por 12 h en medio MRS-almidón a 30°C. Los muestreos de la fermentación se realizaron cada 30 min por 26 horas.

Los resultados obtenidos por Díaz fueron que *S. bovis* (*S. infantarium*) se caracterizó por tener un bajo rendimiento de amilasa relativo a la biomasa [$139 \text{ U (g células secas)}^{-1} \text{ h}^{-1}$]. En contraste la cepa mostró una alta velocidad específica de crecimiento (0.94 h^{-1}) y una conversión eficiente de sustrato en biomasa [$0.31 \text{ g biomasa (g sustrato)}^{-1}$]. Estas características le dan a *S. bovis* (*S. infantarium*) ventajas competitivas sobre otras especies de bacterias lácticas y podrían explicar su dominio en la fermentación (Díaz et al. 2003).

Sin embargo, al comparar estos datos con otras bacterias lácticas amilolíticas aisladas de otros alimentos fermentados amiláceos, como el Ogi, se observó que *S. bovis* (*S. infantarium*) produce poca actividad amilolítica ya que el almidón es pobremente hidrolizado por esta cepa (Díaz et al. 2003) (Tabla 2.5).

ANTECEDENTES

Tabla 2.5 Comparación de los rendimientos metabólicos de diferentes BAL amilolíticas

Parámetro	Valores obtenidos para			
	<i>S. bovis</i>	<i>L. manihotivorans</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. fermentum</i>
Azúcares totales consumidos (%)	25.5	45	Nd*	78
$Y_{x/s}$ (g g ⁻¹)	0.31	0.09 (0.15)	Nd (0.18)**	0.1
$Y_{lac/s}$ (g g ⁻¹)	0.78	0.71 (0.67)	Nd (0.84)	0.33
$Y_{lac/x}$ (g g ⁻¹)	2.56	7.89 (4.47)	Nd (4.7)	3.3
$Y_{amy/x}$ (U g ⁻¹)	139	2400 (4900)	2300 (5700)	5400
μ (h ⁻¹)	0.94	Nd (0.36)	0.43 (0.41)	0.35

Donde:

$Y_{x/s}$	Rendimiento del crecimiento relativo al sustrato	*Nd: No determinado.
$Y_{lac/s}$	Rendimiento de ácido láctico relativo al sustrato	**Valores determinados a pH controlado
$Y_{lac/x}$	Rendimiento de ácido láctico relativo a la biomasa	
$Y_{amy/x}$	Rendimiento amilolítico relativo a la biomasa	
μ	Velocidad de crecimiento específica	

Referencia: Díaz *et al.* 2003

La alta concentración de bacterias lácticas amilolíticas sugiere su importancia en la fermentación de la masa de maíz; sin embargo, el número de bacterias lácticas que no son capaces de utilizar el almidón es alto al final de las 72 horas de fermentación, quizá debido al uso eficiente de mono- y disacáridos inicialmente presentes y de otros azúcares producto de la hidrólisis del almidón por las bacterias lácticas amilolíticas (Díaz *et al.* 2003).

2.6 Proteómica

El término proteoma fue introducido por Wilkins en 1996, para describir la totalidad de proteínas en una célula, tejido u organismo, en una etapa dada y bajo condiciones específicas (Bendixen 2013).

El proteoma tiene un carácter dinámico, a diferencia del genoma que es esencialmente constante a lo largo de la vida de la célula, esto porque las proteínas cambian en diferentes etapas del ciclo celular y en respuesta a factores externos como cambios en el entorno o situaciones de estrés; por lo que el estudio del proteoma ofrece una aproximación más cercana al ciclo de vida celular (Castellanos *et al.* 2004, Fey y Larsen 2001).

En general las etapas principales para realizar un análisis proteómico son las siguientes:

- Preparación de la muestra
- Separación y detección de las proteínas
- Identificación de las proteínas de interés
- Análisis de la identidad de la proteína

La preparación de la muestra se lleva a cabo mediante la extracción de las proteínas en estudio, el objetivo es la eliminación de componentes no proteicos, como carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos, sales, etc. (Chevalier 2010).

La separación y detección tienen como objetivo resolver las complejas mezclas de proteínas de las muestras biológicas, en esta etapa generalmente se pueden combinar diversos procedimientos electroforéticos y cromatográficos.

La electroforesis bidimensional es la técnica central para analizar un número grande de proteínas al mismo tiempo. Los geles bidimensionales fueron introducidos en el año de 1975 simultáneamente por J. Klose en Berlin y O' Farrell en los Estados Unidos.

Esta técnica permite obtener un arreglo o despliegue físico en dos dimensiones de las mezclas complejas de proteínas (Fey y Larsen 2001) y se basa en la combinación de dos técnicas que se rigen por principios físicos diferentes: primero la separación por carga eléctrica (focalización isoeléctrica), donde las proteínas migran en un gradiente de pH

hasta alcanzar el correspondiente a su punto isoeléctrico (pI), es decir, el punto donde las especies peptídicas tienen una carga eléctrica neta igual a cero, por lo que la concentración de la forma aniónica es igual a la concentración de la forma catiónica (Castellanos *et al.* 2004).

La segunda dimensión permite la separación de las especies peptídicas de acuerdo a su peso molecular: El gel que contiene la primera separación se coloca perpendicularmente a la dirección de migración en un segundo gel, ahora en presencia de SDS (Chevalier 2010).

Las proteínas de interés en un experimento de proteómica pueden ser analizadas directamente mediante espectrometría de masas. El análisis por espectrometría de masas de las fracciones separadas por electroforesis o cromatografía permite identificar las proteínas e incluso sus posibles modificaciones postraduccionales como glicosilaciones, fosforilaciones, etcétera (Wright *et al.* 2012).

La información que se obtiene mediante este método es una relación carga masa Z/m de cada uno de los péptidos, al dar como resultado un espectro de masas (MS) denominado huella peptídica (Villegas 2013).

Finalmente los valores de Z/m obtenidos se comparan con bases de datos de las digestiones virtuales del proteoma teórico del organismo analizado (si el genoma es conocido). Si el genoma no es conocido se comparan los valores con las digestiones virtuales de proteomas derivados de genomas conocidos procedentes de especies cercanas (Castellanos *et al.* 2004).

La proteómica es, por tanto, una ciencia multidisciplinaria que estudia el perfil de abundancia de las proteínas pertenecientes a un individuo en términos de espacialidad y temporalidad. Es decir, responde a las preguntas: En cada punto del tiempo ¿Qué proteínas están presentes y en dónde se encuentran?

Por otro lado, entender la estructura y función de las proteínas presentes en los alimentos es esencial para la optimización de los procesos de elaboración de los mismos, debido a que las proteínas tienen un papel de suma importancia en la textura, sabor y valor nutricional de los alimentos (Bendixen 2013).

La proteómica ha sido de utilidad para estudiar los sistemas alimenticios y lograr una caracterización eficiente de los mecanismos bioquímicos a los que son sometidos durante la fermentación, maduración o almacenamiento. Por ejemplo, durante la maduración de los quesos y los productos cárnicos fermentados se llevan a cabo diferentes fenómenos proteolíticos que son los responsables de modificar tanto la imagen, como el sabor y el contenido nutricional de dichos alimentos (Fadda 2012).

El uso de la proteómica en el estudio de los alimentos ha permitido la caracterización de proteínas con una gran relevancia estructural, nutricional o funcional en los mismos, además ha contribuido de manera muy importante en los estudios de evaluación de calidad en muchos alimentos (Bendixen 2013).

Todo lo anterior, hace de la proteómica una valiosa y poderosa herramienta para el entendimiento de los cambios que sufre la matriz alimentaria a lo largo de las etapas de fermentación (Fadda 2012).

3 Justificación

El pozol es una bebida tradicional de origen maya, ácida, refrescante y no alcohólica que se obtiene de la fermentación de la masa de maíz nixtamalizado (Wacher *et al.* 2000). A lo largo de la historia esta bebida ha tenido distintos usos medicinales, de alimento básico y de bebida refrescante (Ulloa *et al.* 1987). Hoy en día, esta bebida es preparada y consumida como parte de la dieta cotidiana en diversas regiones del sur y sureste de México.

En estudios previos se había propuesto que el almidón, al ser el componente mayoritario del grano de maíz, debería ser el principal sustrato disponible para llevar a cabo la fermentación ácido láctica en el pozol; sin embargo, la actividad amilolítica nunca ha podido ser identificada directamente en la masa y las bacterias lácticas presentes en esta fermentación, son débilmente amilolíticas si se comparan con otras bacterias lácticas aisladas de fermentaciones semejantes (Díaz *et al.* 2003).

Resulta entonces difícil de entender cómo un contenido tan bajo de azúcares libres y una baja actividad amilolítica puedan mantener una microbiota tan abundante y diversa, por lo que se decidió identificar las glicósido-hidrolasas presentes en la fermentación del pozol mediante el uso de técnicas proteómicas, con el fin de inferir cuales son los carbohidratos que están siendo utilizados durante el proceso de fermentación de esta bebida.

4 Objetivos

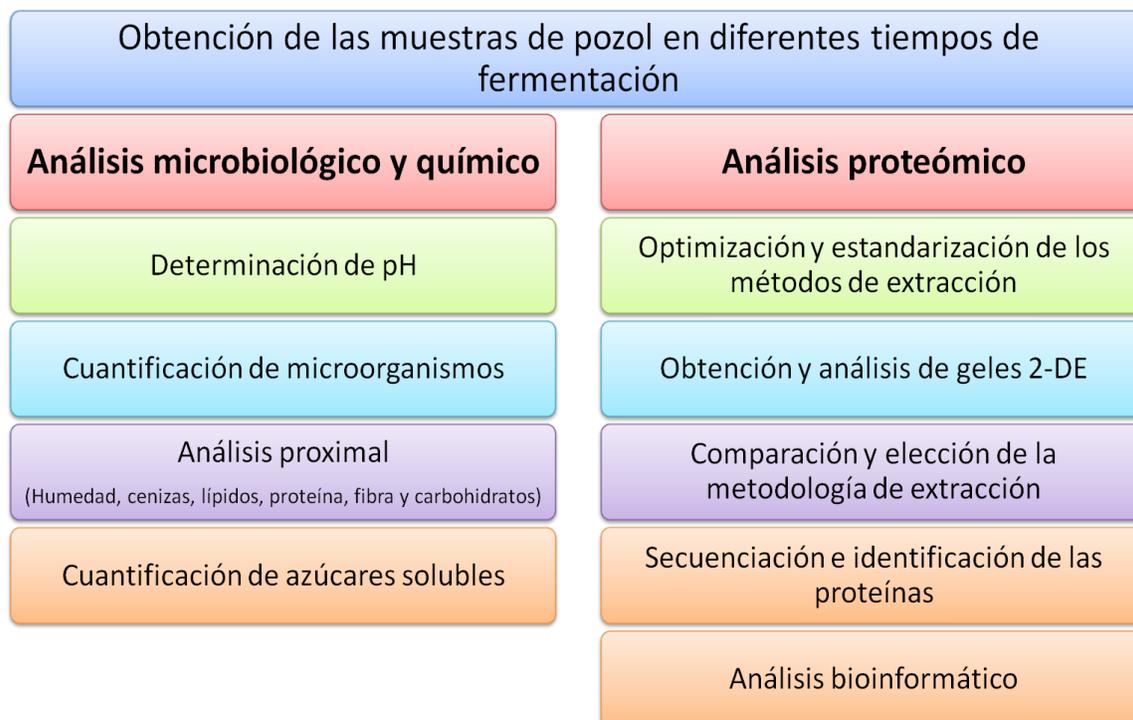
4.1 Objetivo general

- Diseñar y estandarizar un método de extracción del metaproteoma del pozol que favorezca el aislamiento de proteínas de microorganismos sobre las proteínas propias del maíz.

4.2 Objetivos particulares

- Obtener e identificar las proteínas del metaproteoma del pozol.
- Correlacionar los estudios microbiológicos, analíticos y del metaproteoma con los sustratos utilizables durante la fermentación del pozol.

5 Estrategia experimental



6 Materiales y Métodos

6.1 Muestras de pozol

Se adquirió masa de maíz nixtamalizado y hojas de plátano en un mercado local de la ciudad de Villahermosa, Tabasco, en dos locales diferentes y en fechas distintas: el 30 de noviembre de 2013 y el 13 de abril de 2015.

En el primer muestreo, realizado en 2013, se tomaron muestras dentro de las primeras 48 h de la fermentación (0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 24 y 48 h). A partir de lo observado en este muestreo se realizó un segundo muestreo, en 2015, y se tomaron muestras solo de los tiempos 0, 9, 12, 24 y 48 h de fermentación para su estudio y comparación.

Con el objetivo de estandarizar las muestras, el maíz recién nixtamalizado se procesó en un molino manual en el momento de la compra e inmediatamente se enfrió en hielo para retardar el inicio de la fermentación. Posteriormente la masa se dividió en porciones de 300 g que se moldearon en forma de bolas y se envolvieron en hojas de plátano para el seguimiento de la fermentación. Transcurrido el tiempo de fermentación, la masa se extendió en bolsas de plástico con cierre hermético y se almacenaron a -70°C hasta su uso.

Con el objetivo de facilitar la lectura se nombraron las muestras con la letra inicial del mes en el que fueron colectadas seguida del número correspondiente a cada tiempo de fermentación. Las muestras colectadas en el mes de noviembre tienen los siguientes nombres: N-0, N-3, N-6, N-9, N-12, N-15, N-18, N-24 y N-48, respectivamente; mientras que las tomadas en abril son: A-0, A-9, A-12, A-24 y A-48.

6.2 Análisis microbiológicos

Estos análisis fueron realizados por la Dra. Gloria Díaz y la Biol. Ma. Teresa Flores del laboratorio de la Dra. Carmen Wachter. Se pesaron 25 g de muestra de pozol en una bolsa de Stomacher (Seward 400), se añadieron 225 mL de agua peptonada al 0.1% (Peptona bacteriológica, Oxoid, L37), se homogeneizaron por un minuto a velocidad normal en el Stomacher (Seward 400) y se realizaron diluciones decimales.

6.2.1 Cuantificación de bacterias lácticas y bacterias lácticas amilolíticas

El conteo de bacterias lácticas y de bacterias lácticas amilolíticas se realizó por triplicado en el laboratorio de la Dra. Carmen Wachter (Facultad de Química, UNAM). Se inocularon cajas de agar MRS (Oxid, CM361) y de agar MRS-almidón con 2% de almidón soluble (J.T. Baker) en lugar de glucosa, con 0.1 mL de la dilución correspondiente mediante el método de extensión por superficie.

Composición del medio MRS-Almidón (g/L): peptona pancreática de caseína 10; extracto de carne 10; extracto de levadura 5; almidón 20; citrato diamoniacal 2.17; acetato de sodio 5; sulfato de magnesio heptahidratado 0.207; sulfato de manganeso 0.056; fosfato dipotásico 2.62; agra bacteriológico 15. El pH final fue de 6.8.

6.2.2 Cuantificación de otros grupos microbianos

Se realizó por triplicado el conteo de enterobacterias, mesófilos aerobios, mohos y levaduras. Para las enterobacterias se usó agar bilis rojo violeta glucosa (Oxoid CM 485), para los mesófilos aerobios agar para cuenta en placa (Oxoid CM 325) y finalmente los mohos y levaduras se crecieron en agar papa dextrosa (Oxoid CM 139) acidificado con ácido tartárico al 10% para obtener un pH final de 5.5.

6.3 Análisis químicos

6.3.1 Medición del pH

Se suspendieron 2 g de pozol macerado con hielo seco 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.

6.3.2 Análisis proximal

El análisis proximal es un análisis químico que determina la composición de un alimento en términos de sus principales grupos y nutrientes. Comprende humedad, cenizas, extracto etéreo (lípidos), proteína cruda, fibra cruda y por diferencia a 100, el extracto libre de nitrógeno (ELN) (Greenfield y Southgate 2006).

La humedad representa el contenido de agua del alimento y se obtiene de la diferencia en peso después de una deshidratación en condiciones dadas (Greenfield y Southgate 2006).

El extracto libre de nitrógeno (ELN) se obtiene por diferencia de los otros nutrimentos cuantificables (agua, lípidos, cenizas, proteína y fibra cruda), al restar a 100 los porcentajes calculados para cada nutriente. Dentro de este concepto se agrupan todos los nutrientes no cuantificados en el análisis proximal, como carbohidratos digeribles, vitaminas y demás compuestos orgánicos solubles no nitrogenados. En general, dado que la contribución de vitaminas y otros compuestos orgánicos es de trazas, se le considera al ELN como el total de carbohidratos digeribles presentes en el alimento.

La proteína cruda se analiza mediante el método de Kjeldahl, este evalúa el contenido de nitrógeno total de la muestra después de ser digerida con ácido sulfúrico, en presencia de un catalizador de mercurio o selenio (Greenfield y Southgate 2006).

El método empleado para determinar el contenido de ceniza en los alimentos es la calcinación. Se considera a las cenizas como el contenido de minerales totales o material inorgánico de la muestra.

Los lípidos de la muestra son, por definición, la fracción del alimento que es soluble en disolventes orgánicos. Se determinan por extracción repetida con éter y son evaluados como porcentaje del peso después de evaporar el solvente (Greenfield y Southgate 2006).

Para determinar el contenido de fibra, la muestra se trató con soluciones de ácido sulfúrico e hidróxido de sodio y posteriormente el residuo fue calcinado. La diferencia de pesos después de la calcinación nos indica la cantidad de fibra presente. Este método para determinar la fibra cruda es un método drástico y contempla el material no degradable del tejido de la planta como lo es la lignina y la celulosa, pero no contempla otros polisacáridos digeribles que se incluyen en la fibra dietética total (Morales 2016).

6.3.3 Determinación de carbohidratos solubles totales

Se pesaron 5 g de muestra, previamente macerada en mortero con hielo seco y se agregaron 15 mL de agua destilada. Se agitó esta suspensión mecánicamente durante 30

min, se dejó sedimentar durante otros 30 min y se filtró el sobrenadante en papel Whatman No. 1. A 0.5 mL de una dilución 1:100 se le adicionaron 0.3 mL de solución acuosa de fenol al 5%. Se agitó y posteriormente se añadieron 1.8 mL de H₂SO₄ concentrado homogeneizando en vórtex. Se dejó enfriar la mezcla a temperatura ambiente por 30 min y se determinó la absorbancia a 480 nm frente a un blanco preparado de la misma manera, pero empleando agua como muestra. Se calculó la cantidad de carbohidratos presentes en base a una curva patrón de glucosa con concentraciones de 10 a 50 µg/mL.

6.3.4 Determinación de azúcares solubles reductores

Se prepararon las muestras de la misma manera que en la determinación de carbohidratos solubles totales. Se diluyó a la mitad y a 100 µL de la dilución se agregaron 100 µL de reactivo (ácido 3,5-dinitrosalicílico) y se homogeneizó en vórtex. Para desarrollar el color se colocaron los tubos en un baño de agua en ebullición por 10 min, se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se les añadió 1 mL de agua destilada. Se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm contra un blanco preparado de igual manera, pero usando agua. Se calculó la cantidad de azúcares reductores presentes en base a una curva patrón de glucosa con concentraciones de 0.1 a 1 mg/mL.

6.4 Análisis Proteómico

Para este análisis se siguieron dos métodos de extracción de proteínas, uno desarrollado previamente en el grupo de trabajo por Cárdenas (Método A) (Cárdenas *et al.* 2014) y se desarrolló un segundo protocolo extrayendo primero las células de microorganismos, mediante lavados de la masa, y la posterior extracción de proteínas (Método B).

6.4.1 Extracción de proteínas (Método A)

Las muestras se homogeneizaron mediante la maceración del pozol con hielo seco en un mortero hasta la obtención de un polvo fino.

A 0.1 g de la muestra macerada y agitada en vórtex con perlas de vidrio se le agregó 1.0 mL de buffer de extracción ASB-14 (7 M urea, 2 M tiourea, 2% CHAPS, 2% ASB-14, buffer 30 mM Tris-HCl) y se dejó a temperatura ambiente durante 1 h, con 5 min de agitación vigorosa en vórtex cada 20 min. Posteriormente las muestras se

centrifugaron tres veces por 10 min a 13,200 g y 4°C agregando 0.5 mL de buffer en cada ocasión y conservando el sobrenadante obtenido.

6.4.1.1 Cuantificación de proteína

El sobrenadante obtenido se diluyó 1:400, colocando 800 µL de cada dilución en tubos eppendorf de 1.5 mL y se adicionaron 200 µL del reactivo de Bradford, como blanco se utilizó agua destilada. Cada tubo, incluido el blanco, se agitó en vórtex y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 5 min. Posteriormente se determinó la absorbancia de las muestras a 595 nm.

Para determinar la cantidad de proteína en las muestras se realizó una curva patrón. El rango lineal del ensayo es de 1.2 a 10 µg/mL al usar BSA como estándar, tomando en cuenta esto se partió de una solución stock de 1 mg/mL.

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

Se precipitaron 20 µg de proteína a partir de los sobrenadantes obtenidos añadiendo un volumen de muestra y un volumen de ácido tricloroacético (TCA) al 20%.

La muestra se incubó por una hora a 4°C y posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm por 20 min a 4°C, se descartó el sobrenadante y el pellet obtenido se lavó con etanol al 70% a temperatura ambiente por 1 h. Se centrifugó nuevamente a 13,000 rpm por 10 min a 4°C. Finalmente se decantó la muestra y el pellet se secó al aire 2 min.

Los pellets obtenidos se resuspendieron en 10 µL de urea 6 M y 10 µL de buffer de Laemmli 8X (buffer tris-HCl 0.5M pH 6.8, glicerol, SDS 10%, β-mercaptoetanol, azul de bromofenol 0.05% w/v), luego se cargaron en un gel de acrilamida al 10%, la electroforesis se corrió a 20 mA hasta que el frente llegó al final del gel.

6.4.2 Extracción de proteínas (Método B)

A 1 g de la muestra macerada, como se menciona anteriormente, se le agregaron 10 mL de buffer citrato fosfato pH 5, y posteriormente se homogeneizó mecánicamente por 2 h. Las muestras se centrifugaron tres veces por 10 min a 800 g y 4°C, agregando 10 mL más de buffer en cada ocasión, agitando mecánicamente por 30 min más y apartando los sobrenadantes obtenidos en cada paso. Los sobrenadantes se filtraron por Miracloth y

posteriormente se centrifugaron a 12,000 g por 10 min descartando el sobrenadante y conservando el pellet a -20°C hasta su uso.

Al pellet obtenido se le realizó la extracción de las proteínas de acuerdo con el protocolo propuesto por Cárdenas *et al.*, 2014 y descrito anteriormente (Método A).

6.4.2.1 Cuantificación de proteína

Después de la extracción, la concentración de proteína presente en las muestras se cuantificó mediante el método de microensayos de Bradford (Bio-Rad) usando como referencia albúmina sérica bovina (BSA).

Debido a la interferencia que presentan los detergentes contenidos en el buffer de extracción con el método de cuantificación de proteínas, se decidió hacer primero la precipitación de las mismas con ácido tricloroacético (TCA) al 10%, como se describe en el apartado **6.4.1.2**. El pellet obtenido se resuspendió en 50 µL de urea 6 M y se llevó a un volumen de 800 µL con agua destilada.

A cada tubo se le adicionaron 200 µL del reactivo de Bradford, se agitaron en vórtex y se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 5 min. Posteriormente se leyó la absorbancia a 595 nm frente a un blanco preparado de la misma manera, pero empleando agua en lugar de muestra.

Para determinar la cantidad de proteína en las muestras se realizó una curva patrón. El rango lineal del ensayo es de 1.2 a 10 µg/mL al usar BSA como estándar, tomando en cuenta esto se partió de una solución stock de 1 mg/mL.

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

Las proteínas se precipitaron con TCA al 10%. Los pellets obtenidos se resuspendieron en 10 µL de urea 6 M y 10 µL de buffer de Laemmli 8X, y se cargaron en un gel de poliacrilamida al 10%. La electroforesis se corrió a 20 mA hasta que el frente llegó al final del gel.

6.4.2.3 Evaluación de la proteína extraída mediante electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida

Para la electroforesis bidimensional se precipitaron 50 µg de proteína con TCA al 10%. Los pellets obtenidos se resuspendieron en 130 µL de buffer de hidratación (7 M urea, 2 M tiourea, 2% CHAPS, 2% ABS-14, 50 mM ditiotretitol y 0.5% anfólitos pH 3-10 (Bio-Lyte, Bio-Rad) por agitación en vórtex a baja velocidad. Las muestras se centrifugaron a 13 200 g por 2 min para remover cualquier sólido remanente. El sobrenadante fue utilizado para hidratar las tiras IPG de 7 cm de longitud, pH 3-10 (Bio-Rad) a 20 °C y 50 V por 16 h.

Posteriormente, se realizó el enfoque isoeléctrico (IEF) con un protocolo de cuatro pasos, primero 250 V por 15 min, luego 4,000 V por 2 h, 4,000 V a 20,000 Vh y para concluir 500 V durante aproximadamente 2 h.

Finalmente, se realizaron dos etapas para equilibrar las tiras IPG. Primero se redujeron incubándolas con el buffer de equilibrio I (6 M urea, 2% SDS, 20% glicerol y 2% DTT en 50 mM Tris-HCl [pH 8.8]) por 20 min, para luego alquilarlas con el buffer de equilibrio II (6 M urea, 2% SDS, 20% glicerol, 2.5% yodoacetamida en 50 mM Tris-HCL [pH 8.8]) por 20 min más.

Después, las tiras IPG se enjuagaron con agua y se colocaron horizontalmente sobre un gel de poliacrilamida 10% (SDS-PAGE), para ser recubiertas con agarosa de bajo punto de fusión al 0.5% en buffer de corrida SDS (25 mM Tris pH 8.3, 0.2 M glicina y 0.1% SDS). La electroforesis se corrió a 10 mA hasta que el frente llegó al final del gel.

6.4.3 Revelado de los geles y obtención de imágenes

Se realizaron dos tipos de tinciones: Tinción con (45% etanol, 10% ácido acético y 0.1% de colorante Coomassie Brilliant Blue R-250) y la tinción con plata con el kit Dodeca Silver Stain (Bio-Rad). La obtención de las imágenes se realizó mediante el uso del fotodocumentador Bio-Imaging Systems y del escáner plano de Hewlett Packard (ScanJet 3970).

6.4.4 Análisis de los geles

El análisis de imágenes se llevó a cabo con el software ImageMaster 2D Platinum (versión 5.0, Amersham Biosciences).

6.4.5 Identificación de proteínas

Se realizó el triplicado de la extracción de proteínas para cada tiempo de fermentación elegido. Se separaron las proteínas en SDS-PAGE, las bandas fueron escindidas del gel en cortes de 5 mm y se enviaron los triplicados de cada fracción a la unidad de proteómica del Instituto de Ciencias Clínicas de Montreal (*Institut de Recherches Cliniques de Montreal* [IRCM]), en donde fueron procesadas para la identificación de péptidos. A continuación se detallan las técnicas utilizadas en el IRCM.

6.4.5.1 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 h. Los geles se lavaron con agua durante 5 min y se destiñeron dos veces con buffer de destinción (tiosulfato de sodio 100 mM, ferrocianuro de potasio 30 mM) durante 15 min. Se realizó un lavado adicional de 5 min con buffer bicarbonato de amonio 50 mM.

Las piezas del gel se deshidrataron 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 min a 40°C. Después, se secaron a 40°C durante 5 min y se rehidrataron a 4°C durante 40 min 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 h y se detuvo con 15 µL de 1% ácido fórmico/2% acetonitrilo.

El sobrenadante se transfirió a una placa de 96 pocillos y se realizó la extracción de los péptidos por 30 min 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 por LC-MS/MS.

6.4.5.2 Análisis por LC-MS/MS

Los extractos de los péptidos fueron solubilizados bajo agitación durante 15 min en 12 µL de 0.2% de ácido fórmico y se centrifugaron a 2000 rpm por 1 min. Para la cromatografía líquida (LC) se utilizó la columna C18 Jupiter de fase inversa, la cual se instaló en el sistema nanoLC-2D (Eksigent) y se acopló al LTQ Orbitrap Velos (ThermoFisher Scientific).

Se inyectaron 5 μ L de muestra a la columna, la separación se hizo mediante un gradiente de 2 a 80% de buffer B (100% de acetonitrilo/0.2% de ácido fórmico) durante un periodo de 20 min con un flujo de 650 nL/min, posteriormente el gradiente se regresó a 2% de B por 10 min. La masa sobre el rango de carga fue de 380 a 2000 y la resolución de masas fue de 60,000 (a m/z 400). El voltaje para el nanospray fue de 0.9-1.6 kV.

6.4.5.3 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 (Matrix Science, London, UK; version 2.5.1). La búsqueda de Mascot se realizó en la base de datos uniprot_sprot (seleccionada para Bacterias y Hongos) asumiendo digestión con tripsina. 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 UniProtKB/Swiss-Prot para bacterias, hongos y levaduras.

6.4.6 Análisis del metaproteoma del pozol (criterios de identificación)

Se utilizó el programa Scaffold (versión Scaffold_4.3.4, Proteome Software Inc., Portland, OR) para validar los péptidos y proteínas identificadas por MS/MS. La identificación de péptidos fue aceptada como válida si excedía los límites establecidos de base en Scaffold. 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 se tomaron como válidas proteínas con al menos 2 péptidos únicos identificados, mientras que la identificación de las proteínas asociadas a la degradación de polisacáridos se tomó como válido 1 péptido único, si este había sido identificado al menos en dos de las tres extracciones. En ambos casos se tomaron como límites para proteínas (protein threshold) 95% y para péptidos se tomó el límite (peptide threshold) Mascot_25.

7 Resultados y Discusión

7.1 Análisis microbiológico

Se realizó el análisis microbiológico de las muestras A-0, A-9, A-24 y A-48 (Dra. Gloria Díaz, Facultad de Química, UNAM). Se hizo el aislamiento en placa y la cuantificación de los grupos microbianos más representativos presentes en el pozol.

En el tiempo cero de fermentación las cuentas generales de microorganismos fueron de entre 10^4 - 10^7 UFC/g pozol (Figura 7.1). Esto coincide con lo reportado en estudios previos donde se observó una concentración inicial de microorganismos de 10^5 - 10^6 UFC/g pozol, la cual incrementa conforme avanza la fermentación (Wacher *et al.* 2000).

Las BAL iniciaron con una cuenta de 1.8×10^6 UFC/ g pozol. A las 9 horas su concentración aumentó hasta 1.6×10^9 UFC/g pozol, a las 24 horas subió a 4.4×10^{10} UFC/g pozol y se mantuvo constante hasta las 48 horas. Estos resultados concuerdan con otros reportados previamente, en los que identifican a este grupo de bacterias como el grupo predominante durante todas las etapas de fermentación del pozol, ya sea que se hayan empleado métodos de cultivo tradicionales (Nuraida *et al.* 1995, Wacher *et al.* 1993) o métodos independientes de cultivo (Ampe *et al.* 1999a, Escalante *et al.* 2001).

Esta alta concentración de BAL en el alimento y su aumento exponencial, indican su importancia durante la fermentación del pozol, ya que son las responsables de la producción de ácido láctico y la consecuente disminución del pH, lo que les permite inhibir a otros microorganismos y lograr así ser el grupo dominante en la fermentación (Cabeza-Herrera 2006, Steinkraus 1983).

La cuenta inicial de BAL amilolíticas fue de 2.7×10^6 UFC/ g pozol, aumentando a las 9 horas a 1.2×10^9 UFC/ g pozol y permaneció prácticamente constante hasta las 48 horas. En el pozol ya se ha reportado la presencia de bacterias lácticas amilolíticas (Ampe *et al.* 1999a, Díaz *et al.* 2003, Nuraida *et al.* 1995). Por ejemplo, la mayoría de las bacterias aisladas por Nuraida *et al.* 1995, hidrolizaron el almidón en caja. Mientras que Díaz *et al.* 2003 reportan que el 40% de las bacterias lácticas presentes en la masa al

inicio de la fermentación fueron amilolíticas y esta proporción se redujo hasta 3% después de 72 horas.

Los mesófilos aerobios iniciaron en cuentas de 2×10^7 UFC/ g pozol y la cuenta más alta se presentó a las 9 horas con un valor de 5.1×10^9 UFC/ g pozol, manteniéndose prácticamente constante para los demás tiempos de fermentación estudiados.

Las cuentas de enterobacterias fueron las más bajas al tiempo cero, iniciaron en 1.4×10^4 UFC/ g pozol, con una cuenta máxima a las 9 horas de 5.5×10^6 UFC/ g pozol. Aunque las cuentas fueron disminuyendo para los tiempos posteriores (7.7×10^5 UFC/ g pozol para las 24 horas y 3.3×10^4 UFC/ g pozol para las 48 horas), las enterobacterias no desaparecen de la fermentación y existen reportes que indican que éstas se mantienen en cuantías altas hasta los 5 días (Díaz *et al.* 2003, Giles 2012, Wachter *et al.* 2000).

Los hongos y levaduras iniciaron en cuentas de 2.3×10^5 UFC/ g pozol y disminuyen a 4.07×10^4 UFC/ g pozol a las 9 horas manteniéndose constantes hasta las 48 horas. De acuerdo con estudios previos los hongos comienzan a crecer a partir de las 48 a 72 horas de fermentación, esto podría explicar el por qué no se observa un aumento en su crecimiento en las primeras horas de fermentación (Ben Omar y Ampe 2000).

Como se mencionó, en el pozol se lleva a cabo una fermentación natural, es decir, no se añade inóculo alguno a la masa para iniciar la fermentación, sino que los microorganismos presentes naturalmente en ella son los que intervienen en este proceso (Wachter 1999). Aún con esta amplia diversidad de microorganismos que proceden de fuentes tan diversas de inoculación como los utensilios usados en la preparación, las manos de los productores, el aire, el agua, etc., se observa que cada vez que se prepara el pozol se obtiene un producto con las mismas características, tanto en apariencia como en sabor. Esto indica que el proceso de fermentación es llevado a cabo por microorganismos, como los descritos anteriormente, que son favorecidos tanto por la composición química del alimento como por los factores ambientales involucrados en dicho proceso (Ulloa 1974).

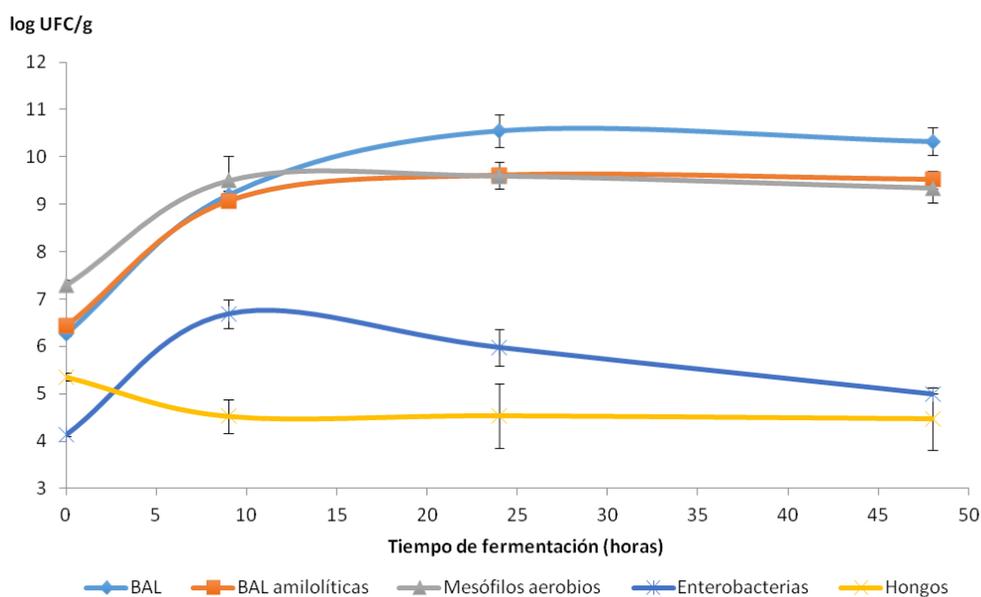


Figura 7.1 Cuantificación de grupos microbianos durante la fermentación del pozol. Se muestra la gráfica del log UFC/g de pozol contra el tiempo de fermentación. Los grupos microbianos cuantificados fueron BAL (—●— línea azul claro), BAL amilolíticas (—■— línea naranja), mesófilos aerobios (—▲— línea gris), enterobacterias (—*— línea azul) y hongos (—×— línea amarilla). Resultados obtenidos por triplicado con desviación estándar.

7.2 Análisis químicos

7.2.1 Medición del pH

Se midió el pH de cada una de las muestras colectadas. En la Figura 7.2, se observa el cambio de pH a lo largo del tiempo de fermentación. Los valores de pH iniciales para cada muestreo fueron diferentes, para la muestra N-0 se obtuvo un valor de 6.6, mientras que para la muestra A-0 fue de 7.8. Esta diferencia en el pH podría deberse al manejo de la muestra, probablemente en el segundo muestreo el nixtamal no se lavó adecuadamente y mantuvo remanentes de hidróxido de calcio, lo que provoca un valor de pH mayor en la muestra A-0. Con esto se observa la variación que existe al inicio de la fermentación, dependiendo del proceso que realizó cada productor en la elaboración del pozol.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Sin embargo, desde las 9 horas el pH desciende hasta valores similares para ambas muestras, para N-0 llega a 5.7 y para A-0 llega a 5.8. A las 24 horas el pH ha descendido hasta 4.7- 4.8 y se mantiene prácticamente constante hasta las 48 horas en uno y otro caso, lo que indica que conforme la fermentación avanza se va generando un sistema más homogéneo.

La mayor disminución de pH, para ambas muestras, se da en las primeras 9 horas de fermentación. Esta disminución de pH es seguramente consecuencia de la formación de ácido láctico, fórmico y acético. El más abundante de estos es el ácido láctico, el cual es el producto principal de la fermentación de los carbohidratos presentes en el pozol por acción de las BAL (Ampe *et al.* 1999a, Ben Omar y Ampe 2000). Los valores de pH obtenidos en ambos muestreos coinciden con los reportados previamente para muestras de pozol de la misma región (Ampe *et al.* 1999b, Díaz *et al.* 2003, Sainz *et al.* 2001).

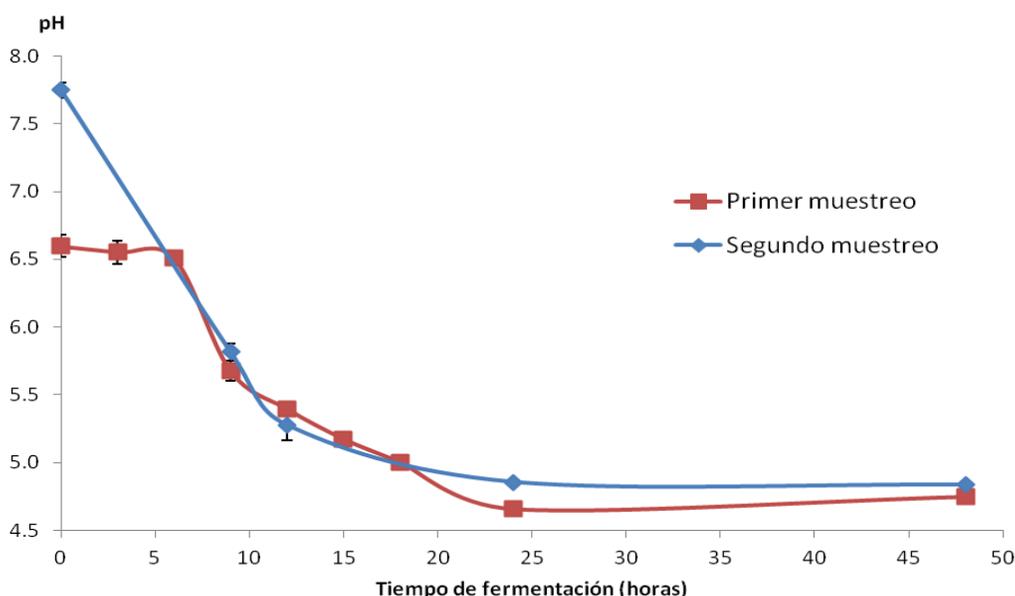


Figura 7.2 Comparación del pH en los diferentes muestreos. Se muestran los valores de pH obtenidos para los muestreos realizados: el 30 de noviembre de 2013 (línea roja) y el 13 de abril de 2015 (línea azul). Resultados obtenidos por triplicado con desviación estándar.

7.2.2 Análisis proximal

Se realizó un análisis proximal de las muestras A-0, A-9, A-24 y A-48 (Laboratorio de Análisis Químicos para Alimentos, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM).

La humedad de la bola de pozol se mantuvo prácticamente constante, alrededor del 53%, durante todo el tiempo de la fermentación, aunque se observó un decremento significativo de esta de las 24 a las 48 horas (Figura 7.3). La humedad de la bola de pozol se encuentra dentro del rango reportado por otros investigadores para este alimento que va de entre 50-60% de humedad (Tabla 7.1) (Cravioto *et al.* 1955, Loaeza 1991).

En la determinación de proteína cruda se observó un incremento significativo a partir de las 9 horas, para posteriormente mantenerse constante hasta las 48 horas (Figura 7.4). Resultado previamente observado por Rizo (2015), quien reporta un aumento del nitrógeno total y proteico a partir de las 24 horas. En otros estudios se ha reportado un máximo aumento de proteína a los 10 días de fermentación (Figura 7.1) (Cravioto *et al.* 1955, Ulloa *et al.* 1971). Se ha reportado además, que la masa fermentada contiene proteína de mejor calidad nutrimentalmente hablando, mayor cantidad de aminoácidos y vitaminas respecto al maíz con el que se prepara (Cravioto *et al.* 1955).

No se observaron diferencias significativas en el contenido de cenizas para ningún tiempo de fermentación (Figura 7.4). Lo que resulta lógico debido a que los microorganismos emplean los minerales contenidos en el alimento en una muy baja proporción y éstos permanecen dentro del sistema (Loaeza 1991). Y que concuerda con lo reportado por Cravioto en 1955 (Tabla 7.1).

Para las muestras de pozol se observó un aumento significativo en la cantidad de lípidos en todos los tiempos de fermentación. Esto puede deberse por un lado al crecimiento de los microorganismos, además, se sabe que entre los constituyentes heterogéneos de los gránulos de almidón se encuentran los lípidos. Estos están encerrados dentro de las hélices de amilosa y se liberan conforme el almidón se va degradando (Belitz y Grosch 1997), lo que coincidiría con la disminución de los carbohidratos digeribles por la hidrólisis del almidón.

Para los carbohidratos totales, aunque hubo una disminución de 84.4% a las cero horas a 83.21% a las 48 horas de fermentación, no se encontró una diferencia

estadísticamente significativa (Figura 7.4). La fibra cruda cuantificada en la muestra se ve significativamente disminuida desde el tiempo 9 horas de fermentación (Figura 7.4). En el estudio realizado por Cravioto en 1955 (Chiapas), también se observa una disminución en el contenido de fibra al comparar el grano de maíz con el pozol; sin embargo, la explicación que se da en ese momento está referida al proceso de elaboración del pozol en donde, el "hollejo" del maíz era eliminado (Tabla 7.1).

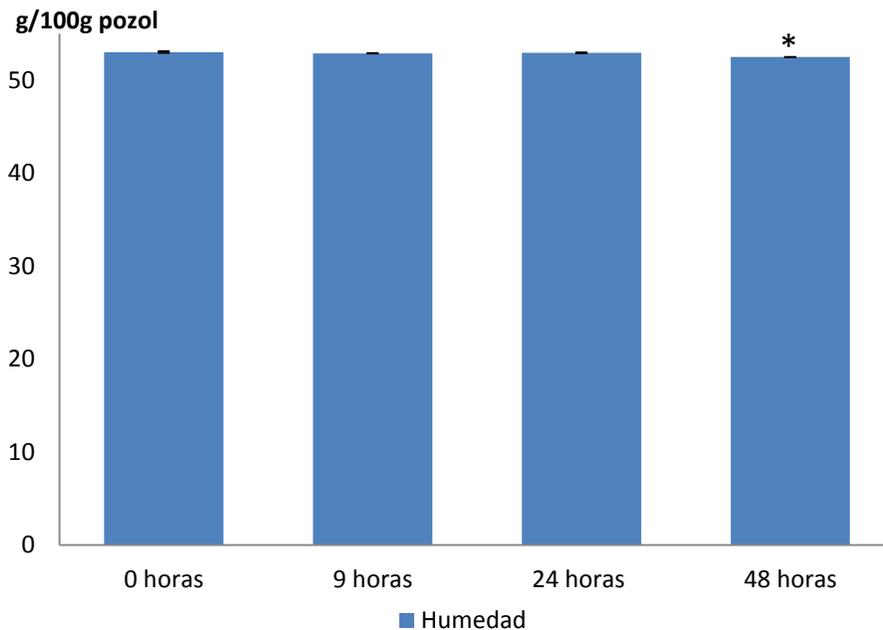


Figura 7.3 Cuantificación de la humedad en el análisis proximal. Se muestran los valores obtenidos en la medición de humedad (barras azules). Datos en base seca. Resultados obtenidos por triplicado con desviación estándar. El asterisco indica diferencia significativa ($p < 0.05$) en el análisis estadístico ANOVA.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

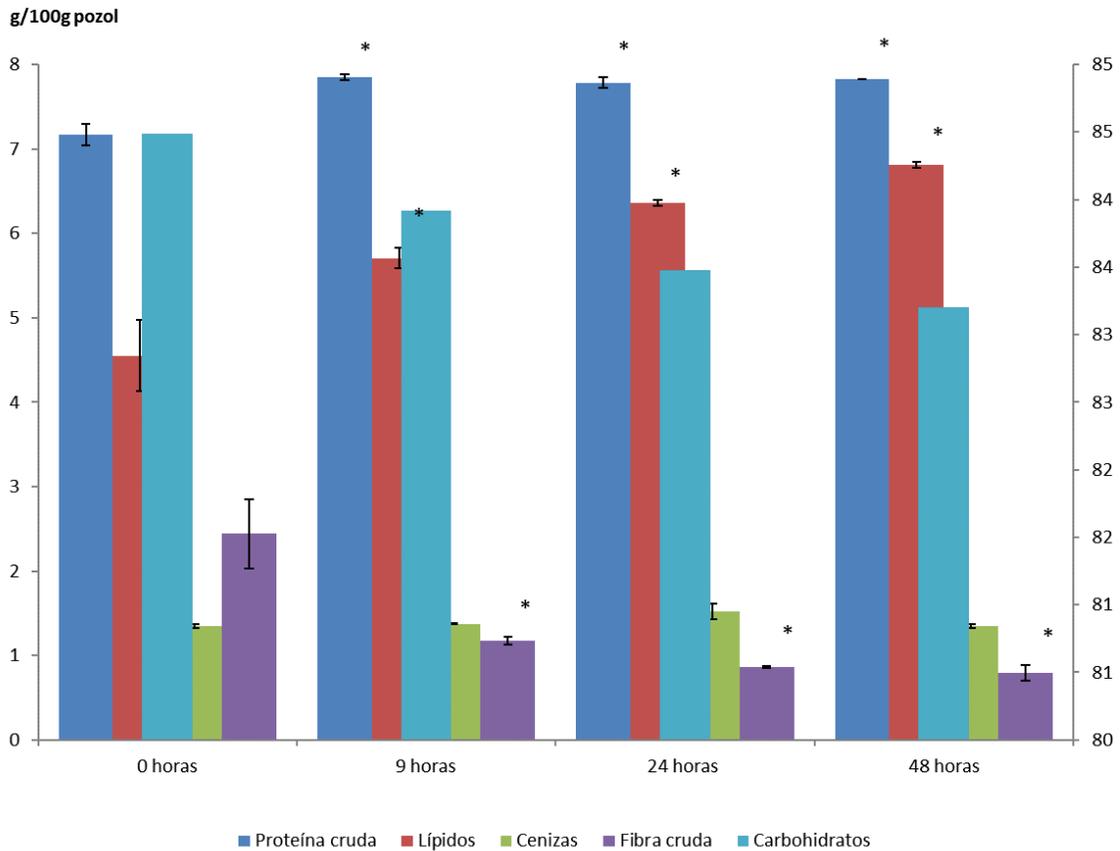


Figura 7.4 Cuantificación de proteína cruda, lípidos, cenizas, fibra cruda y ELN (carbohidratos) en el análisis proximal. Se muestran los valores obtenidos en la medición de proteína cruda (barras azules), lípidos (barras rojas), cenizas (barras verdes), fibra cruda (barras moradas) en la escala de 0 a 8 y los carbohidratos (ELN, barras azul claro) en la escala de 80 a 85. Datos en base seca. Resultados obtenidos por triplicado con desviación estándar. Los asteriscos indican los tiempos donde hubo diferencia significativa ($p < 0.05$) en el análisis estadístico ANOVA.

Tabla 7.1 Comparación del análisis proximal del pozo y del maíz utilizado en su preparación

Constituyentes	Maíz (g/100g) ^a	Pozol Chiapas (1955) (g/100g) ^a	Pozol (g/100g) Tabasco (2015) 0 horas de fermentación ^b	Pozol (g/100g) Tabasco (2015) 48 horas de fermentación ^b
Humedad	11.20	61.2	53.02	52.48
Cenizas	1.69	1.65	1.35	1.35
Proteína	10.50	15.18	7.17	7.83
Extracto etéreo	4.73	8.60	4.55	6.82
Fibra cruda	2.55	1.51	2.44	0.80

^a Cravioto *et al.*, 1955.

^b Este trabajo

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran prácticamente la misma cantidad de fibra cruda al tiempo 0 horas de fermentación que en el grano de maíz. Esto sugiere que el pericarpio del grano no es removido completamente en el proceso de elaboración del pozol, como se supone sucedía en el proceso tradicional, rural o antiguo.

Al observar el proceso de nixtamalización durante el último muestreo (abril 2015), se observó que el método de elaboración del pozol ha sido modificado con el objetivo de reducir los tiempos de preparación; el grano se hierva en presencia de cal por alrededor de 1 hora y posteriormente se lava, ya no se deja en remojo toda la noche. Además, los lavados dependen del productor y ya no es condición determinante el que se desprenda el pericarpio para llevar los granos a la molienda. Claramente la modificación en el proceso proporciona fuentes de carbono alternativas al almidón para los microorganismos presentes en dicho alimento.

Así mismo, se observó que la fibra disminuye conforme pasa la fermentación, lo que indica que la microbiota presente en la fermentación no sólo está consumiendo los carbohidratos digeribles, sino que también está haciendo uso de otros compuestos como la celulosa y hemicelulosa que son los componentes principales del pericarpio del grano de maíz (Boyer y Shannon 1987).

7.2.3 Determinación de carbohidratos solubles totales y reductores

Se llevó a cabo la cuantificación de azúcares solubles totales y reductores de las muestras A-0, A-9, A-12, A-24 y A-48. Como se observa en la Figura 7.5 la concentración de azúcares solubles totales para todos los tiempos es de alrededor del 2% (g/100g masa). Lo cual puede contener azúcares como glucosa, fructosa, sacarosa, maltosa, maltotriosa, entre otros, además de almidón soluble (Loaeza 1991).

En la muestra A-9 se observa un decremento significativo en la concentración de azúcares totales, coincidiendo con la caída del pH para el mismo tiempo de fermentación. Esto sugiere que los azúcares están siendo consumidos por los microorganismos metabólicamente activos para producir ácidos y de ésta manera reducir el pH, lo cual corrobora lo descrito en el análisis proximal para la cuantificación de carbohidratos digeribles, en la que se observa un descenso de los mismos a las 9 horas de fermentación (sección 7.2.2).

Posteriormente, la concentración de azúcares solubles totales aumenta a partir de las 12 y continúa aumentando hasta las 48 horas de fermentación. Esto puede explicarse por la hidrólisis de los polisacáridos presentes, como el almidón y tal vez la celulosa o hemicelulosa, con la consecuente liberación al medio de azúcares simples. Además de la presencia de microorganismos productores de exopolisacáridos, que de acuerdo con diversos estudios están presentes en estas etapas de la fermentación podrían incidir en lo observado (Ben Omar y Ampe 2000, Nuraida *et al.* 1995).

Estudios referentes a la producción de polímero extracelular de bacterias ácido lácticas revelan que sólo algunos de sus géneros son capaces de producir polímeros. Dentro de estos se encuentran los géneros *Streptococcus* y *Leuconostoc*, que son capaces de producir polímero cuando son crecidas en un medio con sacarosa y almidón (Oliva 2010). Estas especies han sido reportadas como las predominantes en la fermentación del pozol y se sabe que la producción de polímero en ambientes naturales se asocia a la protección celular (por desecación, estrés osmótico, antibióticos, compuestos tóxicos o ataques de bacteriófagos o protozoos) (DeVuyst y Degeest 1999).

Por otro lado, los azúcares reductores se encuentran desde el inicio de la fermentación (A-0) en una concentración del 0.59%. Para la muestra A-9 se observa un aumento de estos azúcares reductores (0.70%), lo que indica la hidrólisis de carbohidratos complejos (Bernfeld 1951). Además, coincide con la disminución en los azúcares totales (por la degradación de oligosacáridos) y el descenso del pH en este tiempo. Posteriormente, la concentración de azúcares reductores va disminuyendo hasta las 48 horas de fermentación, lo que puede indicarnos que los azúcares reductores que se están liberando al medio a la vez están siendo consumidos por los microorganismos para llevar a cabo la fermentación.

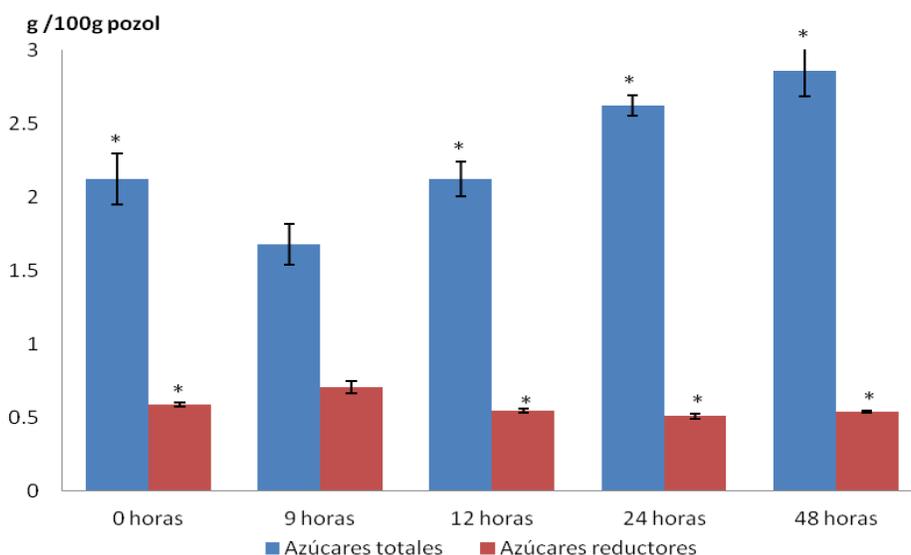


Figura 7.5 Cuantificación de los azúcares solubles en cada muestra. Se muestran los valores obtenidos en la medición de azúcares solubles totales (barras azules) y azúcares solubles reductores (barras rojas). Resultados obtenidos por triplicado con desviación estándar. Los asteriscos indican los tiempos donde hubo diferencia significativa ($p < 0.05$) al ser comparados con el tiempo 9 horas de fermentación en el análisis estadístico ANOVA.

Con todo lo anterior logramos observar que en las primeras 9 horas de fermentación del pozol se da el crecimiento exponencial de la microbiota, una disminución drástica de pH, el consumo de carbohidratos digeribles y de fibra cruda, lo que indica una importante actividad metabólica de los microorganismos presentes en este alimento a este tiempo de fermentación.

7.3 Análisis proteómico

El análisis proteómico es presentado en tres subsecciones. En la primera, se describen los diferentes métodos de extracción de las proteínas de las muestras de pozol. El análisis de los geles de dos dimensiones obtenidos, se presenta en la segunda sección. Finalmente se presenta el análisis bioinformático del metaproteoma del pozol.

7.3.1 Métodos de extracción de proteínas

I. Método A

Este método fue desarrollado previamente en el grupo de trabajo por Cárdenas *et al.* en 2014. En este protocolo se realiza la extracción de proteínas directamente de la masa fermentada e incluye pasos tanto mecánicos como químicos (Método A) (Cárdenas *et al.* 2014).

Inicialmente se llevó a cabo la extracción de las proteínas de las muestras N-0, N-3, N-6, N-9, N-12, N-15, N-18, N-24 y N-48 con este método.

Los diferentes extractos proteicos obtenidos fueron separados mediante SDS-PAGE y teñidos con azul de Coomassie (Figura 7.6). En cada carril del gel se cargaron 20 μ g de proteína solubilizada en buffer de carga. Se logran observar claramente las bandas de proteínas más abundantes. Como las cercanas a 66.2 kDa y las que se encuentran entre 21.5 y 31 kDa. Un poco más difusas se observan bandas cercanas a los 14.4 kDa. Además, se logran observar algunas otras bandas, aunque con menor claridad, entre 45 y 31 kDa.

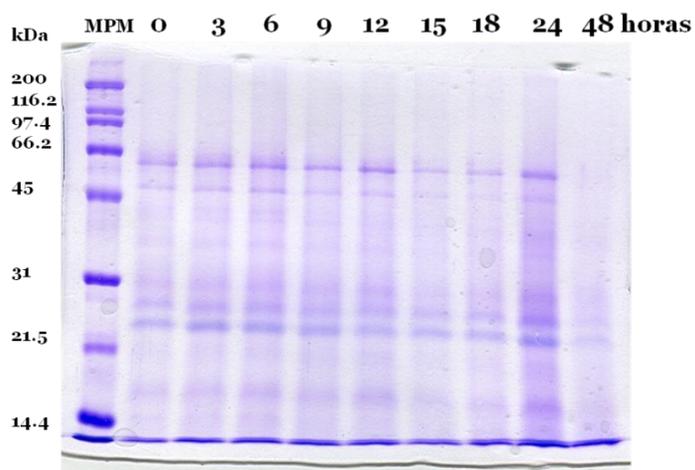


Figura 7.6 SDS-PAGE con la proteína obtenida a diferentes tiempos de fermentación. SDS-PAGE al 10% de acrilamida, teñido con Coomassie y cargado con 20 μ g de proteína de los tiempos 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 24 y 48 horas de fermentación del pozol obtenido en el primer muestreo (30 de noviembre de 2013).

Como se puede apreciar en la Figura 7.6 el perfil de proteínas para cada tiempo de fermentación es muy semejante, esto debido a que las proteínas de mayor abundancia provenientes del maíz enmascaran a las proteínas de baja abundancia pertenecientes a los microorganismos presentes en la fermentación. Ya que los granos de maíz tienen cantidades importantes de proteína, principalmente zeínas, que representan el 50% del total de las proteínas de reserva que el grano de maíz maduro contiene (Cárdenas *et al.* 2014).

En un intento por obtener las proteínas pertenecientes a los microorganismos presentes en la fermentación y disminuir la cantidad extraída de proteínas provenientes del grano se decidió modificar el protocolo de Cárdenas (Método B).

II. Método B

Tomando como base los estudios microbiológicos encaminados a la extracción de ARN de las células microbianas (Ampe *et al.* 1999a, Escalante *et al.* 2001), se desarrolló un nuevo protocolo que permite la extracción de células de microorganismos, mediante lavados sucesivos de la masa, y la posterior extracción de proteínas. En la Figura 7.7 se presenta la comparación de los métodos de extracción en geles de una dimensión de la muestra A-9, se cargaron 20 μg de proteína en cada carril y ambos se tiñeron con Coomassie.

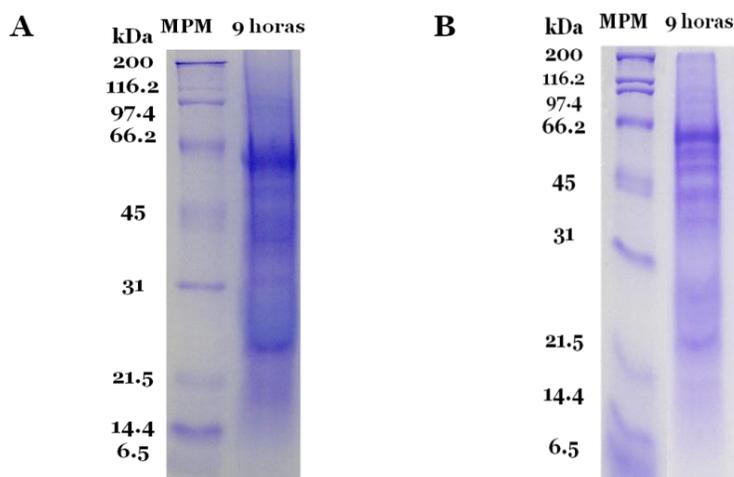


Figura 7.7 Comparación entre los métodos de extracción de las proteínas de la masa del pozol. A) SDS-PAGE con 10% de acrilamida, teñido con Coomassie y cargado con 20 μg de proteína obtenida con el método de extracción A. B) SDS-PAGE con 10% de acrilamida, teñido con Coomassie y cargado con 20 μg de proteína obtenida con el método de extracción B.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Utilizando el método B (Figura 7.7) se observa una mejor definición en el perfil de proteínas, en comparación con el gel obtenido con el método A. Se conservan las bandas más abundantes, como las que se encuentran entre 45 y 66 kDa, o las que se encuentran por debajo de 31 kDa. Además que con el método A se observa un barrido en todo el carril, lo que dificulta la identificación de las bandas.

Con la finalidad de observar una mejor separación de las proteínas, éstas fueron separadas mediante electroforesis bidimensional y se comparó posteriormente el patrón electroforético obtenido con cada método de extracción. Se realizaron geles en dos dimensiones de la muestra A-9 siguiendo ambas metodologías (Figura 7.8).

El estudio en geles bidimensionales requiere el uso de un buffer de hidratación (7 M urea, 2 M tiourea, 2% CHAPS, 2% ASB-14, 50 mM de DTT y 0.5% anfolitos), constituido por agentes caotrópicos, detergentes y reductores que provocan la ruptura de los puentes de hidrógeno, de las interacciones hidrofílicas, hidrofóbicas y puentes disulfuro que permiten la desnaturalización, así como la solubilización de las proteínas (Cárdenas *et al.* 2014, Chevalier 2010).

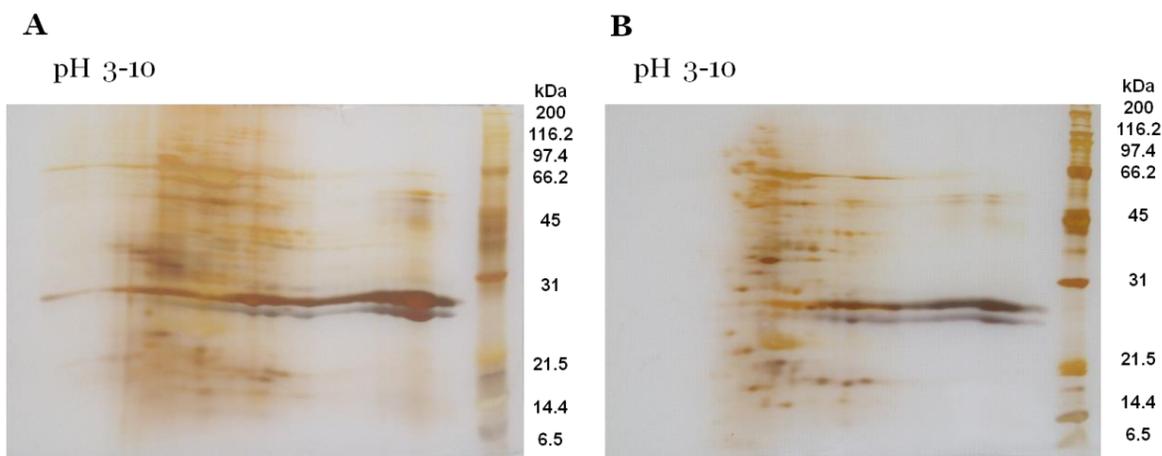


Figura 7.8 Comparación de los geles 2D con los diferentes métodos de extracción. A) Gel bidimensional con 10% de acrilamida, teñido con plata y con 50µg de proteína extraída con el método A. B) Gel bidimensional con 10% de acrilamida, teñido con plata y con 50µg de proteína extraída con el método B.

En el gel de la Figura 7.8-B se observan puntos con mayor definición e intensidad, mientras que con el método A se observa mucho ruido de fondo en el gel. Esto puede deberse a que con el método A no se logran eliminar completamente los carbohidratos presentes en la muestra, sobre todo el almidón, y esto puede provocar las estrías verticales que se observan de fondo en el gel.

Es importante resaltar que el método A permite obtener un rendimiento de 43 mg de proteína/g de pozol, lo cual corresponde con lo reportado por Cárdenas para el mismo método (40 mg de proteína/ g de pozol) (Cárdenas *et al.* 2014). Mientras que para el método B se obtiene un rendimiento de 0.068 mg de proteína/g de pozol, valor muy por debajo del otro método; sin embargo, es posible que la cuantificación de la proteína haya resultado sobreestimada en el método A.

Para la cuantificación de las proteínas en el método A, se hace una dilución del buffer de extracción, y se procede a realizar el ensayo de Bradford. Existen diversos reportes que indican que debido a la interferencia combinada de agentes como la urea, tiourea y los detergentes, esta determinación resulta en la sobrestimación de la cantidad de proteína (Bradford 1976, Ramagli y Rodríguez 1985). Además, dado que en este procedimiento se hace la extracción directa de la masa, podrían estar presentes otros componentes de la misma que interfirieran con la determinación como azúcares, almidón, ácidos grasos, por mencionar algunos (Bradford 1976, Granier 1988).

7.3.2 Análisis de los geles de dos dimensiones

Se realizó el análisis de los geles con el software Image Master 2D Platinum, se analizaron triplicados de los geles obtenidos con cada método y se compararon inicialmente de forma automática todas las proteínas presentes en cada uno de ellos.

Se verificaron los puntos del gel con una herramienta del software que permite la visualización de los mismos en una proyección en tercera dimensión, obteniendo una imagen definida y redondeada de las proteínas detectadas y asegurando de esta manera que no se estuviera identificando de manera errónea ruido o artefactos contaminantes (Perez Pulido *et al.* 2005).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Utilizando esta herramienta se compararon los geles obtenidos con la muestra A-9 para ambos procedimientos. En la Figura 7.9 se observa el conteo de puntos de los geles. Con el método A se resolvieron 107 ± 7 puntos, mientras que con el método B fue posible obtener un promedio de 104 ± 2 puntos.

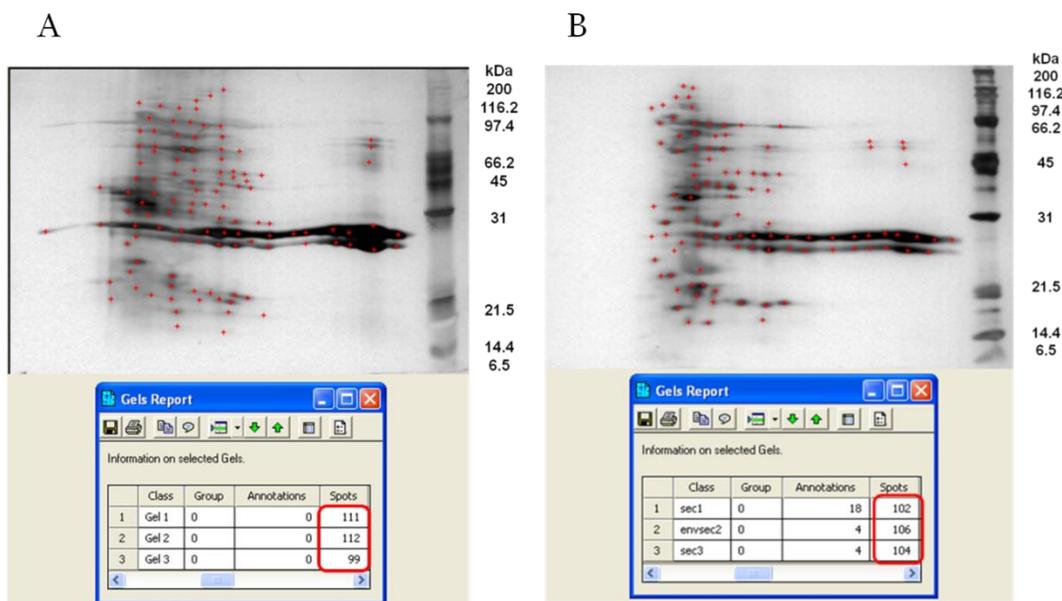


Figura 7.9 Conteo de puntos de los geles 2D utilizando el software Image Master 2D
A) Método de extracción A
B) Método de extracción B.

Aún con las mejoras realizadas, la gran gama de proteínas codificadas por un genoma limita la capacidad de los geles de dos dimensiones para resolver proteínas de mediana o baja abundancia (Fey y Larsen 2001, Gygi *et al.* 2000), y es posible que debido a esto, se obtengan valores muy cercanos en cuanto al número de spots para cada metodología, ya que sólo se logran resolver las proteínas más abundantes presentes en la muestra.

Otro parámetro importante al analizar la cantidad de puntos en un gel es el porcentaje de coincidencia entre los geles, es decir, la cantidad de puntos que se repiten en todos los geles analizados de una misma muestra (Sainz *et al.* 2001).

En la Figura 7.10 se muestra el análisis de coincidencia de los geles obtenidos con el método A. El porcentaje obtenido fue de 60.1% y 66.7% para cada gel al compararlo con un tercer gel que se toma como referencia. Este gel se eligió como referencia porque presentó el mayor número de puntos.

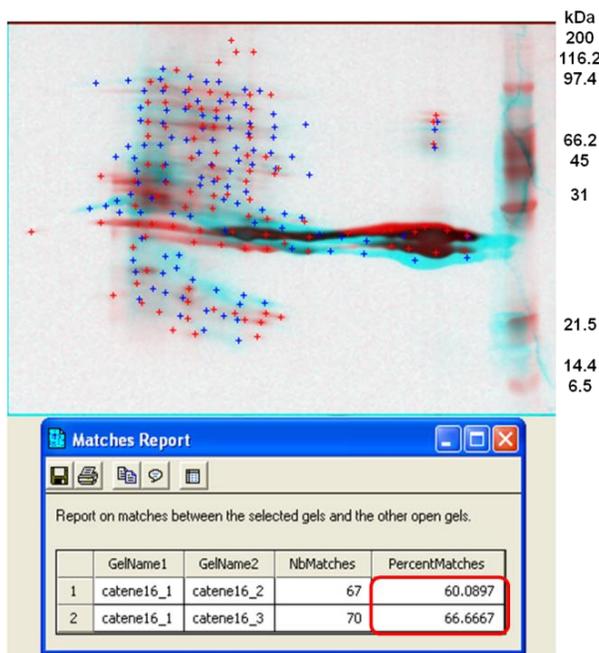


Figura 7.10 Porcentajes de coincidencia obtenidos con los triplicados del gel 2D de N-9 con el método A

Así mismo se hizo la comparación entre los geles obtenidos con el método B de extracción de proteínas, con el que se obtiene un porcentaje de coincidencia de 83.8% y 79.4% para los distintos geles (Figura 7.11). De acuerdo con la literatura estos valores ya son aceptables para el análisis de coincidencias que debe encontrarse entre el 70-90%, (Brandão *et al.* 2010).

Este cálculo de coincidencia se utiliza principalmente para analizar cambios en la expresión de proteínas; sin embargo, es una herramienta útil para analizar triplicados de la misma muestra y demuestra que el método B es reproducible mientras que el método A no lo es. (Brandão *et al.* 2010, Cutler *et al.* 2003, Choe y Lee 2003).

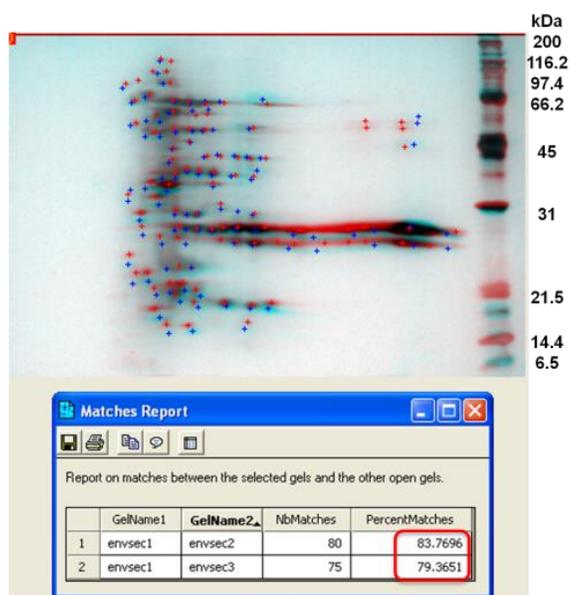


Figura 7.11 Porcentajes de coincidencia obtenidos con los triplicados del gel 2D de N-9 con el método B

Se realizó también la comparación del porcentaje de coincidencia entre ambos métodos, obteniéndose un valor de 58%. Como se observa en la Figura 7.12 aunque el porcentaje de coincidencia supera el 50%, muchos puntos del método A (color azul) desaparecen al hacer el tratamiento con el método B; sin embargo, la menor cantidad de estrías de fondo, puntos más definidos, así como el mayor porcentaje de coincidencia en los triplicados (~80%), hacen del método B un método mejor y más reproducible. En consecuencia se eligió el método B para la extracción de las proteínas de cada muestra y su posterior secuenciación

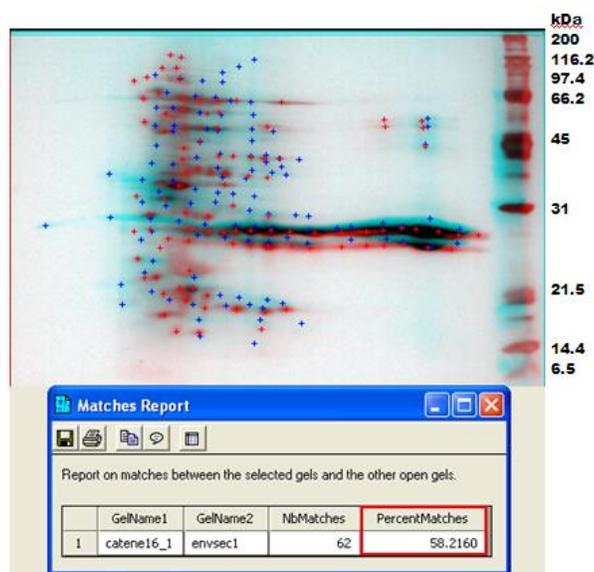


Figura 7.12 Porcentaje de coincidencia obtenido comparando el gel de referencia de cada método (A y B).

7.3.3 Análisis MS/MS y bioinformático de las proteínas relacionadas con el catabolismo de carbohidratos identificadas del metaproteoma del pozol

La metaproteómica estudia el conjunto de proteínas de todos los miembros de una comunidad en un determinado momento. Este campo de investigación permite, por ejemplo, el estudio de los organismos en su entorno natural y las interacciones que ocurren entre ellos (Hettich *et al.* 2012); sin embargo, la complejidad inherente a estas comunidades ambientales presenta una serie de desafíos técnicos: el principal es, sin duda, la capacidad de extraer las proteínas de los consorcios microbianos (Leary *et al.* 2013).

Como se ha descrito a lo largo de este trabajo, los alimentos y bebidas fermentados son matrices complejas ricas en proteínas, estas proteínas propias del alimento, pueden interferir con el estudio metaproteómico de los microorganismos presentes en dicho ambiente.

De hecho, muchos análisis proteómicos sobre alimentos fermentados se enfocan en la matriz alimentaria y no en los microorganismos presentes en ella; esto debido a que en la mayoría de los productos fermentados, el pozol incluido, la biomasa representada por la microbiota es insignificante cuando se compara con la cantidad de proteínas y péptidos presentes en la matriz alimentaria, lo que hace del estudio metaproteómico un gran reto (Rul *et al.* 2013).

Sin embargo, conocer el rol que juegan los microorganismos durante el proceso de fermentación, la capacidad de estos para adaptarse a las drásticas condiciones producidas en este tipo de procesos (disminución de pH, baja concentración de azúcares simples, producción de diferentes metabolitos, etc.), su papel en la calidad del producto final, hacen de los estudios metaproteómicos enfocados a microorganismos un interesante campo de investigación.

Aún con la complejidad de la muestra, en este trabajo se buscaron proteínas que estuvieran relacionadas con la utilización de diferentes carbohidratos para llevar a cabo la fermentación.

Para ello, de cada tiempo de fermentación elegido (0, 9, 24 y 48 horas) se realizaron extracciones independientes por triplicado siguiendo el protocolo del método B, se corrieron los extractos proteicos en un SDS-PAGE y se enviaron a secuenciar las bandas escindidas. En la Figura 7.13 se muestran los cortes realizados a los geles. Los carriles A, B y C indican los triplicados de la extracción y los números del 1 al 6 indican los fragmentos enviados a análisis.

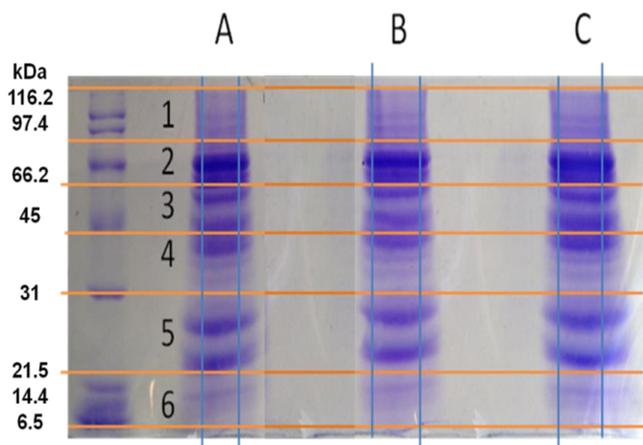


Figura 7.13 Cortes de los fragmentos enviados a secuenciación. SDS-PAGE con 10% de acrilamida teñido con azul de comassie. Las extracciones se realizaron por triplicado utilizando el método B y se corrieron en el mismo gel.

En la base de datos obtenida para bacterias, no se lograron identificar proteínas relacionadas con la degradación de carbohidratos; sin embargo, en la base de datos para hongos y levaduras se encontraron diferentes enzimas relacionadas con la degradación de almidón, celulosa y hemicelulosa (Tabla 7.2).

En la base de datos de hongos y levaduras los resultados muestran correlación entre algunos de los pesos moleculares relativos de las bandas observadas en el SDS-PAGE (Figura 7.13) y los pesos moleculares teóricos de las proteínas obtenidas (Tabla 7.2). Por ejemplo, la exo-1,4-beta-xilosidasa del género *Aspergillus* de 82 kDa correlaciona con los fragmentos del gel A3 y B2 de entre 66.2 y 97.4 kDa; de igual modo, la probable endo-beta-1,4-glucanase del mismo género y de 36 kDa correlaciona con los fragmentos del gel B4 y C4 de entre 45 y 31 kDa.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 7.2 Proteínas de hongos y levaduras identificadas en la base de datos Uniprot relacionadas con la degradación de polisacáridos

Proteína y origen ^a	No. Acceso ^b	PM ^c (kDa)	#pep ^d	Secuencia del péptido ^e	Tiempo ^f (h)	Fragmentos ^g	E-value ^h
Glucoamilase 1 <i>[Candida sp]</i>	AMYG_CANAL	106	1	(K)KQKFTAGK(N)	9	A6, C6	0.17
Uncharacterized family 31 glucosidase <i>[Schizosaccharomyces sp]</i>	YAJ1_SCHPO	111	1	(R)STFVGSGR(Y)	0 9 24 48	A1, B1, C1 A1, B2, C1 A1, C2 A2, B1, C1	0.12
Probable beta-glucosidase I <i>[Aspergillus sp]</i>	BGLI_ASPCL	92	1	(R)EKWASEK(G)	0 9 24	A2, B1, C2 A1, B1, C1 A3, B2, C2	0.39
Probable beta-glucosidase H <i>[Aspergillus]</i>	BGLH_EMENI	91	1	(K)SSTLDARAR(K)	48	C5	5.3 e-2
Probable beta-glucosidase L <i>[Aspergillus]</i>	BGLL_ASPFC	78	1	(R)GAAMGAEAK(G)	48	A6, B6, C6	5.3 e-2
Beta-glucosidase 1B <i>[Phanerochaete]</i>	BGL1B_PHACH	61	1	(R)FSISWSR(I)	24 48	A2, A4, C5 B3	0.15
Probable endo-beta-1,4- glucanase B <i>[Aspergillus]</i>	EGLB_NEOFI	36	1	(K)ERVTAATK(W)	24	A5, B4, C4	4.4e-2
Endo-1,3(4)-beta-glucanase 2 <i>[Saccharomyces]</i>	ENG2_YEAST	88	1	(K)LTIAMER(F)	48	C5	0.21

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Exo-1,4-beta-xylosidase <i>[Aspergillus]</i>	BXLB_EMENI	82	1	(K)FEIKGDVQVLEK(F)	24	A3, B2	4.3e-6
Endo-1,4-beta-xylosidase A <i>[Fusarium]</i>	XYNA_FUSO4	36	1	(K)LYYNDYNLEYGNAK(T)	48	C3	4.7 e-9

En la Tabla 7.2 se presentan las proteínas identificadas en la base de datos de hongos y levaduras que tienen relación con la degradación de polisacáridos. Se presenta el nombre de la proteína y el género del microorganismo del cual proviene^a. El número de acceso en la base de datos de Uniprot^b. El peso molecular teórico de la proteína^c. El número de péptidos únicos con los que fue identificada esa proteína^d. La secuencia del péptido único identificado^e. El tiempo de fermentación en el que se identificó dicha proteína^f. El número de veces que se encontró el péptido y en qué fragmento del gel^g. E-value o valor de expectancia significa el número de coincidencias con otras proteínas con iguales o mejores scores que se espera ocurran por casualidad, a menor valor de expectancia más significativo es el score^h.

Las proteínas identificadas por MS/MS, demuestran la presencia de enzimas con actividad hemicelulolítica en su mayoría (10 enzimas), además de dos enzimas con actividad celulolítica (glucanasas) y una glucoamilasa.

Como se mencionó anteriormente, el pericarpio del maíz está compuesto por un 70% de hemicelulosa, un 23% de celulosa y 0.1% de lignina (Boyer y Shannon 1987). La hemicelulosa constituye uno de los componentes orgánicos naturales más abundantes presentes en la biósfera. El principal compuesto de esta fracción es el xilano, segundo polisacárido más abundante, después de la celulosa, que constituye entre un 20 a 30% del peso seco de los residuos hemicelulósicos (Flores, 1996).

La celulosa constituye la base estructural de las células vegetales. Se trata de un polímero de elevado peso molecular formado por moléculas de glucosa unidas por enlaces β -glucosídicos (López y Llera 2010).

Las hemicelulosas son polímeros formados por unidades de xilosa, arabinosa, galactosa, manosa, ramnosa y otros azúcares y ácidos urónicos. En general, las hemicelulosas están compuestas por una cadena lineal de 150 a 200 residuos de xilopiranosos unidos por enlaces β -(1-4) y con ramificaciones que a su vez pueden estar interaccionando con la celulosa, la lignina y otros polisacáridos (López y Llera 2010, Takao *et al.* 2002).

La degradación de la hemicelulosa impone varios retos intrínsecos para el microorganismo. El polímero es de alto peso molecular, ya sea solo o asociado con la celulosa y la lignina. La hemicelulosa también es muy variable en su estructura y la eficiente degradación del polímero requiere la acción concertada de enzimas que tienen que trabajar de forma sinérgica. Se requiere de enzimas que corten la cadena principal y también las laterales. La endo-1,4-beta-D-xilanasa actúa sobre la cadena de xilano al azar, disminuyendo el grado de polimerización con liberación de xilooligosacáridos, xilobiosa y xilosa. La 1,4-beta-xilosidasa interviene luego de la endoxilanasa, actuando sobre los xilooligosacáridos (a partir de los extremos no reductores) o sobre la xilobiosa, dando como producto xilosa (Bajpai 1997).

En la naturaleza, todas estas enzimas están presentes, usualmente en mezclas con otras enzimas degradadoras de biomasa y actúan sinérgicamente con ellas para romper las paredes celulares. El sinergismo entre las α -arabinosidasas, xilanasas y las

β -xilosidasas ha sido demostrado en la hidrólisis de arabinoxilano de salvado de trigo con enzimas purificadas de *Trichoderma reesei* (Bajpai 1997).

Se ha reportado que algunos hongos, como *Aspergillus*, secretan una alta concentración de un complejo de enzimas hemicelulolíticas que trabajan sinérgicamente. Estas enzimas degradan completamente los polímeros en monosacáridos o disacáridos que pueden ser utilizados por los microorganismos que los rodean (Shallom y Shoham 2003).

Por otro lado, las endoglucanasas producen una disminución en el grado de polimerización de la celulosa, por cortes al azar de la cadena glucosídica, produciendo glucosa, celobiosa (disacáridos) y celotriosa (trisacáridos). Los sustratos sobre los que actúan las endoglucanasas incluyen carboximetilcelulosa, celulosa amorfa y celooligosacáridos (Bégum y Lemaire 1996).

Las beta-glucosidasas, por su parte, hidrolizan celobiosa y otros beta-1,4-oligosacáridos de cadena corta, para formar glucosa. Siendo la glucosa el resultado final de la acción degradativa del complejo celulolítico sobre el polímero de celulosa (Bégum y Lemaire 1996).

El maíz contiene también hemicelulosa, siendo el xilano el principal componente de esta. El complejo de D-xilanasas, que degradan xilano, se compone básicamente de dos enzimas: endo-1,4-beta-D-xilanasas y 1,4-beta-D-xilosidasas (ambas identificadas por el análisis MS/MS) (Haltrich *et al.* 1996).

Estos resultados indican que los hongos y levaduras asociados al pozol, están consumiendo xilano, celulosa y hemicelulosa como fuente de carbono, carbohidratos presentes principalmente en el pericarpio del grano. Esto concuerda con el análisis proximal realizado al alimento (sección 7.2.2), ya que se observó un descenso significativo en la cantidad de fibra cruda presente en el pozol desde las primeras 9 horas de fermentación.

Por otro lado, el almidón es el principal componente del grano de maíz (70-80%), éste se encuentra ampliamente distribuido en los más diversos órganos de las plantas como carbohidrato de reserva (Belitz y Grosch 1997).

El almidón está formado por una mezcla de amilosa y amilopectina. La amilosa es un polisacárido lineal, formado por unidades de α -D-glucosa con enlaces α -1,4, lo cual favorece la formación de estructuras helicoidales. La amilopectina posee una estructura compleja de cadenas ramificadas. En las cadenas principales, los monómeros de D-glucosa están unidos por enlaces α -1,4 y las ramificaciones se realizan mediante enlaces α -1,6, con un punto de ramificación de 15 a 30 unidades de glucosa (Belitz y Grosch 1997).

En este trabajo se logró identificar una glucoamilasa en el tiempo 9 horas de fermentación. Las glucoamilasas son enzimas que liberan unidades de glucosa a partir de los extremos no reductores de α -D-glucanos o maltooligosacáridos con liberación de β -D-glucosa mediante un mecanismo de inversión. Su función es actuar en la reacción de hidrólisis en cadenas de polisacáridos operando en los enlaces α -1,4-D-glucosa que están de manera residual después de haberse expuesto la cadena de almidón a la acción de α y β amilasas. El almidón, amilosa, amilopectina, pululano y maltooligosacáridos son sustratos naturales para las glucoamilasas (Volkov *et al.* 2015).

El principal producto de la acción de la glucoamilasa sobre el almidón es glucosa, lo que la diferencia de las α y β amilasas. Además, las glucoamilasas son producidas principalmente por hongos y levaduras, son termolábiles y permanecen activas a valores ácidos de pH (Bagheri *et al.* 2014).

Estos resultados apuntan a que el almidón también es una fuente de carbono que los microorganismos utilizan para llevar a cabo la fermentación, y que corrobora con el análisis proximal (sección 7.2.2); ya que se observa un descenso en la cantidad de carbohidratos digeribles, los cuales incluyen azúcares solubles así como almidón, que es el principal componente del maíz.

Es posible que no se hayan logrado identificar otras amilasas porque los reportes previos de estas enzimas en el pozol, indican que son enzimas de alto peso molecular (200-250 kDa) y que están ancladas a la membrana de las bacterias lácticas amilolíticas (Díaz *et al.* 2003; El-Fallal *et al.* 2012).

7.3.3.1 Diversidad de microorganismos

- Bacterias

Se compararon los resultados obtenidos en este trabajo con la secuenciación realizada por Cárdenas en 2014, la cual se realizó como el antes descrito método A.

Se lograron identificar 220 proteínas de bacterias con el método A (Cárdenas *et al.* 2014) y 680 proteínas de bacterias con el método B (este trabajo), tomando en cuenta sólo las proteínas identificadas a partir de 2 péptidos únicos; la mayoría pertenecientes al grupo de las bacterias lácticas para ambos métodos, esto coincide con el análisis microbiológico realizado a las muestras (sección 7.1) donde se reporta que las bacterias lácticas son las más abundantes.

Las proteínas identificadas con el método A provienen de 33 géneros diferentes de bacterias, mientras que con el método B las proteínas identificadas provienen de 70 géneros de bacterias.

Para el método B los géneros de bacterias lácticas de los que se logró identificar una mayor cantidad de proteínas fueron *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Enterococcus*. A pesar de que estas bacterias están presentes desde el inicio de la fermentación, en el tiempo cero no se encontraron proteínas de éstos géneros; sin embargo, a partir de las 9 horas y hasta las 48 horas fueron los más abundantes (Figura 7.15).

El 48% de las proteínas identificadas con este método pertenecen al género *Streptococcus*, esto concuerda con lo reportado por Díaz en 2003, quien indica que *Streptococcus bovis* (actualmente *S. infantarius*) es el microorganismo dominante durante la fermentación del pozol. La cepa estudiada (*S. bovis* cepa 25124) se caracterizó por tener una alta velocidad específica de crecimiento (0.94 h^{-1}) y una conversión eficiente de sustrato en biomasa (0.31 g biomasa/ g sustrato). Estas características le dan a *S. bovis* ventajas competitivas sobre otras especies de bacterias lácticas, lo que explica su dominio en esta fermentación (Díaz *et al.* 2003).

Lactobacillus tiene el 7% de representación, siendo más abundante en el tiempo 48 horas de fermentación. Es un microorganismo que se ha reportado en el pozol en numerosas ocasiones y las investigaciones indican que este género se encuentra desde

las primeras 9 horas y aumenta conforme la fermentación del pozol se lleva a cabo (Ampe *et al.* 1999a, Ampe *et al.* 1999b, Nuraida *et al.* 1995).

Estos resultados coinciden con lo reportado por Rizo en 2015, donde en un análisis proteómico realizado a una muestra de pozol fermentada por 15 días, *Streptococcus* fue el género del cual se identificaron una mayor cantidad de proteínas, seguido de *Lactococcus* y *Lactobacillus*.

Con respecto a las enterobacterias, observamos que el género *Escherichia* está presente desde el tiempo cero horas y aunque disminuye su abundancia, se mantienen hasta el final de la fermentación, lo que concuerda con el análisis microbiológico realizado en este trabajo y con reportes como el de Giles (2012). Las proteínas de éste género representan el 3% del total.

Se identificaron también algunas proteínas de bacterias patógenas como *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella* y *Listeria* en cantidades muy bajas. Esto porque una de las características más significativas de los alimentos fermentados es que durante su proceso fermentativo se inhiben microorganismos patógenos, esta inhibición puede darse como consecuencia del crecimiento de las BAL que compiten por los nutrientes (consumidos preferentemente por quienes llevan a cabo la fermentación, al crecer de forma masiva) y a que se producen sustancias antimicrobianas, como ácidos orgánicos o bacteriocinas (Wacher 1993).

La mayoría de los microorganismos patógenos se ven inhibidos o disminuyen la concentración de éstos, debido al descenso de pH causado por las BAL y la producción de bacteriocinas, lo que trae como consecuencia una menor cuenta de esta microbiota patógena. Sin embargo, hay microorganismos patógenos que llegan a sobrevivir al proceso de fermentación y/o se incorporan al alimento por contaminación cruzada (Llanos 2015).

Una de las propiedades que tienen algunos patógenos presentes en el pozol, es la capacidad de sobrevivir en condiciones ácidas (Sainz *et al.* 2005). Esta resistencia a un bajo pH es importante para los patógenos transmitidos por alimentos, ya que requieren sobrevivir el paso por el estómago, que se encuentra a valores de pH muy bajos (2-3), por lo que al incrementar su resistencia al pH bajo aumentan también su virulencia. Esto los ayuda a sobrevivir a la fermentación ácida del pozol.

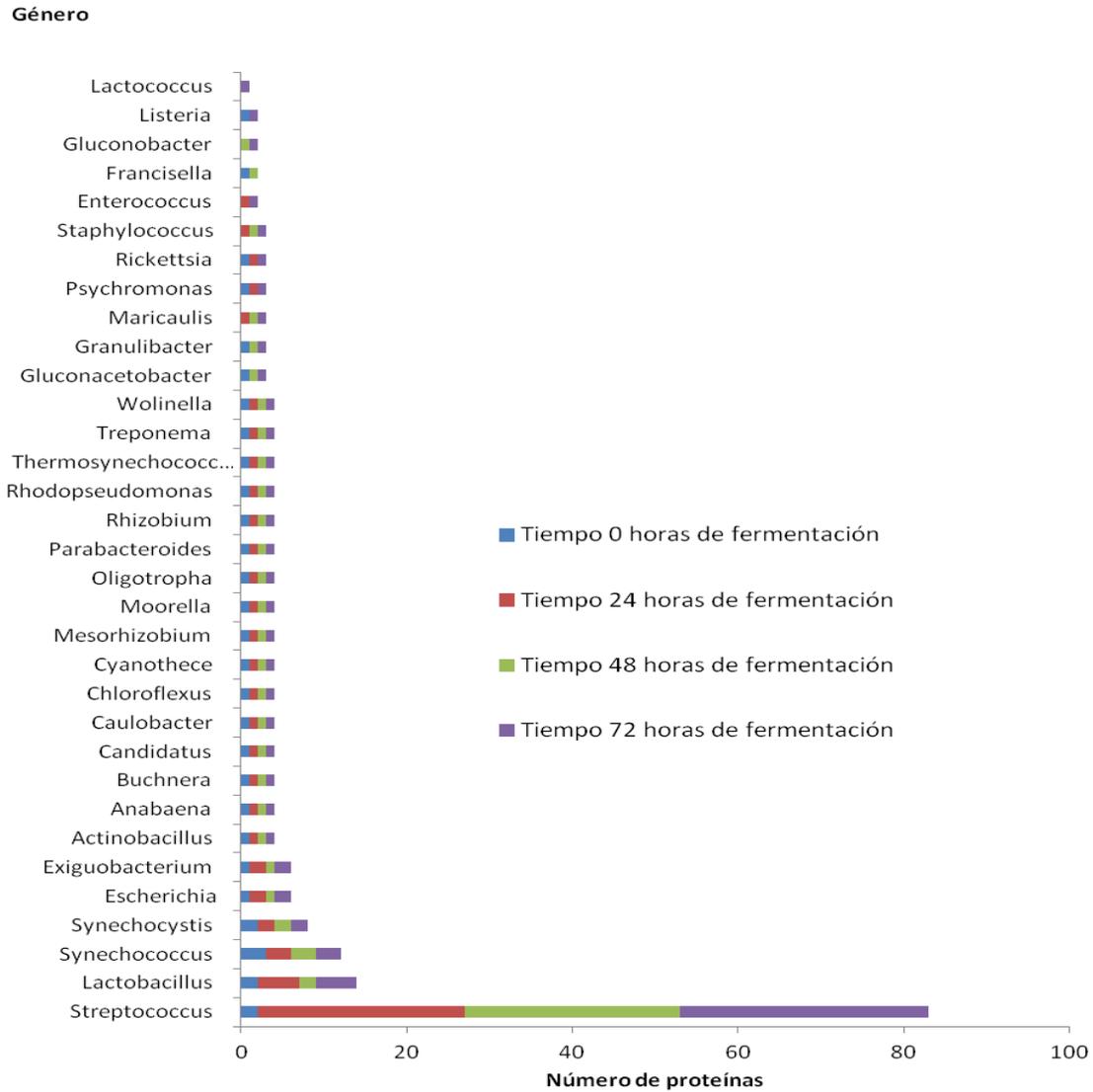


Figura 7.14 Número de proteínas identificadas en la base de datos de bacterias con el método de extracción A. Se muestra la gráfica de la distribución del número de proteínas identificadas por género y tiempo de fermentación. Las proteínas se identificaron a partir de 2 péptidos únicos en el análisis MS/MS.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

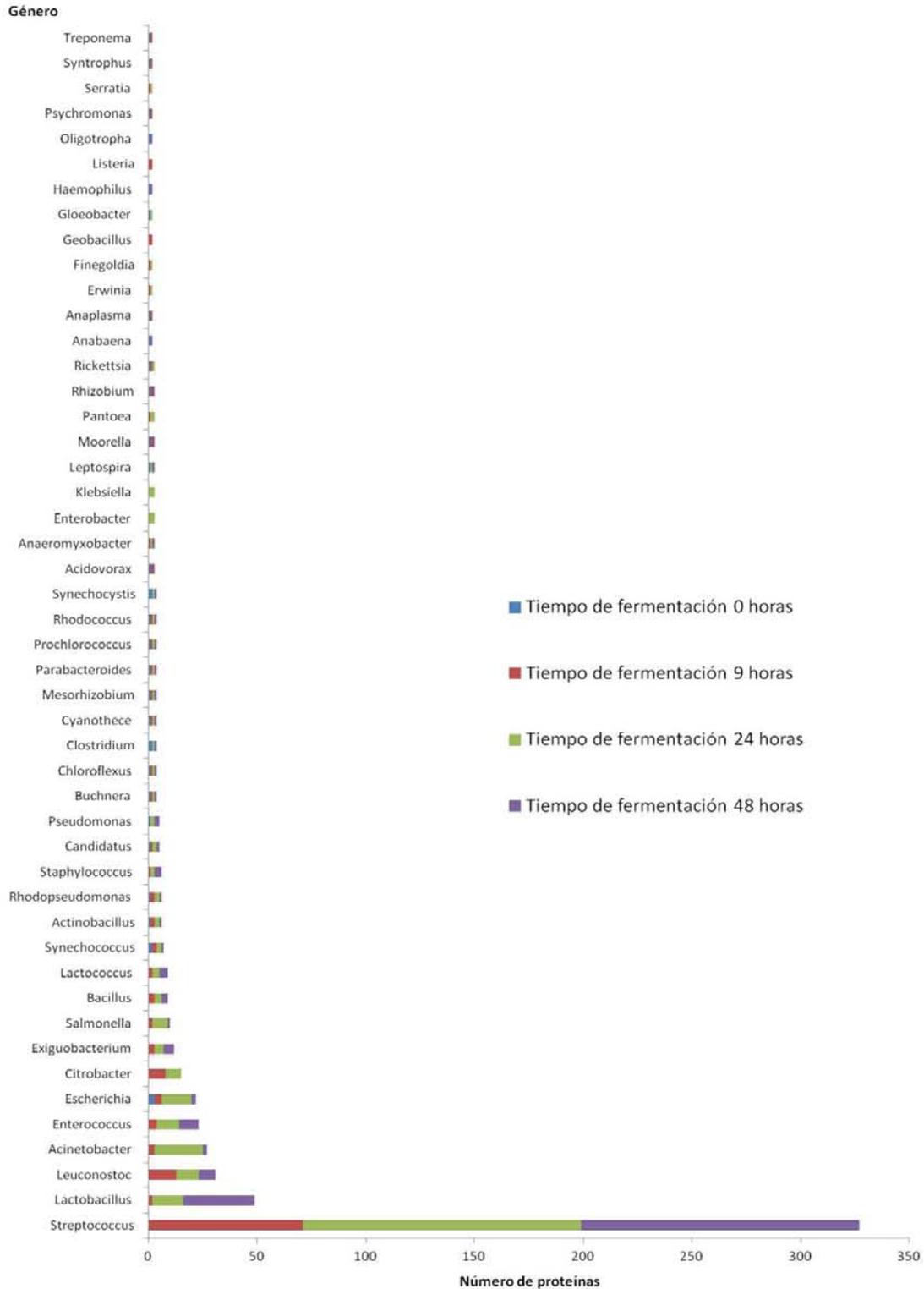


Figura 7.15 Número de proteínas identificadas en la base de datos de bacterias con el método de extracción B. Se muestra la gráfica de la distribución del número de proteínas identificadas por género y tiempo de fermentación. Las proteínas se identificaron a partir de 2 péptidos únicos en el análisis MS/MS.

- Hongos y levaduras

Se lograron identificar 150 proteínas de hongos y levaduras con el método A, y 249 proteínas de éstos con el método B a partir de 2 péptidos únicos. Al igual que en la comparación con las bacterias se logró identificar un mayor número de proteínas a partir de la extracción de proteínas con el método B.

Se observa que los hongos están presentes durante toda la fermentación (desde el tiempo cero hasta las 48 horas), lo cuál coincide con el reporte del análisis microbiológico (sección 7.1) que indica presencia de hongos a lo largo de todos los tiempos estudiados de fermentación (Figuras 7.16 y 7.17).

En comparación con las bacterias, los hongos presentaron una menor diversidad en cuanto a número de géneros, esto puede ser debido a que se encuentran en una menor concentración (de hasta seis órdenes de magnitud por debajo de las bacterias lácticas) ya que sus ciclos de crecimiento son mucho más lentos que los de las bacterias.

Para ambos métodos las proteínas mayoritarias pertenecen a los géneros *Neurospora*, *Schizosaccharomyces*, *Saccharomyces* y *Aspergillus*. Con el método de extracción B, las proteínas de estos hongos tienen un 24, 20, 17 y 7% de abundancia respectivamente.

El género *Neurospora*, que resultó ser el más abundante, no ha sido reportado previamente en el pozol; sin embargo, los hongos pertenecientes a este género han sido aislados de diversos alimentos fermentados como pan, ensilados, carne y fruta almacenada (Ho 1986); además es ampliamente usado en la producción de oncom, que es un alimento fermentado de soya o cacahuate muy popular en Indonesia (Griffiths y Yang 1993, Sutton 2014).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

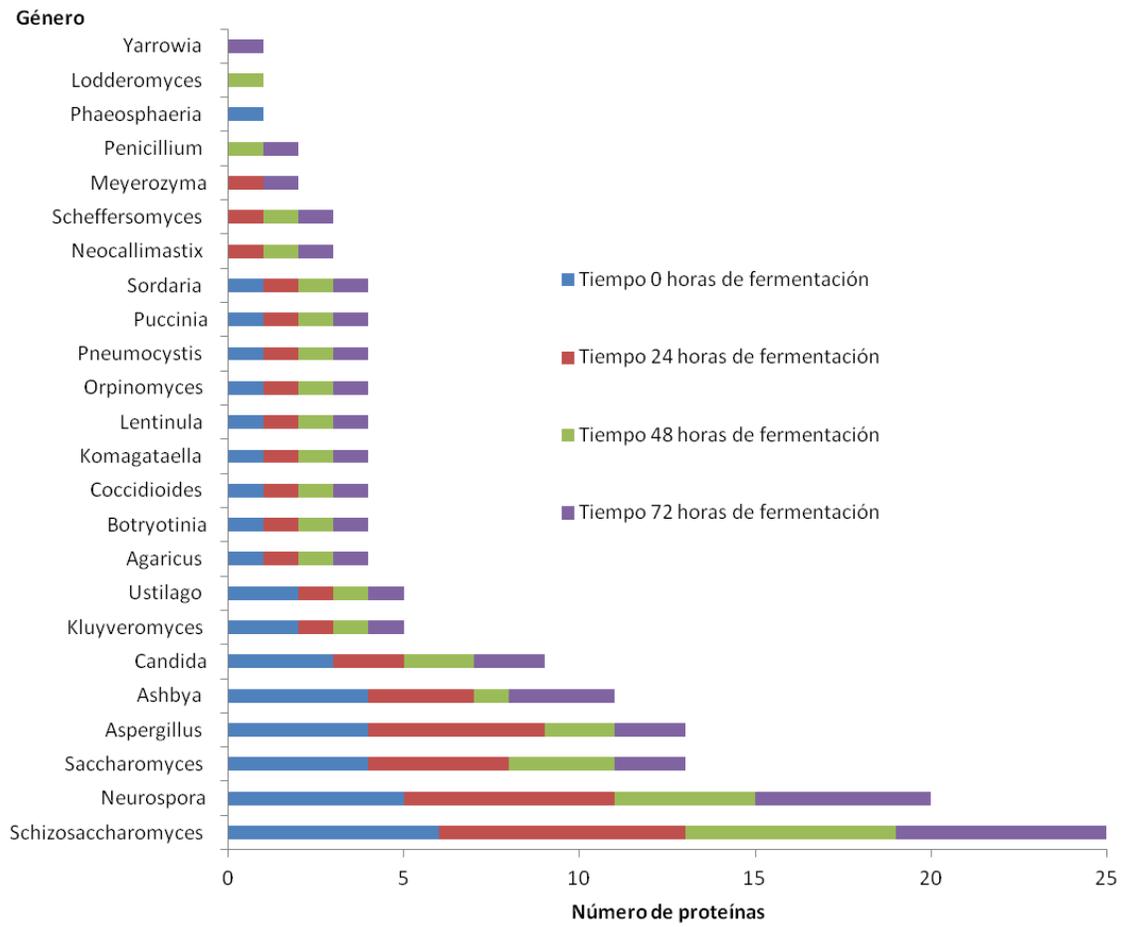


Figura 7.16 Número de proteínas identificadas en la base de datos de hongos y levaduras con el método de extracción A. Se muestra la gráfica de la distribución del número de proteínas por género y tiempo de fermentación. Las proteínas se identificaron a partir de 2 péptidos únicos en el análisis MS/MS.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

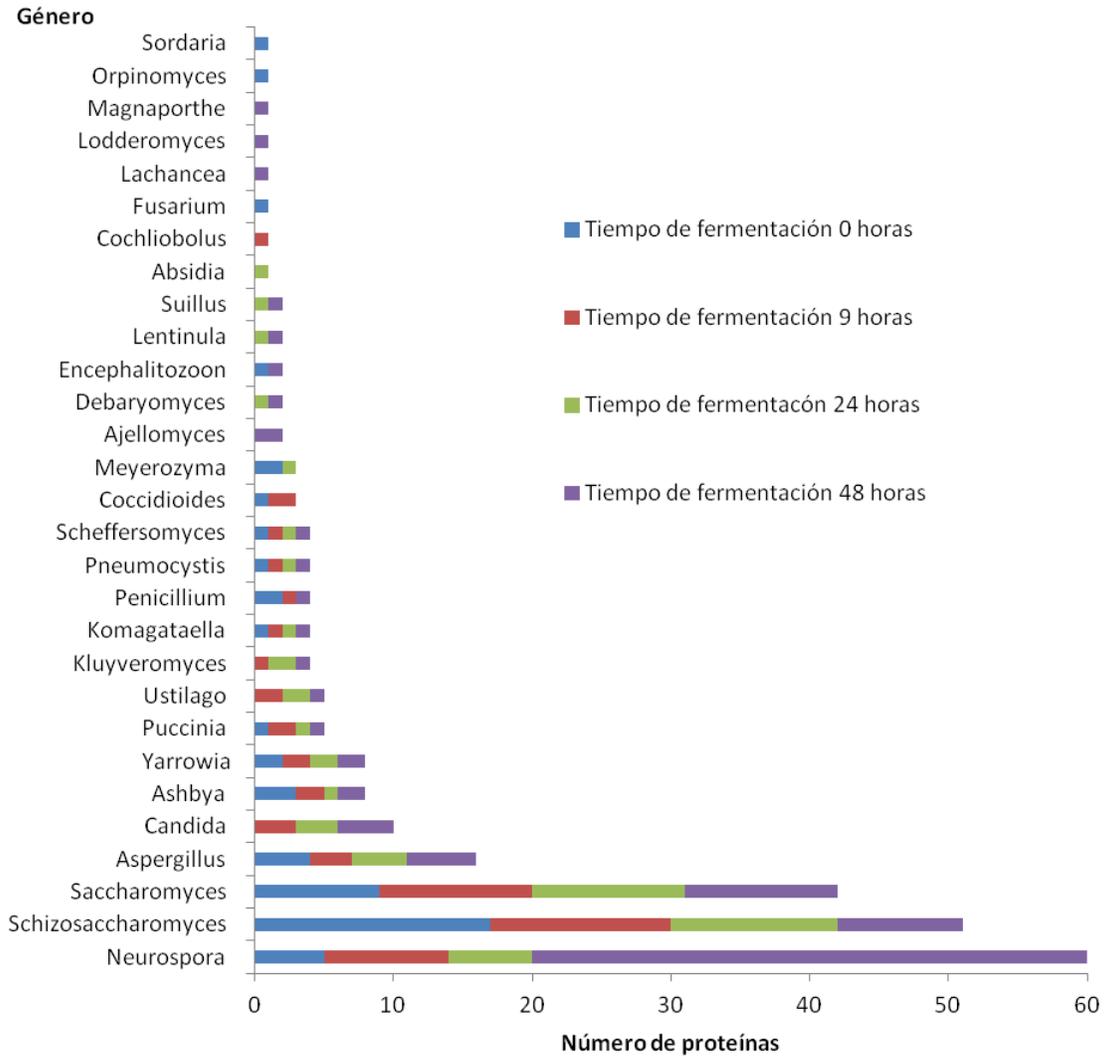


Figura 7.17 Número de proteínas identificadas en la base de datos de hongos y levaduras con el método de extracción B. Se muestra la gráfica de la distribución del número de proteínas por género y tiempo de fermentación. Las proteínas se identificaron a partir de 2 péptidos únicos en el análisis MS/MS.

8 Conclusiones

- El periodo de mayor acidificación en el pozol se da entre las 6 y las 24 horas de fermentación, lo que coincide con la fase de crecimiento exponencial y por lo tanto con una mayor actividad metabólica que conlleva a la generación de ácidos orgánicos.
- Se identificaron enzimas de hongos y levaduras relacionadas con la degradación de celulosa y hemicelulosa, sugiriendo una mayor actividad glicósido-hidrolasa por parte de los hongos.
- Dentro de los hongos los géneros más abundantes fueron *Neurospora*, *Schizosaccharomyces*, *Saccharomyces* y *Aspergillus*.
- La mayor diversidad microbiológica en el pozol fue bacteriana, predominando las bacterias lácticas, lo cual otorga al producto sus características ácidas.

9 Perspectivas

- Buscar las actividades celulolítica y xilanolítica en la masa del pozol.
- Proponer un modelo metabólico de la dinámica de fermentación del pozol.

10 Bibliografía

- Ampe F, Ben Omar N, Guyot J. 1999a. 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
- Ampe F, Ben Omar N, Moizan C, Wachter C, Guyot J. 1999b. Polyphasic study of spatial distribution of microorganisms in mexican pozol, a fermented maize dough, demonstrates the need for cultivation-independent methods to investigate traditional fermentations. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 5464-73
- Ashburner M, Ball C, Blake J, Botstein D, Butler H, Cherry M, Davis A, Dolinski K, Dwight S, Eppig J, Harris M, Hill D, Issel-Tarver L, Kasarskis A, Lewis S, Matese J, Richardson J, Ringwald M, Rubin G y Sherlock G. 2000. Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nature Genetics*. 25: 25-29
- Badui, S. 2006. *Química de los alimentos*. Cuarta edición. México: Pearson Educación. 736 pp.
- Bagheri A, Khodarahmi R, Mostafaie A. 2014. Purification and biochemical characterisation of glucoamylase from a newly isolated *Aspergillus niger*: Relation to starch processing. *Food Chemistry* 161: 270-78
- Bajpai P. 1997. Microbial xylanolytic enzyme system: Properties and applications. *Advances in Applied Microbiology* 43: 141-94
- Bégum P, Lemaire M. 1996. The cellulosome: An extracellular, multiprotein complex specialized in cellulose degradation. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 31: 201-36
- Belitz H-D, Grosch W. 1997. *Química de los alimentos* pp. 1134. España: Editorial Acribia. 1134 pp.
- Ben Omar N, Ampe F. 2000. Microbial community dynamics during production of the Mexican fermented maize dough pozol. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 3664-73
- Bendixen E. 2013. Understanding the proteome En *Proteomics in Foods: Principles and Applications*, ed. F Toldrá, L Nollet, pp. 589. New York: Springer

- Bernfeld P. 1951. Enzymes of starch degradation and synthesis En: Advances in enzymology and related areas of Molecular Biology, ed. FF Nord, pp. 379-428. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons
- Boyer C, Shannon J. 1987. Carbohidrates of the kernel En: Corn Chemistry and Technology, ed. S Watson, P Ramstad, pp. 253-72. St Paul Minnessota: American Association of Cereal Chemist
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-54
- Brandão AR, Barbosa HS, Arruda MAZ. 2010. Image analysis of two-dimensional gel electrophoresis for comparative proteomics of transgenic and non-transgenic soybean seeds. *Journal of Proteomics* 73: 1433-40
- Brock TD, Madigan MT, Martinko JM, Parker J. 2003. *Biología de los microorganismos*. España: Pearson-Prentice Hall. 420-22 pp.
- Cabeza-Herrera EA. 2006. Bacterias ácido-lácticas (BAL):aplicaciones como cultivos estárter para la industria láctea y cárnica. Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Básicas, Universidad de Pamplona, España.
- Cañas A, Bárzana E, Owens J, Wachter C. 1993. La elaboración de pozol en los altos de Chiapas. *Ciencia* 44: 219-29
- 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, González LJ, Padrón G. 2004. Proteómica. En *Combinatoria molecular*, ed. R Silva, M Mariña, pp. 367-78. La Habana: Elfos scientiae
- Coda R, Cagno RD, Gobbetti M, Rizzello CG. 2014. Sourdough lactic acid bacteria: Exploration of non-wheat cereal-based fermentation. *Food Microbiology* 37: 51-58
- Colgrave ML, Goswami H, Howitt CA, Tanner GJ. 2013. Proteomics as a tool to understand the complexity of beer. *Food Research International* 54: 1001-12
- Collar C. 2016. Bread: Types of Bread. *Encyclopedia of Food and Health*: 500-07
- Cravioto O, Cravioto G, Massieu H, Guzman J. 1955. El pozol, forma indígena de consumir el maíz en el sureste de México y su aporte de nutrientes a la dieta. *Ciencia* 15: 27-30

- Cutler P, Heald G, White IR, Ruan J. 2003. A novel approach to spot detection for two-dimensional gel electrophoresis images using pixel value collection. *Proteomics* 3: 392–401
- Chevalier F. 2010. Highlights on the capacities of "Gel-based" proteomics. *Proteome Science* 8: 23
- Choe LH, Lee KH. 2003. Quantitative and qualitative measure of intralaboratory two-dimensional protein gel reproducibility and the effects of sample preparation, sample load, and image analysis. *Electrophoresis* 24: 3500-07
- DeVuyst L, Degeest B. 1999. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 23: 153-77
- Di Girolamo F, D'Amato A, Righetti PG. 2011. Horam nonam exclamavit: sitio. The trace proteome of your daily vinegar. *Journal of Proteomics* 75: 718-24
- Díaz G, Guyot J, Ruiz-Terán F, Morlon-Guyot J, Wachter C. 2003. Microbial and physiological characterization of weakly amylolytic but fast-growing lactic acid bacteria: a functional role in supporting microbial diversity in pozol, a Mexican fermented maize beverage. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 4367-74
- El-Fallal A, Abou M, El-Sayed A, Omar N. 2012. Starch and microbial α -amylases: From concepts to biotechnological applications in carbohydrates – *Comprehensive studies on glycobiology and glycotecnology*, ed. Chuan-Fa Chang, pp. 459-488.
- 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. *Journal of Food Microbiology* 64: 21-31
- Fadda S. 2012. Contribution of proteomics for diving into the lactic acid bacteria role and the modification of the food matrix during fermentation. *Single-Cell Biology* 1: 1-2
- Fernández R, Morales LA, Gálvez A. 2013. Importancia de los maíces nativos de México en la dieta nacional. Una revisión indispensable. *Revista Fitotecnia Mexicana* 36: 275-83
- Fey SJ, Larsen PM. 2001. 2D or not 2D. *Current Opinion in Chemical Biology* 5: 26-33
- Flores-Ramírez E. 2008. Pozol: una bebida fermentada tradicional de México. *Cienciorama Universidad Nacional Autónoma de México*. [En línea]: Disponible en <http://www.cienciorama.unam.mx/#!titulo/177/?pozol--una-bebida-fermentada-tradicional-de-mexico>
- Flores M. 1996. Caracterización fisiológica de las bacterias lácticas aisladas del pozol. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM, México, DF.

- Gallardo JM, Ortea I, Carrera M. 2013. Proteomics and its applications for food authentication and food-technology research. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 52: 135-41
- Giles M. 2012. Estudio de la sobrevivencia de enterobacterias aisladas del pozol durante la fermentación láctica de masas y suspensiones de harina de maíz nixtamalizada. Tesis de Maestría. UNAM. México, DF.
- Giraud E, Champailier A, Raimbault M. 1994. Degradation of raw starch by a wild amylolytic strain of *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 4319-23
- Giribaldi M, Giuffrida MG. 2010. Heard it through the grapevine: Proteomic perspective on grape and wine. *Journal of Proteomics* 73: 1647-55
- Granier F. 1988. Extraction of plant proteins for two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* 9: 712-18
- Greenfield H, Southgate DAT. 2006. Datos de composición de alimentos: obtención, gestión y utilización. FAO. 330 pp.
- Griffiths A, Yang X. 1993. Senescence in natural populations of *Neurospora intermedia*. *Mycological Research* 97: 1379-87
- Guo G, Lv D, Yan X, Subburaj S, Ge P. 2012. Proteome characterization of developing grains in bread wheat cultivars (*Triticum aestivum*). *BMC Plant Biology* 12: 147
- Gygi SP, Corthals GL, Zhang Y, Rochon Y, Aebersold R. 2000. Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97: 9390-95
- Haltrich D, Nidetzky B, Kulbe KD, Steiner W, Zupancic S. 1996. Production of fungal xylanases. *Bioresource Technology* 58: 137-61
- Havlis J, Thomas H, Sabela M, Shevchenko A. 2003. Fast-response proteomics by accelerated in-gel digestion of proteins. *Analytical Chemistry* 75: 1300-06
- Herrera T, Ulloa M. 1975. Antagonismo del pozol y de *Agrobacterium azotophilium* sobre diversas especies de bacterias y hongos, algunas patógenas para el hombre. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 17: 143-47
- Hettich RL, Sharma R, Chourey K, Giannone RJ. 2012. Microbial metaproteomics: identifying the repertoire of proteins that microorganisms use to compete and cooperate in complex environmental communities. *Current Opinion in Microbiology* 15: 373-80

- Ho C. 1986. Identity and characteristics of *Neurospora intermedia* responsible for oncom fermentation in Indonesia. *Food Microbiology* 3: 115-32
- Jackson RS. 2016. Wines: Wine Tasting. *Encyclopedia of Food and Health*: 577-84
- Jardin J, Mollé D, Piot M, Lortal S, Gagnaire V. 2012. Quantitative proteomic analysis of bacterial enzymes released in cheese during ripening. *International Journal of Food Microbiology* 155: 19-28
- Jay JM. 1997. *Microbiología Moderna de los Alimentos*. pp. 442-449. Zaragoza, España: ACRIBIA.
- Jerónimo E, X.Malcata F. 2016. Cheese: Composition and Health Effects. *Encyclopedia of Food and Health*: 741-47
- Leary DH, Hervey WJ, Deschamps JR, Kusterbeck AW, Vora GJ. 2013. Which metaproteome? The impact of protein extraction bias on metaproteomic analyses. *Molecular and Cellular Probes* 27: 193-99
- Livens S. 2016. Beer: Fermentation. *Encyclopedia of Food and Health*: 339-44
- Llanos A. 2015. Estudio de la actividad antimicrobiana de cepas de *Streptococcus* aisladas del pozol y su efecto en la inhibición de bacterias patógenas presentes en alimentos y en la cavidad oral. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM, México, DF.
- Loeza N. 1991. Efecto de la nixtamalización en la fermentación del pozol. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM, México, DF.
- López E, Llera E. 2010. Caracterización de los combustibles sólidos. En: *Energía de la biomasa*, ed. F Sebastián-Nogués, D García-Galindo, A Rezeau, pp. 557. Zaragoza: Prensas Universitarias de Zaragoza
- López G. 2006. Estudio de la variabilidad microbiológica del pozol mediante PCR-DGGE con el gen *rpoB*. Tesis de Maestría. UNAM, México, D.F.
- Mendez-Albores J. 2004. Aflatoxins in pozol, a nixtamalized, maize-based food. *International Journal of Food Microbiology* 94: 211-15
- Morales M. 2016. Análisis bromatológico y determinación de factores tóxicos naturales de los hongos silvestres Morochike (*Amanita caesarea*) y Sojachi (*Amanita rubescens*) en forma natural y cocidos, consumidos en la sierra Tarahumara de Chihuahua. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM, México, DF.
- Nuraida L, Wacher MC, Owens JD. 1995. Microbiology of pozol, a Mexican fermented maize dough. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 11: 567-71

- Oliva G. 2010. Cuantificación diferencial de bacterias lácticas del pozol a partir de cultivos mixtos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM, México, D.F.
- Ozturka I, Caliskana O, Tornukb F, Ozcanc N, Yalcina H, et al. 2015. Antioxidant, antimicrobial, mineral, volatile, physicochemical and microbiological characteristics of traditional home-made Turkish vinegars. *LWT-Food Science and Technology* 63: 144-51
- Paredes O, Guevara F, Bello L. 2008. La nixtamalización y el valor nutritivo del maíz. *Ciencias* 92: 60-70
- Parra R. 2010. Bacterias ácido lácticas: Papel funcional en los alimentos. *Facultad de Ciencias Agropecuarias* 8: 93-104
- Perez Pulido R, Ben Omar N, Abriouel H, Lucas Lopez R, Martinez Canamero M, Galvez A. 2005. Microbiological study of lactic acid fermentation of caper berries by molecular and culture-dependent methods. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 7872-79
- Pozo-Bayón MA, Moreno-Arribas MV. 2016. Sherry wines: Manufacture, composition and analysis. *Encyclopedia of Food and Health*: 779-84
- Ramagli LS, Rodríguez LV. 1985. Quantitation of microgram amounts of protein in two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis sample buffer. *Electrophoresis* 6: 559-63
- Rizo J. 2012. Enzimas amilolíticas del pozol. Aproximación proteómica. UNAM. Tesis de Licenciatura, México, D.F. 88 pp.
- Rizo J. 2015. Estudio proteómico de las hidrolasas del pozol. UNAM. Tesis de Maestría, México, D.F. 107 pp.
- Rul F, Zagorec M, Champomier-Vergès M-C. 2013. Lactic acid bacteria in fermented foods. En: *Proteomics in foods: Principles and applications*, ed. F Toldrá, LML Nollet, pp. 261. New York: Springer
- Sainz T, Wachter C, Espinoza J, Centurión D, Navarro A. 2001. Survival and characterization of *Escherichia coli* strains in a typical Mexican acid-fermented food. *International Journal of Food Microbiology* 71: 169-76
- Sainz T, Perez J, Villseca J, Hernandez U, Eslava C, Mendoza G, Wachter C. 2005. Survival to different acid challenges and outer membrane protein profiles of pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from pozol, a Mexican typical maize fermented food. *International Journal of Food Microbiology* 105: 357-367

- Santillana R. 1995. Desarrollo de un método por cromatografía líquida de alta eficiencia para el análisis químico de nixtamal y pozol. Tesis de Maestría. UNAM, México D.F.
- Shallom D, Shoham Y. 2003. Microbial hemicellulases. *Current Opinion in Microbiology* 6: 219-28
- Steinkraus K. 1983. Lactic acid fermentation in the production of foods from vegetables, cereals and legumes. *Antonie van Leeuwenhoek* 49: 337-48
- Sutton BC. 2014. FUNGI: Overview of classification of the fungi. *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)* 1: 1-10
- Takao M, Akiyama K, Sakai T. 2002. Purification and characterization of thermostable endo-1,5-L-arabinase from a strain of *Bacillus thermodenitrificans*. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 1639-46
- Ulloa M. 1974. Mycofloral succession in pozol from Tabasco, Mexico. *Bol. Soc. Mex. Mic.* 8: 17-48
- Ulloa M, Herrera T, Lanza Gdl. 1971. Fijación de nitrógeno atmosférico por microorganismos del pozol *Revista Latinoamericana de Microbiología*: 113-24
- Ulloa M, Herrera T, Lappe P. 1987. Fermentaciones tradicionales indígenas de México. *Serie de Investigaciones Sociales. Instituto Nacional Indigenista.* 16: 13-20
- Ulloa M, Kurtzman C. 1975. Occurrence of *Candida parapsilosis*, *C. tropicalis*, and *Saccharomyces cerevisiae* in pozol from Tabasco, México. *Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología* 9: 7-12
- Villegas A. 2013. Cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado a masas (HPLC-MS) como herramienta para la identificación de proteínas. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM, México, DF.
- Volkov PV, Rozhkova AM, Gusakov AV, Zorov IN, Sinitsyn AP. 2015. Glucoamylases from *Penicillium verruculosum* and *Myceliophthora thermophila*: Analysis of differences in activity against polymeric substrates based on 3D model structures of the intact enzymes. *Biochimie* 110: 45-51
- Wacher C. 1993. Alimentos y bebidas fermentadas tradicionales. En: *Biotechnología alimentaria*, ed. M García Garibay, R Quintero Ramírez, A López-Munguía Canales, pp. 635. México: Limusa
- Wacher C. 1999. El pozol. *Cuadernos de nutrición* 22: 125-27
- Wacher C, Cañas A, Bárzana E, Lappe P, Ulloa M, Owens D. 2000. Microbiology of Indian and Mestizo pozol fermentations. *Food Microbiology* 17: 251-56

BIBLIOGRAFÍA

- Wacher C, Cañas A, Cook PE, Barzana E, Owens JD. 1993. Sources of microorganisms in pozol, a traditional Mexican fermented maize dough. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 9: 269-74
- Wright PC, Noirel J, Ow SY, Fazeli A. 2012. A review of current proteomics technologies with a survey on their widespread use in reproductive biology investigations. *Theriogenology* 77: 738-65.e52
- Zhou K, Slavin M, Lutterodt H, Whent M, Eskin M, Yu L. 2013. Cereals and Legumes In *Biochemistry of Foods*, ed. M Eskin, F Shahidi, pp. 556. San Diego: Elsevier