

Enfoque multidisciplinario para el estudio de un alimento fermentado tradicional a base de maíz

Jocelin Rizo¹, Teresa Martínez², Brenda Cruz², Aidé Martínez², Daniel Guillén², Sergio Encarnación¹, Carmen Wachter³, Romina Rodríguez-Sanoja^{2*}.

¹Centro de Ciencias Genómicas, UNAM, Cuernavaca, Morelos.

²Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Ciudad de México.

³Facultad de Química, UNAM, Ciudad de México.

*romina@iibiomedicas.unam.mx

Resumen

El pozol es una bebida de origen maya, ácida, y no alcohólica, elaborada con masa de maíz nixtamalizado y fermentada de forma natural. Es consumido en la región sureste del país como alimento esencial en la dieta de la población indígena o como bebida refrescante por el resto de la población.

Debido a su importancia dentro de las poblaciones que lo consumen, son varios los estudios microbiológicos que se han llevado para tratar de entender el proceso de fermentación. Se ha demostrado que en este alimento se desarrolla una microbiota muy diversa y abundante, compuestas por bacterias, principalmente ácido lácticas, hongos y levaduras. Sin embargo, se ha dejado de lado el papel que estos tienen desde el punto de vista ecológico y funcional en el alimento.

En este trabajo, se realizó el estudio de la fermentación del pozol a través de un enfoque multidisciplinario que involucró el análisis microbiológico, químico, bioquímico y metaproteómico. Se estudiaron los cambios que se generan durante la fermentación del pozol, se determinaron cuáles son las fuentes de carbono y nitrógeno que se utilizan, y finalmente, se generó un mapa metabólico del sistema de manera integral que permitió elucidar el potencial metabólico de la microbiota.

Palabras Claves: Pozol, alimentos fermentados tradicionales, metaproteómica, fijación de nitrógeno

Abstract

Pozol is a Mayan acidic, refreshing and nonalcoholic acidic beverage made of nixtamalized maize dough naturally fermented. It is consumed in the country's southeastern region as an essential food in the diet of the indigenous population or as a refreshing drink at any time of the day by the rest of the population.

Due to its importance within the populations that consume it, several microbiological studies have been carried out to try to understand the fermentation process. It has been shown that a very diverse and abundant microbiota develops in this food, composed of bacteria, mainly lactic acid, fungi, and yeasts. However, these microorganisms' role from an ecological and functional point of view has not been determined.

In this work, pozol fermentation was studied through a multidisciplinary approach that involved microbiological, chemical, biochemical and metaproteomic analysis. The changes generated during the fermentation of pozol were studied, the carbon and nitrogen sources used were determined and finally, a comprehensive metabolic map of the system was generated that allowed the metabolic potential of the microbiota to be elucidated.

Key Words: Pozol, traditional fermented foods, metaproteomics, nitrogen fixation

Introducción

En México, existen más de 200 alimentos y bebidas fermentadas tradicionales, los cuales no solo son parte esencial en la dieta de quienes los consumen, sino también tienen usos en la medicina tradicional y poseen relevancia a nivel cultural. Dentro de estos, el pozol es uno de los más estudiados en el país. Su origen data de la época prehispánica y por los escritos que se tienen de la época colonial se sabe que su consumo era exclusivo de los indígenas de Tabasco, Quintana Roo y Chiapas (Cañas et al., 1993).

El pozol se describe como una bebida fermentada de origen maya, ácida, y no alcohólica hecha a base de maíz nixtamalizado (Ulloa, 1987; Cañas et al., 1993). Es consumido como alimento esencial en la dieta o como bebida refrescante a cualquier hora del día. Además, tiene un importante uso en la medicina tradicional para el tratamiento de heridas superficiales o padecimientos gastrointestinales y como ofrenda en las ceremonias relacionadas con el cultivo y cosecha del maíz (Cañas et al., 1993).

La fermentación del pozol es llevada a cabo por una microbiota natural constituida por bacterias, hongos filamentosos y levaduras, que resulta de la inoculación del nixtamal durante el remojo y la molienda (Wacher et al., 1993). Dentro de las bacterias, las ácido lácticas (BAL) son el grupo predominante durante la fermentación y entre ellas, los géneros más abundantes son: *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* y *Weissella* (Ampe et al., 1999; Escalante et al., 2001; Ben & Ampe, 2000).

Dado que durante la nixtamalización (cocción de los granos en hidróxido de calcio), se reduce la concentración de mono- y disacáridos, dejando al almidón como la principal fuente de carbono fermentable, diferentes estudios se han enfocado en la búsqueda e identificación de microorganismos amilolíticos y sus enzimas (Nuraida et al., 1995; Díaz-Ruiz et al., 2003). Se ha demostrado que la actividad amilolítica de las BAL encontradas es menor a la reportada para otras bacterias lácticas aisladas de fermentaciones vegetales, mientras que para los hongos y levaduras los resultados no han sido reproducibles (Díaz-Ruiz et al., 2003; Ampe et al., 1999). En consecuencia, se ha planteado que además del almidón, la hidrólisis de otras fuentes de carbono, como la

celulosa y hemicelulosa, puede proveer de azúcares solubles a la microbiota para su crecimiento.

Así, se ha demostrado que *Streptococcus infantarius* ssp. *infantarius*, microorganismo predominante durante la fermentación, es capaz de crecer en xilano como única fuente de carbono gracias a su actividad xilanolítica y que varias cepas de *Weissella* solo pueden utilizar xilo-oligosacáridos como fuente de carbono, lo que indica que su crecimiento depende de la capacidad de otros microorganismos para degradar la hemicelulosa (Cooper-Bribiesca et al., 2018; López-Hernández et al., 2018).

Por otro lado, se ha reportado que la fermentación de la masa de maíz provoca un aumento en la concentración de nitrógeno total, proteína cruda, aminoácidos esenciales (lisina y triptófano) y vitaminas (niacina y riboflavina), cambios que resultan relevantes desde el punto de vista nutricional (Cravioto et al., 1955; Ulloa et al., 1971; Ramírez, 1987; Loaeza, 1991; Giles, 1995; Rizo, 2015). Algunos de estos cambios se han reportado en otros alimentos fermentados y se asocian al metabolismo de los microorganismos que se desarrollan durante la fermentación (Di Cagno et al., 2002; Leroy & Vuyst, 2004), sin embargo, este es el único alimento en el que se ha observado un incremento en el contenido de nitrógeno. Ulloa y colaboradores (1971) sugirieron que estos cambios son producto de la fijación de nitrógeno atmosférico y aunque en diferentes estudios se han reportados incrementos del 10% al 69%, hasta la fecha no ha sido posible demostrar la fijación biológica de nitrógeno en el pozol. Así, el objetivo de este trabajo fue realizar el estudio integral de la fermentación del pozol, para determinar la estructura y los cambios de las comunidades microbianas, cómo estas modifican y utilizan el sustrato y así poder determinar su papel funcional durante la fermentación.

Materiales y métodos

1. Muestreo

Se adquirió masa de maíz nixtamalizada de dos productores diferentes en el mercado de Pino Suárez en la ciudad de Villahermosa, Tabasco. Las muestras se mezclaron para formar bolas de 300g, las cuales se envolvieron en hojas de plátano previamente sanitizadas y se incubaron a 37°C. Las fermentaciones fueron independientes y por

triplicado, y se tomaron muestras a las 0, 9, 24 y 48 h. Las muestras recolectadas se almacenaron a -80°C hasta su uso.

2. Análisis microbiológico

Se realizó en el Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química, UNAM.

Se realizó el conteo por triplicado de mesófilos aerobios, bacterias lácticas, lácticas amilolíticas, enterobacterias, mohos y levaduras (Wacher et al., 2000; Nuraida et al., 1995; Ben Omar & Ampe, 2000).

3. Análisis químicos

3.1 pH

Se suspendieron 2 g de la masa de maíz macerada con CO_2 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. Cada determinación se realizó por triplicado

3.2. Análisis proximal

Se realizó en el Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (UNAM) y consistió en la cuantificación del contenido de ceniza, nitrógeno, proteína cruda ($\text{Nx}6.25$) (Mariotti et al., 2008), lípidos, fibra cruda y extracto libre de nitrógeno según el método oficial 992.23 de la AOAC (2000).

4. Análisis bioquímico

La actividad nitrogenasa se midió mediante el método de reducción de acetileno a etileno (ARA por sus siglas en inglés). Los ensayos se realizaron en viales de 10 mL que contenían 5 mL de medio semisólido libre de nitrógeno MMK (2,2 g/L de $\text{N}_2\text{HPO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$, 0,425 g/L de $\text{N}_2\text{H}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$, 0,435 g/L $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 1,0 g/L sacarosa) o medio MMp/299 (3,8 g/L K_2HPO_4 , 3 g/L KH_2PO_4 , 0,1 g/L $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,005 g/L $\text{Fe}(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)$, 0,1 g/L CaCl_2 y 1,0 g/L sacarosa). Los tubos de vidrio se sellaron con goma hermética y se inyectaron 0.6 mL de acetileno retirando un volumen igual de aire del tubo. La producción de etileno se detectó a las 24 h inyectando 0.4 mL del gas en un cromatógrafo de gases Bruker modelo GC 450 con un detector de ionización de llama (FID) y una columna Poropak-N. Los cromatogramas se utilizaron para integrar las áreas de las curvas de acetileno (C_2H_2) y etileno (C_2H_4) para estimar la producción de C_2H_4 (Rogel et al., 2001).

Se realizó el ensayo ARA directamente en las muestras de pozol, para ello se pesaron 150 g de masa, se homogenizaron en 100 mL de NaCl al 0.9% (p/v) y se inocularon 100 μL de la solución en medio semisólido MMK y MMp/299. Como control negativo se usaron viales con volúmenes similares de medio de cultivo sin inocular y como control positivo se utilizó a *Klebsiella varicola* sp. nov. ATCC® BAA-830™, de la colección del Centro de Ciencias Genómicas (CCG, UNAM).

5. Aislamiento de bacterias

Se realizó el aislamiento de bacterias de los viales donde se observó actividad nitrogenasa. Las muestras de pozol se homogenizaron en NaCl al 0.9% (p/v), se realizaron diluciones seriadas con la misma disolución y el homogenizado (100 μL) se sembró en placas MMK y MMp/299. Las placas se incubaron a 29°C hasta que se observó crecimiento de colonias. Se seleccionaron colonias con características morfológicas distintas y se inocularon en el medio semisólido correspondiente para realizar el ensayo ARA. Las colonias positivas se caracterizaron mediante tinción de Gram y morfología. Los cultivos puros se almacenaron en glicerol al 20% como crioprotector a -80°C .

6. Identificación molecular

6.1. Amplificación del gen 16S rRNA y del gen *nifH*

Se hizo la amplificación de la región V1 a la V6 del gen 16S rRNA y del gen *nifH* que codifica para la dinitrogenasa reductasa. La amplificación del fragmento del gen 16S rRNA se realizó con los primers universales pA (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) forward y 16R1093 (GTTGCGCTCGTTGCGGGACT) reverse (Ramírez-Chavarín et al., 2010). La PCR se realizó utilizando las siguientes condiciones: precalentamiento (94°C , 2 min), seguido de 30 ciclos de desnaturalización (94°C , 1 min), hibridación (65°C , 1 min), extensión (72°C , 1 min) y un paso de extensión final (72°C , 7 min).

Para la amplificación de gene gen *nifH* se usaron los primers Polf (TGCGAYCCSAARGCBGACTC) forward y Polr (ATSGCCATCATYTCRCCGGA) (Rosenblueth et al., 2003) reverse. La mezcla de reacción se incubó durante 2 min a 94°C y luego se sometió a 30 ciclos de desnaturalización (94°C , 4 min), hibridación

(65°C, 1 min), extensión (72°C, 1 min) y un paso de extensión final (72°C, 5 min).

6.2. Análisis de las secuencias

Los fragmentos del gen 16S rRNA y *nifH* se purificaron con el sistema de purificación de ADN Wizard PCR Preps (Promega). Los productos de PCR purificados fueron secuenciados en el Laboratorio de Secuenciación Genómica de la Biodiversidad y de la Salud, UNAM. La calidad de las secuencias se verificó con el programa Chromas 2.6.6 y se corrigieron manualmente. Para la identificación de las bacterias, las secuencias curadas fueron analizadas con el programa online Blastn usando la base de datos de secuencias de 16S rRNA para bacterias y arqueas depositada en NCBI y con la base de datos de colección de nucleótidos (nr/nt).

7. Experimento de inoculación del pozol

Se seleccionó la bacteria con mayor actividad nitrogenasa y se inoculó en la masa de pozol. Para ello, la bacteria se creció toda la noche en agar Luria-Bertani a 29°C y se inoculó asepticamente en 1 g de pozol a una concentración de 10⁷ UFC. El pozol inoculado se agregó a viales que contenían agar semisólido.

En este experimento se usaron dos controles. En el primer control, el pozol sin inocular se agregó a los viales con agar semisólido. En el segundo control, la bacteria aislada se inoculó directamente a la misma concentración en medio semisólido MMK y agar semisólido. Finalmente se realizó el ensayo ARA.

8. Análisis estadísticos

Los datos se analizaron con una ANOVA (Análisis de Varianza Unidireccional) utilizando el software GraphPad Prism, versión 4 y las diferencias significativas se estimaron con una prueba post-hoc de Tukey.

9. Análisis metaproteómico

9.1. Extracción de proteínas

La extracción de proteínas se realizó por triplicado para cada tiempo de fermentación utilizando un método que combina dos enfoques metodológicos previamente reportados (Ampe et al., 1999; Cárdenas et al., 2014; Leyva, 2018). Brevemente, una muestra representativa de pozol se pulverizó con CO₂ sólido y se pesó 1 g de muestra, esta se mezcló mecánicamente a temperatura

ambiente durante dos horas con 10 mL de buffer citrato-fosfato 0.1 M, pH 5 con inhibidor de proteasa 1:100 (Sigma P2714). Las muestras se centrifugaron (800 x g, 10 min) y se recuperó el sobrenadante. Se realizaron dos extracciones más con 10 mL de buffer y agitación mecánica durante 30 min. Se colectaron los sobrenadantes y se centrifugaron (13.200 x g, 10 min). El pellet obtenido se utilizó para la extracción de proteínas como se describió anteriormente (Cárdenas et al., 2014).

La concentración de proteína se cuantificó con el kit Bio-Rad Protein Assay. Para evitar interferencias relacionadas con el buffer de extracción, las muestras se precipitaron con ácido tricloroacético (TCA) al 10% (p/v), se solubilizaron en 50 µl de urea 6 M y finalmente se ajustaron a un volumen de 750 µl con agua destilada.

9.2. Secuenciación de proteínas

Los extractos obtenidos se analizaron en geles SDS-PAGE al 10% para la separación de las proteínas, el gel se tiñó con azul de coomassie y se escindieron las bandas del gel en cortes de 5 mm. Los triplicados de cada fracción se enviaron a la unidad de proteómica del Instituto de Ciencias Clínicas de Montreal (Institut de Recherches Cliniques de Montreal (IRCM), en donde fueron procesados para la identificación de péptidos y proteínas por cromatografía líquida con espectrometría de masas (LC-MS/MS) (Havliš et al., 2003, Cárdenas et al., 2014; Rizo et al., 2021).

9.3. Identificación de proteínas

Los archivos MS sin procesar fueron analizados en Mascot versión 2.5.1 (Matrix Science, Londres, Reino Unido; versión 2.5.1) y X! Tandem (The GPM, thegpm.org; versión 2007.01.01.1) o con el programa MaxQuant (versión 1.6.2.10) con los parámetros predeterminados (Cox, 2008).

Mascot se configuró para buscar en la base de datos UniProt sprot (bacterias329683 entradas, hongos31499 entradas), la base de datos UniProt_Maize_txid4577_20160927 (160789 entradas) y la base de datos UniProt_Archaea_txid2157_20160921 (135190entradas) con tripsina como enzima de digestión. Se especificó O+18 de pirrolisina y carbamidometilo de cisteína como modificaciones fijas. La oxidación de la metionina se especificó como una modificación variable.

Para el análisis en el software MaxQuant, la identificación de péptidos individuales se realizó en grupos de proteínas. Las búsquedas en MaxQuant se ejecutaron en la base de datos CAZy (CAZyDB.07312019.fa) con los siguientes parámetros: carbamidometilación en cisteína como modificación fija, acetilación N-terminal de la proteína y la oxidación de metionina como modificaciones variables. Todas las entradas se filtraron utilizando una tasa de falsos positivos del 1% y se eliminaron todos los falsos positivos.

Para todos los análisis, la tolerancia del primer péptido de búsqueda fue de 20 ppm y la tolerancia del péptido de búsqueda principal fue de 4.5 ppm. Se estableció una tolerancia de masa de iones de fragmentos de 0.60 Da y una tolerancia de iones originales de 10 ppm.

9.4. Criterios de identificación de proteínas

Se utilizó Scaffold_4.8.6 (Proteome Software Inc., Portland, OR) para validar las identificaciones de péptidos y proteínas basadas en MS/MS para Mascot y X! tandem. Para la validación de las proteínas identificadas, se ajustó el FDR para obtener probabilidades >95% para los péptidos y 99% para las proteínas. Ambas probabilidades fueron asignadas mediante el algoritmo Protein Prophet (Nesvizhskii et al., 2003). Las proteínas que contenían péptidos similares y que no podían diferenciarse basándose únicamente en el análisis MS/MS se agruparon para satisfacer los principios de parsimonia (Institut de Recherches Cliniques de Montreal, IRCM, Quebec, Canadá). Para la descripción de la diversidad microbiana se

consideraron proteínas que contenían al menos dos péptidos únicos identificados, mientras que para la clasificación funcional se aceptaron proteínas que contenían al menos un péptido único. En ambos casos, solo se consideraron las proteínas que se identificaron en al menos dos de las tres réplicas experimentales y los falsos positivos se eliminaron manualmente.

Resultados y discusión

1. Fijación de nitrógeno en el pozol

El pozol es una fermentación extraordinariamente compleja, en la que una amplia variedad de microorganismos se desarrolla en gran abundancia. Para comprender la dinámica de fermentación del sistema y cómo los microorganismos utilizan y modifican el sustrato, se realizó el análisis proximal (Tabla 1) de las muestras fermentadas por 0, 9, 24 y 48 h, considerando que estos tiempos representan el periodo en el que la mayoría de la gente lo consume. En general, se observó que no hay cambios significativos en la concentración de carbohidratos totales, pero si un aumento en el contenido de lípidos y disminución en la concentración de fibra cruda. Esto cambios pueden ser explicados en términos de metabolismo del carbono durante la fermentación. Respecto al contenido de nitrógeno, se observó un aumento de 11.4 a 12.5 mg/g de masa seca en las primeras 9 h de fermentación. Este incremento no ha sido reportado en otros alimentos fermentados y puede atribuirse a la fijación de nitrógeno (Tabla 1).

Tabla 1. Análisis aproximado del pozol a diferentes tiempos de fermentación

Tiempo de fermentación (h)	Contenido en el pozol (mg/g de masa seca) ^a						Nitrógeno fijado (mg)	Relación nitrógeno/ceniza (mg/mg)
	Carbohidratos totales	Fibra cruda	Lípidos	Ceniza	Nitrógeno	Proteína		
0	845 ± 9.9	24 ± 4.1	46 ± 4.2	13 ± 0.2	11.47 ± 0.2A	71.73 ± 1.2A	---	0.882
9	839 ± 8	12 ± 0.5	57 ± 1.2	13 ± 4	12.56 ± 0.0 B	78.52 ± 0.3B	0.99	0.96
24	841 ± 3	9 ± 1	64 ± 0.3	13 ± 0.9	12.44 ± 0.1 B	77.75 ± 0.5B	0.96	0.95
48	832 ± 7	8 ± 1	68 ± 0.3	13 ± 0.2	12.52 ± 0.0 B	78.28 ± 0.0B	0.96	0.96

^aLos resultados se expresan como medias ± DE. Las diferencias se evaluaron mediante ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey (P <0,001). Diferentes letras mayúsculas indican diferencias estadísticamente significativas entre muestras.

Considerando que durante la fermentación pueden darse pérdidas de materia orgánica, principalmente por metabolismo aerobio, se propuso un marco matemático simple que acopla las entradas de nitrógeno con las salidas de carbono a través de la respiración para eliminar el sesgo que esta pérdida podría tener sobre el aumento de nitrógeno observado. Así, la cantidad de nitrógeno fijado (Nfx) se calculó con la siguiente ecuación:

$$Nf_x = N_f - N_i (C_i/C_f)$$

Donde:

Nf: es la concentración final de nitrógeno en un tiempo de fermentación determinado x

Ni: es la concentración de nitrógeno inicial en la masa no fermentada

Ci/Cf: es la relación de concentración de carbono entre la masa no fermentadas y la masa fermentada en un tiempo determinado x
Adicionalmente, se determinó la relación nitrógeno/ceniza, considerando que los microorganismos emplean en mínima proporción residuos inorgánico. Con ambas aproximaciones se observó un incremento de 8 a 9% a las 9 h de fermentación (Tabla 1). Estudios previos han reportado incrementos mayores en el contenido de nitrógeno (21-

65%) a los observados en este trabajo (Cravioto et al., 1955; Ulloa et al., 1971; Ramírez, 1987; Giles, 1995; Rizo, 2015), sin embargo, se debe considerar que en algunos de ellos no se reportan duplicados biológicos o los respectivos análisis estadísticos, por lo que los incrementos observados pueden deberse a errores en las técnicas utilizadas. Además, estos aumentos se dan en etapas tardías de la fermentación, a partir de las 120 h, mientras que aquí se encontró en las primeras 9 h, lo que podría explicar las diferencias.

Para corroborar que el aumento de nitrógeno es producto de la fijación biológica, se midió la actividad nitrogenasa directamente en las muestras de pozol inoculadas en medio libre de nitrógeno MMK y MMp/299. En todos los casos se encontró producción de etileno, lo que indica la presencia de bacterias fijadoras de nitrógeno aun después de la nixtamalización de la masa. Independientemente del medio usado, la máxima actividad nitrogenasa se cuantificó en la muestra fermentada por 24 h, mientras que para la muestra fermentada por 48 h la actividad se redujo drásticamente (Figura 1A).

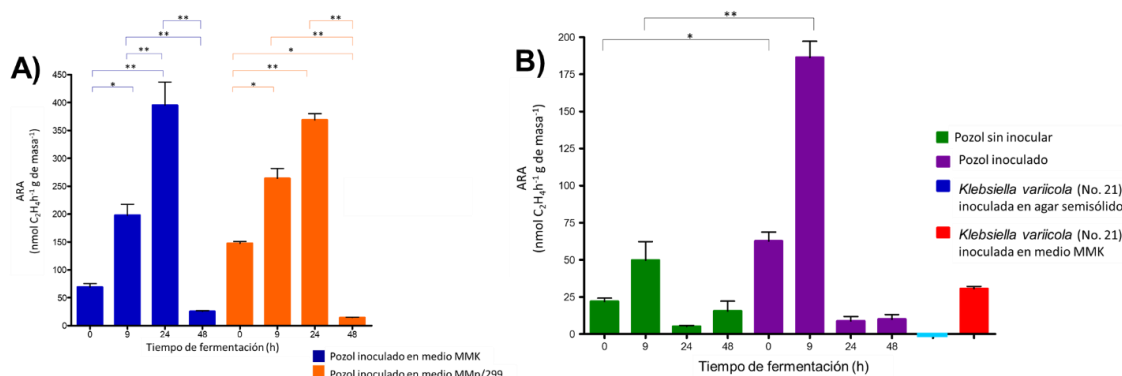


Figura 1. (A) Actividad nitrogenasa en las distintas muestras de pozol. Azul: pozol inoculado en medio semisólido MMK; Naranja: pozol inoculado en medio semisólido MMp/299. (B) Actividad nitrogenasa en muestras de pozol con diferentes tratamientos. Para las muestras inoculadas se usó *K. variicola* (10^7 UFC/g muestra). Imagen tomada de Rizo et al., 2020

1.1. Bacterias fijadoras de nitrógeno

1.1.1. Aislamiento de bacterias

De todos los tiempos de fermentación se aislaron bacterias fijadoras de nitrógeno y con base a las características coloniales, se seleccionaron veintiocho UFC (aislados bacterianos) para determinar la actividad nitrogenasa mediante el ensayo ARA.

Si bien algunas cepas una vez aisladas tuvieron baja actividad, por ejemplo, la cepa No. 16 solo produjo 0.16 nmol C₂H₄ h⁻¹, se consideraron positivas ya que hubo formación

del pico de etileno característico, mientras que en los controles negativos y en dos aislados bacterianos no se observó producción de etileno (datos no mostrados). Curiosamente, casi todos los aislados tuvieron una alta capacidad para fijar nitrógeno, ya que mostraron una mayor actividad reductora de acetileno que la del control positivo. Específicamente, los aislados No. 2, 3, 4, 8, 10 y 21, mostraron una actividad 10 veces mayor (Tabla 2). De todas estas veinticinco presentaron características microscópicas

Artículos

similares (bacilos gramnegativos y presencia de exopolisacáridos) y sólo un aislado fue

diferente (bacilos gramnegativos que no formaron exopolisacáridos).

Tabla 2. Ensayo ARA en las bacterias aisladas del pozol

Número de identificación de la colonia	ARA (nmol C ₂ H ₄ h ⁻¹)	Número de identificación de la colonia	ARA (nmol C ₂ H ₄ h ⁻¹)	Número de identificación de la colonia	ARA (nmol C ₂ H ₄ h ⁻¹)
No. 1 (MMp/299)	10.44±1.01	No. 11 (MMp/299)	20.46±2.38	No. 21 (MMK)	52.82±1.93
No. 2 (MMp/299)	48.16±2.33	No. 12 (MMp/299)	20.21±1.66	No. 22 (MMK)	16.13±3.98
No. 3 (MMp/299)	48.07±1.84	No. 13 (MMp/299)	16.62±2.61	No. 23 (MMK)	15.25±0.05
No. 4 (MMp/299)	40.81±3.55	No. 14 (MMp/299)	15.35±1.52	No. 24 (MMK)	18.02±1.05
No. 5 (MMp/299)	35.79±7.20	No. 15 (MMp/299)	21.99±6.68	No. 25 (MMK)	18.41±5.73
No. 6 (MMp/299)	37.83±3.49	No. 16 (MMK)	0.16±0.09	No. 26 (MMK)	21.83±4.07
No. 7 (MMp/299)	2.64±1.76	No. 17 (MMK)	23.72±2.58	<i>Klebsiella varicola</i> sp. nov. ATCC® BAA-830™ ^a	4.34±0.311
No. 8 (MMp/299)	41.56±1.80	No. 18 (MMK)	14.95±0.81	<i>Klebsiella varicola</i> sp. nov. ATCC® BAA-830™ ^b	4.21±0.98
No. 9 (MMp/299)	3.67±0.28	No. 19 (MMK)	19.15±7.40		

Los medios de crecimiento indicados fueron donde las bacterias aisladas mostraron mayor actividad. ^aInoculado en medio semisólido MMp/299. ^bInoculado en medio MMK semisólido.

1.1.2. Identificación molecular

Los resultados de secuenciación demostraron que las bacterias tienen similitudes con tres miembros de la familia *Enterobacteriaceae*. La bacteria con características coloniales diferentes a las demás presentó la mayor identidad con *Kosakonia oryzendophytica*

(99.90%) y una identidad menor con *Enterobacter* sp. (99.88%). Dos de las colonias se identificaron como *Kosakonia* con 99.80% y 99.70% de identidad, respectivamente. El resto de los aislados tuvo una identidad de más del 99% con miembros del género *Klebsiella* (Tabla 3).

Tabla 3. Identificación molecular de las bacterias aisladas del pozol

Número de identificación	Condiciones de aislamiento ^a	Identificación basada en el gen 16S rRNA		Identificación basada en el gen <i>nifH</i>	
No. 2	0h MMp/299	<i>Kosakonia radicincitans</i> DSM 16656	1495 (TS) 99.63% (I)	<i>Kosakonia oryzae</i> R5-395	553 (TS) 98.11% (I)
		<i>Kosakonia oryzae</i> OIa51	1489 (TS) 99.51% (I)		
No. 3	0h MMp/299	<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain DSM 30104,	1500 (TS) 99.76% (I)	<i>Klebsiella</i> sp. CRPV0611a	571 (TS) 98.47% (I)
No. 5	9h MMp/299	<i>Klebsiella varicola</i> F2R9	1513(TS) 99.88% (I)		
No. 7	24h MMp/299	<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain DSM 30104	1465 (TS) 99.02% (I)		
		<i>Klebsiella varicola</i> strain F2R9	1454 (TS) 98.78% (I)		
No. 9	48h MMp/299	<i>Klebsiella varicola</i> F2R9	1495 (TS) 99.63% (I)		
No. 10	48h MMp/299	<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain DSM 30104	1498 (TS) 99.76% (I)	<i>Klebsiella</i> sp. CRLIQ728	569 (TS) 99.37% (I)
		<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>rhinoscleromatis</i> strain R-70	1836 (TS) 99.80% (I)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> NG14	564 (TS) 99.36% (I)
No. 11	48h MMp/299	<i>Kosakonia oryzendophytica</i> REICA 082	1500 (TS) 99.76% (I)	<i>Enterobacter</i> sp. strain BKA4	510(TS) 95.62%(I)
		<i>Enterobacter cloacae</i> DSM30054, NBRC 13535, 279-56 and subsp. <i>dissolvens</i> LMG2683	1469 (TS) 99.02 (I)	<i>Enterobacter oryzendophyticus</i> REICA 082	462(TS) 94.95%(I)
No. 12	48h MMp/299	<i>Klebsiella quasipneumoniae</i> subsp. <i>similipneumoniae</i> 07A044	1480 (TS) 99.75% (I)		
No. 13	48h MMp/299	<i>Klebsiella quasipneumoniae</i> subsp. <i>similipneumoniae</i> strain 07A044	1504 (TS) 99.76% (I)	1) <i>Klebsiella</i> sp. CRPV0611a	569 (TS) 99.37% (I)
No. 17	0h MMK	<i>Kosakonia radicincitans</i> DSM 16656	1506 (TS) 98.8% (I)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	468 (TS) 100% (I)
				<i>Kosakonia radicincitans</i> DSM 16656	468 (TS) 98.08% (I)
				<i>Kosakonia oryzae</i> R5-395	446 (TS) 98.80% (I)
No. 21	24h MMK	<i>Klebsiella varicola</i> F2R9	1463(TS) 99.50% (I)	<i>Klebsiella varicola</i> AJ29, E57-7, WCHKP19, GJ3, GJ2, GJ1, DX120E	490 (TS) 100% (I)
No. 22	24h MMK	<i>Klebsiella quasipneumoniae</i> subsp. <i>similipneumoniae</i> strain 07A044	1506 (TS) 99.76% (I)	<i>Klebsiella quasipneumoniae</i> subsp. <i>similipneumoniae</i> strain ATCC 700603	490 (TS) 100% (I)

No. 23	24h MMK	<i>Klebsiella variicola</i> F2R9	1511 (TS) 100% (I)	<i>Klebsiella variicola</i> gene for dinitrogenase reductase, partial cds, strain NGB-FR96	490 (TS) 100% (I)
No. 24	48h MMK	<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain DSM 30104	1498 (TS) 99.76% (I)		
		<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>rhinoscleromatis</i> strain R-70	1820 (TS) 99.31% (I)		
No. 25	48h MMK	<i>Klebsiella quasipneumoniae</i> subsp. <i>similipneumoniae</i> strain 07A044	1827 (TS) 98.46% (I)	<i>Klebsiella quasipneumoniae</i> subsp. <i>similipneumoniae</i> strain ATCC 700603	499 (TS) 100% (I)
No. 26	48h MMK	<i>Klebsiella quasipneumoniae</i> subsp. <i>similipneumoniae</i> strain 07A044	1493 (TS) 99.51% (I)		

^aIndica el tiempo de fermentación y medio de cultivo del que se aislaron las bacterias.

TS (Score total)

I (Porcentaje de identidad)

Dado que el análisis del gen 16S rRNA no proporciona suficiente poder de resolución en especies estrechamente relacionadas como es el caso de los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, se hizo la identificación de algunas cepas utilizando el gen housekeeping *nifH*. Nuevamente se identificaron los géneros *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Kosakonia* (Tabla 3).

Aunque no se evaluaron los cambios en la composición de las bacterias fijadoras de nitrógeno durante la fermentación del pozol, observamos que las bacterias aisladas variaron en función del tiempo. *Kosakonia*, género no reportado previamente en la fermentación, solo se aisló en la masa no fermentada, *Enterobacter* solo se aisló a las 48 h de fermentación y las cepas de *Klebsiella* se aislaron en todos los tiempos de fermentación. La prevalencia de enterobacterias en la fermentación del pozol ha sido estudiada por Giles (2012), demostrando que *Klebsiella pneumoniae* aislada del pozol es capaz de sobrevivir en condiciones ácidas y con una concentración de ácido láctico de 2.1 g/100 g, en contraste con el aislado clínico *Klebsiella pneumoniae* que, en las mismas condiciones, es indetectable.

1.2. Capacidad de fijación de nitrógeno en el pozol

Para corroborar que el aumento de nitrógeno es producto de la fijación biológica, se midió la actividad nitrogenasa directamente en las muestras de pozol disueltas en agar semisólido. En todos los casos se encontró producción de etileno, con un máximo en la muestra fermentada por 24 h (Figura 1B).

Además, para demostrar definitivamente si los diazotrofos aislados pueden fijar nitrógeno en el pozol, la bacteria con la mayor actividad nitrogenasa aparente, *Klebsiella variicola* (No. 21), se inoculó directamente en la masa homogeneizada y la masa inoculada se

transfirió a agar semisólido. Al mismo tiempo, una concentración igual del aislado se inoculó en agar semisólido y en medio semisólido MMK (Figura 1B). Los datos mostraron que la inoculación de *K. variicola* resultó en un aumento en la concentración de etileno en la muestra sin fermentar y con 9 h de fermentación, alcanzando la actividad máxima en este periodo. Como era de esperarse, la inoculación de la bacteria en el medio MMK también resultó en una actividad positiva, mientras que cuando se inoculó en agar semisólido no se observó reducción de acetileno (Figura 1B). Estos resultados indican que la fijación de nitrógeno en el pozol es un proceso activo, lo que representa la primera demostración de este fenómeno en un alimento fermentado. La fijación en el pozol fue respaldada por el ensayo ARA directamente en la masa, así como por el aislamiento de bacterias con esta actividad, y por la detección del gen *nifH* en las cepas analizadas. La importancia de este fenómeno en los alimentos se acentúa si consideramos que es un proceso simple y económico que podría permitir la mejora del valor nutricional en bebidas y alimentos fermentados a base de cereal.

2. Estudio metaproteómico del pozol

2.1. Estructura y cambios de la microbiota en la fermentación del pozol

En los alimentos fermentados tradicionales la presencia y desarrollo de los diferentes microorganismos está determinada por el tipo de sustrato utilizado para su elaboración y por su capacidad de adaptarse a las condiciones que se generan a lo largo de la fermentación. En algunos alimentos, alteraciones menores en la diversidad o el número de especies pueden dar como resultado productos alimenticios significativamente diferentes y variaciones en la calidad y características de este (Labib et al., 2018). Por lo tanto, resulta importante establecer la composición y los

cambios de los microorganismos durante la fermentación.

Para el pozol, diversos estudios microbiológicos han demostrado los cambios y la distribución espacial de los principales grupos microbianos durante la fermentación y se han aislado e identificado un gran número de microorganismos (Nuraida et al., 1995; Ampe, Ben Omar & Guyot, 1999; Ampe et al., 1999; Wachter et al., 2000; Ben Omar & Ampe, 2000; Escalante et al., 2001; Díaz-Ruiz et al., 2003; Sainz et al., 2005; Wachter-Rodarte et al., 2015; Olvera et al., 2017; López-Hernández et al., 2018; Cooper-Bribiesca et al., 2019; Rizo et al., 2020; Domínguez-Ramírez et al., 2020). Sin embargo, los pocos estudios que han determinado la dinámica de la comunidad microbiana durante la fermentación se enfocaron en las bacterias, principalmente en las lácticas. En este trabajo se realizó el estudio metaproteómico del pozol en diferentes etapas de la fermentación para determinar los principales cambios en las comunidades microbianas.

Previo al análisis metaproteómico, se realizó la cuantificación de los principales grupos microbianos para corroborar si la fermentación se estaba llevando a cabo como ha sido ampliamente descrita.

En general, se observó que justo después de la nixtamalización, los recuentos bacterianos para todos los grupos analizados fueron del orden de 10^6 UFC, excepto para el grupo de enterobacterias que estuvieron en una concentración de 10^4 UFC. Los mesófilos aeróbicos iniciaron la fermentación con una concentración de 10^6 UFC/g de masa, incrementándose después de 24 h de fermentación a 10^9 UFC/g. Entre ellas, las BAL, el grupo predominante durante la fermentación (Nuraida et al., 1995; Wachter et al., 2000; Ampe et al., 1999; Escalante et al., 2000), comenzaron con un recuento de 10^6 UFC/g y aumentaron después de 24 h de fermentación a 10^{10} UFC/g. Este aumento coincidió con la caída del pH de casi 3 unidades, de 7.75 a 4.83.

Respecto a las bacterias lácticas amilolíticas, se observó el mismo comportamiento, una cuenta inicial alta (10^6 UFC/g muestra seca) y un aumento a las 24 h de fermentación (10^9 UFC/g de masa seca). La presencia de estas bacterias al inicio de la fermentación es importante, considerando que el almidón el principal sustrato para la fermentación láctica. Otro grupo importante fue el de las

enterobacterias, que presentó un recuento inicial de 10^4 UFC/g y un aumento durante las primeras 9 h a 10^6 UFC /g, momento a partir del cual detuvieron su crecimiento y comenzaron a disminuir lentamente a 10^5 UFC/g después de 48 h. Por otro lado, a medida que el valor del pH del pozol se volvió más ácido, la concentración de los hongos aumentó, con un máximo de 10^6 UFC/g a las 48 h. Estos resultados concuerdan con todos los estudios microbiológicos descritos hasta la fecha.

Por otro lado, el estudio metaproteómico del pozol mostró que este alimento fermentado es un ecosistema complejo, donde no solo encontramos proteínas del sustrato, sino también proteínas de bacterias, hongos y arqueas. Evidentemente, las proteínas identificadas en mayor proporción fueron del sustrato, 69.9% del metaproteoma corresponde a maíz, con un importante número de proteínas de bacterias y hongos, las cuales representaron el 28.5% del metaproteoma y un menor porcentaje (1.6%) asociado a arqueas.

El estudio por tiempo de fermentación mostró que la masa no fermentada está compuesta por una microbiota heterogénea, representada por proteínas de bacterias relacionadas con el medio ambiente, el sustrato o el material utilizado para la elaboración del pozol. Sin embargo, estas proteínas se redujeron o eliminaron durante la fermentación, por lo que estas especies pueden no ser necesarias para el proceso. A medida que la masa se fermenta, la microbiota se hace más homogénea y se establece un núcleo de microorganismos, compuesto principalmente por BAL (Figura 2A). La presencia de BAL en los alimentos fermentados está asociada a la producción de ácidos orgánicos responsables de los sabores y olores característicos de cada alimento (Blandino *et al.* 2003; Oyewole, 1997; Nout y Rombouts, 1992). Durante la fermentación del pozol, la drástica disminución de pH correlacionó con el aumento en la concentración de BAL y con el número de proteínas identificadas para este grupo.

Dentro de las BAL el género predominante fue *Streptococcus*, que al final de la fermentación representó el 56% del metaproteoma bacteriano total (Figura 2A). Estudios previos demostraron que *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* tiene características únicas, como una alta velocidad específica de

crecimiento, una conversión eficiente de sustrato a biomasa, tiene actividad amilolítica, es capaz de crecer en arabinosilano de maíz y sobrevive en condiciones extremas de pH (ácidos y alcalinas), lo que le da ventajas competitivas sobre otras bacterias y explica su abundancia durante la fermentación (Díaz-Ruiz et al., 2003; Cooper-Bribiesca et al., 2018; Domínguez-Ramírez et al., 2020).

Otras proteínas identificadas de BAL corresponden a los géneros *Leuconostoc*, *Lactobacillus* y *Enterococcus*, géneros previamente descritos en el pozol (Figura 2A) (Wacher, 1995; Nuraida et al., 1995; Ampe et al., 1999; Ampe et al., 1999; Ben Omar & Ampe, 2002; Escalante et al., 2001; Díaz-Ruiz et al., 2003). Su presencia en la fermentación está determinada por su capacidad para degradar algunos de los polisacáridos presentes en la masa. La baja abundancia de proteínas identificadas para *Enterococcus* en comparación con los géneros *Lactobacillus* y *Leuconostoc*, podría estar relacionada con su baja actividad amilolítica (Díaz, 2003) y a que algunas especies de *Lactobacillus* y *Leuconostoc* pueden utilizar almidón y xilano como única fuente de carbono para crecer (Nuraida et al., 2001; Flores, 1995; Flores, 2007).

Otros cambios importantes en la composición microbiana corresponden al grupo de las enterobacterias. Tanto la cuenta en placa como el análisis metaproteómico, mostraron que están presentes desde el inicio de la fermentación y que a medida que la masa se va acidificando, su concentración disminuye considerablemente y, al final, las proteínas identificadas para este grupo representaron <3% del metaproteoma (Figura 2A). Diferentes estudios han reportado la presencia de enterobacterias en diferentes etapas del proceso de fermentación (Wacher, 1995; Ampe et al., 1999; Ampe et al., 1999;

Wacher et al., 2000; Morales, 2011), su caracterización ha permitido identificar varias especies, *Escherichia coli*, *Escherichia fergusonii*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter sakazakii*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella* sp., *Klebsiella variicola* y *Kosakonia* sp. (Ulloa et al., 1987; Sainz, 1998; Sainz et al., 2001; Rizo et al., 2020). Su presencia a pesar de la alta concentración de ácidos orgánicos puede deberse a la generación de microambientes dentro de la masa, a la tolerancia de algunas cepas o porque otros microorganismos utilizan los ácidos orgánicos para su crecimiento, disminuyendo localmente su concentración (Ampe et al., 1999; Ben Omar & Ampe, 2000; Giles, 2012).

Para los hongos los resultados de la cuenta en placa y el análisis metaproteómico mostraron que estos están presentes desde el inicio de la fermentación. Se encontró que en la masa no fermentada hay proteínas de hongos filamentosos asociados a suelo y plantas como *Ajellomyces*, *Cercospora* y *Fusarium*. Mientras que los géneros predominantes a las 9 h de fermentación fueron *Schizosaccharomyces* y *Saccharomyces*. La muestra fermentada por 48 h consistió principalmente de proteínas del género *Neurospora* que represento el 44%, mientras que la abundancia de los géneros *Schizosaccharomyces* y *Saccharomyces* se redujo a menos del 10% (Figura 2B). El desarrollo de este grupo coincidió con la disminución de pH asociada a la producción de ácidos orgánicos. Se ha sugerido que la proliferación de hongos en los alimentos es estimulada por las BAL y a su vez los hongos favorecen el crecimiento de otras bacterias, aportando factores de crecimiento como vitaminas y compuestos nitrogenados solubles (Nout, 1991).

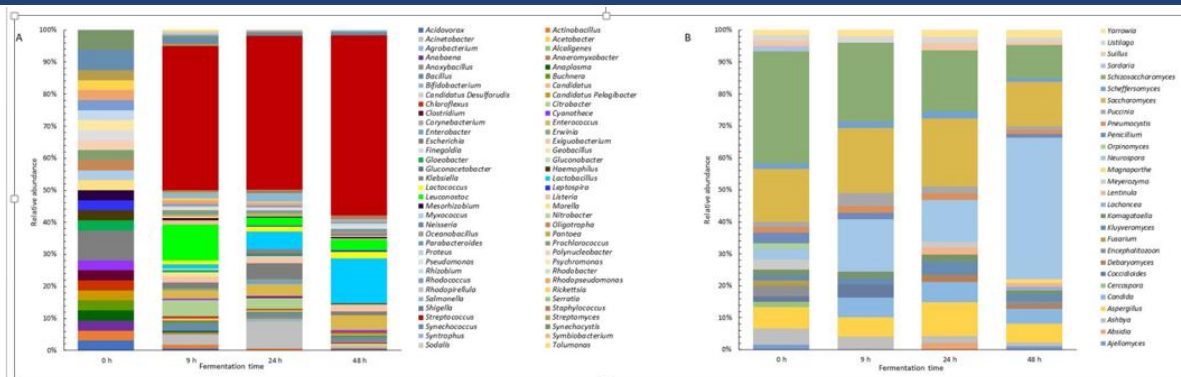


Figura 2. Abundancia relativa de las proteínas identificadas en el análisis MS/MS. Las proteínas se identificaron a partir de 2 péptidos únicos y se agruparon por género. (A). Proteínas identificadas para bacterias. (B): Proteínas identificada para hongos. Imagen tomada de Rizo et al., 2021.

2.2. Meta-análisis del metaproteoma

Para la construcción de las rutas metabólicas se utilizaron los datos metaproteómicos de bacterias, hongos y plantas, para cada proteína se buscó asignar su identificador KO (KEGG Orthology) para su posterior

integración en la respectiva vía metabólica. Se analizaron un total de 3246 identificadores, los cuales resultaron en la reconstrucción parcial o total de diferentes rutas metabólicas (Figura 3).

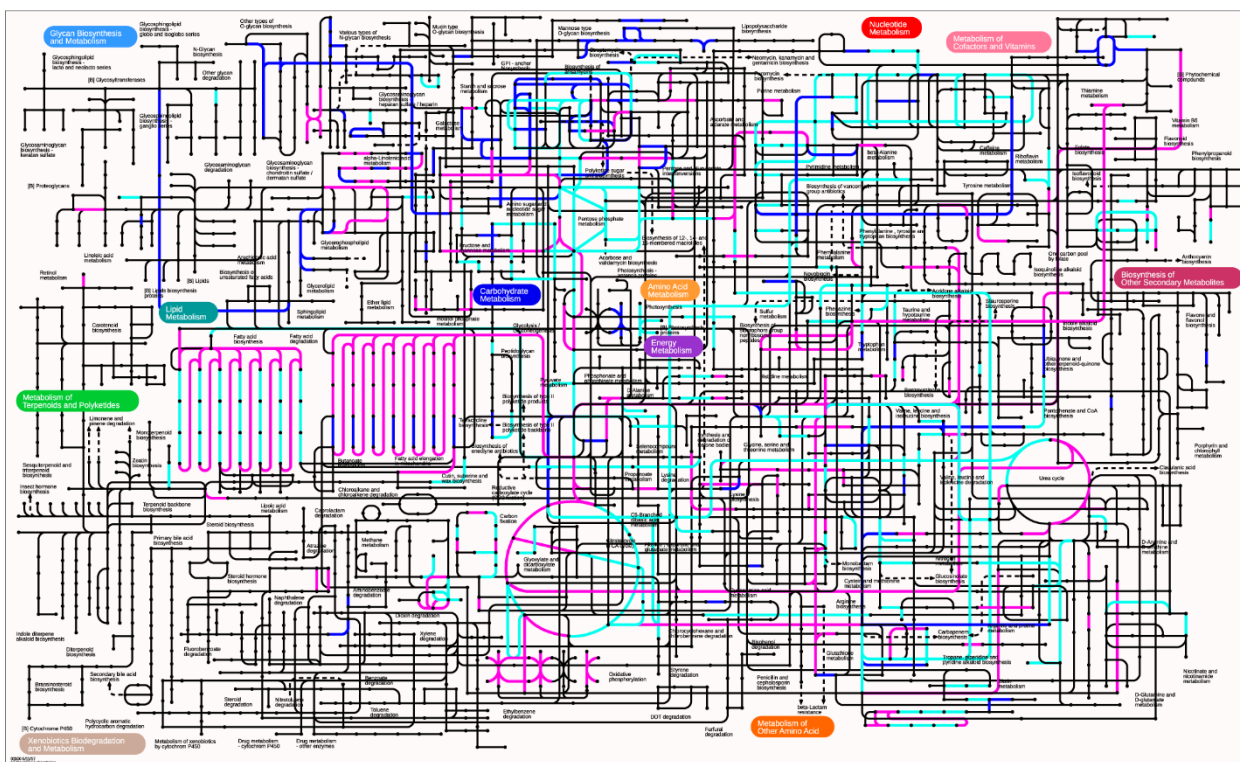


Figura 3. Atlas KEGG de las vías metabólicas que se encuentran en el metaproteoma del pozol. Las proteínas identificadas únicamente en bacterias y hongos se muestran en azul. Las proteínas identificadas únicamente en plantas se muestran en rosa. Las líneas cian indican proteínas en común. Imagen tomada de Rizo et al., 2021.

En las vías metabólicas relacionadas con el metabolismo central de carbohidratos, se lograron detectar todas las proteínas que participan en la glucólisis, gluconeogénesis, oxidación del piruvato, ciclo de Krebs y la ruta de la pentosa fosfato. Mientras que para la

ruta del catabolismo de glucosa a piruvato (ruta Entner-Doudoroff) solo algunas proteínas fueron identificadas. Además, se encontraron proteínas para el metabolismo de carbohidratos complejos.

En el metabolismo de aminoácidos se agruparon diferentes proteínas tanto para su biosíntesis como para su degradación. Sin embargo, el análisis demostró que solo en algunos casos se pudo hacer una reconstrucción total de las vías.

Para el metabolismo de lípidos se encontraron todas las proteínas para la biosíntesis y degradación de ácidos grasos y algunas proteínas para la biosíntesis de otros lípidos como lactosilceramida, triacilglicerol y ácido jasmónico.

Con relación al metabolismo energético, todas las proteínas se relacionaron con la fijación de carbono, en donde podemos encontrar procesos exclusivos de plantas como la fotosíntesis para la producción de energía en forma de ATP y NADPH. Otras vías de fijación de carbono encontradas corresponden al ciclo reductivo del ácido cítrico y a la vía reductiva de acetil-CoA.

Otra ruta metabólica importante encontrada en la fermentación del pozol corresponde al metabolismo de vitaminas y cofactores, para las cuales se encontraron un menor número de proteínas asociadas a la biosíntesis de vitaminas como piridoxina, tiamina, riboflavina, biotina y ácido pantoténico, sin embargo, en ninguno de los casos se encontraron todas las enzimas para completar las respectivas vías.

Finalmente, se observó que dentro del sistema puede haber complementación metabólica ya que las proteínas de los microorganismos y el sustrato pueden contribuir a la misma vía biosintética o catabólica. Otros procesos metabólicos se relacionaron exclusivamente a plantas, bacterias u hongos.

2.2.1. Metabolismo de carbohidratos

El pozol se caracteriza por tener una baja concentración de carbohidratos solubles, un alto contenido de almidón y presencia de celulosa y hemicelulosa del pericarpio, por lo que estos polisacáridos representan las principales fuentes de carbono, que en conjunto deben sostener una abundante y compleja microbiota.

En los datos metaproteómicos se identificaron diferentes enzimas implicadas en la hidrólisis de almidón, celulosa y hemicelulosa, fuentes de carbono presentes en la masa nixtamalizada. Para el almidón, se identificaron dos proteínas en la base de datos de plantas, una β -amilasa que produce

maltosa y una α -glucosidasa que produce glucosa a partir de almidón y maltosa. Estas enzimas podrían jugar un papel importante, principalmente en la primera etapa de fermentación, liberando azúcares simples que pueden ser utilizados para el crecimiento de microorganismos que se encuentran en la materia prima. En bacterias, se identificaron múltiples enzimas amilolíticas, α -amilasas, α -glucosidasas y enzimas desramificantes (pululanasas), juntas pueden despolimerizar al almidón en oligosacáridos y azúcares más pequeños (glucosa y maltosa) (Figura 4A). Trabajos previos han reportado la presencia de bacterias lácticas capaces de crecer e hidrolizar almidón en distintas etapas de la fermentación (Nuraida et al., 1995; Ampe et al., 2000; Díaz-Ruiz et al., 2003). La caracterización de algunas bacterias resultó en la identificación de *Streptococcus macedonicus*, *Lactococcus lactis*, *Enterococcus sulfureus* y *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius*, siendo esta última la especie predominante durante la fermentación. Se sabe que la actividad de estas bacterias está asociada a la célula y que sus amilasas son de alto peso molecular (Díaz, 2003). Específicamente, *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* produce dos amilasas, una amilopululanasa con capacidad desramificante y una α -amilasa (Díaz-Ruiz et al., 2003; Rodríguez et al., 2021). Con relación a los hongos y levaduras, los estudios han resultado variables en cuanto a si este grupo es capaz de degradar el almidón.

Para la hidrólisis de celulosa, se identificaron endoglucanasas en la base de datos de bacterias y plantas para la hidrólisis inicial de la celulosa. Además, de enzimas necesarias para la producción de celobiosa, glucosa y celo-oligómeros a partir de este sustrato (Figura 4B). De manera inexplicable no se identificaron enzimas celulolíticas de hongos. Por otro lado, la degradación de la hemicelulosa imponer varios retos, ya que es un polímero de alto peso molecular y es muy variable en su estructura, por lo que su degradación requiere la acción de varias enzimas que deben actuar de forma sinérgica para una eficiente degradación del polímero (van den Brink y de Vries, 2011). Además, la completa degradación de la hemicelulosa requiere la presencia de enzimas que actúen sobre los distintos tipos de decoraciones, para finalmente liberar azúcares simples y xilooligosacáridos. En los datos

metaproteómicos se identificaron proteínas de bacterias y hongos que actúan sobre el esqueleto principal de la cadena y las diferentes sustituciones, lo que permite la

completa hidrólisis de este polisacárido y la liberación de xilosa, xilobiosa y xilooligosacáridos (Figura 4C).

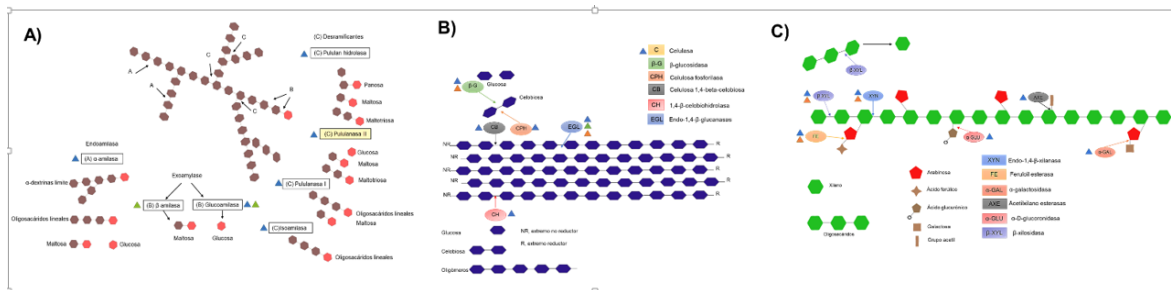


Figura 4. Representación esquemática de los diferentes polisacáridos presentes en la masa de maíz y las enzimas implicadas en su degradación. (A) Proteínas identificadas en el metaproteoma para la hidrólisis del almidón; (B) celulosa y (C) arabinoxilano. Imagen tomada de Rizo et al., 2021.

Se ha demostrado que algunas bacterias aisladas de este alimento pueden degradar xilano y recientemente se demostró que *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* es capaz de degradar xilano de maíz o madera y que varias cepas de *Weissella* solo pueden utilizar xilooligosacáridos como fuente de carbono para su crecimiento (Cooper-Bribiesca et al. 2018; López-Hernández et al. 2018).

En correlación con los resultados anteriores, el análisis químico mostró una disminución importante en el contenido de fibra, carbohidratos que se puede asociar a las actividades enzimáticas de las proteínas identificadas en el estudio metaproteómico. Con estos datos se puede sugerir que durante las primeras 9 h de fermentación la microbiota consume además del almidón, polisacáridos como la celulosa y hemicelulosa, lo que libera azúcares solubles, que de hecho aumentaron significativamente. Después de este periodo se observó una disminución importante de estos carbohidratos, lo que implica su utilización y explicaría el aumento en las cuentas de microorganismos.

Finalmente, el análisis de las proteínas sugiere un posible sinergismo entre bacterias, hongos y maíz para la degradación de los diferentes sustratos.

2.2.2. Metabolismo de aminoácidos

La biosíntesis de aminoácidos se puede producir a partir de precursores metabólicos, por el metabolismo de alguno de ellos o por la acción de diferentes proteasas para el reciclado de proteínas.

En el análisis metaproteómico se logró identificar la enzima necesaria para la condensación de α -cetoglutarato y amoníaco a glutamato, este

aminoácido puede ser posteriormente metabolizado a glutamina y a prolina. En el primer caso se identificaron las proteínas involucradas en su biosíntesis y aunque para la prolina la vía quedó incompleta, se identificó una proteasa específica (prolina iminopeptidasa) para su producción.

También se identificaron las proteínas involucradas en el metabolismo de oxalacetato a aspartato y asparagina. A pesar de que la metionina y treonina también son sintetizadas a partir de este precursor, el análisis mostró que estos aminoácidos se producen a partir de homocisteína y homoserina, respectivamente. Para la arginina se identificaron dos posibles rutas para su síntesis, mediante la vía ornitina para la cual se encontraron las enzimas necesarias para su producción y mediante el ciclo de la urea.

Para los aminoácidos histidina, serina, leucina, isoleucina y valina se observó lo mismo, presencia de los precursores y la identificación de algunas de las enzimas para su producción, sin embargo, en todos los casos la vía quedó trunca en el paso final.

Respecto a la degradación de aminoácidos se identificaron las proteínas aminotransferasas para la reacción de transaminación, sin embargo, no se encontraron proteínas para la posterior conversión de los α -cetoácidos, lo que indica que la degradación de aminoácidos para la producción de sabores no es una vía metabólica clave durante la fermentación del pozol.

Para la degradación de proteínas, se identificaron diferentes proteasas, aminopeptidasas y carboxipeptidasas, lo que indica que esta puede ser una vía alterna para la

producción de distintos aminoácidos, así como para la posible liberación de péptidos.

2.4. Análisis funcional de la microbiota

Por ser un intermediario importante para la producción de sabores se analizó el metabolismo del piruvato. Se encontró que este puede ser producido a través de la glucólisis y que puede ser metabolizado por cinco mecanismos diferentes. En primer lugar, se identificaron enzimas relacionadas con la producción de acetil-CoA, que luego puede ser metabolizado hasta acetato y etanol. En segundo lugar, se evidenció la reducción de piruvato a lactato por la lactato deshidrogenasa. En tercer lugar, se encontró la piruvato descarboxilasa para la producción de acetaldehído. En cuarto lugar, el análisis mostró la presencia de la enzima formiato acetiltransferasa, que cataliza la conversión reversible de piruvato y coenzima A en formiato y acetil-CoA. Finalmente, se encontró que el piruvato se puede metabolizar a acetoína, diacetilo y butano-2,3-diol mediante el metabolismo del butanoato. La producción de lactato, acetato y etanol en el pozol implica que en la fermentación se desarrollan especies de BAL homo y heterofermentativas. La actividad de estas bacterias da como resultado la producción de lactato como principal producto de fermentación, acetato y etanol en menor concentración (Ampe et al., 1999). Aunque en pozol no se ha estudiado la producción de acetoína y butanodiol, en otros alimentos fermentados, la síntesis de estos dos compuestos está asociada principalmente al metabolismo de las BAL y, aunque no representan un producto principal de la fermentación, son importantes para la mejorar de las características organolépticas (Güzel-Seydim et al., 1999; Jung et al., 2011; Wu et al., 2015).

Conclusiones

El análisis microbiológico, bioquímico y metaproteómico del pozol permitió la construcción de una imagen integral del sistema de fermentación. Se logró determinar que además de los sistemas enzimáticos del propio sustrato, bacterias, hongos, levaduras y arqueas también participan durante el proceso, siendo las bacterias el grupo más representado durante los tiempos estudiados.

Los principales cambios tanto en el sustrato como en la microbiota se dan en las primeras 9 horas de fermentación y se correlaciona con el aumento logarítmico de los microorganismos,

con la caída del pH, con la disminución del contenido de carbohidratos y fibra, lo que muestra esta etapa como la de mayor actividad metabólica.

Se encontraron por primera vez muchos microorganismos ambientales, relacionados con el maíz y con el agua, sin embargo, la mayor parte de ellos desaparecen o disminuyen drásticamente, por lo que se puede considerar que su presencia no determina las características del alimento. Las bacterias se encuentran representadas en su mayoría por bacterias lácticas y dentro de estas el género *Streptococcus* es de manera contundente el más abundante, todas estas bacterias pueden encontrarse en el medio ambiente pero su hábitat más importante son los mamíferos, lo que indica que si bien se trata de una fermentación espontánea, la participación humana a nivel del proceso de nixtamalización y de inoculación es determinante en la microbiota que se desarrolla. Con relación a las levaduras, se observó que están presentes en todas las muestras analizadas, con un incremento de hongos filamentosos al final de la fermentación.

El enfoque metaproteómico permitió encontrar diversos complejos enzimáticos desconocidos hasta el momento en el sistema. Se encontraron también las enzimas necesarias para la hidrólisis del almidón, la hemicelulosa y la celulosa por lo que todos estos sustratos pueden ser utilizados como fuente de carbono por la microbiota. Resulta interesante que en la degradación del almidón no se encontraron sistemas enzimáticos de hongos y sean las enzimas propias del maíz y de las bacterias las que se encarguen de la hidrólisis del sustrato. En el caso de hemicelulosa y celulosa intervienen tanto bacterias como hongos, con predominancia siempre de las enzimas bacterianas. Este diverso repertorio de enzimas encontradas permitirá nuevos estudios bioquímicos y estructurales.

El metabolismo encontrado permite la síntesis de diversos productos de fermentación como ácidos orgánicos, acetoina, butanediol e intermediarios importantes involucrados en la síntesis de ácidos grasos y aminoácidos. Compuestos que contribuyen con las características organolépticas y nutricionales del pozol.

Otra característica distintiva e importante de esta fermentación fue la presencia de enterobacterias diazótroficas capaces de fijar nitrógeno atmosférico en la masa. La fijación biológica de nitrógeno permite el incremento del valor nutricional del pozol, lo que demuestra que la

fermentación del pozol puede transformar un alimento relativamente pobre, en un mejor alimento. Resultados que abre la posibilidad de estudiar este proceso como un método viable para ser utilizado en otros alimentos bajos en contenido proteínico.

Referencias

Ampe F, Ben ON, Guyton JP (1999) Culture-independent quantification of physiologically-active microbial groups in fermented foods using rRNA-targeted oligonucleotide probes: application to pozol, a Mexican lactic acid fermented maize dough. *Journal of Applied Microbiology* 87:131-140. <https://doi.org/10.1093/aem/87.1.131>

Ampe F, Ben ON, Moizan C, Wachter CM, Guyton JP (1999) Polyphasic study of the spatial distribution of microorganism in Mexican Pozol, a fermented maize dough, demonstrates the need for cultivation-independent methods to investigate traditional fermentations. *Applied and Environmental Microbiology* 65:5464-5473. doi: 10.1128/AEM.65.12.5464-5473.1999.

Association of Official Analytical Chemists (AOAC) (2000) Official method 992.23: crude protein in cereal grains and oil seeds. In *Official methods of analysis of AOAC International*. Horwitz W(ed) 17th ed. AOAC International, Gaithersburg, MD.

Ben Omar N, Ampe F (2000) Microbial community dynamics during production of the Mexican fermented maize dough pozol. *Applied and Environmental Microbiology* 66:3664-3673. doi: 10.1128/aem.66.9.3664-3673.2000.

Berger B, Baldermann S, Ruppel S (2017) The plant growth-promoting bacterium *Kosakonia radicincitans* improves fruit yield and quality of *Solanum lycopersicum*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 97:4865-4871. doi: 10.1002/jsfa.8357.

Blandino A, Al-Aseeri ME, Pandiella SS, Cantero D, Webb C (2003) Cereal-based fermented foods and beverages. *Food Research International* 36:527-543. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(03\)00009-7](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(03)00009-7).

Cañas A, Barzana E, Owens JD, Wachter C (1993) La elaboración de pozol en los altos de Chiapas. *Ciencia* 4:219-229.

Cárdenas C, Barkla B.J, 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* 111:139-147. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.06.028>.

Cooper-Bribiesca B, Navarro A, Díaz-Ruiz G, Aguilar G, Rodríguez-Sanoja R, Wachter C (2018) Lactic acid fermentation of arabinoxylan from nejayote by *Streptococcus infantarius* ssp. *infantarius* 25124 isolated from pozol. *Frontiers in Microbiology* 9:3061. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03061>.

Cox J, Mann M (2008) MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nature Biotechnology* 26:367-372. doi: 10.1038/nbt.1511.

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.

Di Cagno R, De Angelis M, Lavermicocca P, De Vincenzi M, Giovannini C, Faccia M, Gobbetti M (2002) Proteolysis by sourdough lactic acid bacteria: effects on wheat flour protein fractions and gliadin peptides involved in human cereal intolerance. *Applied and environmental microbiology* 68(2):623-633. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.68.2.623-633.2002>.

Díaz RG (2003) Fermentación del almidón por bacterias lácticas amilolíticas aisladas del pozol. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México, México, CDMX.

Díaz-Ruiz G, Guyot J, Ruiz-Teran F, Morlon-Guyot J, Wachter C (2003) Microbial and physiological characterization of weakly amylolytic but fast-growing lactic acid bacteria: a functional role in supporting microbial diversity in pozol, a Mexican fermented maize beverage. *Applied and Environmental Microbiology* 69(8):4367-4374. doi: 10.1128/AEM.69.8.4367-4374.2003.

Domínguez-Ramírez LL, Rodríguez-Sanoja R, García-Garibay M, Sainz T, Wachter C (2020) Tolerance to acid and alkali by *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* strain 25124

isolated from fermented nixtamal dough: pozol. studies in apt broth. Food Microbiology 90:103458.

<https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103458>.

Escalante A, Wachter CM, Farrés A (2001) Lactic acid bacterial diversity in the traditional Mexican fermented dough pozol as determined by 16S rDNA sequence analysis. International Journal of Food Microbiology 64:21-31. doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00428-1.

Flores AG (2007) Estudio de bacterias lácticas xilanolíticas aisladas del pozol. Identificación por medio de ARDRA. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, México, CDMX.

Giles GM (1995) Estudio sobre las interacciones microbianas importantes para el incremento de proteína durante la fermentación de pozol. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, México, CDMX.

Giles GM (2012) Estudio de la sobrevivencia de enterobacterias aisladas del pozol durante la fermentación láctica de masas y suspensiones de harina de maíz nixtamalizadas. Tesis de Maestría. UNAM, México, CDMX.

Havliš J, Thomas H, Šebela M, Shevchenko A (2003) Fast-response proteomics by accelerated in-gel digestion of proteins. Analytical chemistry 75(6):1300-1306.

<https://doi.org/10.1021/ac026136s>.

Jung JY, Lee SH, Kim JM, Park MS, Bae JW, Hahn Y, Madsen EL, Jeon CO (2011) Metagenomic analysis of kimchi, a traditional korean fermented food. Applied Microbiology and Biotechnology 77(7):2264-2274. doi: [10.1128/AEM.02157-10](https://doi.org/10.1128/AEM.02157-10).

Labib E, Blaut M, Hussein L, Gound M, Kramer DL, Paly O, Ganesh B, Schumann P, Pukall R, Wotting A, Fouad MT (2018) Molecular diversity of gut microbiota and short chain fatty acids in egyptian adults following dietary intervention with fermented sobya. Journal of Food: Microbiology, Safety & Hygiene 3(2):1-11. DOI: 10.4172/2476-2059.1000139.

Leroy F, De Vuyst L (2004) Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. Trends in Food Science &

Technology 15(2):67-78.

<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.09.004>.

Leyva Cynthia (2018) Aproximación proteómica a la fermentación del pozol. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México, México, CDMX.

Lin L, Li Z, Hu C, Zhang X, Chang S, Yang L, Li Y, An Q (2012) Plant growth-promoting nitrogen-fixing enterobacteria are in association with sugarcane plants growing in Guangxi, China. Microbes and Environments 27:391-398. doi: 10.1264/jsme2.me11275.

Loeza NM (1991) Efecto de la nixtamalización en la fermentación del pozol. Tesis de licenciatura.

Universidad Nacional Autónoma de México, México, CDMX.

López-Hernández M, Rodríguez-Alegría ME, López-Munguía A, Wachter C (2018) Evaluation of xylan as carbon source for *Weissella* spp., a predominant strain in pozol fermentation. LWT-Food Science and Technology 89:192-197.

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.10.030>.

Mariotti F, Tomé D, Mirand PP (2008) Converting nitrogen into protein—beyond 6.25 and Jones' factors. Critical reviews in food science and nutrition 48(2), 177-184.

<https://doi.org/10.1080/10408390701279749>.

Morales EC (2011) Estudio de la presencia y sobrevivencia de *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus* en el pozol. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, México, CDMX.

Nesvizhskii AI, Keller A, Kolker E, Aebersold R (2003) A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. Analytical Chemistry 75(17):4646-58.

<https://doi.org/10.1021/ac0341261>.

Nout MJR (1991) Ecology of accelerated natural lactic fermentation of sorghum-based infant food formulas.

International Journal of Food Microbiology. 12:217-224.

Nout MJR, Rombouts FM (1992) Fermentative preservation of plant foods. Journal of Applied Bacteriology 73:136s-147s.

Artículos

Nuraida L, Wachter C, Owens JD (1995) Microbiology of pozol, a Mexican fermented maize dough. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 11:567-571. doi: 10.1007/BF00286375.

Olvera C, Santamaría RI, Bustos P, Vallejo C, Montor JJ, Wachter C, Lopez-Munguia A (2017) Draft genome sequence of *Leuconostoc citreum* CW28 isolated from pozol, a pre-hispanic fermented corn beverage. *Genome Announcements* 5(48):e01283-17. doi: 10.1128/genomeA.01283-17.

Ramírez JF (1987) Biochemical studies on a Mexican fermented food pozol. Tesis de Doctorado. Cornell University, Ithaca, NY.

Ramírez-Chavarín N, Wachter-Rodarte C, Pérez-Chabela ML (2010) Characterization and identification of thermotolerant lactic acid bacteria isolated from cooked sausages as bioprotective cultures. *Journal of Muscle Foods* 21:585-596. doi.org/10.1111/j.1745-4573.2009.00206.x.

Rizo J (2015) Estudio proteómico de las hidrolasas del pozol. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México, México, CDMX.

Rizo J, Rogel MA, Guillén D, Wachter C, Martínez-Romero E, Encarnación S, Sánchez S, Rodríguez-Sanoja R (2020) Nitrogen fixation in pozol, a traditional fermented beverage. *Applied and Environmental Microbiology* 86(16): e00588-20. DOI: 10.1128/AEM.00588-20.

Rodríguez-Saavedra C, Rodríguez-Sanoja R, Guillén D, Wachter C, Díaz-Ruiz G (2021) *Streptococcus infantarius* 25124 isolated from pozol produces a high molecular weight amylopullulanase, a key enzyme for niche colonization. *Amylase* 5(1):1-12. <https://doi.org/10.1515/amyase-2021-0001>.

Rogel MA, Hernández-Lucas I, Kuykendall LD, Balkwill DL, Martínez-Romero E (2001) Nitrogen-fixing nodules with *Ensifer adhaerens* harboring *Rhizobium tropici* symbiotic plasmids. *Applied and Environmental Microbiology* 67(7):3264-3268. DOI:<https://doi.org/10.1128/AEM.67.7.3264-3268.2001>.

Rosenblueth M, Martínez L, Silva J, Martínez-Romer E (2003) *Klebsiella variicola*, a novel species with clinical and plant-associated isolates. *Systematic and Applied Microbiology* 27:27-25. doi.org/10.1078/0723-2020-00261.

Sainz T, Wachter C, Espinoza J, Centurión D, Navarro A, Molina J, Inzunza A, Eslava C (2001) Survival and characterization of *Escherichia coli* strains in a typical Mexican acid-fermented food. *International Journal of Food Microbiology* 71:169-176. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00617-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00617-1).

Sun S, Chen Y, Chen J, Li Q, Zhang Z, Lan Z (2018) Isolation, characterization, genomic sequencing, and GFP-marked insertional mutagenesis of a high-performance nitrogen-fixing bacterium, *Kosakonia radicincitans* GXGL-4A and visualization of bacterial colonization on cucumber roots. *Folia Microbiologica* 63:789-802. doi: 10.1007/s12223-018-0608-1.

Tamura K, Nei M, Kumar S (2004) Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101:11030-5 USA. doi:101:11030-11035.

Ulloa M, Herrera T, Lappe P (1987) Fermentaciones tradicionales indígenas de México. Instituto Nacional Indigenista, México.

Ulloa M, Teófilo H, de la Lanza G (1971) Fijación de nitrógeno atmosférico por microorganismos el pozol. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 13:113-124.

van den Brink J, de Vries RP (2011) Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 91(6):1477-1492.

Wachter C, Canas A, Cook PE, Bárzana E, Owens JD (1993) Sources of microorganisms in pozol, a traditional Mexican fermented maize dough. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 9: 269-274. <https://doi.org/10.1007/BF00327853>.

Wachter C, Cañas A, Bárzana E, Lappe P, Ulloa M, Owens JD (2000) Microbiology of Indian and Mestizo pozol fermentations. *Food Microbiology*

Artículos

17:251–256.

<https://doi.org/10.1006/fmic.1999.0310>.

Wacher RC (1995) Estudio sobre la microbiología del pozol. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México, México, CDMX.

Wacher-Rodarte M, Trejo-Muñúzuri TP, Montiel-Aguirre JF, Drago-Serrano ME, Gutiérrez-Lucas RL, Castañeda-Sánchez JI, Sainz-Espuñes, T (2015) Antibiotic resistance and multidrug-resistant efflux pumps expression in lactic acid bacteria isolated from pozol, a nonalcoholic Mayan maize fermented beverage. *Food Science and Nutrition* 4(3):423-430. doi: 10.1002/fsn3.304.

Wu Z, Zhuang B, Weng P, Zhang X (2015) Fermentation quality characteristics and flavor formation changes during the process of pickled wax gourd in Eastern Zhejiang. *International Journal of Food Properties* 19:409:419.

<https://doi.org/10.1080/10942912.2015.1027775>

Zhu B, Zhou Q, Lin L, Hu C, Shen P, Yang L, An Q, Xie G, Li Y (2013). *Enterobacter sacchari* sp. novo a nitrogen-fixing bacterium associated with sugar cane (*Saccharum officinarum* L.). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63:2577–2582. doi: 10.1099/ijs.0.045500-0.