

UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

T E S I S

El balché; un ejemplo de biotecnología
ancestral en Nahá, Ocosingo, Chiapas

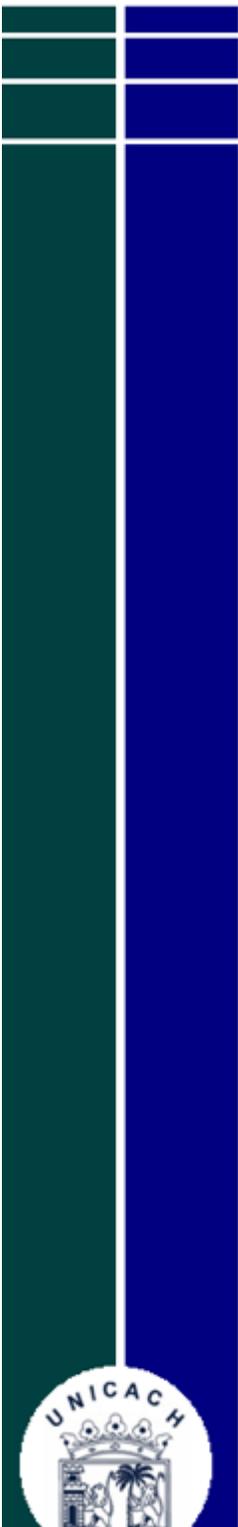
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

ALAN MARTIN SÁNCHEZ DOMÍNGUEZ

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas

Agosto de 2022



UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

TESIS

El balché; un ejemplo de biotecnología
ancestral en Nahá, Ocosingo, Chiapas

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

ALAN MARTIN SÁNCHEZ DOMÍNGUEZ

Directora

Dra. Alma Gabriela Verdugo Valdez

Instituto de Ciencias Biológicas, UNICACH

Asesora

Dra. María Silvia Sánchez Cortes

Instituto de Ciencias Biológicas, UNICACH

Asesora

Dra. Carolina Órantes García

Instituto de Ciencias Biológicas, UNICACH



Tuxtla Gutiérrez, Chiapas

Agosto de 2022

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas (UNICACH) por la formación académica y profesional, así como el constante apoyo a mis pasiones y curiosidades por las diferentes formas de vida, es decir mi amor por la biología.

A la Dra. Alma Gabriela Verdugo Valdez, por permitirme trabajar con usted y ser mi directora en este gran proyecto, sobre todo por brindarme sus conocimientos y su equipo del laboratorio de Microbiología, también agradezco mucho su persistencia a lo largo del proyecto.

A la Dra. M. Silvia Sánchez Cortés por su apoyo y guía que me inspiró una forma diferente de ver la ciencia y entender un poco más a las comunidades de Chiapas.

A la Mtra. M. Ester Molina Ruiz por sus observaciones y comentarios en mi tesis, gracias.

A Don Antonio Martínez, Bor, Cayun y toda la comunidad lacandona de Nahá por permitirme formar parte de este maravilloso viaje cultural y científico.

A las laboratoristas por las facilidades y asesoramiento con los materiales, métodos y equipos.

DEDICATORIA

Gracias a todas las personas que hicieron posible mi sueño de hacer ciencia.

Con especial amor a mi familia, para empezar mis padres, que me apoyaron desde el primer momento que me aventure en este viaje; Mi padre: que se levantó cada mañana, de lunes a viernes, bajo el sol o la lluvia, siempre un ejemplo de ser humano. Mi madre, preciosa mujer que la vida me regalo como otro ejemplo de lo que es ser una persona integra, alegre y empoderada. Fuiste a largo de toda mi formación como la luz de un faro a través de las tormentas.

A mis tíos, Toño y Silvia, son los ángeles que Dios me mando, su tutela a lo largo de todos estos años me hizo un hombre más comprometido conmigo, mi entorno y un ser supremo.

Mi abuelita linda, el rostro más dulce y sus manos como el camino viejo, la responsable de este amor por la biología. Su influencia me hizo conectar con la naturaleza, los pueblos indígenas, mi pueblo y nuestra tierra, rica y sagrada.

A toda mi familia, que siempre vieron con buenos ojos y alimentaron mi curiosidad por la ciencia, cómplices en algunos viajes a comunidades.

A mis amigos, que siempre fomentaron, impulsaron y me ayudaron a desarrollar mi afición por las bebidas fermentadas.

ÍNDICE

RESUMEN.....	VIII
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Los Lacandones.....	3
2.1.1 La cosmovisión de los lacandones	3
2.2. Contexto histórico del balché	7
2.3. <i>Lonchocarpus longistylus</i>	9
2.4. Fermentación	10
2.4.1. Fermentación alcohólica	11
2.4.2. Condiciones para la fermentación alcohólica	12
2.5. Las levaduras	13
2.6. Métodos de identificación de levaduras	14
2.6.1. Descripción morfológica: caracterización macro y microscópica	14
2.6.2. Método molecular para identificación de levaduras	15
2.6.3. Método basado en el uso del genoma ribosomal: polimorfismo de longitud en los fragmentos de restricción del ADNr/RNAr (PCR-RFLP).....	15
III. ANTECEDENTES	18
IV. OBJETIVOS	22
4.1. General	22
4.2. Particulares	22
V. ZONA DE ESTUDIO	23
VI. MÉTODO	26
6.1. Trabajo de campo	26
6.2. Colecta de muestras	26
6.3. Trabajo de laboratorio	27

6.3.1. Aislamiento en placa.....	27
6.3.2. Caracterización de morfotipos.....	27
6.3.3. Polimorfismos de Longitud de los Fragmentos de Restricción de la región ITS- 5.8S del ADNr (RFLP)	28
6.4. Identificación.....	29
VII. RESULTADOS	30
7.1. Ceremonia del balché.....	30
7.1.1. Descripción de la elaboración del balché.....	30
7.2. Parámetros fisicoquímicos.....	39
7.3. Diversidad de levaduras	40
7.3.1. Características morfológicas de las colonias de levaduras.....	40
7.3.2. Características morfológicas celulares	40
7.4. Identificación de levaduras.....	41
VIII. DISCUSIÓN	43
IX. CONCLUSIÓN	46
X. PROPUESTAS Y RECOMENDACIONES	48
XI. REFERENCIAS DOCUMENTALES	49

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Descripción de los tiempo de nuestro en del balché	26
Cuadro 2. Descripción de los pasos de PCR directa	29
Cuadro 3. Parámetros de las variables temperatura y pH, respecto a los diferentes tiempos demuestreo.....	39
Cuadro 4.Morfotipos de las colonias amplificadas y digeridas con las enzimas de restricción; comparas con literatura especializada	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación taxonómica de <i>Lonchocarpus longistylus</i> , tomado de Enciclopedia (CONABIO, 2019).....	9
Figura 2. Localización de la comunidad de Nahá en la selva Lacandona, Chiapas, México	23
Figura 3. Fotografía de Don Antonio descubriendo la canoa para balché, cubierta con ramas de palmera.	31
Figura 4. Fotografía de Don Antonio mientras manipula la resina de copal con fuego para sellar cualquier orificio de la canoa.	34
Figura 5. Fotografía del recipiente sagrado, elaborado con barro y de vistosas decoraciones en toda su superficie, de altura no mayor a 30 cm, su nombre “Bol” deriva de ser un Dios menos, señor del vino.	33
Figura 6. Fotografía de Don Antonio mientras realizaba el canto secreto antes de añadir las cortezas de balché.....	33
Figura 7. Fotografía de Don Antonio mientras escogía las cortezas secas de balché, para añadirlas a la canoa.....	34
Figura 8. Don Antonio mientras tala el árbol de balché.....	35
Figura 9. Don Antonio mientras golpea una rama del árbol de balché para obtener la corteza fresca que se va a añadir a la canoa.....	35
Figura 10. Fotografía de Don Antonio mientras llenaba las 11 jícaras con balché. Se observa en el centro a Bor	35
Figura 11. Fotografía de Don Antonio mientras elaboraba algo similar a una cuchara con la palma xate recién cortada de la selva.	36
Figura 12. Fotografía de Don Antonio con la mano derecha encendiendo el incienso de los Dioses. Con la mano izquierda las hojas de palma xate	37
Figura 13. Fotografía de Don Antonio enseñando como se debe beber el balché a Alan Sánchez	38

Figura 14. Fotografía macroscópica de las colonias L-1, aisladas en medio LW durante la elaboración del balché en la comunidad de Nahá	40
Figura 15. Fotografía macroscópica de las colonias L-2, aisladas en medio LW durante la elaboración del balché en la comunidad de Nahá,	40
Figura 16. Células de levaduras de la colonia L-1 observadas con un Objetivo 100X, del balché en la comunidad de Nahá, Ocosingo, Chiapas.....	41
Figura 17. Células de levaduras de la colonia L-2 observadas con un Objetivo 100X, del balché en la comunidad de Nahá, Ocosingo, Chiapas.....	41
Figura 18. Captura de pantalla del gel despues de la digestion con las enzimas Hhal, HaeIII, HinfI, de color amarillo a ambos extremos observamos el marcador de peso molecular en el pozo 1 y 20.....	42
Figura 19. Captura de pantalla de la segunda parte del gel despues de la digestión con las enzimas Hhal, HaeIII, HinfI, de color amarillo a ambos extremos observamos el marcador de peso molecular en el pozo 1 y 11.....	42

RESUMEN

El presente trabajo asume la responsabilidad de presentar el desarrollo de la investigación con un acercamiento cultural, encontrando un vínculo entre el conocimiento científico y las otras formas de conocimiento convencional, que tienen un valor incalculable sobre todo desde la postura de quienes investigan. El balché como bebida tiene una estrecha relación con la religión, la medicina, agricultura y la vida; por ello el balché aparece en los principales textos mayas y se le vincula con el desarrollo de la civilización, por ser el transporte al mundo de lo divino.

La comunidad lacandona de Nahá, área de protección de flora y fauna, conserva tradiciones mayas que les dan identidad cultural. El balché representa una celebración de unión entre las comunidades lacandonas, siendo Nahá, el último lugar con un templo maya tradicional. Don Antonio con una edad cercana a los 100 años, es protector de un legado tan antiguo que se remonta a los orígenes de la civilización maya, y por ello es la única persona que puede preparar un balché de la misma manera que sus antepasados, considerándose el líder espiritual de la comunidad.

El balché se prepara con tres ingredientes, agua, miel o azúcar y corteza de *Lonchocarpus* sp. Y se deja reposar por dos a cuatro días, hasta llegar a la fermentación deseada, convirtiendo el azúcar o miel en alcohol y gas (CO₂).

En este trabajo se analizó balché preparado el 15 de septiembre del 2018 en la comunidad de Nahá, Ocosingo, Chiapas; aislando las levaduras que participaron en la fermentación de la bebida con un medio de cultivo especializado para este fin; medio WallensteinLaboratory (WL), describiendo sus características macro y microscópicas; Posteriormente se procedió a su identificación utilizando técnicas moleculares, PCR-RFLP, donde se encontró que *Saccharomyces cerevisiae* participa activamente en el proceso de fermentación del balché.

I. INTRODUCCIÓN

La biotecnología ancestral corresponde a la era anterior a Pasteur y sus comienzos se confunden con los de la humanidad. En esta época, la biotecnología se refiere a las prácticas empíricas de selección de plantas y animales; sus cruces y a la fermentación como un proceso para preservar y enriquecer el contenido proteico de los alimentos. Este periodo se extiende hasta la segunda mitad del siglo XIX y se caracteriza como la aplicación artesanal de una experiencia (González, 2011).

El pueblo de Egipto lo representó a través del vino y todo lo relacionado con el arte de su preparación. Sin embargo, fueron los griegos y romanos quienes volvieron popular la fabricación artesanal del vino (Dominé, 2004). En la meseta central de México se preparaba una bebida ceremonial conocida como “pulque”, mientras que en Chiapas se elaboran diferentes tipos de bebidas artesanales que tienen valor cultural muy importante, como el pozol, la chicha, taberna, entre otras (Godoy, Herrera y Ulloa, 2003).

En lo profundo de la selva lacandona, la comunidad de Nahá es el último vestigio de lo que fue la religión Maya lacandona, aun conservando la tradición de tener un líder espiritual, encargado de dirigir todas las ceremonias y rituales. Una de las ceremonias más importantes es la elaboración del “balché”. Es una bebida exclusiva de la cultura Maya, elaborada a base de la corteza de un árbol nativo de América (*Lonchocarpus longistylus* *Lonchocarpus violaceus*) que también es llamado balchéy es por el cual lleva el nombre la bebida, otro ingrediente es la miel de abeja (o azúcar) y agua, todos los ingredientes se exponen a una fermentación natural por varios días durante los cuales, la microbiota realiza la transformación de la materia prima, sustrato y medio ambiente (Marianne, 2007).

Entre la microbiota que participa en el proceso fermentativo, están las levaduras que son hongos unicelulares de forma ovalada o alargada de 6 a 8 milésimas de milímetros (μm). La célula de levadura está envuelta por una membrana exterior denominada pared celular que cumple con varias funciones, como regular el intercambio de la célula con el medio exterior permite la entrada

de nutrientes a la célula, y que el CO₂ y el etanol sean secretados al medio (Ponce, 2011). Las levaduras son organismos importantes en el sector biotecnológico (Rodríguez, 2007). Son esenciales en la producción de algunos alimentos y bebidas, tales como pan, cerveza, vino, sidra, entre otros (Senses *et al.*, 2005).

Los trabajos realizados para conocer la microbiota asociada a bebidas tradicionales con procesos de fermentación espontánea en el estado de Chiapas son escasos. La investigación que relacione a las levaduras que participan en los procesos de fermentación natural de las bebidas tradicionales, ayudara a describir un proceso de biotecnología ancestral. Por ello, el presente estudio explora la bebida ceremonial lacandona “balché”, tomando como relevante las levaduras en el proceso de fermentación silvestre (Katz, 2003). Si identificamos a las levaduras que se desarrollan durante el proceso de elaboración del balché, podremos explorar el potencial biotecnológico de las levaduras de este proceso.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Los Lacandones

Se considera que el término “lacandones” alude a todos los indígenas rebeldes que habitaban la selva durante el periodo colonial (Boremanse, 1978, citado por Eroza, 2006). Sin embargo, también se ha propuesto que originalmente se refería a un grupo específico hablante de lengua chortí, que habitaba una pequeña isla situada en el río Lacantún, en el extremo sur de la selva. Sus miembros se autodenominaban “los del Lacam-Tún”, que significa en chortí “gran peñón” o “piedra erecta”. Al ser castellanizado, el vocablo se convirtió en lacandón o lacandones (De Vos, 1980).

Los lacandones son un grupo indígena maya. Representan una de las minorías étnicas más pequeñas de México y del mundo. Los lacandones de Chiapas retornaron en el siglo XV a las formas de vida que habían desarrollado durante el siglo X, al final del periodo clásico (De Vos, 1980). Fue éste el orden de cosas que los españoles encontraron en la región en el mismo siglo XVI, periodo cuando incursionaron en Chiapas (García, 1985).

Estas formas de vida, así como el refugio que el medio selvático procuraba, permitieron a los habitantes de esta región resistir las incursiones militares y misioneras por parte de los españoles durante un periodo más largo de lo que fue posible en otras regiones (García, 1985).

2.1.1 La cosmovisión de los lacandones

A partir de los primeros escritos realizados por exploradores de la selva, los lacandones aparecieron como los últimos sobrevivientes de la extinta civilización maya constructora de los grandes centros ceremoniales; como los últimos sustentadores de una religión libre de toda influencia europea. En lugar de conformar comunidades, los lacandones estaban conformados por grupos que se distribuyeron a lo largo de la selva en núcleos socioparentales (Eroza, 2006).

De acuerdo con Bruce, los habitantes de Nahá fueron los únicos que rechazaron por completo los intentos evangelizadores. A partir de este supuesto,

él redefinió a la comunidad como el último reducto de la religión politeísta maya (Eroza, 2006).

Los lacandones imaginan un cosmos amenazado de destrucción, cuyo equilibrio están obligados a mantener. Los mitos narran de qué manera nacieron los dioses, que a su vez dieron nacimiento a los humanos y crearon los astros para asegurar la reproducción del universo. En esa época mítica se separaron las aguas de la tierra y los distintos niveles del universo: el cielo, la tierra y el inframundo. Entonces hubo también un primer intento de clasificación de los seres humanos (por grupos familiares y territoriales) y de los animales silvestres y míticos. Dos héroes míticos se sacrificaron en una hoguera para convertirse en el Sol y la Luna. A partir de este primer intento de ordenar el mundo, cada uno de los dioses adquirió sus características propias y estableció sus vínculos con el mundo de los hombres. Al mismo tiempo, los dioses se instalaron en el firmamento, donde engendraron una familia que tiene las mismas características que las familias humanas, salvo la mortalidad. Cada uno de esos dioses está revestido de atributos particulares que les permiten asegurar la reproducción de la sociedad, la naturaleza y el cosmos (Marion, 2000).

El orden universal depende del equilibrio existente entre esos tres niveles y del cumplimiento de las obligaciones rituales por parte de los lacandones hacia las deidades que moran en cada uno de esos espacios (Marion, 2000).

Para los lacandones del Nahá los dioses supremos son *Sukukyum*, “señor del inframundo”, *Akyantho*, “el dios de los extranjeros”, y *Hachakyum*, “nuestro verdadero señor”, quien es considerado creador de los lacandones. Los hombres de Nahá y Metzabook que mantienen sus prácticas religiosas tradicionales suelen levantarse en medio de la noche para acudir a orar a la choza consagrada a sus dioses (Eroza, 2006). De manera formal, se puede decir que la cosmogonía lacandona expresa un ordenamiento jerárquico que ubica a las deidades en diferentes niveles (los dioses supremos, los intermedios, las divinidades menores y algunos otros seres sobrenaturales).

Independientemente de su rango, todas las divinidades actúan de manera complementaria en los contextos míticos y rituales. Por consiguiente, todas ellas

son capaces de incidir en la vida de los seres humanos. Por ejemplo, a través de enfermedades pueden demandar la realización de una ceremonia dedicada a ellos en especial (Eroza, 2006).

Para que sus dioses no destruyan el cosmos y por el contrario, atiendan la renovación cíclica de la selva y la alternancia de las fases de vida y muerte de los seres humanos, los lacandones elaboraron un complejo sistema de rituales que se nutre de los relatos contenidos en los mitos y reproduce la oposición, la complementariedad y la alternancia de los principios y categorías míticas (Marion, 1995).

Algunos ritos se realizan en la intimidad del espacio doméstico, otros tienen lugar en el templo familiar y otros en espacios privilegiados, como los ritos que se realizan en Yaxchilán en la estructura del antiguo dios Itzamna, dios de las ciencias, la medicina, la astronomía, etcétera. Otros ritos se verifican en sitios relacionados con la misma ceremonia; por ejemplo, ciertas plegarias en las cuevas del lago de Metzabook para el dios *K'ak*, o bien *Itzanolh Ku*, *Tsibatnah*, para propiciar el nacimiento de un hijo, la curación de un enfermo, el regreso de un familiar, o para obtener una buena cosecha. Metzabook es el dueño del mundo de los muertos; a la orilla del lago que lleva su nombre está la entrada al mundo de las almas. Una cueva llena de restos humanos, de sahumerios rituales y de tambores ceremoniales indica el paso del mundo de los vivos al de los difuntos. Los hombres de los pueblos de Metzabook y de Naha acuden eventualmente a la cueva de Metzabook para ofrendar copal y otros objetos rituales en honor de sus difuntos que descansan en la cueva.

Los rituales más importantes son las ceremonias realizadas por los jefes de familia para asegurar la perennidad del mundo. Estas ceremonias involucran a todos los hombres de la comunidad, independientemente de su linaje, sus compromisos familiares y su nivel de iniciación. Exigen un estricto respeto a la norma de abstinencia sexual y excluyen del recinto sagrado a las mujeres durante todo el tiempo que dura el ritual (Marion, 1995). Estas complejas ceremonias persiguen el objetivo primordial de renovar a los dioses para asegurar el rejuvenecimiento del cosmos.

En sus templos, los lacandones alimentan a sus dioses con copal. Las “ollas de dios” son los receptáculos donde vivirán las deidades durante su ciclo de vida solar. Cada seis o siete años, estas ollas, que son consideradas como una especie de útero que alberga a la deidad, serán destruidas y sustituidas por nuevos recipientes sagrados, a tiempo que los viejos recipientes son sepultados en una cueva del monte. Este ejercicio de renovación cósmica (cada una de las deidades está vinculada con un fenómeno cósmico) hace de los hombres lacandones los reproductores del universo. Para realizar estas ceremonias se visten con la piel del jaguar, es decir, pintan manchas rojas sobre sus túnicas recordando así su filiación con el gran jaguar mítico, genitor universal y destructor apocalíptico de los mayas de la selva.

En los rituales lacandones aparece nítidamente la lógica de un sistema simbólico que restablece el equilibrio entre hombres y mujeres, Sol y Luna, vida y muerte, sin violentar las representaciones que vinculan a los hombres entre sí, con la naturaleza y con el cosmos (Marion, 1995). Y lo más admirable es que se instalan en un mundo estructurado sobre el orden cósmico, realizando así la fusión del pasado con la realidad del presente.

De modo que el sistema ritual de los lacandones no se puede explicar sin los datos mitológicos. Los mitos y las prácticas rituales son la culminación tangible de un proceso de reflexión colectiva acerca de su existencia (Marion, 1995). Fuera de este contexto mitológico, cosmogónico y teogónico.

Por tanto, los lacandones que aún conservan sus creencias tradicionales mantienen una asidua interacción ritual con las deidades. Sus imágenes son representadas por incensarios de barro que los hombres colocan en los templos familiares para la realización de ceremonias (Eroza, 2006).

Cualquiera que sea la naturaleza de los rituales, todos se fundamentan en el mismo patrón: ofrecer copal, comida y bebida ceremonial (Tozzer, 1907). Algunos son de carácter propiciatorio y pueden ser divididos en dos tipos: los que tienen lugar de manera periódica (por ejemplo, cada año) y los relativos al ciclo de vida de los individuos. Además de expresar su gratitud a los dioses, los primeros

tienen como fin renovar y reforzar los vínculos entre los miembros de un grupo socio parental.

Entre las ceremonias periódicas se pueden mencionar el ofrecimiento de las primicias agrícolas y la renovación de los incensarios; ambas ceremonias se prolongan durante días. Entre las ceremonias relacionadas con el ciclo de vida están los ritos de iniciación tendientes a introducir formalmente a los individuos en la colectividad, en función de sus roles sexuales. En el caso de los lacandones de Nahá, tal ceremonia es denominada *meeckchar* o *mecchahaly* se realiza esta ceremonia cuando la persona alcanza la pubertad (Eroza, 2006).

Los lacandones piensan que las enfermedades se presentan como resultado de la voluntad divina; en este sentido, suele asumirse que cuando una persona enferma es porque ha cometido algún acto censurable, tanto en el contexto de su grupo social como en términos de alguna transgresión relativa al entorno natural. Así, quien no pide permiso a los dueños del monte para quemarlo, o quién no deposita las ofrendas correspondientes, es susceptible de enfermar. No obstante, la enfermedad puede indicar que alguna divinidad intenta comunicarse con la persona afectada para expresarle un deseo (por ejemplo, que su incensario sea incluido en el altar familiar para ser venerada) (Eroza, 2006).

2.2. Contexto histórico del balché

La palabra “balché” deriva de su origen etimológico: *Baalche'* es el árbol oculto o secreto, o que rodea o esconde algo, de *baal*, escondido, esconder, cubrir, ocultar; y *che'*, árbol, ya que algunas plantas con propiedades narcóticas o embriagantes llevan nombres que significan oculto, enterrado, secreto (Godoy, Herrera y Ulloa, 2003).

Las primeras referencias documentadas sobre el balché, la redactó el Fray Diego de Landa en su obra “Relación de las cosas de Yucatán” escrito alrededor de 1566, mientras describía la conquista, escribió “Un vino de miel y agua y cierta raíz de un árbol que para esto criaban, con lo cual se hacia el vino fuerte y muy hediondo” haciendo referencia al balché (Sánchez,2018).

El Chilam Balam de Chumayel, un libro de relatos que dejan constancia de las tradiciones religiosas del pueblo original, hace alusión al consumo del balché y rituales secretos.

La Relación geográfica de Tekal denunciaba lo siguiente: “Fueron amigos del vino y se emborrachaban con un vino que hacían los antiguos de miel de abejas y de una corteza de un árbol y dicen los antiguos que era saludable aquella borrachera por ser hecho el vino con miel y purgativo”. La bebida realizada con la corteza del balche, causaba efectos purgativos en el sistema digestivo, siendo también empleada para curar a los débiles y con “frío” por el mal viento. Los oriundos exaltaban sus cualidades desintoxicantes y energizantes, pues los “hacía andar más sanos” (Garza, 1983).

La Relación de la Villa de Valladolid refuerza la idea del balche como brebaje medicinal, siendo también empleado como agente anímico pues “para estos sacrificios y sus areitos usaban de beber y emborracharse con un vino que ellos hacían de una corteza de un árbol que llaman balché, y miel y agua; este vino dicen les causaba sanidad, porque con él se purgaban los cuerpos y lanzaban por la boca muchas lombrices; criábanse robustos y los viejos vivían mucho tiempo y frescos” (Garza, 1983).

A principios del siglo XVII, en un informe contra *Idolorum cultores* prohibieron el consumo, preparación, venta en público y secretamente del balché y pulque, por el gran daño que recibían los dichos indios, a causa de las propiedades de las bebidas que los ponían fuera de sentido y que estando así idolatran (Sánchez, 2018).

Al llegar el siglo XIX, estalló la guerra de Castas, la cual exigía por parte de los indígenas la repartición justa de tierras, autonomía política y religiosa, entre otras causas; lo que permitió el uso del balché como bebida ritual, santiguando y purificando tanto espacios sacros como altares. También se amplió su uso en toda la península de Yucatán, traspasando espacios y tiempos, utilizándose hoy en día en rituales conmemorativos, rogativos, y sesiones terapéuticas (Sánchez, 2018).

2.3. *Lonchocarpus longistylus*

El árbol del balché pertenece al género *Lonchocarpus*; son plantas arbóreas, arbustos, trepadoras, de raíces venenosas; pertenecientes a la familia Fabaceae. Comprende 358 especies descritas y de estas, solo 87 se distribuyen en México (Figura 1). Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO, 2019).

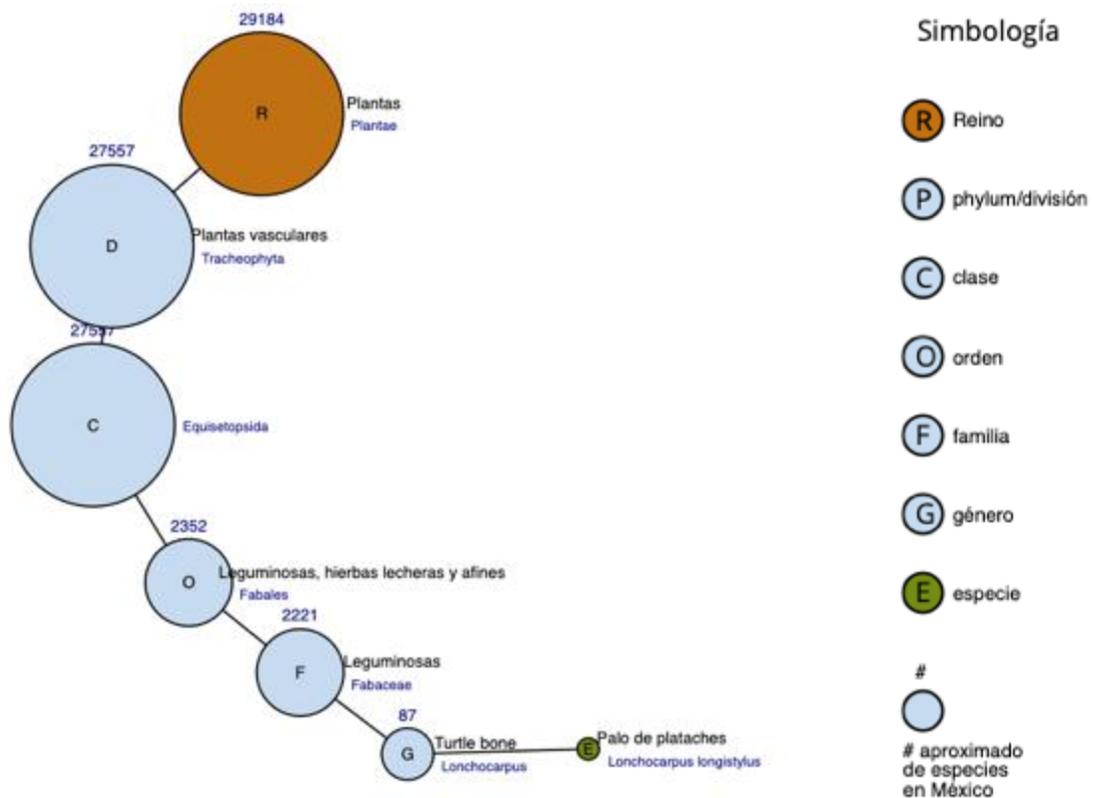


Figura 1. Clasificación taxonómica de *Lonchocarpus longistylus*, tomado de Enciclovida (CONABIO, 2019).

Balché, *bal-ché*, palo gusano, *saayab*, *sakiabyx bal-che'* son los nombres comunes con el que se conoce a la *Lonchocarpus longistylus*, es un árbol nativo del continente Americano, se distribuye desde el sureste de México, particularmente en la península de Yucatán y Chiapas, hasta la región del Petén en Guatemala (Avilés, 2015).

Dependiendo de la disponibilidad de agua puede ser perenne o caduco. Alcanza hasta 18 m de altura y de 20 a 25 cm de diámetro a la altura del pecho. El tronco es recto y corto, la copa es grande, extendida y se compone de ramas finas, ascendentes con follaje denso.

La corteza es fácilmente desprendible del tronco, tiene color gris en el exterior y rosáceo en el interior. Las hojas son compuestas, imparipinnadas y tienen 15 folíolos de 3 a 8 cm de largo, oblongos u ovados, de ápice acuminado a subcaudado (Avilés, 2015). Su floración es durante septiembre, octubre y la fructificación de abril a junio. Las flores son papilionáceas, púrpuras-violeta, y dispuestas en racimos (Corral, 1985).

Los frutos son vainas oblongas y aplanadas, indehiscentes y de color marrón claro cuando están maduros. Cada fruto contiene de una a dos semillas. Las semillas son reniformes, aplanadas lateralmente, de 12.0 a 14.5 mm de largo, de 6.8 a 7.0 mm de ancho y 4.5 a 6.0 mm de diámetro. La cubierta de la semilla es rojiza oscura marrón a marrón oscura, lisa, opaca y coriácea (Avilés, 2015; Corral, 1985).

El hilum es lateral, oblongo o elíptico, rodeado de restos funiculares y una aureola más oscura, y tiene una división. El micropilo es puntiforme y muy próximo al lóbulo radicular. La lente es opuesta al micropilo, oblonga y oscura. El embrión amarillo oscuro tiene un eje curvo y es asimétrico. Los dos cotiledones son planoconvexos en sección transversal, pulposo y aceitoso. La ciruela está ligeramente desarrollada. La radícula es curvada y alargada (Niembro, 1986).

L. longistylus no se encuentra actualmente en alguna categoría de riesgo, sin embargo esta especie tiene un gran valor cultural y etnobotánico ya que más de una parte de la planta puede ser utilizada en la medicina tradicional.

2.4. Fermentación

Uno de los estudios desarrollado por algunos de los científicos fue el proceso de la fermentación a mediados del siglo XIX, debido a las necesidades de las industrias licoreras y alimentarias, por lo que se piensa que Latour estudió el fermento denominado levadura, donde observó que estaba constituido por células. Por otra

parte, Berzelius y Liebig se encargaron de realizar estudios de este fenómeno, de los que surgió una teoría universalmente aceptada: “las materias albuminoides sufren, cuando han sido expuestas al contacto con el aire, una alteración... que les da el carácter de fermento” (Pasteur, 1944).

La fermentación es el proceso de transformación química de las sustancias orgánicas, llevado a cabo por las enzimas producidas por los microorganismos y que, generalmente, va acompañado de un desprendimiento de gases y de un efecto calorífico (Fula, 2010).

Las bebidas alcohólicas son elaboradas por el proceso de fermentación, el cual es llevado a cabo mediante distintas reacciones químicas a partir de la acción de levaduras y bacterias específicas para producir energía como parte de su metabolismo, estas consisten en reacciones redox que ocurren dentro de las células (Molina, 2014).

Así pues, los principales microorganismos fermentadores son las levaduras del género *Saccharomyces*, las bacterias lácticas, *Lactobacillus* spp. y *Streptococcus* spp., las *Enterobacteriaceae* (Puerta, 2010).

2.4.1. Fermentación alcohólica

La fermentación alcohólica es la conversión de la glucosa en etanol, especialmente por las levaduras, quienes descarboxilan primero el piruvato para formar acetaldehído. Se lleva a cabo en dos etapas: la primera que convierte el piruvato en acetaldehído y CO₂, el acetaldehído con NADH₂ produce ácido láctico. Este tipo de fermentación tiene aplicaciones en la industria de alimentos en la producción de pan, cerveza, vino y otras (Tortora *et al.*, 2007; Fula, 2010).

Las levaduras juegan un papel importante, ya que de ellas depende el producto final, esto debido a que se pueden llevar a cabo dos tipos de metabolismos quimiorganotróficos: la fermentación y la respiración (Valdivieso, 2017). Cuando el oxígeno está presente, las levaduras crecen eficazmente sobre el azúcar formando biomasa y CO₂ (respiración). Sin embargo, en ausencia de oxígeno las levaduras cambian a un metabolismo anaeróbico (fermentación) que origina menor cantidad de biomasa celular pero cantidades notables de alcohol y

CO₂. Dentro del género *Saccharomyces*, la especie *Saccharomyces cerevisiae* constituye la levadura y el microorganismo eucariota más estudiado en la industria de alimentos y bebidas fermentadas, de acuerdo con los sustratos y las cepas, se obtienen otros alcoholes como propanol, butanol, isobutanol, pentanol y además, glicerina, ácidosuccínico, ésteres, aldehídos, cetonas, aminas y compuestos de azufre, entre otros (Puerta, 2010).

2.4.2. Condiciones para la fermentación alcohólica

1) Temperatura

La temperatura adecuada, es de los requerimientos más importantes que afectan directamente al proceso fermentativo, la sucesión y el proceso metabólico de las levaduras. Cada especie es diferente, necesita distintos parámetros de temperatura para realizar sus ciclos. Esta condición debe controlarse pues durante la misma se produce un relativo aumento de esta, la temperatura no debe ser muy baja debido a que la fermentación será lenta, si la temperatura excede de los 35°C disminuye la acción de las levaduras y si esta aumenta por encima de los 40°C esta se puede detener, se recomienda como temperatura óptima los 27°C (Molina, 2014; Rodríguez, 2007; Valdivieso, 2017).

2) pH

El crecimiento de la levadura y la velocidad de fermentación alcanza un óptimo desarrollo de acuerdo a la formación del producto y el crecimiento de la levadura a valores de pH entre 4 a 5; en una fermentación alcohólica el pH varía, sin embargo las levaduras tiene la ventaja de soportar en medios más ácidos, que otros microorganismos, lo que en la industria de bebidas fermentadas sirve para controlar los medios libres de bacterias que puedan competir por el sustrato (Suárez, 2016).

3) Aireación

Se pueden llevar a cabo dos tipos de metabolismos quimiorganotróficos: la fermentación y la respiración. En presencia de oxígeno, los microorganismos crecen eficazmente sobre el azúcar formando biomasa y CO₂, y en ausencia de oxígeno cambian a un metabolismo anaeróbico que origina menor cantidad de

biomasa y mayor cantidad de alcoholes, la mayor parte del carbono se emplea como energía y solo el 2 % se asimila como material celular (Molina, 2014; Garzón Hernández, 2009).

4) Nutrientes

Un medio de cultivo debe tener todos los elementos necesarios para el crecimiento microbiano, para esto se debe tener en cuenta los requerimientos nutricionales del microorganismo con el cual se va a trabajar. Las necesidades nutricionales de las levaduras, buscan medios de cultivo que aporten los elementos necesarios para la síntesis de los tejidos celulares y para cubrir las necesidades energéticas de las levaduras (Garzón Hernández, 2009; Valdivieso, 2017).

2.5. Las levaduras

Las levaduras juegan un papel importante en el proceso de fermentación en general; desde el punto de vista de las bebidas alcohólicas, estas mismas son utilizadas para hacer el producto más digerible o para incrementar su valor nutricional (Segura *et al.*, 2010).

Una levadura puede definirse como un hongo unicelular no filamentoso, de forma esférica u oval típicamente, que se reproduce de una manera vegetativa y asimétricamente por gemación o en casos excepcionales por escisión binaria, como sucede con las levaduras que pertenecen al género *Schizosaccharomyces* (Trujillo, 2015). Por otra parte, las levaduras son taxonómicamente diversas ya que se encuentran distribuidas dentro de la división Eumicota que agrupa a los denominados hongos verdaderos, los cuales incluyen en dos de las cinco subdivisiones de los Eumicetos, la Ascomicotina representada por las levaduras capaces de producir ascosporas, llamadas por ello esporógenas, y la Deuteromycotina representada por las levaduras incapaces de formar esporas, llamadas por ello aspógenas o no esporógenas (Mesas y Alegre, 1999, citado por Ambrocio, 2018).

Las levaduras son cosmopolitas por lo que están ampliamente distribuidas en la naturaleza y con frecuencia se las encuentra como una cubierta en las

diferentes partes de una planta (Tortora, Berdely Case, 2007). El intervalo de crecimiento de las levaduras es parecido al de los mohos, con una temperatura que puede ir de 5 a 47 °C; con un desarrollo óptimo de los 25 a 30 °C; también requieren una cantidad de humedad mayor que los mohos. Las levaduras crecen mejor en aerobiosis, aunque las especies de tipo fermentativo son capaces de crecer, aunque lentamente en anaerobiosis (Camacho *et al.*, 2009, citado por Ambrocio, 2018).

2.6. Métodos de identificación de levaduras

Durante el último siglo se ha dependido del aislamiento y cultivo de los microorganismos para su identificación. Éstos han sido caracterizados tradicionalmente por su fenotipo, el conjunto de propiedades celulares observables, como su morfología, propiedades fisiológicas y por la estructura de sus componentes celulares. La necesidad de cultivar los microorganismos para identificarlos ha limitado la comprensión de la diversidad microbiana, ya que ahora se sabe que más del 90% de los microorganismos en los ambientes naturales no pueden ser cultivados usando las técnicas tradicionales (Diazy Wachter 2003).

La identificación de las levaduras se puede llevar a cabo atendiendo a cuatro criterios diferentes: morfológicos, bioquímicos, inmunológicos o genéticos (Linares y Solís, 2007).

2.6.1. Descripción morfológica: caracterización macro y microscópica

La descripción morfológica, la cual se encarga de referir el fenotipo de los individuos u especies, pueden ser dividida en dos apartados: La descripción macroscópica (descripción de los rasgos distinguidos a simple vista) y la descripción microscópica (descripción de los rasgos a nivel celular). El primer criterio tiene en cuenta el aspecto de las colonias de levaduras al crecer en los diferentes medios de cultivo (Linares y Solís, 2007).

Así pues, por disposición en La Norma Oficial Mexicana (NOM- 111- SSA1- 1994), actualmente se debería utilizar únicamente el agar papa dextrosa para la detección y cuantificación de levaduras; sin embargo, en este medio es difícil

diferenciar las colonias de levaduras de las colonias bacterianas; la observación microscópica de los microorganismos es la única forma segura de diferenciarlas. La mayoría de las colonias jóvenes de levaduras son húmedas y algo mucosas; la mayoría de las colonias son blanquecinas, aunque algunas tienen un color crema o rosa (Camacho *et al.*, 2009, citado por Ambrocio, 2018).

Por su parte, las características morfológicas microscópicas de las levaduras se determinan mediante su observación celular, en donde su forma puede ser desde esférica a ovoide, alimonada, piriforme, cilíndrica, triangular e incluso alargada. Es importante señalar que la mayoría de las levaduras, se reproducen asexualmente por gemación multicelular o por gemación polar. Unas pocas especies se reproducen por fisión (Camacho *et al.*, 2009, citado por Ambrocio, 2018).

2.6.2. Método molecular para identificación de levaduras

Las levaduras poseen numerosas aplicaciones en la biotecnología tradicional y moderna. Participan en procesos de producción de alimentos, proteínas de organismos unicelulares, productos con valor añadido y en las últimas décadas se han incorporado a la industria biotecnológica como hospederos para la producción de proteínas de eucariontes. Por estas razones se hace imprescindible la identificación exacta y rápida de las levaduras de interés industrial, clínico y ambiental; unos de los métodos más utilizados actualmente para la identificación de levaduras es el PCR-RFLP (Obrerá, 2004).

2.6.3. Método basado en el uso del genoma ribosomal: polimorfismo de longitud en los fragmentos de restricción del ADN_r/RNA_r (PCR-RFLP)

El análisis de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción PCR (RFLP) es una popular técnica que aprovecha que los SNPs, MNPs y microindels a menudo están asociadas con la creación o supresión de una enzima de restricción (Magdeldin, 2012).

La técnica de PCR-RFLP es muy valiosa para el genotipado de las variaciones específicas de las especies. Es el estándar de referencia más

comúnmente utilizado para el genotipado del Factor V Leiden y G20210A de protrombina. También se ha usado para la detección del alelo JK asociado con un fenotipo Kidd nulo, y la determinación de la apolipoproteína E (APOE) (Magdeldin, 2012).

La determinación del polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción, consiste en la diferenciación de los organismos por el análisis de los patrones de ruptura que se generan en un sitio específico del genoma, cuando es cortado por enzimas de restricción. De esta forma en un gel de electroforesis aparece un patrón de bandas polimórficas correspondientes a los fragmentos de diferentes tamaños, que se generan con el corte de cada endonucleasa. Estos fragmentos polimórficos aparecen debido a que los organismos de diferentes especies, e incluso cepas, difieren en la distancia de los sitios de clivaje para cada enzima de restricción. La similitud de los patrones generados permite establecer correlaciones entre especies y cepas, y la existencia de patrones únicos permite la identificación. Este método se ha empleado para diferenciar entre las especies de los géneros *Candida*, *Cryptococcus* y otras, así como para estudios ecológicos utilizando el ARNr 16S, en determinación de posición taxonómica utilizando el ADNr 18S, para el dominio D1/D2 del ADNr 26S, una región de elevada variabilidad (Obrerá, 2004).

El más amplio uso que se le ha dado a la técnica PRC-RFLP ha sido en estudios de identificación y filogenia de levaduras de interés industrial, utilizando la región del ADNr 5.8S y los espaciadores transcritos internos ITS 1 y ITS 2 (5.8SITS) (Sankar *et al.*, 2011).

En las cepas de levadura la región 5.8S es codificadora y conservada y muestra una baja variabilidad intraespecífica que no permite la delimitación entre cepas de una misma especie, sin embargo, la zona de los ITS, que es una región no codificadora e hipervariable, permite el reconocimiento a nivel interespecífico. Ésta ha sido empleada para la identificación de especies del género *Kluyveromyces*. En muchos estudios se ha utilizado la técnica RFLP acoplada a la reacción de PCR, conocida también como PCR-RFLP y luego son tratados con endonucleasas de restricción para obtener los patrones específicos. Las

diferencias en las secuencias nucleotídicas de las diferentes especies darán lugar a fragmentos de distintos tamaños que son examinados por electroforesis (Obrerá, 2004).

Por su parte, las enzimas más utilizadas para la generación de los fragmentos de restricción son la *HhaI* (homólogo *CfoI*), *HaeIII* y *HinfI*, para completar el análisis y realizar una identificación más certera, recientemente para aquellas especies en donde el patrón generado con esas enzimas es el mismo, es necesario utilizar otras endonucleasas que generen patrones de polimorfismos diferentes para cada especie (Segura *et al.*, 2010).

III. ANTECEDENTES

La elaboración artesanal de bebidas fermentadas ha formado parte de costumbres, tradiciones sociales, religiosas y alimentarias, por lo tanto, han sido culturalmente importantes en el desarrollo de la humanidad. Es conocido que los grandes filósofos como Sócrates, capturaron su época en pensamientos y muchos de ellos se han ayudado de alguna que otra copa de vino, del mismo modo en América.

El estudio de los rituales mexicanos exige un conocimiento profundo de las ideas que forjaron el sistema de pensamiento que los nutre. Estas ideas evolucionaron a través del tiempo y en muchos casos se encuentran al borde de la extinción, sometido a poderosas influencias que explican su deterioro (Marion, 2000).

La identidad cultural de los mayas lacandones en Nahá a venido sufriendo cambios y ajustes en la forma que se relacionan con sus Dioses; Alfred M. Tozzer (1902 a 1905) nos ofrece una brújula a través de sus estudios del sistema espiritual lacandon, y nos advierte de las complejas relaciones de sus ritos y costumbres, así como destaca ser supervivencias de la conquista. Robert D. Bruce (1953 a 1974), recoge información de Chankín Viejo, quien era líder espiritual de la comunidad y murió a los 104 años. Marion Marie Odile (1976 a 1999) describió profundamente el sistema de religiosidad de Nahá, ligada a la selva, a los peñones de la orilla de los lagos, a las rocas pintadas, a las cuevas y a los templos mayas (Roblero, 2008)

Jon R. McGee (1991) da a conocer el rico y complejo universo de saberes, creencias y prácticas mayas lacandonas, relata su impresión durante la preparación del ritual del balche en la comunidad lacandona de Nahá, y describe de manera precisa cada uno de los elementos que acompañan la ceremonia, como las deidades involucradas, los cantos realizados y los motivos por los cuales se realiza, planteando un claro panorama de lo que era el ritual del balché hace más de 30 años.

Díaz y Wachter (2003) describieron los diferentes métodos para estudiar las comunidades microbianas en alimentos fermentados, también compartieron las

diferentes alternativas para la determinación de la estructura microbiana de estos alimentos. Una de ellas consiste en aislar microorganismos y tipificarlos mediante técnicas basadas en el ADN, como el RFLP, la ribotipificación, el AFLP, el ARDRA y el RAPD. Para incluir la detección de microorganismos no cultivables o aún no cultivados se utilizan métodos en los que se extraen ácidos nucleicos directamente del alimento y a partir de éstos se determina la diversidad microbiana. La construcción de bibliotecas de clonas de ADNr 16S, la obtención de “huellas digitales” mediante DGGE o TGGE son ejemplos de estas técnicas. Se presentan avances recientes de la aplicación de estos métodos para el estudio de alimentos fermentados.

Godoy, Herrera y Ulloa, (2003) describieron al “Balché” como una bebida alcohólica no destilada indígenas de México. También destacan el uso de la miel en el proceso por tener posible actividad antibacteriana de origen enzimático que se ha atribuido al peróxido de hidrogeno, el cual se presenta solo en mieles de abejas diluídas, ellos mencionan que la miel genuina es bacteriostática, de menor acción contra hongos levaduriformes que contra bacterias.

Cervantes y Pedroza (2008) Caracterizaron la microbiota presente en el Pulque. Aislaron e identificaron por métodos bioquímicos a un hongo levaduriforme, un cocobacilo Gram negativo y un bacilo Gram positivo pertenecientes a los géneros *Saccharomyces* sp, *Zymomonass* sp, y *Lactobacillus* sp.

Arias *et al.*, (2010) aislaron e identificaron con herramientas moleculares las levaduras presentes en el masato, una bebida fermentada a base de yuca, tradicional del Perú. Se identificaron las diferentes especies de levaduras en cuatro tipos de masato, con ayuda del método PCR-RFLP. Como resultado se aislaron 46 cepas de levaduras, se identificaron 3 especies y dos patrones (A y B) que no pudieron ser identificadas. Siendo *Saccharomyces cerevisiae* la especie predominante en los cuatro tipos de masato.

López *et al.*, (2010) analizaron e identificaron las levaduras asociadas a las chichas de maíz, piña y arracacha, que son bebidas fermentadas de manera

artesanal en Colombia, se tomaron muestras de chicha durante sus tres fases de fermentación: inicial, tumultosa y final. Para su identificación se incluyen pruebas fisiológicas, además, se complementó el estudio de cada aislado empleando técnicas moleculares basadas en el análisis de restricción del gen ARNr 5.8S, los espaciadores transcritos internos (ITS1 e ITS2) y para confirmar las asignaciones realizadas usaron PCR-RFLP, se secuenció el dominio D1/D2 del gen 26S ARNr de los aislados más representativos. Mediante estas técnicas se lograron identificar las especies más representativas de los tres tipos de chicha que fueron 20 especies.

González (2011) durante el congreso multidisciplinario e internacional de agrobiotecnología en Nicaragua, destaca la importancia de la biotecnología ancestral en América Latina.

Molina (2014), también trabajó con la taberna en dos lugares, llevando a cabo la identificación de las levaduras también por el método PCR-RFLP de la región 5.8S-ITS. Molina (2014), logro aislar nueve tipos de colonias de la localidad Benito Juárez, todas correspondientes a la especie *Saccharomyces cerevisiae*. Para la localidad de Las Arreolas se aislaron 16 tipos de colonias en total, de las cuales 10 fueron identificadas (*Saccharomyces pastorianus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia nakasei*, *Rhodotorula minuta*, *Candidatropicalis*, *Candida incommunis*, *Candida stellata*, *Candida mesentérica*), para tres de ellas no fue posible su identificación y los tres restantes podrían tratarse de bacterias.

Santiago *et al.*, (2015) amplió el conocimiento sobre las levaduras asociadas a la fermentación espontánea en la taberna, una bebida tradicional conocida como “vino de palma”. En su trabajo logró el aislamiento e identificación de las levaduras, durante la fermentación espontánea de la savia de la palma de coyol; de esta se aislaron 450 levaduras obtenidas de 45 muestras que fueron colectadas durante 15 días, cada 12 horas de tres palmas en la localidad de Benito Juárez, Villaflores, Chiapas. Los aislados de levadura se identificaron mediante el análisis del patrón de restricción de la región 5.8S-ITS y mediante el análisis de secuencia del dominio divergente D1 / D2 del gen 26S ARNr.

Sánchez (2018) relaciona la ceremonia del balché como un elemento empleado desde la antigüedad como interlocutor entre el hombre y lo trascendental, siendo la bebida del balché consumido para exaltar emociones físicas y mentales, demostrando así su devoción, volviéndose la ceremonia del balché una forma de resistencia en el ámbito religioso; registrando así su importancia a través del espacio y tiempo, utilizándose hoy en día en rituales conmemorativos, rogativos, y sesiones terapéuticas en algunos pueblo de la península de Yucatán.

Los últimos estudios que se encuentran sobre el balché en su mayoría hacen referencia a la iconografía, así es el caso de los murales de Tulum (Pérez, Bíró y Boucher, 2021) describen los contenedores de balché como utensilio para ceremonias religiosas. También presentan la identificación de las flores y frutos del balché, dentro del contexto temporal de los murales del templo 16, y la representación del árbol de balché en el Códice Madrid. Pérez, Bíró y Boucher, (2021) destacan la relevancia de que muchos elementos iconográficos presentes en los murales del templo 16 coinciden con la estación de otoño.

IV. OBJETIVOS

4.1. General

Analizar el proceso biotecnológico ancestral usado en la comunidad de Nahá para la producción del balché.

4.2. Particulares

- Documentar la ceremoniade elaboración del balché en la comunidad de Nahá, Ocosingo, Chiapas.
- Identificar las levaduras asociadas a la etapa de fermentación en la producción del balché.

V. ZONA DE ESTUDIO

Nahá se encuentra ubicada en el sureste de México. En la porción noroeste de la Selva Lacandona del Estado de Chiapas. Ocupa una superficie de 3,847 - 41-59.5 ha y ubicada entre los paralelos 16° 56' 41" y 17° 00' 42" de latitud Norte y a 91° 32' 52" y 91° 37' 43" de longitud Oeste, Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI, 1988). El 23 de septiembre de 1998 se publicó en el Diario Oficial de la Federación el Decreto por el cual se declara área natural protegida (Figura 2), con el carácter de área de protección de flora y fauna con una superficie aproximada de 3,847.41 ha por la Comisión Nacional de Áreas

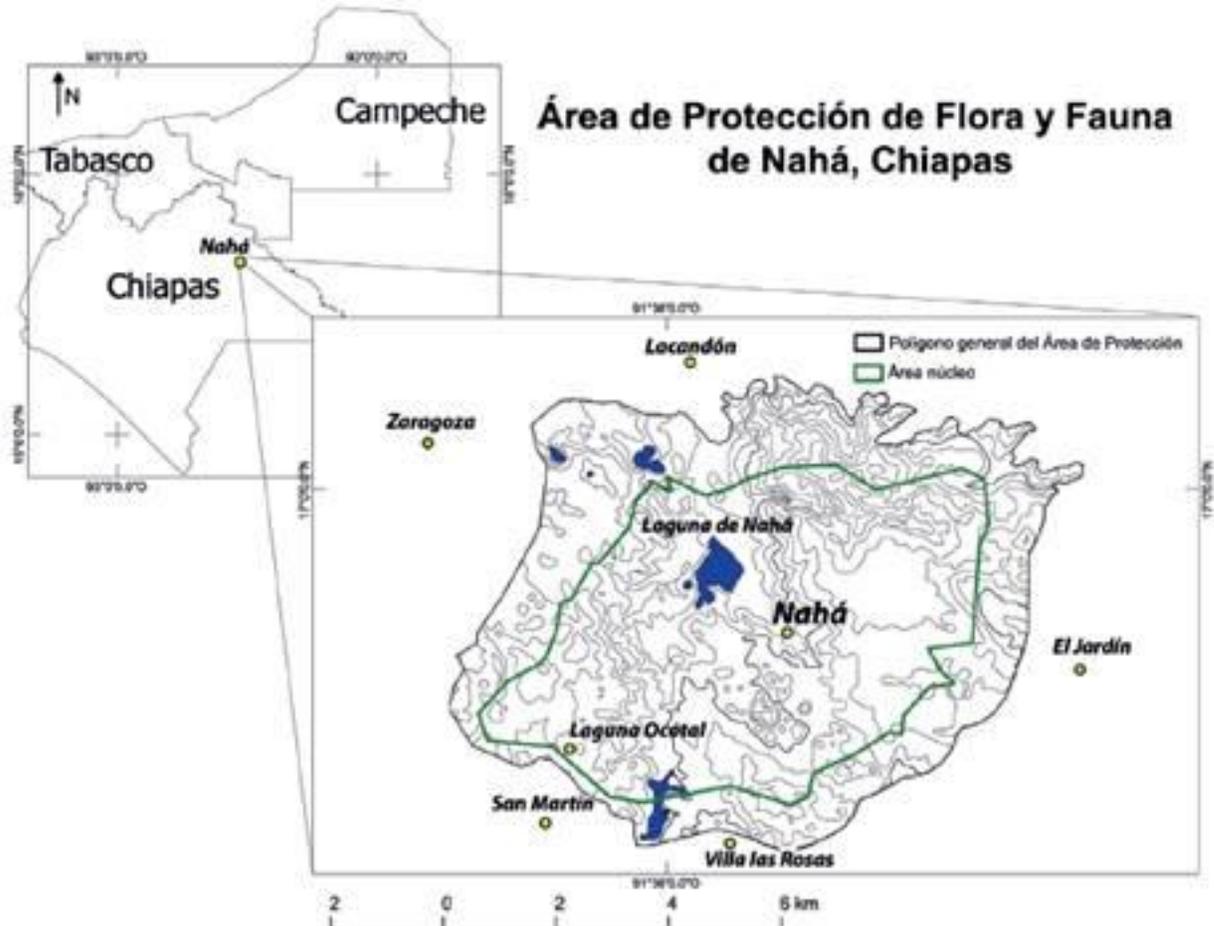


Figura 2. Localización de la comunidad de Nahá en la selva Lacandona, Chiapas, México. Tomado de Duránet *et al.*, (2016).

Naturales Protegidas (CONANP, 2006).

Con sólo 0.16 % de la superficie del país, se considera que esta región cuenta con más que 20 % del total de las especies existentes en México. En menos de cinco décadas la cobertura selvática de esta región ha disminuido en más del 50 %, como consecuencia de un fuerte proceso de colonización, expansión de las vías de comunicación, la tala inmoderada y la incorporación de nuevas áreas al aprovechamiento agrícola y pecuario (Durán *et al.*, 2016).

El área se encuentra sobre mesetas de origen cárstico, su fisiografía se caracteriza por una secuencia meseta-sierra-planicie sedimentaria con un gradiente altitudinal que va de los 800 msnm en las planicies a los 1,280 msnm en las mesetas, alternadas con valles, geoformas que Muench (1978) consideró como serranías y terrazas antiguas. Geológicamente predominan las calizas del Cretácico superior de inicios aproximadamente hace 60 ó 70 millones de años. (INEGI, 1988).

El sistema fluvial superficial se manifiesta en una red de ríos y arroyos que desembocan en los ríos Tulijá y Santo Domingo-Chocoljá, los cuales drenan en dirección sureste-noroeste y forman parte de la gran cuenca del Usumacinta (INEGI, 1988). El sistema de lagos de Nahá está integrado por nueve cuerpos de agua permanentes cuyo nivel varía muy poco entre la temporada seca y la húmeda. Los lagos Nahá y el Ocotolito poseen dimensiones considerables: 52.26 y 7.41 ha respectivamente. Los cuerpos de agua ocupan 127 ha, que corresponden al 3.31 % de la superficie que ocupa el Área (CONANP, 2006).

El clima es cálido húmedo con lluvias abundantes en el verano y parte del otoño, y una temporada seca corta de marzo a abril. La temperatura media mensual es de 23.6 °C, con una oscilación térmica anual de 5.6 °C; el mes más frío es enero, con un promedio de 20.9 °C, y los más cálidos son mayo y junio con un promedio mensual de 25.6 °C (CONANP, 2006). La precipitación total anual va de 1,862 mm a 2,500 mm (Muench, 1978; CONANP, 2006). Los suelos predominantes son rendzinas y litosoles, de coloración roja y gris, respectivamente; son suelos poco desarrollados que no sobrepasan 50 cm de espesor, generalmente arcillosos (Muench, 1978).

Con base en las clasificaciones de Rzedowski (1978) se ha clasificado a la vegetación de Nahá como: bosque tropical perennifolio, bosque mesófilo de montaña, bosque de coníferas y vegetación secundaria (acahuales). El listado de flora incluye 779 especies de plantas vasculares que pertenecen a 452 géneros de 116 familias (CONANP, 2006). El 51 % de las especies se agrupan en las familias: Rubiaceae, Fabaceae, Orchidaceae, Bromeliaceae, Melastomataceae, Euphorbiaceae, Lauraceae, Araceae, Moraceae, Meliaceae y Arecaceae (CONANP, 2006).

La etnia lacandona constituye el único grupo realmente autóctono de la región y posee un conocimiento tradicional sobre las formas de aprovechamiento de la flora y vegetación regional, mediante el sistema de roza, tumba y quema para el manejo del suelo (Levy Aguirre, 2005).

VI. MÉTODO

6.1. Trabajo de campo

Se solicitó permiso a las autoridades de la comunidad para tener acceso y libre tránsito en el interior de la comunidad.

Se realizaron entrevistas no estructuradas a Don Antonio Martínez, su esposa y nietos. Así mismo, se realizaron caminatas por el interior del Área Natural Protegida de Nahá.; estableciendo una relación de intimidad, sintonía y armonía, basado en lo propuesto por Taylor y Bogdan (1987).

Se utilizó una cámara Canon EOS Rebel T6, con un lente EFS 18-55 para fotografiar lo que Don Antonio nos permitía durante todo el proceso.

6.2. Colecta de muestras

La colecta de muestras se llevó a cabo dentro de la comunidad de Nahá, específicamente en el templo de los Dioses Mayas Lacandones; se tomaron muestras en diferentes tiempos (cuadro 1) determinados por el líder espiritual con un lapso no mayor a 24 horas entre muestreo, durante el periodo de fermentación de tres días y también cuando la bebida estuvo lista para su consumo (López *et al.*, 2010).

Cuadro 1. Descripción de los tiempos de muestreo en el balché

Tiempos de muestreo	Fecha	Día	Hora
To	15/09/2018	Sábado	00.0
t1	16/09/2018	Domingo	23.5
t2	16/09/2018	Domingo	33.5
t3	17/09/2018	Lunes	49.5

Para cada muestreo se obtuvo el pH, la temperatura de la bebida con un Medidor analógico HI83141 de pH/mV/°C con electrodo HI1230B HANNA® instruments y la temperatura del ambiente a través de la estación meteorológica automática (EMA) de Montes Azules, Chiapas.

En el t0 se colectaron tres muestras, la primera se inóculo directamente, de la segunda muestra se hizo una dilución 1:10 con agua destilada estéril y de la tercera muestra la dilución fue 1:100. En el t1 (23.5 h) se hicieron dos diluciones, 1:100 y 1:1,000. En el t2 (33.5 h) las diluciones fueron 1:1,000 y 1:10,000. En el t3 (49.5 h) que correspondió al producto terminado, las diluciones fueron 1:10,000, 1:100,000 y 1:1,000,000. En todas las muestras se tomaron 100 µL de la dilución para ser inoculados por duplicado en las placas con agar nutritivo Wallerstein (WL), adicionado con 0.05% de Cloranfenicol. El inóculo se distribuyó por dispersión en toda la superficie de la caja con una varilla de vidrio acodada estéril hasta su absorción completa.

Las placas, se registraron con un número; así como el día, la hora de colecta, la dilución decimal que fue inoculada y el número de réplica. Se mantuvieron a temperatura ambiente hasta el traslado al Laboratorio de Microbiología del Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas (UNICACH) para su procesamiento.

6.3. Trabajo de laboratorio

En el laboratorio de microbiología se guardaron las placas en la Incubadora bacteriológica ARSA a 29°C por 48 horas, para su posterior conservación en refrigeración.

6.3.1. Aislamiento en placa

Las diferentes colonias desarrolladas en las cajas durante el muestreo se aislaron en el laboratorio de microbiología en placas petri con medio WL, para posteriormente pasar a su caracterización con un microscopio Carl Zeiss, Primo Star.

6.3.2. Caracterización de morfotipos.

Las características morfológicas observadas fueron: forma de la colonia, textura, color directo del centro, color directo del borde, forma del borde, brillo, superficie, elevación, anillo interno, color del anillo interno y medición celular (Verdugo, 2013).

Se procedió a separar a todos los morfotipos caracterizados y se aislaron por duplicado en cajas con agar YPD (Por sus siglas en inglés: Yeastextract, Peptone, Dextrose Agar).

De los morfotipos aislados se eligieron al azar las cepas representativas para realizar los análisis moleculares.

6.3.3. Polimorfismos de Longitud de los Fragmentos de Restricción de la región ITS- 5.8S del ADNr (RFLP)

En primera instancia se activaron los tubos de reacción del GoTaq® Green Master Mix de PromegaCorporation; con una mezcla de reacción de 12.5 µL de una solución premezclada que contiene ADN polimerasa Taq derivada de bacterias, dNTP, MgCl₂ y tampones de reacción para una amplificación eficiente de las plantillas de ADN mediante PCR. Se añadió a la mezcla de reacción 1 µL de ITS 1 (5'- TCC GTA GGT GAA CCT GCG G- 3'), 1 µL de ITS 4 (5- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC- 3') y 10.5 µL de agua destilada estéril; posteriormente se inoculó la biomasa de la colonia deseada; dicho inóculo se tomó por picadura única de colonias frescas (Valdivieso, 2017).

Las muestras se amplificaron por PCR directa de acuerdo a las condiciones mencionadas en el Cuadro 2, con 35 ciclos. Con el resultado de la PCR se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa (UltraPure™, Invitrogen) al 1% durante 30 minutos a 80 Volts; en cada pozo, se depositaron 3 µL de muestra amplificada con 2 µL de buffer de carga 6X (Xylencianol, 0.25%; azul de bromofenol, 0.25%; glicerol, 30% y TAE 10X, 10%) y 2 µL marcador de peso molecular de 100pb de PromegaCorporation en cada extremo del gel; para visualizar los amplicones; el gel se tiñó con Bromuro de Etidio (BrEt) al 1% en TAE 1X durante 15 minutos; la visualización del mismo se realizó en un fotodocumentador (Enduro™ GDS Labnet International, Inc.). La imagen se digitalizó mediante el programa Enduro GDS 2.0.

Cuadro 2. Descripción de los pasos de PCR directa

Pasos	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	96 °C	25 min
Desnaturalización	94 °C	1 min
Alineamiento	55°C	2 min
Extensión	72°C	2 min
Extensión Final	72 °C	10 min
Incubación	4° C	∞

Cada muestra de ADN amplificada se dividió en 6 µL que se mezclaron con 19 µL de una solución madre a base de 2.0 µL de buffer 10X 0.2 µL del Act. BSA, y 16.3 µL de agua destilada estéril y 0.5 µL de la enzima de restricción correspondiente (HhaI, HaeIII y HinfI de PromegaCorporation).

La digestión se llevó a cabo en un termociclador (AppliedBiosystemsVeriti 96 WellThermalCycler) durante 2 horas a 37 °C. Los fragmentos de restricción fueron analizados mediante corrimiento en gel de agarosa al 3% durante 1 hora a 100 Volts; en cada pozo se depositarán 10 µL de muestra digerida mezclada con 2 µL de buffer 10X y 3 µL del marcador de peso molecular de 100 pb de PromegaCorporation en cada extremo. El corrimiento de las muestras se realizó con buffer TAE 1X (Tris base, 40 mM; Ácido acético glacial, 20 mM y EDTA al 0.5 M a pH 8, 1mM). Para la tinción y observación de los patrones de digestión se replicó el mismo procedimiento que para la visualización de los amplicones.

6.4. Identificación

Los patrones de bandas obtenidos por la digestión de cada enzima de restricción se analizaron con el programa QuantityOne y se compararon con los perfiles descritos en la bibliografía especializada.

VII. RESULTADOS

7.1. Ceremonia del balché

Se procedió a un encuentro con Don Antonio Martínez, líder espiritual de la comunidad lacandona de Nahá, Ocosingo, Chiapas, a quien se solicitó permiso para documentar y estudiar el proceso ceremonial de elaboración del balché, participando en todos los rituales de la ceremonia, hasta concluir con una degustación del balché.

Al ir camino al lugar donde se realizó la ceremonia Don Antonio relata que él y sus hijos (Bol Martínez y Chankín Martínez) hicieron todo con ayuda del último gobernador (Juan Sabines Gutiérrez) que les regaló el guano (*Sabal mexicana* Martius) para construir el templo.

Durante el proceso de elaboración del balché se obtuvieron comentarios al respecto del peligro que corren sus tradiciones por la llegada de la modernidad a la comunidad y el cambio de su alimentación por productos comerciales, así como el hecho de que a la mayoría de las personas de la comunidad han perdido interés por sus rituales. Cuenta que antes las personas pedían mucho a sus Dioses, para cuidar, comida, no morir, etc... “pedían haciendo balché”.

7.1.1. Descripción de la elaboración del balché

La ceremonia del balché fue ofrecida por Don Antonio Martínez, último líder espiritual de Nahá. Al llegar al *Yatochku'h* (templo de los Dioses Mayas) se procedió a hacer una ligera limpieza del lugar y del espacio donde tiene a los Dioses; así como del recipiente donde se producirá el balché que se llama *balché chem* (canoa para balché) la cual está elaborada con madera de Caoba (*Swietenia macrophylla*). Don Antonio narra que antes tenían una tradición de salir a buscar el árbol de Caoba a lo profundo de la Selva y tenían una técnica especial para darle la forma de canoa, tradición que se ha abandonado.



Figura 3. Fotografía de Don Antonio descubriendo la canoa para hacer balché, cubierta con ramas de palmera.

La canoa se encontró aproximadamente a 30 cm del suelo; estaba boca abajo, cubierta con ramas de una palmera conocida como *Jtya' chij'ipy* atada con pedazos de corteza de árbol (Figura 3). Al descubrir la canoa salieron huyendo rápidamente diferentes artrópodos.

La limpieza de la canoa se realizó solo con agua entubada proveniente de un manantial a no más de dos kilómetros de distancia; al llenar la canoa con agua aparecieron grietas y perforaciones realizadas por los artrópodos que habitaron la canoa mientras esta no se utilizaba (nueve meses).



Figura 4. Fotografía de Don Antonio mientras manipula la resina de copal con fuego para sellar cualquier orificio de la canoa.

Don Antonio utilizó como goma una resina aromática de origen vegetal llamada “copal” proveniente de un árbol de la familia Burseraceae, dicha resina se calentó con fuego de la rama de un ocote (*Pinus montezumae*) y así se consiguió un pagamento natural que ayudó a sellar los huecos en la canoa (Figura 4), un procedimiento que se llevó un tiempo, pero lo realizó con mucha calma y paciencia.

Una vez lista la canoa se le volvió a añadir agua a través de un recipiente especial llamado “Bol” (Figura 5) con capacidad hasta 17 litros, por lo que se llenó varias veces agua hasta conseguir un volumen aproximado de 40 litros. Don Antonio narra que bol es el señor del vino que hace felices a los Dioses.



Figura 5. Fotografía del recipiente sagrado, elaborado con barro y de vistosas decoraciones en toda su superficie, de altura no mayor a 30 cm, su nombre “*Bo!*” deriva de ser un Dios menos, señor del vino.

Se procedió a adicionar dos bolsas de un kilogramo de azúcar morena (Zulka) al agua de la canoa y se disolvió suavemente, a esto le siguió un canto secreto de 2:33 minutos, en Maya lacandón y posterior a eso con una jícara (*Crescentia cujete*) se entregó un poco de esa agua a la madre tierra en los diferentes puntos cardinales (Figura 6).



Figura 6. Fotografía de Don Antonio mientras realizaba el canto secreto antes de añadir las cortezas de balché, su posición es viendo al este, por donde sale el sol.

Una vez lista el agua con azúcar se le añadieron 20 cortezas de balché (*Lonchocarpus longistylus*) que se habían puesto a secar varios días antes bajo la luz del sol. También se añadieron cinco cortezas de balché frescas, de un árbol no mayor a cinco años de edad. Todas las cortezas de balché se sumergieron en el agua con azúcar y se colocaron pequeñas estacas en la canoa para evitar que las cortezas de balché se levantaran y así asegurar que siempre se mantuvieran sumergidas (Figura 7).



Figura 7. Fotografía de Don Antonio mientras escogía las cortezas secas de balché, para añadirlas a la canoa.

Se dejaron las cortezas reposar por 49 horas, al mismo tiempo que se realizaban visitas para monitorear la fermentación del balché. Don Antonio decidió el momento en el balché se había fermentado y estaba listo para su consumo (al segundo día), cuando los Dioses estaban listos para escucharlo (Figura 8 y 9).



Figura 8 y 9. De izquierda a derecha se observa a Don Antonio mientras tala el árbol de balché. Don Antonio mientras golpea una rama del árbol de balché para obtener la corteza fresca que se va a añadir a la canoa.

Cuando el balché estaba completamente listo para su consumo, se procedió a iniciar con los rituales de agradecimiento, petición y protección a los Dioses; esto consistió en extraer un poco del balché directamente de la canoa con una jícara y colarlo a través de un paliacate, hasta tener el recipiente Bol lleno, el mismo recipiente y todos los instrumentos que se comenzaron a utilizar en la ceremonia estaban sobre hojas de plátano (*Musa sp.*). Don Antonio comentó al respecto de eso lo siguiente:

“Los Dioses son sagrados y viven en los cielos, ellos no deben tocar la tierra”.



Figura 10. Fotografía de Don Antonio mientras llenaba las 11 jicaras con balché. Se observa en el centro a Bol

Una vez se tuvo el recipiente de Bol dentro de la casa de los Dioses, se colocaron 11 jícaras a su alrededor. Don Antonio procedió a cantar a los Dioses para posteriormente llenar las jícaras con balché (Figura 10).

Después de tener llena las jícaras se procedió a colocar a nueve Dioses al frente de donde se tenían las 11 jícaras y Bol, con una distancia de tres metros.

Los Dioses están hechos de barro en forma de incensarios con diferentes rostros cada uno representado a una deidad.

Don Antonio procedió a elaborar algo similar a cucharas con hojas de palma Xate (*Chameadoreaelegans*) las cuales sirvieron para dar balché a los Dioses y también fueron obsequio de Don Antonio como amuleto para la protección de los que estaban presentes y bebieron balché en la ceremonia (Figura 11).



Figura 11. Fotografía de Don Antonio mientras elaboraba algo similar a una cuchara con la palma xate recién cortada de la selva.

Don Antonio procedió a colocarles 23 jícaras al frente de los Dioses y les añadió un poco de balché del recipiente Bol. Al mismo tiempo que les fue dando de beber a los nueve Dioses balché con la hoja de la palma, en promedio les dio cinco veces balché. También tomó un poco de balché para los otros Dioses que no fueron colocados sobre las hojas de plátano y se encontraban en su lugar de descanso alrededor de 1.30 m del suelo, colgando de lianas, bejucos y carrizo.

Al terminar de beber los Dioses, Don Antonio tomó su caracol gigante (*PleuroplocaSp.*) y comenzó a soplar de él hasta lograr lo que considero: “Llamar a todos los espíritus de la selva para que tomaran balché”.

Después tomó un poco de balché en una jícara y con las mismas hojas de palma xate que les dio balché a los Dioses, arrojó un poco de balché a la tierra, al cielo y a la selva.

Don Antonio tomó un poco de incienso y copal para prender fuego a los nueve Dioses que estaban cercanos a las jícaras de balché. También procedió a cantarles mientras el incienso se consumía, al mismo tiempo que pasaba por el humo las hojas de palma xate (Figura 12).

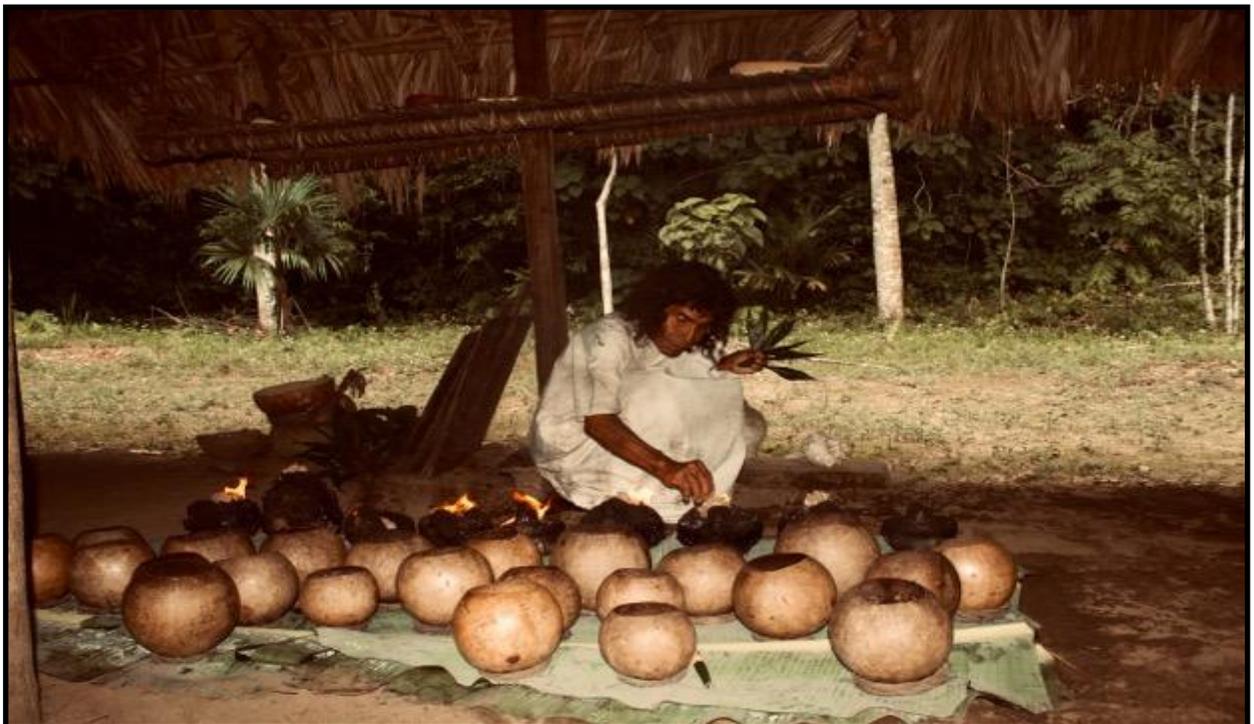


Figura 12. Fotografía de Don Antonio con la mano derecha encendiendo el incienso de los Dioses. Con la mano izquierda las hojas de palma xate.

Don Antonio tomo las hojas de palma xate que había expuesto al humo del incienso de los Dioses y realizó un ritual para pedir a los Dioses por los que estaban presentes y por los que bebieron balché, el ritual consistió en un canto en Maya lacandon, mientras tomaba una hoja de palma xate y la colocaba en la cabeza y a ambos lados de los hombros, para después obsequiar en nuestras manos, mencionando:

“Esto para que no venga enfermedad, no caiga camino, no choques y te cuide”

Al terminar el ritual Don Antonio procedió a entregar a cada persona una de las 11 jícaras con balché que estaban alrededor de Bol y enseñó que antes de beber el balché primero se toma un poco de balché directamente de la jícara y se arroja a la tierra para poder beber balché. Este proceso se repite cada que tomes una jícara nueva con balché (Figura 13).



Figura 13. Fotografía de Don Antonio enseñando como se debe beber el balché a Alan Sánchez

Con respecto a sus características organolépticas; el balché es una bebida de color blanco amarillento pálido, moderadamente turbio y con una efervescencia

discreta; en nariz tiene una intensidad alta, reflejo de la corteza del balché, aromas herbáceos, humedad y tierra mojada.

En boca el balché tiene buena acidez, semi seco, mineral, herbal con persistencia de 11 segundos para un final a madera.

7.2. Parámetros fisicoquímicos

Los parámetros fisicoquímicos que se midieron durante el proceso de fermentación del balché son: temperatura (en grados Celsius “°C”) y el pH (potencial de Hidrógeno); a continuación, se muestran los registros de temperatura de una estación meteorológica automática (EMA), la temperatura de la bebida y el pH de la bebida.

Cuadro 3. Parámetros de las variables temperatura y pH, respecto a los diferentes tiempos de muestreo.

Tiempos de muestreo	Fecha	Día	Hora	Temperatura EMA "MONTES AZULES"	Temperatura bebida	pH bebida
0	15/09/2018	Sábado	10:05	20.2 °C	26.3 °C	7.02
1	16/09/2018	Domingo	9:35	18.9 °C	23.0 °C	4.53
2	16/09/2018	Domingo	19:30	31.2 °C	26.0 °C	4.44
3	17/09/2018	Lunes	11:00	20.8 °C	23.9 °C	4.33

En el cuadro 3. Se observa que la temperatura máxima registrada por la EMA fue de 31.2 °C en el tiempo T2, mientras que en la bebida la temperatura más alta se registró al comienzo del proceso, en el tiempo T0 (26.3). Con el parámetro del pH podemos observar que la bebida inicio con un pH neutro (7.02) que en medida que la bebida se fermento el pH se tornó ácido (4.33).

7.3. Diversidad de levaduras

7.3.1. Características morfológicas de las colonias de levaduras

Se desarrollaron dos colonias con diferentes morfologías que se clasificaron como L-1 y L-2.

L-1 presentó colonias circulares, cremosas, de color blanco mate con borde liso blanco y con superficie elevada (Figura 14).

L-2 presentó colonias ameboides, cremosas, de color verde en el centro y blanco mate en el borde con forma lisa, la elevación umbeliforme, con un anillo interno de color verde (Figura 15).



Figura 14. Fotografía macroscópica de las colonias L-1, aisladas en medio LW durante la elaboración del balché en la comunidad de Nahá, Ocosingo, Chiapas.



Figura 15. Fotografía macroscópica de las colonias L-2, aisladas en medio LW durante la elaboración del balché en la comunidad de Nahá, Ocosingo, Chiapas.

7.3.2. Características morfológicas celulares

A nivel microscópico las colonias presentaron características similares.

Las colonias UFC (unidades formadoras de colonias) de levaduras L-1 presentaron células circulares, únicas, las cuales miden alrededor de 2 a 5 μm de diámetro (Figura 16).



Figura 16. Células de levaduras de la colonia L-1 observadas con un Objetivo 100X, del balché en la comunidad de Nahá, Ocosingo, Chiapas.

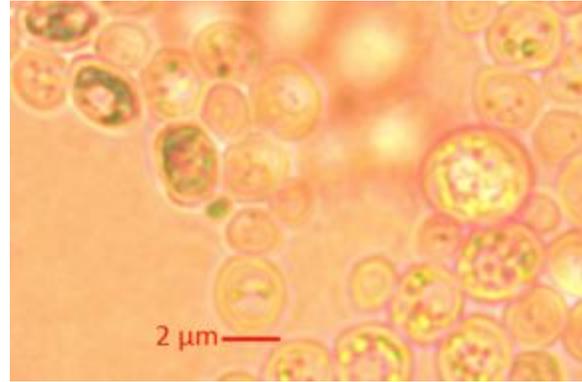


Figura 17. Células de levaduras de la colonia L-2 observadas con un Objetivo 100X, del balché en la comunidad de Nahá, Ocosingo, Chiapas.

Las colonias UFC de levaduras L-2 presentaron células circulares, de 2 a 5 µm de diámetro, con una coloración verde en su interior (Figura 17).

7.4. Identificación de levaduras

El análisis molecular de las dos diferentes colonias que se aislaron en este estudio, dio como resultado los perfiles que se describen en el cuadro 4 y que se presentan en las figuras 18 y 19.

Cuadro 4. Morfotipos de las colonias amplificadas y digeridas con las enzimas de restricción; comparas con literatura especializada.

N°	Colonia	Hha I (pb).	Hae III (pb).	Hinf I (pb).	Especie	Referencia
1	L-1	359, 325, 133	340, 298, 210, 153	381, 123	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Santiago-Urbina et al., 2014.
2	L-1	378, 335, 132	325, 226, 170, 131	380, 107	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Santiago-Urbina et al., 2014.
3	L-1	357, 295, 119	307, 202, 154, 113	355, 105	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Santiago-Urbina et al., 2014.
4	L-1	341, 308, 112	292, 200, 152, 110	339, 124	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Santiago-Urbina et al., 2014.
5	L-2	355, 308, 128	315, 230, 156, 132	323, 119	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Santiago-Urbina et al., 2014.
6	L-2	559, 313, 245	604	301	Sin registro	Sin registro
7	L-2	548, 311, 237	591	305	Sin registro	Sin registro
8	L-2	322, 234, 148	365, 221, 160, 119	336, 117	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Santiago-Urbina et al., 2014.

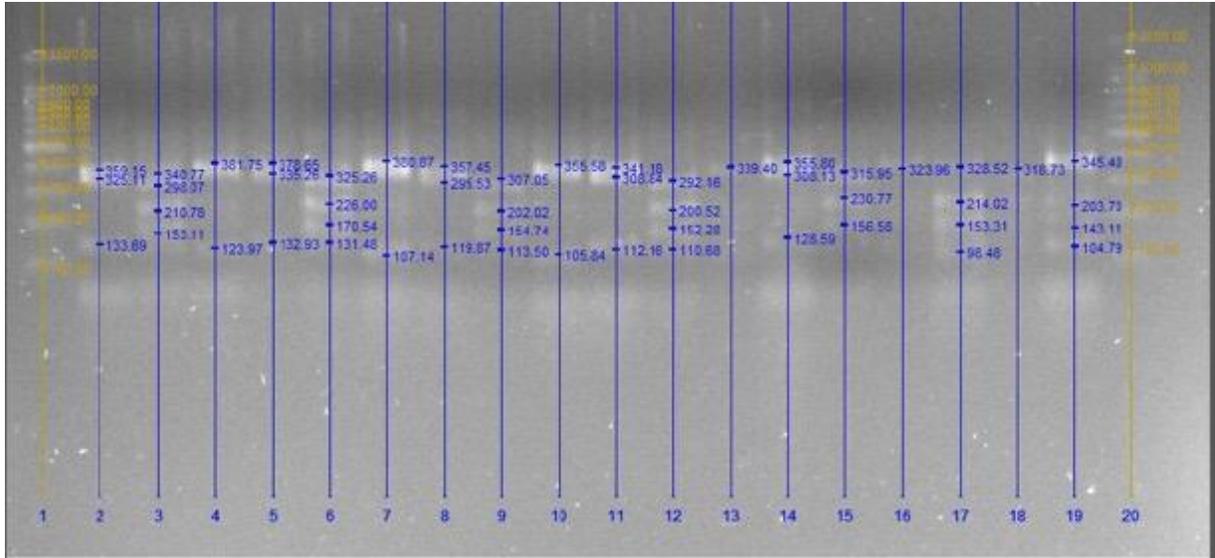


Figura 18. Captura de pantalla del gel de agarosa al 3%, con los perfiles moleculares de RFLP de la región ITS-5.8 S de las levaduras aisladas en el balché después de la digestión con las enzimas HhaI, HaeIII, HinfI, de color amarillo a ambos extremos observamos el marcador de peso molecular en el pozo 1 y 20.

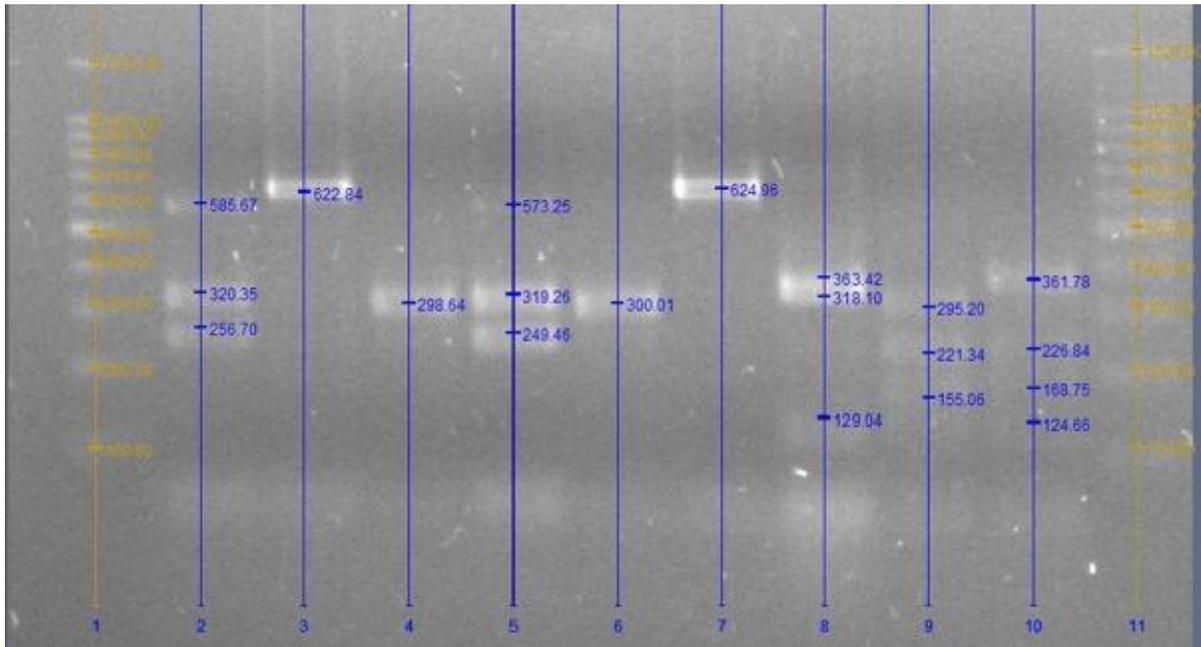


Figura 19. Captura de pantalla del gel de agarosa al 3%, con los perfiles moleculares de RFLP de la región ITS-5.8 S de las levaduras aisladas en el balché después de la digestión con las enzimas HhaI, HaeIII, HinfI, de color amarillo a ambos extremos observamos el marcador de peso molecular en el pozo 1 y 11.

VIII. DISCUSIÓN

Desde un punto de vista de occidental, los entornos que nos rodean como las comunidades indígenas y sus culturas; en este caso la comunidad lacandona, pueden ser consideradas como sistemas (Aracil, 1986). Entendiéndose de esa forma son sistemas complejos cuya sustentabilidad trasciende a la suma de las partes de la comunidad. Es por ello que las poblaciones lacandonas de Nahá, Metzabook y lacanjachansayab tienen modos propios de entender la cultura, la ecología, la vida, etc. Sin embargo, la Organización de la Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura (UNESCO), reconocen que las diferencias entre los puntos de vista científicos e indígenas continúan creando barreras que no permiten el intercambio de conocimientos; es por eso que la descripción de la ceremonia del balché se puede reconocer como un puente intercultural científico.

Don Antonio, líder espiritual de la comunidad lacandona de Nahá, aún mantiene algunas de sus prácticas religiosas tradicionales; como la ceremonia del balché y orar en la casa de sus Dioses con los incensarios de barro que representan a sus deidades que están ordenadas jerárquicamente (los dioses supremos, los intermedios, las divinidades menores y algunos otros seres sobrenaturales) independientemente de su rango, todas las divinidades actúan de manera complementaria en los contextos míticos y rituales (Fig. 12). Por consiguiente, todas ellas son capaces de incidir en la vida de los seres humanos (Eroza, 2006). Schulter y Hofmann (1979), afirman que hay una relación o vínculo muy profundo entre las plantas y las culturas milenarias donde el común denominador son las propiedades no materiales de los seres y que al mismo tiempo sugiere una reconceptualización de lo que entendemos por salud y sus alcances; es decir que para Don Antonio la salud incluye el contacto con sus Dioses.

Los lacandones realizaban la ceremonia del balché en fiestas, compromisos, bodas, año nuevo, para solicitar favores de curación en enfermos y para agradecer por las cosechas. Sin embargo, en los últimos 10 años la ceremonia del balché y los rituales con los cuales se acompaña se están dejando de lado, y se observa una menor relación entre los miembros de la comunidad de

Nahá y sus deidades lacandonas; Tozzer (1907) comentó que el balché de Nahá contiene una cantidad mayor de alcohol y destaca que los jóvenes varones participaban activamente en todo el proceso, sin embargo Don Antonio destaca que hay muy poco interés en los jóvenes por continuar participando en las practicas ceremoniales en Nahá.

Los diferentes asentamientos poblacionales de la comunidad lacandona (Metzabok, LacanjaChansayab y Nahá) son sabedores de la existencia de la ceremonia y la bebida balché, pero solo en Nahá se prepara la bebida y dentro de la misma comunidad la introducción de nuevas prácticas religiosas ha generado una deformación del concepto de la bebida, por lo que se hace cada vez mayor el rechazo a bebidas embriagantes, y con ello la práctica ceremonial del balché se está abandonando, sin embargo una reciente visita en LacanjaChansayab sugiere están retomando el consumo del balché.

La literatura respecto al balché expone una bebida dogmática, sin embargo los estudios científicos realizados por Kabelik (1967, citado en Goncalves, 1975) ha descubierto cierta actividad antibacteriana de origen enzimático que se ha atribuido al peróxido de hidrógeno, el cual se presenta solo en miel de abeja diluida, uno de los principales ingredientes del balché tradicional, sin embargo la avanzada edad de Don Antonio le impide salir a buscar miel y ha sustituido en la ceremonia del balché el uso de la miel por el azúcar de caña; este cambio origina un sustrato rico para levaduras del género *Saccharomyces* (Fig. 14 y 15).

Goncalves, (1975) encontró una multitud de células viables de *Saccharomyces cerevisiae* en el recipiente de los Dioses Bol, con el cual Don Antonio prepara el balché, la misma especie de levadura que se identificaron en los diferentes tiempos de muestreo por medio del método PCR-RFLP. Sin embargo tambien encontramos levaduras desconocidas o bien se podría tratar de una especie nueva (Cuadro 4).

Thompson (1972, citado en Goncalves, 1975) señaló que la corteza del balché puede ser usada como sazonante para propocionarle a la bebida un sabor y aroma característico, sin embargo se conoce que en *Lonchocarpus longistylus* se encuentran el isoflavonoide rotenona, un importante producto de pesticidas e

insecticidas, también se encuentran sustancias fenólicas que se identifican como hidroxiestilbenos, compuestos antimicrobianos especialmente efectivos en bacterias Gram negativas.

Emboden (1979, citado en Litzinger, 1983) sugiere que los compuestos de *Lonchocarpus longistylus* son tóxicos para los humanos por que interfieren con la transferencia de electrones a través de la membrana, aunque a *Saccharomyces cerevisiae* no le afectan las bajas concentraciones de los compuestos. Higbee (1947, citado en Litzinger, 1983) señala que el cambio del pH en el balché puede ser un indicador de su baja toxicidad de los compuestos de *Lonchocarpus longistylus*. Sin embargo, López *et al* (2010) analizó las bebidas tradicionales de Colombia con métodos moleculares como PCR-RFLP; para poder identificar las levaduras a nivel de especie; sin embargo, utilizó otras pruebas como la tolerancia a etanol y halo-tolerancia para identificar levaduras nativas con posible utilización biotecnológica en el sector industrial, aunque el uso del balché no se extiende al sector industrial si es pertinente aplicar las pruebas mencionadas en el proceso de fermentación así como ampliar su descripción de la microbiota que participa en su elaboración.

IX. CONCLUSIÓN

El balché como una ceremonia Maya es un acto de identidad; constituye una conexión entre los seres humanos que habitan la selva Lacandona y los dioses que formaron a ellos y su pueblo. El líder espiritual en la cultura Maya Lacandona son un oficio de hombres, es entregar con fe una vida hasta el final de la misma. Labor que ahora no tiene sucesor, es decir que Don Antonio es el último líder espiritual de la comunidad de Nahá y probablemente de toda la cultura maya lacandona.

De acuerdo a los resultados la preparación del balché se ha mantenido en la convivencia como una ceremonia “oculta” por sus propiedades embriagantes.

Una de las finalidades de esta investigación fue la aplicación de la biotecnología como una ciencia y herramienta para identificar los microorganismos que producen la fermentación y obtención de la bebida el balché.

La levadura que se identificó es *Saccharomyces cerevisiae* se realizó a través de pruebas medibles que se realizaron como son los patrones enzimáticos de Hhal, HaeIII y HinfI. Cabe mencionar que esta levadura es la que se utiliza para producir la cerveza, pan, vino y kumis, entre otros productos, gracias a su capacidad de generar etanol y dióxido de carbono durante el proceso de fermentación.

La segunda levadura que participo en el proceso de fermentación no logro ser identificada con los metodos moleculares utilizados. Sin embargo, si pudo ser aislada para futuras investigaciones

Es importante, mencionar que un estudio de levaduras en el balché, utilizando tecnicas moleculares puede convertirse en un primer paso para explorar los potenciales biotecnologicos que guardan las Areas Naturales Proteginas de Flora y Fauna como lo es la comunidad de Nahá.

En cuanto a la identificación del microorganismo *Saccharomyces cerevisiae* que hace especial y particular el balché aplicando los conocimientos que han pasado de generación en generación combinándolos con sus tradiciones, es decir

que desde épocas antiguas en Mesoamérica y sobre todo donde se desarrolló la cultura maya permaneció el balché como un vestigio de lo que fue una civilización con amplios conocimientos en lo que ahora llamamos biotecnología ancestral.

Aunque menos dramático que lo ocurrido en la conquista de Tenochtitlán, la comunidad de Nahá atraviesa un desuso de sus ceremonias lacandonas como lo es con la ceremonia del balché, un acto que se olvida, se desmemoriza y deja de tener significado para la comunidad.

X. PROPUESTAS Y RECOMENDACIONES

Para tener un conocimiento amplio de las ceremonias en Nahá se requiere un estudio a profundida con profesionales en diversas areas del conocimiento científico.

Es preciso resguardar como patrimonio de la humanidad los conocimientos, cuentos, historias y relatos que guarda Don Antonio Martinez.

Considerar el muestreo de las diferentes etapas de preparación para un analisis integral de la bebida. Para explicar los atributos que se le confieren en la literatura respecto a su carácter medicinal y ceremonial.

XI. REFERENCIAS DOCUMENTALES

- Ambrocio-Ríos, J., A. 2018. Ecología de levaduras asociadas a la taberna, bebida extraída de la palma de coyol (*Acrocomiaaculeata* (Jacq.) Lodd. Ex Mart). Tesis de maestría. Maestría en Ciencias en Biodiversidad y Conservación de Ecosistemas Tropicales. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Tuxtla Gutiérrez, México.
- Aracil, J. 1986. Máquinas, sistemas y modelos. Tecnos. Madrid, España.
- Arias, A., Barrio, E., Quillama, E., Querol, A. 2010. Identificación molecular de levaduras aisladas del masato, bebida fermentada tradicional de Perú. Departamento de biotecnología IATA. Memoria del VII simposio de producción de alcoholes y levaduras. San Marcos, Perú.
- Avilés-Peraza, G. C. 2015. Balché (*Lonchocarpuslongistylus*): árbol mágico, usos ceremoniales y medicinales. *Desde el Herbario CICY*. 7: 46-48.
- Barrera-Vásquez, A. 2017. “Los Mayas”. http://www.historicas.unam.mx/publicaciones/publicadigital/libros/historia_documento/vol01.html. Consultado el 01 de febrero de 2019.
- Cervantes-Contrera, M. y Pedroza, A. M. 2008. Caracterización microbiológica del pulque y cuantificación de su contenido de etanol mediante espectroscopia Raman. *Superficie y Vacío*. 20: 1- 5.
- CONABIO, 2019. Enciclovida.<https://enciclovida.mx/especies/192703-lonchocarpus-longistylus>. Consultado el 26 de febrero del 2019.
- CONANP. 2006. Programa de Conservación y Manejo Área de Protección de Flora y Fauna Nahá. Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas, Mexico D.F.
- Corral-López M. G. 1985. Características anatómicas de la madera de once especies tropicales. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales. México.
- De Vos. 1980. La paz de Dios y del rey. La conquista de la Selva Lacandona. Fondo de Cultura Económica-Secretaría de Educación Pública. Chiapas, México.

- Díaz-Ruiz, G. y Wachter-Rodarte, C. 2003. Métodos para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 1-2(45): 30-40.
- Dominé, A. 2008. El vino. Könemann. China.
- Durán-Fernández, A. Aguirre-Rivera, J. R. García-Pérez, J. Levy-Tacher, S. y De Nova-Vázquez, J. A. 2016. Inventario florístico de la comunidad lacandona de Nahá, Chiapas, México. *Botanical Sciences*.94:157-184.
- Eroza-Solana, J. E. 2006. Lacandones. Comisión Nacional para el Desarrollo de los Pueblos Indígenas. México, D.F.
- Fula-Arguello, A. G. 2010. Desarrollo de una bebida fermentada con adición de cocción de maíz. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.
- García De León, A. 1985. Resistencia y utopía. Memorial de agravios y crónica de revueltas y profecías acaecidas en la provincia de Chiapas durante los últimos 450 años de su historia, México.
- Garza, M. D. L. 1983. Relaciones histórico-geográficas de la gobernación de Yucatán: Mérida, Valladolid y Tabasco. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Investigaciones Filológicas, Centro de Estudios Mayas. México.
- Garzón-Castaño, S. C. y C. Hernández-Londoño. 2009. Estudio comparativo para la producción de etanol entre *Saccharomyces cerevisiae* silvestre, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 y *Candida utilis* ATCC 9950. Tesis de Licenciatura. Facultad de Tecnologías Químicas. Universidad Tecnológica de Pereira. Colombia.
- Godoy, A., Herrera, T. y Ulloa, M. 2003. Más allá del pulque y el tepache. Las bebidas alcohólicas no destiladas indígenas de México. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
- Goncalves-Lima, O. 1975. Pulque balché e pajauuaru. Na etnobiologia das bebidas e dos alimentos fermentados. Recife, Universidade Federale de Pernambuco. Brasil.

- Gonzalez, R. A. 2011. Biotecnología, historia y desarrollo: situación actual en Nicaragua. Memorias del II Congreso Multidisciplinario E Internacional de Agrobiotecnología. Nicaragua.
- INEGI. 1988. Carta geológica, E15-12, D15-3 (Las Margaritas), escala 1:250,000. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática, México D.F.
- Katz, S. E. 2003. Wild fermentation: the flavor, nutrition, and craft of live-culture foods. Chelsea Green Publishing Company.
- Linares-Sicilia, M. J. y Solís-Cuesta, F. 2007. Identificación de Levaduras. *Revista Iberoamericana de Micología*. 11: 1-11.
- Litzinger, W. 1983. The ethnobiology of alcoholic beverage production by the lacandon, taramara and other aboriginal mesoamerican peoples. Tesis de doctorado. Universidad de Colorado. Estados Unidos de America.
- López-Arboleda, W. A., Ramírez-Castrillón, M., Mambuscay-Mena, L. A. y Osorio-Cadavid, E. 2010. Diversidad de levaduras asociadas a chichas tradicionales de Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología*.12: 176-186.
- Magdeldin, S. 2012. Gel Electrophoresis-Principles and Basics. InTech. Croatia.
- Marion, M.O. 1995, Identidad y ritualidad entre los mayas. INI. México.
- Marion, M.O. 2000. Bajo la sombra de la gran ceiba: la cosmovisión de los lacandones. *Desacatos. Revista de Ciencias Sociales*. México.
- Marianne, G. 2007. El uso ritual de alcohol, tabaco, cacao e incienso en las ceremonias agrarias de los mayas yucatecos contemporáneos. *Estudios de cultura maya*. 29: 155-184.
- McGee, R. J. 1991. The *Balché* ritual of the Lacandon Maya. *Estudios de Cultura Maya*. 18: 439-457.
- Molina-Ruiz, M. E. 2014. Influencia de la región productora sobre la diversidad de comunidades de levaduras asociadas a la “taberna”, bebida derivada de *Acrocomia mexicana* karw. ex mart. Tesis de Licenciatura. Instituto de Ciencias Biológicas. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Tuxtla Gutiérrez, México.

- Muench-Navarro, P. E. 1978. Los sistemas de producción agrícola en la región Lacandona (Estudio agronómico preliminar). Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, Estado de México, México.
- Niembro-Rocas, A. 1986. Árboles y Arbustos: Útiles De México. Editorial Limusa. México, D. F.
- Orberá-Ratón, T. 2004. Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico. *Revista Iberoamericana Micología*. 21:15-19.
- Pasteur, L. 1944. Estudios sobre generación espontánea. Emecé Editores. Argentina.
- Pérez, H. E., Bíró, P. y Boucher, S. 2021. Maíz y *balché*. Una revisión de la iconografía de los murales de Tulum. *Estudios de la cultura Maya*. 57: 117-149.
- Ponce-Adams, M. J. 2011. Aprovechamiento de levadura recuperada de la fermentación en destilería. Tesis de Ingeniería. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Ecuador.
- Puerta-Quintero, G. I. 2010. Fundamentos del proceso de fermentación en el beneficio del café. *Avances técnicos Cenicafé*. Colombia.
- Roblero-Morales, M. 2008. La relación hombre-naturaleza entre los lacandones de Nahá, Ocosingo, Chiapas. *LiminaR*. 6: 125-140.
- Rodríguez, M. 2007. Análisis genómico y molecular de levaduras vínicas. Aplicación a la mejora del proceso de fermentación de vinos mediante selección de levaduras autóctonas. Tesis de Doctorado. Universidad de Cádiz. España.
- Rzedowski, J. 1978. Vegetación de México. Limusa, México D.F.
- Sánchez-Aroche, D. 2018. Con el diablo adentro. El consumo medicinal y ritual del *balché* entre los mayas de Yucatán visto desde una perspectiva etnohistórica. Escuela Nacional de Antropología e Historia (ENAH). México.
- Sankar, S., Ramamurthy, M. y Nandagopal, B. 2011. An appraisal of PCR-based technology in the detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Diagnosis Therapy*. 1: 1-11.

- Santiago-Urbina, J. A., Arias-García, J. A. y Ruíz-Terán, F. 2015. Yeast species associated with spontaneous fermentation of taberna, a traditional palm wine from the southeast of Mexico. *Annals of Microbiology*. 65: 287-296.
- Segura, G. L. E., Kirchmayr, M., Flores, B. E. P. y Gschaedler, M. A. C. 2010. PCR-RFLP de las regiones ITS-5.8S como herramienta de identificación de levaduras: ventajas y desventajas. *E-Gnosis*. 8:1-12.
- Sense-Ergul, S., Ägoston, R., Belák, Ä. y Deák, T. 2005. Characterization of some yeast isolated from foods by traditional and molecular tests. *International Journal Of Food Microbiology*. 16: 509-516.
- Schulter, R. y Hofmann, A. 1979. Plantas de los Dioses. Solar. México
- Suárez-Machín, C., Garrido-Carralero, N. A., Guevara-Rodríguez, C. A. 2016. Levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de alcohol. Revisión bibliográfica. *Sobre los Derivados de la caña de azúcar*. 50: 20-28.
- Taylor, S. J. y Bogdan, R. 1987. Introducción a los métodos cualitativos en investigación. Ediciones Paidós Ibérica. Barcelona, España.
- Tortora, G. J., Funke, R. B. y Case, C. L. 2007. Introducción a la microbiología. 9ª Edición. Editorial Medica Panamericana. Argentina.
- Tozzer, A. M. 1907. A comparative study of the mayas and the lacandones. Archaeological Institute of America. New York.
- Trujillo-Rodríguez, A. 2015. Selección de cepas de levaduras para reducir insumos en la elaboración de cerveza. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, México.
- Valdivieso-Solís, D. G. 2017. Análisis de la capacidad fermentativa de levaduras asociadas a dos bebidas fermentadas tradicionales. Tesis de Licenciatura. Instituto de Ciencias Biológicas. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Tuxtla Gutiérrez, México.
- Verdugo-Valdez, A. G. 2013. Caracterización de las levaduras asociadas al proceso fermentativo del mezcal. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma de México. México.