



# **UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS.**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIODIVERSIDAD Y  
CONSERVACIÓN DE ECOSISTEMAS TROPICALES.**

## **TESIS**

**ECOLOGÍA DE LEVADURAS ASOCIADAS  
A LA TABERNA, BEBIDA EXTRAÍDA DE  
LA PALMA DE COYOL (*Acrocomia  
aculeata* (JACQ.) LODD. EX MART).**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO

**EN CIENCIAS EN  
BIODIVERSIDAD Y  
CONSERVACIÓN DE  
ECOSISTEMAS TROPICALES.**

PRESENTA

**JOSÉ ALONSO AMBROCIO RÍOS.**



Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.

Junio de 2018.

**Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas.**

**Maestría en Ciencias en Biodiversidad y Conservación de  
Ecosistemas Tropicales.**

**Tesis de Maestría.**

**Ecología de levaduras asociadas a la taberna, bebida extraída de  
la palma de coyol (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart).**

**José Alonso Ambrocio Ríos.**

**Director.**

**Dra. Alma Gabriela Verdugo Valdez.**

**Asesores.**

**Dr. Wilfredo A. Matamoros.**

**Dra. Carolina Orantes García.**

**Dra. María Silvia Sánchez Cortés.**



**Junio de 2018.**

## **DEDICATORIA.**

Dedico este trabajo a la persona que se ha esforzado por sacarme adelante todo este tiempo, con todo el amor del mundo, a mi madre;

**la Sra. CECILIA RÍOS SERRANO**

Y

Con amor y cariño para **MAMÁ RAQUEL, MIS HERMANOS (VERO, LORE Y ALEX), MIS SOBRINOS (MILLO, LUCI, EFRÉN E ISRAEL)**, por siempre estar al pendiente de mi crecimiento intelectual.

Con amor y cariño, para mis grandes amigos de Maestría, para **ELLA** y mi primo **CARLOS RÍOS**, los quiero mucho.

Con amor y cariño, para mis amigas de tesis, de convivencia, de ánimos, para **DIANA, PATY** y **ERI**, con cariño.

Con cariño para **CECI** por ayudarme en cada momento de este proceso, de manera desinteresada.

Para mis amigos de Crossfit **JORGE, ITA, ALE ZAPATA, MIRI, ERIC, NASH, HECTOR.**

En memoria de mis seres queridos, los cuales llevo por siempre en el corazón:

A mi bisabuelita, **Mamá CECILIA BURGUETE AVENDAÑO**, por ese amor intrañable que le tengo, a pesar de no haberle conocido.

Mi padre, el **Sr. JORGE AMBROSIO REYES**, por enseñarme con su rectitud que la vida es un constante tomar de decisiones; que en la vida hay que tener carácter para lograr tus metas y que con la ayuda de Dios y de una esposa maravillosa se logran grandes cosas.

A mis primitos, **XIMENITA ESTRADA JIMÉNEZ, ANDRESITO ESTRADA JIMÉNEZ, FÁTIMA ESTRADA JIMÉNEZ Y ALBERTO ESTRADA JIMÉNEZ**, porque los quiero y anhelaba tanto verlos crecer y ser personas de bien.

## **AGRADECIMIENTOS.**

Agradezco primeramente a **DIOS**, por la vida y los momentos que me regala; así como el permitirme terminar otra etapa de mi vida. **Gracias Señor.**

Agradezco a **MIS PADRES**, por siempre ser ejemplo, para lograr ser siempre una persona de bien, de amor, de humildad.

Gracias eternamente a mi directora de tesis, la **DRA. ALMA GABRIELA VERDUGO VALDEZ**, por siempre acompañar con dedicación y esmero este proyecto, por saber ser maestra y amiga a la vez.

Gracias al **DR. WILFREDO MATAMOROS**, por ser un buen amigo y excelente catedrático, por valorar a la persona que soy, por sus consejos, sus enseñanzas; por quien es, esa persona tan humana.

Gracias a mis asesoras, la **DRA. CAROLINA ORANTES** y la **DRA. SILVIA SANCHEZ**, por dedicar largas horas a comprender mi trabajo, de igual manera, gracias a la **DRA. CAROLINA** por concederme la dicha de trabajar horas extras en el laboratorio de Germoplasma.

Gracias al Laboratorio de Genética, especialmente al **DR. JAVIER**, por su apoyo, por su comprensión y dedicación para conmigo y mi trabajo.

Gracias al **DR. IVÁN** por todo su apoyo incondicional, por hacerme crecer intelectualmente.

Agradezco a mis **CATEDRÁTICOS DE LA MAESTRIA**, al **DR. IVÁN**, el **DR. SERGIO**, el **DR. NETTEL**, el **DR. BONILLA**, al **DR. FELIPE**, por inducirme la enseñanza con amor y dedicación.

Gracias de igual manera al **CIATEJ**, especialmente a la **DRA. ANNE**, al **DR. MANUEL K.**, y al **DR. MELCHOR**, por ser mis maestros desde siempre en mi estancia en Guadalajara.

Gracias al **CONACyT** por el financiamiento en manutención del presente trabajo, así como el financiamiento de la estancia en Guadalajara, les estoy muy agradecido.

# ÍNDICE.

## Introducción.

<b>1. Marco Teórico</b> ..	18
<b>1.1. La familia Arecaceae y su importancia como materia prima en las bebidas fermentadas</b> .....	18
<b>1.1.1. <i>Acrocomia aculeata</i> (Jacq.) Lodd. ex Mart.</b> .....	18
A) Nombres comunes .....	18
B) Descripción de la especie .....	20
C) Usos e importancia de la palma de coyol .....	21
<b>1.1.2. La taberna: Su proceso de producción y su relevancia como bebida</b> .....	22
A) La taberna: descripción e importancia .....	22
B) Proceso de producción de la taberna .....	23
C) Efectos de la bebida .....	24
D) Creencias .....	25
<b>1.2. El proceso fermentativo y la microbiota asociada</b> .....	25
<b>1.2.1. Bebidas fermentadas</b> .....	25
<b>1.2.2. Proceso fermentativo</b> .....	26
A) Fermentación alcohólica .....	28
<b>1.2.3. Microbiota asociada a procesos fermentativos</b> .....	29
A) Levaduras asociadas a procesos fermentativos .....	30
B) Taxonomía de levaduras .....	33
<b>1.3. Técnicas de descripción e identificación de levaduras</b> .....	34
<b>1.3.1. Descripción morfológica: caracterización macro y microscópica</b> .....	34
<b>1.3.2. Identificación de levaduras mediante el análisis de los Polimorfismos de Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP)</b> .....	35
<b>1.3.3. Identificación de levaduras por secuenciación del Dominio D1/D2 del ADNr</b> .....	36
<b>1.3.4. Identificación de levaduras mediante Espectrometría de Masas (Maldi-Tof/MS)</b> .....	37
<b>1.4. Técnicas para la determinación de compuestos químicos en bebidas fermentadas</b> .....	37

1.4.1. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) .....	38
1.4.2. Cromatografía de Gases (CG) .....	38
<b>1.5. Ecología: Definición y áreas de estudio.</b> .....	<b>39</b>
1.5.1. Ecología de levaduras en fermentaciones espontáneas .....	40
A) Ecología aplicada a procesos fermentativos .....	41
1.5.2. Riqueza, Abundancia y Diversidad .....	41
A) Diversidad alfa o diversidad local .....	42
1.5.3. Sucesión ecológica.....	42
<b>1.6. Herramientas estadísticas para el estudio ecológico en levaduras</b> .....	<b>43</b>
1.6.1. Análisis de clasificación .....	43
A) Análisis Cluster (AC).....	44
1.6.2. Análisis de ordenación .....	45
A) Análisis de Componentes Principales (ACP) .....	45
1.6.3. Regresiones múltiples multivariantes .....	47
A) Análisis de Redundancia (ADR) .....	47
1.6.4. Análisis para la prueba de hipótesis .....	47
A) Análisis de Similitud (ANOSIM) .....	48
<b>2. Antecedentes</b> .....	<b>49</b>
<b>2.1 Estudios microbiológicos en la taberna</b> .....	<b>49</b>
2.1.1. La comunidad bacteriana en la taberna, una bebida tradicional del sureste de México (Alcántara et al., 2010).....	49
2.1.2. Influencia de la región productora sobre la diversidad de comunidades de levaduras asociadas a la “taberna”, bebida derivada de <i>Acrocomia mexicana</i> Karw. ex Mart. (Molina, 2014) .....	50
2.1.3. Especies de levaduras asociadas a la fermentación espontánea en la taberna, tradicional vino de palma del sureste de México (Santiago et al., 2014) .....	50
<b>2.2. Estudios fisicoquímicos en la taberna</b> .....	<b>51</b>
2.2.1. Producción de vino de coyol de <i>Acrocomia mexicana</i> (Arecacea) en Honduras (Balick, 1990) .....	52

2.2.2. Cambios fisicoquímicos y microbiológico durante la emanación de savia de palma para la producción de una bebida alcohólica llamada “taberna”, la cual es producida en el sureste de México (Santiago et al., 2013) .....	52
2.2.3. Selección de la bebida “taberna” obtenida de la palma <i>Acrocomia aculeata</i> y análisis químico proximal (Coutiño et al., 2015) .....	53
<b>2.3. Estudios con enfoque biotecnológico en la taberna</b> .....	<b>54</b>
2.3.1. La taberna ¿un posible probiótico? (Rodríguez et al., 2008).....	54
2.3.2. Elaboración <i>in vitro</i> de una bebida tipo “taberna” (Bermúdez, 2011) .....	54
<b>2.4. Estudios ecológicos de levaduras en bebidas fermentadas</b> .....	<b>55</b>
<b>3. Preguntas de investigación</b> .....	<b>56</b>
<b>4. Hipótesis</b> .....	<b>57</b>
<b>5. Objetivos</b> .....	<b>58</b>
5.1. <b>Objetivo general</b> .....	58
5.2. <b>Objetivos específicos</b> .....	58
<b>6. Método</b> .....	<b>59</b>
6.1. <b>Zonas de recolecta</b> .....	59
6.2. <b>Trabajo de campo</b> .....	59
6.2.1. Colecta de muestras.....	60
6.2.2. Conocimiento sobre el manejo y manipulación de la palma para la producción de taberna .....	61
6.3. <b>Trabajo de laboratorio</b> .....	61
6.3.1. Aislamiento de morfotipos .....	61
6.3.2. Polimorfismo de Longitud de los Fragmentos de Restricción de la región ITS 5.8S del ADNr (RFLP) .....	61
6.3.3. Matriz Asistida Láser de Desorción/Ionización en Tiempo de Vuelo, acoplado a Espectrofotometría de Masas (MALDI- TOF/MS) .....	62
6.3.4. Conservación de cepas .....	63

6.3.5. Determinación de compuestos no volátiles .....	63
6.3.6. Determinación de compuestos volátiles .....	64
<b>6.4. Trabajo de gabinete .....</b>	<b>65</b>
6.4.1. Análisis de agrupamiento mediante caracteres morfológicos macroscópicos .....	65
6.4.2. Determinación de la diversidad alfa .....	65
6.4.3. Descripción de la relación entre la microbiota y los compuestos químicos asociadas a la taberna.....	65
<b>7. Resultados .....</b>	<b>67</b>
<b>7.1. Conocimiento del proceso artesanal en la producción de la taberna ....</b>	<b>67</b>
7.1.1. Materia prima para la elaboración de la taberna .....	67
7.1.2. Herramientas de uso común usadas durante el proceso de producción de la taberna .....	67
7.1.3. Proceso de manipulación de <i>Acrocomia aculeata</i> para la producción de taberna .....	68
7.1.4. Seguimiento del proceso fermentativo .....	68
7.1.5. Conocimientos relacionados con el proceso artesanal de producción .....	69
7.2. Variables fisicoquímicas.....	70
<b>7.3. Descripción e identificación de levaduras asociadas a la taberna .....</b>	<b>72</b>
7.3.1. Descripción morfológica y molecular de <i>Hanseniaspora opuntiae</i> .....	77
7.3.2. Descripción morfológica y molecular de <i>Pichia kluyveri</i> .....	79
7.3.3. Descripción morfológica y molecular de <i>Pichia manshurica</i> .....	81
7.3.4. Descripción morfológica y molecular de <i>Issatchenkia orientalis</i> .....	83
7.3.5. Descripción morfológica y molecular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	85
<b>7.4. Diversidad biológica del consorcio levaduriforme en la taberna .....</b>	<b>87</b>
<b>7.5. Determinación de compuestos volátiles y no volátiles en la taberna.....</b>	<b>89</b>
<b>7.6. La triada del proceso fermentativo en la taberna: El artesano, las levaduras y la cinética del proceso .....</b>	<b>93</b>



<b>8. Discusión</b> .....	98
8.1. Manejo de la palma y manipulación de la bebida para la generación de la taberna .....	98
8.2. Características morfológicas, moleculares y proteicas de las especies asociadas a la taberna .....	99
8.3. Ecología de levaduras asociadas a la taberna .....	101
<b>9. Conclusiones</b> .....	111
<b>10. Perspectivas</b> .....	112
<b>11. Literatura citada</b> .....	113
<b>12. Anexos</b> .....	125
12.1. Cuadros .....	125
12.2. Figuras .....	131
12.3. Formatos .....	133

## RESUMEN.

La taberna, bebida extraída de la palma de coyol (*Acrocomia aculeata*), es uno de los licores fermentados más consumidos en el estado de Chiapas; ya que en diversas localidades se produce esta bebida de forma artesanal mediante un procedimiento que consta de cuatro pasos: el corte y limpia de la palma, la abertura de la canoa, la extracción de la savia y el raspado y limpieza de la canoa. El líquido de coloración blanca, debe poseer una temperatura de entre 22°C a 35°C para alcanzar las condiciones microambientales, como un aumento en la abundancia de las especies. El pH del proceso, inicialmente es básico (8) y pasa a ser neutro transcurridas 12 horas de iniciado el proceso; finalmente el pH se vuelve ácido (4-5) hacia el sexto día de fermentación.

De las 993 colonias aisladas en campo; se identificaron mediante PCR- RFLP y Maldi-Tof cinco especies (*Hanseniaspora opuntiae*, *Pichia manshurica*, *P. kluyveri*, *Isstachenkia orientalis* y *Saccharomyces cerevisiae*); las cuatro primeras son consideradas levaduras iniciadoras del proceso fermentativo. Los índices de diversidad alfa en el tiempo inicial, denotan una baja dominancia (índice de Simpson: 0.4); sin embargo, a las 12 horas y hasta el final del proceso se promueve la dominancia de especies como *H. opuntia* hasta el séptimo día y de *S. cerevisiae* hasta el final del muestreo.

Por su parte, el análisis de redundancia, con base a la abundancia de las especies y la concentración de los compuestos químicos, denota el uso de los azúcares no reductores para la generación de azúcares reductores; estos últimos utilizados para la generación posterior de etanol y otros compuestos químicos de importancia. Las concentraciones de azúcares reductores (1.9 g/L) se relacionan con el alza en las concentraciones de etanol, hacia el día 6.5 del muestreo (63.1 g/L).

## **ABSTRACT.**

The taberna, is a drink extracted from the palm of coyol (*Acrocomia aculeata*), is one of the most consumed fermented liqueurs in the state of Chiapas; since in several localities this drink is produced by hand using a procedure consisting of four steps: the cutting and cleaning of the palm, the opening of the canoe, the extraction of the sap and the scraping and cleaning of the canoe. The liquid of white coloration, must have a temperature of between 22 ° C to 35 ° C to reach the micro environmental conditions, as an increase in the abundance of the species The pH of the process, initially is basic (8) and becomes neutral 12 hours after the start of the process; finally the pH becomes acidic (4-5) towards the sixth day of fermentation.

Of the 993 colonies isolated in the field; five species (*Hanseniaspora opuntiae*, *Pichia manshurica*, *P. kluyveri*, *Isstachenkia orientalis* and *Saccharomyces cerevisiae*) were identified by PCR-RFLP and MaldiToF; the first four are considered yeasts that initiate the fermentation process. Alpha diversity indices in the initial time, denote a low dominance (Simpson index: 0.4); however, at 12 o'clock and until the end of the process, the dominance of species such as *H. opuntia* until the seventh day and *S. cerevisiae* until the end of the sampling is promoted.

On the other hand, the analysis of redundancy, based on the abundance of the species and the concentration of the chemical compounds, denotes the use of non-reducing sugars for the generation of reducing sugars; the latter used for the subsequent generation of ethanol and other important chemical compounds. The concentrations of reducing sugars (1.9 g / L) are related to the increase in ethanol concentrations, towards day 6.5 of the sampling (63.1 g / L).

## ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Proceso Fermentativo Anaerobio. Transformación de glucosa a piruvato,

Figura 2. Proceso Fermentativo Anaerobio. Transformación de piruvato a compuestos secundarios, principalmente para la generación de etanol.

Figura 3. Estructura del ADN ribosomal en levaduras. Se muestran en ella, las subunidades 18S y 26S, así como los Espaciadores Internos Transcritos (ITS) y los Espaciadores Externos Transcritos (ETS), así como la subunidad 5.8S que sirve para la identificación de levaduras mediante RFLP. Por último, se muestran los dominios D1 y D2 de la subunidad 26S, usados en secuenciación para la identificación taxonómica en especies y cepas de levaduras.

Figura 4. Ubicación geográfica de las dos localidades consideradas para la toma de muestras de la Taberna, bebida extraída de la Palma de Coyol. Ejido Benito Juárez, Villaflores, Chiapas y Ejido Tierra y Libertad, Jiquipilas, Chiapas.

Figura 5. Análisis Cluster de los caracteres morfológicos obtenidos de las colonias de levaduras del ejido Tierra y Libertad, Jiquipilas, Chiapas (método UPGMA; valor cofenético: 0.9557; con un total de cinco grupos terminales y una agrupación general (significancia entre dos grupos generales R: -0.02, p=0.6 (ANOSIM, 999 permutaciones, 95% de confiabilidad).

Figura 6. Análisis de Componentes Principales generado a partir de los caracteres morfológicos descritos de las colonias aisladas de la taberna en el ejido Tierra y Libertad (94% de variabilidad total explicada) (FC: Forma de la colonia; FB: Forma de borde; CDC: Color directo del Centro; CBD: Color de borde directo y E: Elevación).

Figura 7. Análisis Cluster de los caracteres morfológicos obtenidos de los morfotipos de levaduras. Localidad Benito Juárez, Villaflores, Chiapas (método UPGMA; valor confenético: 0.8747; 28 grupos terminales y una agrupación general (R; 0.003, p: 0.401 no habiendo significancia entre dos grupos; nivel de confiabilidad del 95%, 999 permutaciones).

Figura 8. Análisis de Componentes Principales generado a partir de los caracteres morfológicos descritos de las colonias aisladas de la taberna en el ejido Tierra y Libertad (62% de variabilidad total explicada) (FC: Forma de la colonia; FB: Forma de borde; CDB: Color directo de borde; B: Brillo y E: Elevación).

Figura 9. Morfología macro y microscópica de la especie *H. opuntiae*; A) Colonia sobre medio WL; B) Colonia sobre medio YPD; C) Células de *H. opuntiae* (Objetivo 100X).

Figura 10. Análisis proteico y molecular de la especie *H. opuntiae*; a la derecha; espectro obtenido mediante Maldi Tof (score: 2.0); a la izquierda perfil de restricción obtenido mediante la técnica molecular de RFLP.

Figura 11. Morfología macroscópica de la especie *P. kluyveri*; A) Colonia sobre medio WL; B) Colonia sobre medio YPD; C) Células de *P. kluyveri* (Objetivo 100X).

Figura 12. Análisis proteico y molecular de la especie *P. kluyveri*; a la derecha; espectro obtenido mediante Maldi Tof (score: 1.9); a la izquierda perfil de restricción obtenido mediante la técnica molecular de RFLP.

Figura 13. Morfología macroscópica de la especie *P. manshurica*; A) Colonia sobre medio WL; B) Colonia sobre medio YPD; C) Células de *P. manshurica* (Objetivo 100X).

Figura 14. Análisis proteico y molecular de la especie *P. manshurica*; a la derecha; espectro obtenido mediante Maldi Tof (score: 2.1); a la izquierda perfil de restricción obtenido mediante la técnica molecular de RFLP.

Figura 15. Morfología macroscópica de la especie *I. orientalis*; A) Colonia sobre medio WL; B) Colonia sobre medio YPD; C) Células de *I. orientalis* (Objetivo 100X).

Figura 16. Análisis proteico y molecular de la especie *I. orientalis*; a la derecha; espectro obtenido mediante Maldi Tof (score: 2.4); a la izquierda perfil de restricción obtenido mediante la técnica molecular de RFLP.

Figura 17. Morfología macroscópica de la especie *S. cerevisiae*; A) Colonia sobre medio WL; B) Colonia sobre medio YPD; C) Células de *S. cerevisiae* (Objetivo 100X).

Figura 18. Análisis proteico y molecular de la especie *S. cerevisiae*; a la derecha; espectro obtenido mediante Maldi Tof (score: 2.0); a la izquierda perfil de restricción obtenido mediante la técnica molecular de RFLP.

Figura 19. Figura 19. Proceso fermentativo completo, durante 15 días de muestreo (30 muestras); con base al promedio en cuanto a la abundancia por especies registradas a lo largo del proceso fermentativo y el promedio de los compuestos químicos de dos palmas (Benito Juárez, Villaflores y Tierra y Libertad, Jiquipilas, Chiapas). Figura A) Azúcares vs etanol. S: sacarosa; G: glucosa; X: xilosa; A: arabinosa; Et: Etanol. Figura B) Acetaldehído y Alcoholes. AcH: acetaldehído; AE: acetato de etilo; Prop: propanol; IB: isobutanol; OHA: alcohol amílico; LE: lactato de etilo y OE: octanoato de etilo.

Figura 20. Proceso fermentativo completo, durante 15 días de muestreo (30 muestras); con base al promedio en cuanto a la abundancia por especies registradas a lo largo del proceso fermentativo y el promedio de los compuestos químicos de dos palmas (Benito Juárez, Villaflores y Tierra y Libertad, Jiquipilas, Chiapas). C: ácido cítrico; M: ácido málico; Su: ácido succínico; AA: ácido acético; L: ácido levulínico; AP: ácido propiónico.

Figura 21. Análisis de Redundancia, con base al promedio en cuanto a la abundancia por especies registradas a lo largo del proceso fermentativo y el promedio de los compuestos químicos de dos palmas (Benito Juárez, Villaflores y Tierra y Libertad, Jiquipilas, Chiapas). S: sacarosa; G: glucosa; X: xilosa; A: arabinosa; Gli: glicerol; C: ácido cítrico; M: ácido málico; Su: ácido succínico; AA: ácido acético; L: ácido

levulínico; AP: ácido propiónico; Ach: acetaldehído; AE: acetato de etilo; Et: etanol; Prop: propanol; IB: isobutanol; OHA: alcohol amílico; LE: lactato de etilo y OE: octanoato de etilo.

### **ÍNDICE DE FIGURAS EN ANEXOS.**

Figura 1. Rutas metabólicas aeróbicas y anaeróbicas de la degradación de la glucosa y su excreción como etanol, glicerol y acetato en *Saccharomyces cerevisiae*.

Figura 2. Proceso de manipulación y seguimiento del proceso fermentativo para la obtención de Taberna.

## ÍNDICE DE CUADROS.

Cuadro 1. Denominación de origen a nivel internacional y nacional de la palma de coyol (*Acrocomia aculeata*).

Cuadro 2. Géneros de levaduras presentes a nivel industrial en diversos alimentos de importancia.

Cuadro 3. Oscilación de la temperatura y pH en ocho puntos de muestreo de seis palmas de las dos localidades estudiadas. P1: palma 1, P2: palma 2, P3: palma 3,  $\bar{X}$ : promedio,  $\sigma$ : Desviación estándar.

Cuadro 4. Perfiles de Digestión de las cinco especies de levaduras, presentes en la Taberna, bebida extraída de la palma de coyol (*Acrocomia aculeata*); en dos comunidades del Estado de Chiapas.

Cuadro 5. Índices de diversidad alfa del consorcio levaduriforme en la taberna, en ocho puntos de muestreo (inicial, intermedio y final) de las palmas de Benito Juárez, Villaflores, Chiapas y Tierra y Libertad, Jiquipilas, Chiapas. (I: Individuos; S: Número de especies; D: Dominancia; 1-D: Índice de Simpson, H: Índice de Shannon).

Cuadro 6. Compuestos químicos presentes en las seis palmas de las dos localidades muestreadas (Tierra y Libertad y Benito Juárez, Chiapas). AR: Azúcares reductores, ANR: Azúcares No Reductores, Et: Etanol, AS: Alcoholes Superiores, Ac: Acetaldehído, E: Ésteres y Ac: Ácidos orgánicos. Unidad utilizada para la medición de los compuestos: Azúcares y Etanol (g/L); demás compuestos mg/L.

## ÍNDICE DE CUADROS EN ANEXOS.

Cuadro 1. Ciclos de Reacción para PCR. Esteve- Zarzoso *et al.* (1999) con modificaciones de Verdugo (2011).

Cuadro 2. Enzimas de Restricción utilizadas para el análisis de los Polimorfismos de Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP). (Verdugo et al., 2011).

Cuadro 3. Índices Clásicos para medir la diversidad alfa (Diversidad local). (Cordero et al., 2011; Moreno, 2001).

Cuadro 4. Cuadro descriptivo de los principales compuestos químicos que fermentan, asimilan o no son asimilables, por las especies identificadas en el presente estudio.

## INTRODUCCIÓN.

Vino de palma, es el nombre de un grupo de bebidas alcohólicas producidas por la fermentación natural de la savia obtenida de diversas especies de palmas pertenecientes a la familia *Arecaceae* (Okafor, 1975). De sabor dulce, son producidas y consumidas en diferentes partes del mundo; y de acuerdo al país de origen son llamadas con diferentes nombres (Atputharajah et al., 2010).

En México, existen diferentes tipos de bebidas fermentadas. En Chiapas, se tiene conocimiento de licores fermentados, como el bejucalito, el curadito zoque, el tepache de piña, la bacharnuda comiteca, la chicha de calabaza, la cervecita dulce, el pulque del mundial, el anisado chiapacorceso y el morado copainalteco (Mayorga y Mayorga, 2012). Específicamente en el sureste se produce la taberna; savia obtenida del tallo de la palma de coyol (*Acrocomia aculeata*), la cual es fermentada de manera espontánea *in situ* y consumida por los pobladores de la región “Sierra Madre de Chiapas”. A esta bebida se le atribuyen propiedades medicinales para la cura de enfermedades gastrointestinales, cicatrización por úlceras y el alivio de gastritis (Bermúdez, 2011; Velázquez; 2012; Embriz, 2012 en Gómez, 2014; Vázquez, 2012; Mondragón, 2015), así como tratamientos vesiculares, prostáticos y laxante (Bermúdez, 2011).

La taberna, es considerada como uno de los hábitats ideales para el asentamiento y desarrollo de diversos microorganismos (e.g. bacterias, levaduras, coliformes), ya que posee un alto contenido de azúcares y alcoholes (Obire, 2005; Velázquez, 2012). En ella, los microorganismos que coexisten, se encargan de llevar a cabo diversas reacciones químicas y procesos fermentativos que dan lugar a la colonización, dominancia y sucesión de especies a lo largo de las fermentaciones.

Entre los microorganismos que colonizan el microhábitat en donde se lleva a cabo el proceso fermentativo de la taberna, se encuentran las levaduras, encargadas de realizar el proceso de fermentación alcohólica; tal proceso que ha sido descrito en otras bebidas tales como los fermentos históricos mexicanos (el tepache o ponche de mezcal y el pulque) (Robelo, 1948 en Molina, 2014). En la actualidad son carentes los trabajos que se han realizado con el fin de conocer la microbiota asociada a los procesos de fermentación espontánea de las bebidas autóctonas en el estado de Chiapas y más



aún, la carencia en investigaciones que relacionen a los microorganismos con los compuestos químicos presentes a lo largo del proceso fermentativo; se hace relevante el planteamiento de investigaciones con miras ecológicas, que expliquen la relación microorganismos- compuestos químicos durante las fermentaciones; dicho de otra manera, hacer una ecología aplicada a los procesos fermentativos.

## 1. MARCO TEÓRICO.

### 1.1. La familia *Arecaceae* y su importancia como materia prima en las bebidas fermentadas.

El vino de palma que se extrae de diversas especies vegetales alrededor del mundo, posee múltiples denominaciones que, de acuerdo al continente de origen y a la palma de la que se obtiene, es nombrada como: Banjii (*Borassus akeassii*), Mnazi, Toddy, Tuba, Tuak (*Cocos nucifera*) Mimbo, Palm wine (*Elaeis guineensis*), Emu (*Raphia hookeri*), Palmyrah toddy (*Borassus flabelifer*), Toddy (*Phoenix sylvestris*), Palm wine (*Borassus aethiopum*), Toddy (*Nypa fruticans*), Ogorogoro (*Phoenix clorifer*), Nimbo (*Phoenix dactylifera*) y Taberna (*Acrocomia aculeata*) (Santiago-Urbina y Ruiz-Terán, 2014, Coutiño et al., 2015).

La taberna, es una de las bebidas más importantes en México; principalmente en el estado de Chiapas.

#### 1.1.1 *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.

##### A) Nombres comunes.

La denominación de origen de *A. aculeata*, es variable de acuerdo a la región; a continuación, se muestran las denominaciones comunes de la misma.

Cuadro 1. Denominación de origen a nivel internacional y nacional de la palma de coyol (*Acrocomia aculeata*).

Nombre común.	Lugar.	Referencia.
Palma de Vino.	Panamá.	
Palma Gru- Gru.	Paraguay	
Coquito.	Argentina.	

<b>Totai.</b>	Bolivia.	(Ramírez, 2013).
<b>Macaúha.</b>	Brasil.	
<b>Nuez de Coyol.</b>	Francia.	
<b>Amankaya, corajo, corozo, coyol baboso, toai y tucuma.</b>	España.	
<b>“Coquito Baboso y Coyol”</b>	Nayarit, Oaxaca, Veracruz y en el Centro y Costa de Chiapas.	(Bermúdez, 2011; Escobedo y Trujillo, 2016).
<b>Maap</b>	San Luís Potosí.	(Alcorn, 1984 en Lentz, 1986; Bermúdez, 2011).
<b>Coyol (“Coyoli) (nombre de origen náhuatl, que significa “Cascabel” y antiguamente se le conocía como “Cuauhcoyolli” o sea “árbol de Cascabel”).</b>	Sinaloa, Yucatán y norte de Chiapas.	(Cabrera, 1999; Gutiérrez, 2006; Ríos, 2006; Standley y Steyermark, 1946 en Lentz, 1986)
<b>Nap (Tseltal) y Tuk (Maya de Yucatán).</b>	Chiapas y Yucatán.	(Pérez y Márquez; 2011).
<b>Palma de Coyol.</b>	Chiapas.	(Zuart, 1999).
<b>Chichón.</b>	Chiapas (Jiquipilas y Tuxtla Gutiérrez).	(Díaz, 2011; Flores y Farrera-Sarmiento; 2007)

<b>Palma Real.</b>		(Mayorga y Mayorga, 2012).
<b>Tzitzun.</b>	Chiapas (Ocozocoautla).	(Gómez, 2014).
<b>Ya Cul y Aca</b>		(Lentz, 1986).

## **B) Descripción de la especie.**

El coyol, es una palmera espinosa; originaria de América Latina; sus variedades crecen naturalmente en México, algunas de ellas resisten heladas y temperaturas bajo cero, lo que facilita que sean plantadas en todo el subtrópico (Oberlaender y Bohn, s.f. en Mondragón, 2015).

*Acrocomia aculeata*, palma nativa (Farrera, 1997; Gómez, 2014; Gutiérrez, 2006; Ríos, 2006); se distribuye de México hasta Costa Rica (NOTIMEX, 2011). Particularmente en México, esta palma se encuentra a lo largo de las planicies costeras del Golfo de México y del Pacífico; en Chiapas se localiza especialmente en la región de la Frailesca, Centro y Soconusco (Zuart, 1999). Es una palma de reproducción rápida, misma que se observa en potreros y sabanas (Mondragón, 2015; NOTIMEX, 2011); adaptada a hábitat con disturbios, llega a tener de 15 a 20 m de altura; la parte del tronco de esta palma es mucho menos espinosa que la parte del ápice del tallo y el peciolo de sus hojas, las cuales son compuestas (Mondragón, 2015); sus inflorescencias interfoliare son de color amarillo intensos; el periodo de floración empieza en marzo y termina a finales de junio, siendo abril y mayo los meses de mayor floración (Gómez, 2014).

De abundante fructificación entre los cuatro a cinco años, los frutos aparecen en racimos o “cachos” (una palma adulta bien desarrollada produce de cuatro hasta 13 cachos anuales y entre 200 hasta 700 frutos); estos son drupas, esféricas de cáscara lisa y quebradiza, de entre 25- 50 cm de diámetro, color verde oliváceo a amarillo acaramelado (Gómez, 2014), su mesocarpio es un almidón dorado, dulce al madurar; con un endocarpio duro, el cual está formado por un coco (semilla oleosa con un 40%

de aceite); los frutos no caen del árbol, casi un año después de madurar toman un color amarillento (Guerrero, 2012). Se ha reportado que las palmas de *Acrocomia aculeata*, forman bosques extensos llamados “Coyolares”; los cuales son más comunes en las costas del Pacífico, que en las del océano Atlántico (Lentz, 1986).

### **C) Usos e importancia de la palma de coyol.**

La importancia de esta palma (*Acrocomia aculeata*), radica en la diversidad de usos por parte de la población regional; entre los que destacan los frutos y flores comestibles y sus propiedades medicinales, así como artesanales (Orantes-García et al., 2010).

La flor, es utilizada de manera ceremonial; en cuanto a los usos comestibles, es preparada con pepita de calabaza durante la Semana Santa en el municipio de Ocozocoautla (Farrera, 1997; Gómez, 2014); en Pichucalco es hervida o guisada con huevo (Bermúdez, 2011; Flores y Farrera-Sarmiento, 2007). Así también es considerada como planta melífera (Bermúdez, 2011).

El fruto de la palma, se ha utilizado desde la época prehispánica, ejemplo de ello son los registros de su uso en Cajón, Copán; así como en el Centro de México, en el Valle de Tehuacán, donde los pobladores ingerían la pulpa y el núcleo fresco (Lentz, 1986) y extraían el aceite de coco que posee la semilla (Guadamuz, s.f en Mondragón, 2015). Es del fruto del cual se elabora el denominado “Dulce de Coyol” (fruto sin cáscara cocido con azúcar o panela) (Bermúdez, 2011; Gutiérrez, 2006; Mayorga y De la Cruz, 2000); del mucílago o baba revuelta con harina se preparan obleas (Bermúdez, 2011); aceite, es extraído del endocarpo y mesocarpo (Velázquez, 2012); así también el fruto entero se proporciona al ganado como forraje (Lentz, 1986; NOTIMEX, 2011). Con respecto a su composición nutricional, el corozo o coyol, cuenta con vitaminas A, B, C y E, además de minerales como el magnesio, el calcio y el hierro, entre otros (Ovideo, 2014 en Mondragón, 2015). En la actualidad de la almendra se obtiene un aceite de baja calidad que no se industrializa; sin embargo, es utilizado en medicina tradicional, ya sea ingerido o aplicado directamente sobre la zona afectada puesto que posee propiedades analgésicas (Bermúdez, 2011). En Guatemala la parte dura de la nuez es usada para fabricar artesanías como anillos y rosarios (Maldonado-Mares, 1992).

Del tallo, se obtiene un fermento denominado taberna, el cual posee propiedades digestivas y diuréticas (Bermúdez, 2011); así también, la parte central del mismo es comestible y se denomina palmito (Velázquez, 2012).

Las hojas en algunas regiones, se emplean para construir y techar viviendas tradicionales (Gisper et al., 2002 en Pérez y Márquez, 2011; Velázquez, 2012).

La raíz es usada para subsanar el dolor o la inflamación vesicular (Ríos, 2006). Durante mucho tiempo, en los pueblos indígenas de los estados de Yucatán, Tamaulipas y México, los pobladores la han utilizado para el tratamiento de la diabetes; debido a que en ella se han encontrado compuesto hipoglucémicos (Sosnowska y Henrik, 2008 en Toledo, 2014).

### **1.1.2. La taberna: su proceso de producción y relevancia como bebida.**

#### **A) La taberna; descripción e importancia.**

La taberna, bebida colonial demandada durante la vigilia (ya que su producción coincide con la cuaresma), es muy semejante en sabor al “Vino de Palma” de África (Alcántara et al., 2010). Esta bebida es producida en diferentes países, desde México hasta Centroamérica (Payas, Honduras, donde se le conoce con el nombre de vino de savia; Guanacaste) (Lentz, 1986). En México, la extracción y consumo de este licor es de suma importancia entre las poblaciones que la producen; convirtiéndose incluso en algunos ejidos del Istmo de Tehuantepec, en una de las principales tradiciones que se llevan a cabo en distintas festividades (Mondragón, 2015).

En Chiapas, la taberna es consumida en gran parte de las poblaciones de la región “Sierra Madre”. Es a ella, a la que se le atribuyen propiedades medicinales diversas, desde tratamientos gastrointestinales, hasta tratamientos biliares y prostáticos (Bermúdez, 2011; Velázquez, 2012; Embriz, 2012 en Gómez, 2014; Vázquez, 2012; Mondragón, 2015). Tradicionalmente en algunas regiones de Chiapas: la Concordia, Cintalapa, Villaflores y Villacorzo, los pobladores acostumbran en Semana Santa consumir gran cantidad de taberna (Ventura, 2007 en Pérez y Márquez, 2011); preferentemente en los meses de febrero a mayo (Vázquez, 2012; NOTIMEX, 2011);

aunque en algunas partes, como en Reforma de Pineda (Oaxaca), se extrae en el mes de diciembre (Velázquez, 2012). Es importante mencionar que los principales centros taberneros en Chiapas se encuentran en los municipios de Chicomuselo y Villaflores; siendo la localidad de Benito Juárez, la más importante en este último (Vázquez, 2012; Mondragón, 2015).

La taberna, con su alto contenido de azúcares y alcoholes (Obire, 2005; Velázquez, 2012), así como su consistencia espesa y blanca y su exquisito sabor, más fino y delicado que el pulque (Rodríguez, 2008), ha hecho que sea considerada una de las bebidas más aceptadas entre los pobladores; los cuales acostumbran tomar la savia con ayuda de un carrizo (*Graminea*) directamente del boquete donde esta se almacena; o ya sea el caso, es ingerida en forma de helado y bolis, o servida en vasos para agregarle hielo, agua y azúcar (NOTIMEX, 2011; Vázquez, 2012; Santiago, 2013; Matus, 2016). Es común que una persona que tiene taberna, la comparta con familiares y amistades, por lo que se considera un recurso de importancia social que fomenta la convivencia (Santiago, 2013).

## **B) Proceso de producción de la taberna.**

El proceso de elaboración de esta bebida es escasamente conocido; pocos de los que aún dedican su vida a la producción de la misma, explican y detallan en diversas entrevistas, todos y cada uno de los pasos que deben llevarse a cabo para la extracción exitosa de taberna obtenida de la palma de coyol (Mondragón, 2015). Esta singular bebida, se extrae de *Acrocomia aculeata* (comúnmente conocida como coyol o Palma Real); en donde, las palmas taladas por la mañana, se dejan fermentar naturalmente por 24 horas; este proceso es conocido como “hirviendo” o “ebullición del vino” (Balik, 1990 en Bermúdez, 2011). El corte puede ser superficial o de raíz, ya sin hojas y en el suelo, en la extremidad superior donde se encuentra el corazón denominado “Cogoyo o Palmito” se le hace un hueco rectangular de aproximadamente 10 centímetros de ancho por 15 centímetros de largo y 30 centímetros de profundidad, al cual se le denominada “Canoa”, siendo este, por donde emana y se almacena el jugo que ha de ser licor una vez fermentado (Bermúdez, 2011; NOTIMEX, 2011; Mayorga, 2012).

El procedimiento de producción de la bebida; desde la incisión; parece ser de origen autóctono; pues simplemente se trata de cortar el brote apical dejando un boquete que dé cabida a varios litros de savia y se colecta con una caña o pipeta de calabaza. Este proceso es similar al de la incisión para obtener el pulque. Otro método; según testigos presenciales, es el que realizaban los nahuas del suroeste del estado de Chiapas; los cuales conocían el vino de Coyol y para elaborarlo tiraban una palma de Coyol y le cavaban un agujero de uno o dos litros de capacidad cerca de la orilla del tronco caído (Godoy et al., 2003).

Tal como se sabe, durante el proceso de producción, es importante no cortar demasiado por debajo del palmito, ya que esto limita el flujo máximo de la savia; este líquido, es una agua miel dulce con sabor a agua de coco que se fermenta rápidamente (Bermúdez, 2011), este mismo se extrae por lo general tres veces al día (seis de la mañana, una de la tarde y seis de la tarde) (Vázquez, 2012).

Una palma puede producir de dos a tres litros de taberna durante dos meses, dependiendo del tamaño del árbol (el cual debe ser adulto, es decir que tenga una edad promedio de 15 años) (Bermúdez, 2011). En tanto se produce la savia, la cavidad es cubierta con un pedazo de tabla o cartón para evitar que le entren moscas u hormigas (Vázquez, 2012). Es necesario vaciar y raspar todos los días esta cavidad para que la savia siga drenando (Bermúdez, 2011); para posteriormente ser colectada de las canoas y ser colocada en depósitos en donde continúa la fermentación (Velásquez, 2012). Es relevante señalar que la lluvia afecta la producción de taberna, puesto que, si se mojan los troncos, la bebida toma una consistencia ligosa (Velásquez, 2012; Vázquez, 2012).

### **C) Efectos de la bebida.**

Los efectos de beber taberna van desde mareo hasta debilitamiento de las piernas (Bermúdez, 2011; Velásquez, 2012; Vázquez, 2012). También se tiene registro de algunos animales a los cuales les agrada el sabor de la taberna; ejemplo de ellos es el tlacuache, el cual es capaz de quitar las palmas que cubren la canoa y se queda dormido a un lado de la palma, después de tomar el licor (Velásquez, 2012).



## **D) Creencias.**

Una práctica común entre los pobladores de la Taberna, es adornar los tallos en producción con motivos de color rojo, para evitar el “ojeado”, que consiste en la acidificación excesiva y repentina de la taberna, la cual se cree es provocada por la admiración de aquellas personas que no están familiarizadas con ella; siendo así que, los productores evitan esto no dejando pasar personas extrañas hasta donde se encuentran los tallos ya deshojados y listos para su consumo (Santiago-Urbina et al., 2013).

### **1.2. El proceso fermentativo y la microbiota asociada.**

Las fermentaciones, son procesos metabólicos que llevan a cabo un grupo de microorganismos con el fin de transformar los compuestos químicos orgánicos (principalmente azúcares) en otras sustancias orgánicas más simples como etanol, ácido láctico y ácido butírico (Puerta, 2010).

Así pues, los principales microorganismos fermentadores son las levaduras, las bacterias lácticas, *Lactobacillus spp.* y *Streptococcus spp.*, las *Enterobacteriaceae*, algunas especies de *Clostridium* y las bacterias propiónicas y metánicas (Puerta, 2010); las cuales han sido estudiados en diversas bebidas fermentadas.

Es importante mencionar que, la fermentación no es exclusiva de bebidas alcohólicas, ya que, en la elaboración de muchos alimentos se usa este proceso con el fin de transformar alguna característica poco agradable, o incrementar alguna con mayor grado de aceptación para el consumo humano (Vela et al., 2006 en Casas et al., 2015).

#### **1.2.1. Bebidas fermentadas.**

Existen bebidas fermentadas como la cerveza, la sidra y el vino; y bebidas que además de ser fermentadas son destiladas; como son el tequila, ron y el wiski (Casas et al., 2015). Así mismo, existe un gran número de bebidas fermentadas producidas espontáneamente por microorganismos autóctonos adaptados a la región donde estas se generan; estos microorganismos, utilizan la materia prima disponible en su hábitat.

Algunas de estas bebidas se preparan a partir de productos de plantas como: maíz, granos de café, cebada, lúpulo o uvas, caña de azúcar, malta, arroz, almidón de trigo o de maíz, algunas especies de agaves; debido a que estos contienen una gran cantidad de azúcares necesarios para la obtención de alcohol (Ponce y Bermeo, 2011).

Se han descrito diversos datos sobre la composición microbiana y fisicoquímica de diversas bebidas fermentadas; particularmente en México se han caracterizado muchas de ellas; un ejemplo claro, son las bebidas descritas por Godoy et al. (2003) quienes refieren un total de 76 licores naturales, divididos en bebidas obtenidas de frutos, corteza, pulpa, savia, semillas y tallos. Así pues, se han realizado investigaciones referentes a la caracterización microbiológica y composición química en el pulque (Cervantes-Contrera y Pedroza, 2008); agua miel, pozol, sotol (García, 2010), tepache (Banda et al., 2015) y tuba (Salgado- Delgado et al., 2016).

Sin embargo, aún falta mucha información sobre los cambios microbiológicos, bioquímicos y nutricionales durante la fermentación (Chiang et al., 2006).

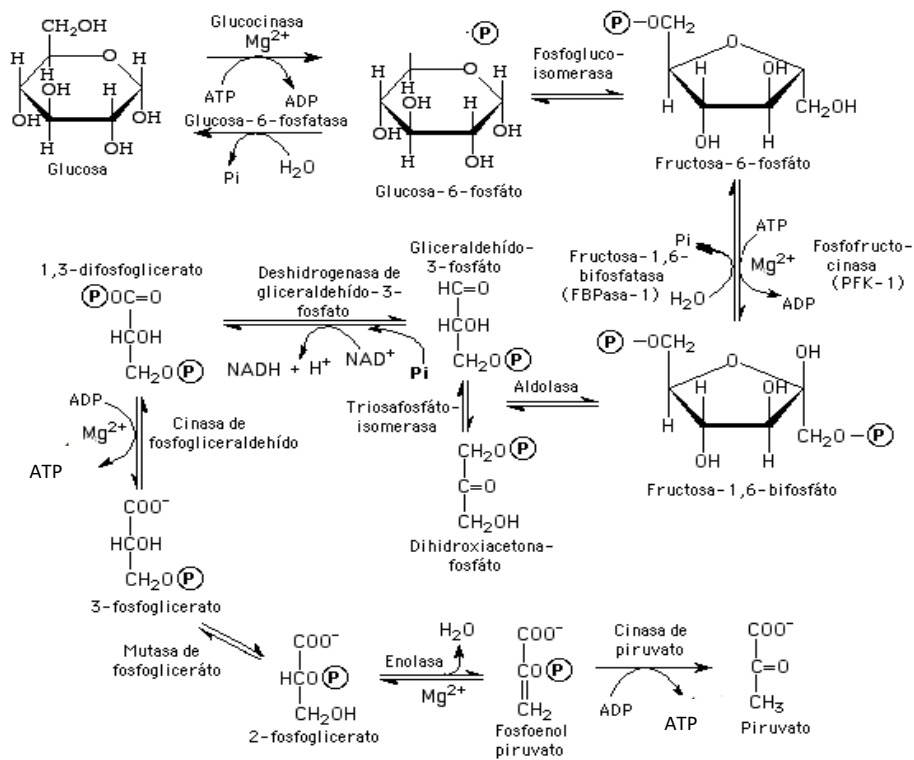
### **1.2.2. Proceso fermentativo.**

Las fermentaciones, son procesos catabólicos de oxidación de sustancias orgánicas que generan otros compuestos orgánicos y energía de forma natural en condiciones ambientales. Los procesos de fermentación son realizados principalmente por levaduras y bacterias en ausencia de oxígeno (Puerta, 2010), en donde los carbohidratos son los principales compuestos químicos que se fermentan; sin embargo, algunas bacterias y levaduras pueden fermentar otros compuestos como ácidos orgánicos, aminoácidos, purinas y pirimidinas; los principales azúcares que se fermentan a lo largo de los procesos son: la glucosa, la fructosa, la maltosa, la sacarosa y la lactosa, los cuales se obtienen de la caña de azúcar, las melazas, los jugos de las frutas y la remolacha (Garrido y Teijón, 2006).

Por su parte, los azúcares pueden ser catalogados en reductores y no reductores. Un azúcar es reductor cuando puede oxidarse. En las reacciones redox ocurre una transferencia de electrones, por lo tanto, los elementos, iones o compuestos cambian su número de oxidación. Estas reacciones suceden en forma simultánea; un elemento

se oxida, cediendo los electrones, y el otro se reduce, aceptando los electrones. En el caso de las sustancias orgánicas como los carbohidratos, la reducción ocurre cuando aumentan los enlaces como el hidrógeno en los átomos de carbono y la oxidación cuando el sustrato dona o pierde hidrogeniones (Puerta, 2010).

Los monosacáridos son azúcares reductores; ejemplo de ellos son la maltosa y la lactosa. Por su parte, la sacarosa es un azúcar no reductor. Esta característica reductora de los azúcares sirve para diferenciar aldosas de cetosas y para verificar la calidad de los productos obtenidos en las fermentaciones (Puerta, 2010).

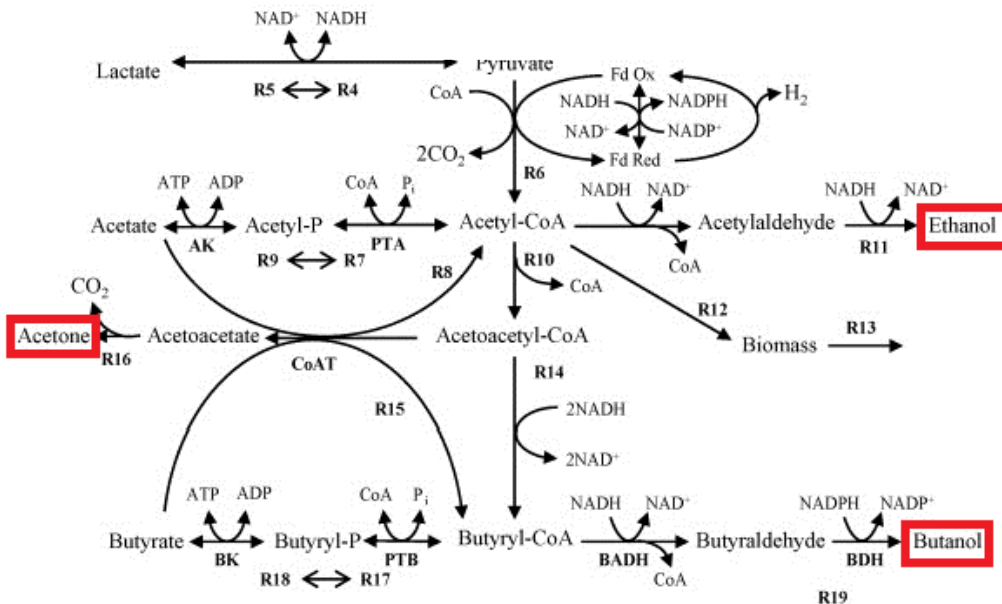


(Tortora et al., 2007).

Figura 1. Proceso fermentativo anaerobio. Transformación de glucosa a piruvato.

Es importante señalar que durante las fermentaciones no se lleva a cabo el proceso químico de cadena de transporte de electrones, dando como resultado que el receptor final de los electrones sea el NADH, el cual se produce durante la glucólisis (figura 1); este compuesto orgánico con poco poder oxidante, se reduce para volver a oxidar el NADH a NAD+. Así bien, las moléculas de ATP producidas en las fermentaciones son consumidas por los mismos microorganismos (Puerta, 2010) (figura 2).

Particularmente la glucólisis es el proceso por el que los organismos escinden la glucosa en ácido láctico en ausencia de oxígeno molecular con el propósito de obtener energía. Otros hidratos de carbono utilizan esta ruta para degradarse, por eso se denomina también ruta central del metabolismo de carbohidratos, ruta de Embden-Meyerhof o fermentación glucolítica (figura 2). Hay otros tipos de fermentación en que el producto final no es el ácido láctico, como las fermentaciones alcohólicas o acéticas (ver figura 1 en anexos) (Hernández, 2003).



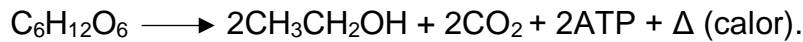
(Hernández, 2003).

Figura 2. Proceso Fermentativo Anaerobio. Transformación de piruvato a compuestos secundarios, principalmente para la generación de etanol.

### A) Fermentación alcohólica.

Las bebidas alcohólicas son elaboradas por bioconversión o biotransformación de la glucosa en etanol (fermentación), proceso que es llevado a cabo mediante una serie de reacciones químicas realizadas por levaduras y bacterias específicas, como parte de un metabolismo de producción de energía cuyo rendimiento varía según el microorganismo involucrado y su capacidad metabólica específica (Arratia, 2009).

La fermentación alcohólica por definición, es el proceso bioquímico de extracción de energía en el cual, compuestos orgánicos sirven tanto de donador (piruvato) como aceptor ( $\text{NAD}^+$ ) de electrones, teniendo como productos el etanol y bióxido de carbono (Arratia, 2009), tal como se muestra en la siguiente fórmula química:



Es así que, en presencia de oxígeno, las levaduras realizan la respiración, crecen, oxidan completamente la glucosa y así obtienen el ATP; pero en condiciones de anaerobiosis, estos microorganismos fermentan azúcares, como la glucosa y la lactosa. Así, la glucosa se transforma en ácido pirúvico (figura 1), siguiendo la secuencia de reacciones de la glucólisis, y luego, el ácido pirúvico se transforma en acetaldehído mediante la enzima piruvato-descarboxilasa, seguidamente el acetaldehído se convierte en etanol por medio de la enzima alcohol-deshidrogenasa (figura 2) (Arratia, 2009; Puerta, 2010).

En las fermentaciones por levaduras, de acuerdo con los sustratos y las cepas, se obtienen otros alcoholes como propanol, butanol, isobutanol, pentanol y además, glicerina, ácido succínico, ésteres, aldehídos, cetonas, aminas y compuestos de azufre, entre otros (Puerta, 2010).

### **1.2.3. Microbiota asociada al proceso fermentativo.**

Dentro del proceso fermentativo existen múltiples microorganismos que contribuyen a la realización de las diversas fermentaciones. Dentro de ellos se encuentran las bacterias (bacterias ácido lácticas; bacterias ácido acéticas) y las levaduras principalmente. Las Bacterias Ácido Lácticas (BAL), llamadas así porque producen ácido láctico (Holguín et al., 2010); pueden ser clasificadas en homofermentativas y heterofermentativas según los productos obtenidos. (Puerta, 2010).

Otro grupo de bacterias de importancia durante la fermentación, son las Bacterias Ácido Acéticas (BAA); las cuales principalmente oxidan el etanol, generando ácido acético,

acetaldehído y agua, de esta manera, el ácido acético puede combinarse con el etanol dando acetato de etilo que es el verdadero responsable del olor picante en la bebida (Puerta, 2010). Es así que las BAA, brindan un sabor muy avinagrado a las bebidas (Amoa-Awua et al., 2007); así como las BAL confieren su sabor ácido, olor, textura; de igual manera fungen como inhibidores de patógenos (Parras, 2010).

Por su parte, las levaduras microorganismos encargados de llevar a cabo primordialmente los procesos de fermentación alcohólica, son consideradas como uno de los grupos más relevantes del consorcio microbiano, por el cual se generan diversos compuestos químicos de interés en las bebidas fermentadas; así como también contribuyen en los procesos ecológicos de sucesión y dominancia a lo largo del proceso fermentativo. A continuación, se describirán de forma particular el grupo de las levaduras, parte central del presente escrito.

#### **A) Levaduras asociadas a procesos fermentativos.**

Como ya se mencionó anteriormente, las levaduras juegan un papel importante en el proceso de fermentación de bebidas alcohólicas y de algunos alimentos; estas mismas son utilizadas en la conservación de alimentos, con el fin de hacer el producto más digerible o de incrementar su valor nutricional (Segura et al., 2010).

Las levaduras, hongos unicelulares no filamentosos, de forma esférica u oval típicamente; están ampliamente distribuidas en la naturaleza y con frecuencia se las encuentra como una cubierta pulverulenta en las frutas y en las hojas (Tortora et al., 2007); aunque la mayoría de ellas crecen mejor con un alto contenido de humedad. No obstante, crecen mejor que la mayoría de las bacterias en sustratos que contienen elevadas concentraciones de solutos (por ejemplo, carbohidratos o cloruro de sodio), es decir son osmotolerantes. El intervalo de crecimiento es parecido al de los mohos, con una temperatura óptima en torno a los 25 a 30 °C y una temperatura máxima en torno a los 35 a 47 °C; también requieren una cantidad de humedad mayor que los mohos. Crecen mejor en aerobiosis, aunque las especies de tipo fermentativo son capaces de crecer, aunque lentamente en anaerobiosis (Camacho et al., 2009).

Las levaduras pueden ser clasificadas de acuerdo a su actividad metabólica en: oxidativas, fermentativas, o bien de ambos tipos. Por su parte, los azúcares son la fuente energética más apropiada para las levaduras, aunque las oxidativas, pueden oxidar los ácidos orgánicos y el alcohol (Camacho et al., 2009).

En la elaboración de bebidas alcohólicas en general, *Saccharomyces cerevisiae* es la levadura que principalmente produce etanol en la fermentación. Durante la elaboración del vino, al inicio de la fermentación se desarrollan varias especies de levaduras no-*Saccharomyces* de los géneros *Hanseniaspora*, *Candida*, *Issatchenkia*, *Metchnikowia*, *Pichia* que le confieren notas características (aromáticas y de sabor) al producto final. Estas levaduras son importantes debido a la capacidad que tienen de producir compuestos aromáticos al inicio de la fermentación y son reemplazadas debido a su baja tolerancia al etanol y por no tener la capacidad de fermentar los azúcares presentes en el mosto (Segura et al., 2010).

Algunos géneros de importancia en alimentos fermentados se muestran en el siguiente cuadro:

Cuadro 2. Géneros de levaduras presentes a nivel industrial en diversos alimentos de importancia.

Género.	Lugar de crecimiento y/o usos.
<i>Schizosaccharomyces</i>	* Frutas tropicales, maleza y en la miel.
<i>Saccharomyces</i>	- Industria alimentaria. Fermentación del pan, fermentación de la cerveza, fermentación de los vinos, en la producción de alcohol, glicerol e invertasa.
	- <i>K. marxianus</i> . Obtención de productos lácteos por su capacidad de fermentar lactosa.
<i>Zygosaccharomyces</i>	* Crecen en medios con elevada concentración de azúcar

---

(osmófilas).

- Intervienen en la alteración de la miel, jarabes y melazas. Fermentan la salsa de soya y algunos vinos.

*Pichia*

\* Superficie de los líquidos formando una película; *P. membranifaciens* produce una película en la superficie de las cervezas y vinos.

*Debaromyces*

\* Película en la superficie de las salmueras. *D. kloeckeri* crece en la superficie de los quesos y embutidos.

*Hanseniaspora*

\* Crecen en los zumos de frutas.

*Torulopsis*

- Originan problemas en las fábricas de cervezas. *T. sphaerica* fermenta la lactosa. Otras especies alteran la leche condensada, los concentrados de zumo de frutas y los alimentos ácidos.

*Candida*

- *C. utilis* se cultiva para la obtención de proteína unicelular. *C. krusei* se utiliza junto con los cultivos iniciadores de productos lácteos. *C. lipolytica* produce alteración de la mantequilla y margarina.

*Brettanomyces*

- Producen ácidos e intervienen en la fermentación de la cerveza belga, cervezas inglesas y de los vinos franceses.

*Trichosporon*

\* Fábricas de cerveza y en la superficie de vacuno refrigerada.

*Rhodotorula*

\* Producen manchas en la superficie de los alimentos como las carnes, o en el sauerkraut.

---

**Nota:** (\*) lugar de crecimiento; (-) uso.

(Camacho et al., 2009).



## **B) Taxonomía de levaduras.**

Las levaduras pertenecen al Reino Fungi y dentro de él a la división Eumicota que agrupa a los denominados hongos verdaderos. Dentro de esta división las levaduras se 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. Los géneros de levaduras esporógenas englobados todos ellos en la familia Saccharomycetaceae, se distribuyen en tres subfamilias. Los de las levaduras no esporógenas, constituyen la familia Cryptococcaceae. Conviene aclarar que los Deuteromicetos constituyen en realidad un “cajón de sastre” en que se incluyen levaduras haploides que tienen su correspondiente fase diploide clasificada en los Ascomicetos. Así por ejemplo la especie *Kloeckera apiculata* es la fase imperfecta (o haploide) de la especie *Hanseniaspora uvarum* (Mesas y Alegre, 1999).

Asimismo, debajo de los taxones género y especie las levaduras pueden ser clasificadas en subespecies y variedades que a menudo adquieren el rango de especies tras nuevas revisiones taxonómicas, o, por el contrario, varias especies son unificadas en una sola como subespecies de la misma con lo que la clasificación se complica aún más y se incrementa el número de sinonimias (Mesas y Alegre, 1999).

Es así que, desde la primera hasta la edición actual del libro *The Yeast*, a taxonomic study, el número de especies de levaduras que se han descrito, ha pasado de 164 en 1952 (basado principalmente en la descripción morfológicas y algunos ensayos fisiológicos); 349 en 1970 (con la incorporación de caracteres nutricionales); 500 en 1984 (con la aplicación temprana de enfoques moleculares); 700 en 1998 (anexando la secuenciación del ADN y la reconstrucción filogenética) hasta 1,500 especies en el 2011 (Gutiérrez, 2017).

### **1.3. Técnicas de descripción e identificación de levaduras.**

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

#### **1.3.1. 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).

Se ha determinado que la mayoría de los organismos levaduriformes crecen fácilmente en medios de cultivo usados rutinariamente en el laboratorio de Microbiología; los más utilizados han sido: el agar sangre, agar chocolate, agar Cled (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).

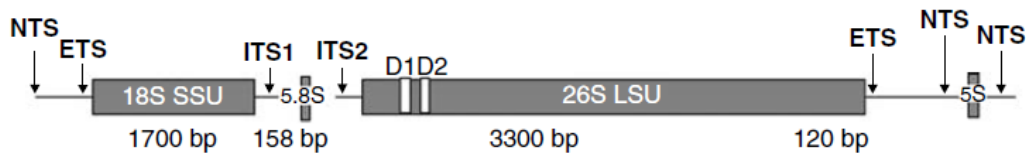
Por su parte, las características morfológicas microscópicas de las levaduras se determinan mediante su observación celular; en donde su forma puede ser desde esférica a ovoide, alimonada, piriforme, cilíndrica, triangular e incluso alargada. Es importante señalar que la mayoría de las levaduras, se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

### **1.3.2. Identificación de levaduras mediante el análisis de los Polimorfismos de Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP).**

La técnica denominada PCR- RFLP (de sus siglas en inglés: Polymerase Chain Reaction- Restriction Fragment Length Polymorphism) de las regiones ITS- 5.8S se desarrolló como una alternativa de identificación de levaduras de manera rápida para su utilización en la industria. Esta técnica ha sido utilizada por diferentes autores para identificar levaduras aisladas de diferentes fuentes como mostos de vinos, sidra, jugo de naranja, miel, cerveza de sorgo, masa, productos lácteos y recientemente en muestras clínicas para la identificación de levaduras y hongos patógenos (Segura et al., 2010).

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 correspondiente 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 (Orbera, 2004).

El uso más amplio que se le ha dado a la técnica de 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 e ITS 2 (ITS 5.8S). 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 (Orbera, 2004).



(Fernández-Espinar et al., 2006).

Figura 3. Estructura del ADN ribosomal en levaduras. Se muestran en ella, las subunidades 18S y 26S, así como los Espaciadores Internos Transcritos (ITS) y los Espaciadores Externos Transcritos (ETS), así como la subunidad 5.8S que sirve para la identificación de levaduras mediante RFLP. Por último, se muestran los dominios D1 y D2 de la subunidad 26S, usados en secuenciación para la identificación taxonómica en especies y cepas de levaduras.

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).

### 1.3.3. Identificación de levaduras por secuenciación del Dominio D1/D2 del ADNr.

El dominio D1/D2 del ADNr 26S, es una región altamente variable, con diferencias entre especies de hasta una única base. Esta región ha permitido separar todas las especies de ascomicetes y basidiomicetos existentes, incluso las altamente relacionadas (Orbera, 2004).

La secuenciación de la subunidad mayor 26S ADNr, especialmente la región D1/D2, ha sido aplicada al estudio de la filogenia de diferentes grupos de levaduras como una importante herramienta en la identificación de levaduras (Baleiras Couto et al., 2005 en González, 2014).

#### **1.3.4. Identificación de levaduras mediante Espectrometría de Masas (Maldi-Tof/MS).**

La espectrometría de masas, conocida en inglés como matrix- assisted laser desorption/ionization time of- flight mass spectrometry (MALDI- TOF MS), es una técnica utilizada en la identificación de microorganismos mediante la creación de un espectro basado en el perfil de proteínas, que es único para una especie dada (Relloso et al., 2015).

Esta técnica existe hace más de 30 años, permite la identificación de microorganismos mediante el análisis de proteínas principalmente ribosómicas, a través de la creación de un espectro de masas que es específico para cada microorganismo. Un microorganismo dado, presentará siempre una serie de picos característicos en el espectro, y esto permite la creación de bases de datos con los espectros de masas que presentan los distintos microorganismos. El espectro obtenido para un determinado microorganismo se compara automáticamente con la base de datos, y el resultado se emite junto a un puntaje (Relloso et al., 2015), el cual señala el nivel de confiabilidad con el que la especie que se está identificando, sea lo más parecida al espectro que se tiene registrado en la biblioteca del programa.

Este sistema constituye una herramienta útil para el laboratorio microbiológico, pues permite una identificación rápida de bacterias y levaduras a partir de colonias aisladas, e incluso es capaz de diferenciar a nivel de subespecie (Relloso et al., 2015).

#### **1.4. Técnicas para la determinación de compuestos químicos en bebidas fermentadas.**

Las técnicas cromatográficas, engloban métodos eficaces en que las moléculas de una mezcla, disueltas en una fase móvil que se mueve por acción de alguna fuerza, bien sea gravitatoria o hidrodinámica, se van desplazando a través de una fase estacionaria (que ejerce la fuerza de retardo), estableciéndose distintos procesos de reparto entre las dos fases (Roca, 2003). De esta manera, las aplicaciones de las diferentes cromatografías basadas en la polaridad de los compuestos, dependerán de las distintas fases alternativas que se puedan utilizar. Así, en la cromatografía de gases y la

cromatografía líquido- líquido se puede elegir un gran número de fases estacionarias; siendo así que la cromatografía líquido- líquido en su variante de cromatografía líquida de alta precisión (HPLC), es la que ofrece la mayor flexibilidad, con una amplia gama de fases estacionarias y un número casi ilimitado de fases móviles que pueden utilizarse para la identificación de compuestos químicos (Roca, 2003).

#### **1.4.1. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).**

El acrónimo HPLC, acuñado por el fallecido profesor Csaba Horváth, quien indicaba el uso de alta presión para generar el flujo requerido en la cromatografía líquida en columnas empaquetadas; es lo que llevo a la denominación de Cromatografía Líquida de Alta Presión (Waters, 2017). En donde, para llevar a cabo el procedimiento de identificación de los compuestos, se requieren presiones de varios centenares de atmósferas, con el fin de conseguir caudales razonables con los modelos empaquetados de cromatografía de líquidos, que constan de partículas de diámetro igual o inferior a 10  $\mu\text{m}$  (Skoog et al., 1997).

En efecto, la Cromatografía Líquida de Alta Resolución es una herramienta potente utilizada en Química Analítica, debido a que el aparato tiene la capacidad de separar, identificar y cuantificar los compuestos que están presentes en cualquier muestra que se pueda disolver en un líquido. Así pues, esta técnica es de interés para estudios de sustancias en ciencia, industria y sociedad como: aminoácidos, carbohidratos, terpenoides, plaguicidas, esteroides, hidrocarburos, drogas, proteínas, antibióticos, órgano metálico, especies inorgánicas y otros. Hoy en día, los compuestos en concentraciones trazas como partes por trillón pueden identificarse fácilmente (Baquero, 2004; Waters, 2017).

#### **1.4.2. Cromatografía de Gases (CG).**

Particularmente, para estudiar de forma individual los componentes de la fracción aromática en las bebidas alcohólicas, se requiere el empleo de una técnica de separación del contenido de la misma; actualmente se utiliza la cromatografía de gases

para la separación de sustancias volátiles presentes en bajas concentraciones y posteriormente para la cuantificación de los mismos; estos disponen de detectores muy sensibles (Gil, 1997).

La Cromatografía de Gases (CG), es la técnica analítica de separación de compuestos que ha experimentado un amplio desarrollo; su uso es extenso, ya que ha sido utilizado para resolver problemas a nivel industrial, medicina, biología y análisis ambiental. Esta técnica ofrece un alto poder de resolución para compuestos orgánicos volátiles; su principal limitación se encuentra en la labilidad térmica de los solutos, los cuales deben ser estables a la temperatura requerida para la volatilización (Valcárcel y Gómez, 1988; Harris, 2007).

En Cromatografía de Gases, la fase móvil es un gas, mientras que la fase estacionaria puede ser: un sólido absorbente o un líquido retenido en un soporte sólido (columna empaquetada) o impregnando las paredes de una columna capilar (columna abierta) (Valcárcel y Gómez, 1988 Harris, 2007).

### **1.5. Ecología: Definición y áreas de estudio.**

El término ecología proviene de dos antiguos vocablos griegos: *oikos*, que significa casa y *logos* ciencia. De ahí que la ecología sea el estudio de las relaciones entre los organismos y su medio (Sánchez et al., 2005).

Es así que, el término ecología que se conoce en la actualidad, fue establecido por el célebre biólogo alemán Ernest H. Haeckel (1834- 1919) en el año de 1869, quien lo definió como el estudio de las relaciones de un organismo con su medio ambiente inorgánico y orgánico; en particular, Haeckel consideraba que un organismo cualquiera presentaba relaciones de tipo positivo o “amistoso” y de tipo negativo o “enemistoso” con las plantas y animales con los que convivía (Sánchez et al., 2005).

De esta manera, la ecología se ocupa del estudio y de la dinámica de existencia de los diferentes grupos de seres vivos, de sus procesos de funcionales en la tierra, en los mares, en las aguas continentales. Así pues, el objeto de estudio de la Ecología es la estructura y función de la naturaleza (De la Llata, 2003).

A continuación, se esbozan los niveles de organización en los que se ocupa la ecología:

- Población. Conjunto de organismos de una misma especie (organismos con características comunes capaces de intercambiar material genético, su descendencia es fértil) que viven en un área y tiempo definidos.
- Comunidad. Conjunto de poblaciones de diferentes especies que viven en un área específica y que interaccionan.
- Ecosistema. Nivel de organización que engloba las relaciones entre los componentes abióticos y bióticos y de éstos entre sí, la comunidad y el ambiente físico. Se considera la unidad funcional de estudio en Ecología.
- Biosfera. Es la parte de la atmósfera (hidrósfera, litósfera, troposfera) en donde se desarrolla la vida (Sánchez et al., 2005).

#### **1.5.1. Ecología de levaduras en fermentaciones espontáneas.**

Existen varias definiciones de comunidad, sin embargo, la más apropiada es: la combinación de poblaciones de diversas especies que coexisten en un escenario evolutivo dado. El número de especies (riqueza), la abundancia relativa de los individuos entre las especies (equitatividad), y las escalas temporal y espacial son las características de las comunidades que se usan tanto para definir diversidad de especies, como para evidenciar el ensamblaje de una comunidad (Bolaños, 2013).

El ensamblaje de una comunidad es un mecanismo dinámico donde individuos, fenotipos, poblaciones y gremios interactúan produciendo patrones observables. La competencia interespecífica, los procesos sucesión y la depredación, determinan la diversidad de las comunidades, donde las especies continuamente están colonizando espacios y perdiendo poblaciones (Bolaños, 2013).

Dado a lo anterior, las etapas de sucesión conducen a cursos en los cuales la materia orgánica producida en el ecosistema es totalmente invertida y utilizada. Si aceptamos que la diversidad aumenta a lo largo de la sucesión, es de esperar encontrar una



correlación inversa entre la diversidad y la acumulación de materia orgánica (Margalef, 1998).

Ahora bien, en el caso de las comunidades levaduriformes, la diversidad presente en las fermentaciones, depende de una gran variedad de factores, tales como las condiciones climáticas, temperatura y precipitación, incluida la localización geográfica, los tratamientos con fungicidas, la variedad y la edad de la planta que se esté usando para la generación de la bebida (Schuller et al., 2005).

### **A) Ecología aplicada a procesos fermentativos.**

Tal como se sabe, el proceso de fermentación espontáneo; es llevado a cabo primordialmente por microorganismos iniciadores, entre ellas los géneros *Hanseniaspora*, *Candida*, *Issatchenkia*, *Metchnikowia*, *Kluyveromyces*, *Pichia* y *Rhodotorula*, que le confieren ciertas características al producto final (Segura et al., 2010); así como especies representativas del género *Saccharomyces*, que le confieren a la bebida el contenido alcohólico.

Sin embargo, hasta el momento no se han registrado trabajos relacionados con la microbiota y los compuestos que se generan a lo largo de procesos tan complejos.

### **1.5.2. Riqueza, abundancia y diversidad.**

Riqueza biológica se define como el número de especies diferentes presentes en un determinado espacio (ecosistema, biotopo o superficie) y en un determinado periodo de tiempo.

En tanto la biodiversidad o diversidad biológica, toma en cuenta no sólo el número de especies diferentes (R), sino también su abundancia (A) o presencia relativa.

Tradicionalmente se han distinguido tres componentes de la diversidad de especies: alfa o diversidad local, diversidad beta o diferenciación, y gamma o diversidad regional (Koleff, 2005).

## **A) Diversidad alfa o diversidad local.**

Originalmente la diversidad alfa fue caracterizada por Whittaker (1960, 1972) como el número de especies a escala local (diversidad dentro del hábitat) (Koleff, 2005). Así bien, la gran mayoría de los métodos propuestos para evaluar la diversidad de especies se refieren a la diversidad dentro de las comunidades (alfa). Para diferenciar los distintos métodos en función de las variables biológicas que miden, se pueden dividir en dos grandes grupos: 1) Métodos basados en la cuantificación del número de especies y 2) Métodos basados en la estructura de las comunidades (Moreno, 2001).

### 1) Métodos basados en la cuantificación de especies:

- Riqueza específica (S): basada en el número de especies presentes, sin tomar en cuenta el valor de importancia de las mismas.
- Índice de Diversidad de Margalef (DMg): Transforma el número de especies por muestra a una proporción a la cual las especies son añadidas por expansión de la muestra.

### 2) Métodos basados en la estructura de las comunidades:

- Índices de dominancia: Basados principalmente en la dominancia e inversamente proporcionales al concepto de uniformidad o equidad de la comunidad. Toman en cuenta la representatividad de las especies con mayor valor de importancia sin evaluar la contribución del resto de las especies. Ejemplo de ello es el índice de Simpson ( $\lambda$ ).
- Índices de equidad: Expresan la uniformidad de los valores de importancia a través de todas las especies de la muestra. Ejemplo de ello es el índice de Shannon- Wiener ( $H'$ ) (Moreno, 2001).

## **1.5.3. Sucesión ecológica.**

Sucesión, se define como los cambios temporales que se presentan en la estructura, la composición taxonómica y las funciones de un ecosistema después de que éste es perturbado (Whitmore, 1978). Los cambios ecológicos que sufre el ecosistema en

sucesión, así como la velocidad con la que ocurren estos cambios, dependen de las características del disturbio, la disponibilidad de organismos regenerativos, el ambiente biótico y las condiciones abióticas prevalecientes en el sitio perturbado (Pickett, 1987).

## **1.6. Herramientas estadísticas para el estudio ecológico de levaduras.**

Los análisis estadísticos son típicamente usados para estudiar una gran cantidad de datos, hipótesis que involucran variables multi respuesta y examinar las relaciones entre estos. El uso de análisis multivariados es suplantado por la simple descripción de los análisis en ecología, en donde datos ecológicos y ambientales, generan dos o más variables de respuesta. En particular, cuando una investigación cuenta con múltiples respuestas, se dice que posee datos multivariados, en donde existe una relación entre una o más variables predictoras (Gotelli y Ellison, 2013; Buttigieg y Ramette, 2014).

Los datos generados en investigación, muchas veces son datos univariados, ello consiste en una o más variables independientes (predictores) y dos o más variables dependientes (respuestas). La distinción entre datos univariados y multivariados en gran medida se encuentra en cómo están organizados los datos y que es lo que se quiere analizar, más no en cómo fueron colectados (Gotelli y Ellison, 2013).

De esta manera, al realizar investigaciones con microorganismos, en donde se conoce la riqueza y abundancia de las especies, y se tiene registro particularmente de la morfología de cada especie; así como los compuestos químicos que generaron tales organismos, los análisis multivariados esbozan claramente mediante relaciones, cómo es el mecanismo de funcionamiento tanto de las especies involucradas, así como los factores ambientales que se encuentran en el fenómeno estudiado.

### **1.6.1. Análisis de clasificación.**

Es el proceso por el cual se da lugar a un objeto en un grupo. El objetivo de la ordenación es la separación de las muestras a lo largo de gradientes ambientales o biológicos; así como de clasificar estos grupos similares en objetos identificables e

interpretar las clases que pueden ser diferenciadas de clases vecinas (Gotelli y Ellison, 2013).

Los ecologistas y científicos ambientales, pueden ser suspicaces de clasificar dado que las clases son asumidas como representaciones de entidades discretas. La ordenación identifica los patrones que ocurren en los gradientes; mientras que la clasificación identifica los puntos finales o extremos de los gradientes (Gotelli y Ellison, 2013).

### **A) Análisis Cluster (AC).**

El análisis cluster describe una clase de técnicas encargadas de colocar objetos en grupos, llamados agrupaciones. Las disimilitudes entre los objetos dentro estos grupos deben ser menores que entre grupos. La definición del análisis varía, ya que existen diferentes técnicas del mismo que pueden abordar el problema de manera diferente. A continuación, se observan dos enfoques ampliamente utilizados (Buttigieg y Ramette, 2014):

1) Análisis de agrupamientos Jerárquicos: El análisis jerárquico se puede realizar usando una matriz de “objeto por objeto” de similitudes o distancias; en la que se trata de encontrar una buena, aunque quizás no la mejor agrupación de los objetos en función de las distancias suministradas de una manera jerárquica, primero se agrupan los objetos con las diferencias más bajas antes de continuar. Una amplia gama de algoritmos y criterios están disponibles para detectar diferentes agrupaciones en conjuntos de datos (Buttigieg y Ramette, 2014).

2) Análisis de agrupamientos No Jerárquicos: Puede utilizar una matriz de disimilitud como entrada, más no requiere de una. Este método intenta encontrar agrupamiento de objetos que optimicen algún criterio de evaluación (que puede ser una medida de disimilitud) mediante la reasignación iterativa de objetos a grupos de tal manera que se mejore el valor de criterio (Buttigieg y Ramette, 2014).

### **1.6.2. Análisis de ordenación.**

Técnicas para ordenar datos multivariados. Crea ordenaciones con nuevas variables (llamados ejes principales), donde cada muestra tiene un valor u ordenación. Esta ordenación muchas veces representa una simplificación de los patrones en matrices de datos con variables complejas. Utilizada de esta manera, la ordenación es una técnica de reducción: comenzando con una base de  $n$  variables, la ordenación genera un pequeño número de variables que ilustran los patrones de importancia de los datos. La ordenación puede ser usada para discriminar o separar las muestras a lo largo de los ejes (Gotelli y Ellison, 2013).

Los ecologistas y científicos ambientalistas, rutinariamente utilizan cinco diferentes tipos de ordenación: Análisis de componentes principales, análisis de factores, análisis de correspondencia, análisis de coordenadas principales y escalamiento multidimensional no métrico (Gotelli y Ellison, 2013).

#### **A) Análisis de Componentes Principales (ACP).**

El PCA es un método algebraico/estadístico que trata de sintetizar y dar una estructura a la información contenida en una matriz de datos. El procedimiento consiste en homologar dicha matriz a un espacio vectorial tratando de encontrar en él unos ejes o dimensiones que, siendo combinación lineal de las variables introducidas, no pierdan la información inicial al conservar la varianza total, no tengan correlación entre ellos, esto es, sean linealmente independientes, lo que asegura la estructuración de las variables iniciales, tengan una importancia diferencial y conocida en la explicación de la varianza total (Lozares et al., 1991).

Realizadas estas exigencias, el objetivo básico consiste en reducir el número de variables introducidas. Para ello se toman como nuevas variables los ejes o componentes hallados, eligiendo un número y peso de los mismo suficiente para que la pérdida de la varianza total sea solo la conveniente, llenando así las finalidades del método, esto es, las de simplificar, reducir y estructurar la información inicial (Lozares et al., 1991).

La utilización del método llena, sobre todo si es previo a la estratificación que conlleva la construcción de una muestra como es el caso, diversas finalidades de interés:

1) Reducir el espacio tal y como se ha anunciado. De las variables introducidas en el método se retendrán unas combinaciones lineales de las mismas salvando en ellas las puntuaciones de los individuos (secciones censales).

2) Eliminación de la información redundante. De las variables introducidas en este análisis se disminuye la repercusión que en el cálculo de muestras tiene la redundancia informativa pues no se tiene en cuenta la acumulación de covarianza de las variables primitivas entre sí.

3) Captar en los nuevos ejes parte de la varianza total. En efecto más decisivo consiste en que siendo dichos ejes linealmente independientes y los que más acumulan la varianza del campo de variables introducido y en el grado decidido por el sociólogo, se asegura doblemente: la incorrelación entre las dimensiones, lo que era una condición decisiva de las establecidas en el apartado primero; el máximo poder discriminante establecido además jerárquicamente según dichos ejes: la estratificación saldrá así beneficiada.

4) Los ejes factoriales proveen también de una triple ventaja: por un lado estructuran la realidad introducida, que es la única existente en los datos disponibles, por otro, que aunque las variables introducidas en el análisis factorial estén elegidas como identificativas o explicativas de las que se utilicen en la encuesta, el método puede atestarnos sobre la validez de la elección; además, y a *posteriori*, estos ejes guardarán un poder extraordinario a la hora de validar precisamente variables importantes de la misma encuesta puesto que, en el caso examinado, se trata de variables censales.

El Análisis de Componentes Principales aparece como un complemento necesario a otras técnicas de categorización de individuos ya que su lógica precisamente es la de agrupar variables (Lozares et al., 1991).

### **1.6.3. Regresiones múltiples multivariantes.**

Dos métodos son usados comúnmente por los ecologistas: el análisis de redundancia (ADR) y el Análisis de Correspondencia Canónica (ACC). Por su parte, ADR, asume una relación causal entre la relación de las variables dependientes y las variables independientes, mientras el ACC focaliza o genera un eje unimodal con respecto a la respuesta de las variables y un eje lineal con respecto a las variables predictoras (Gotelli y Ellison, 2013).

#### **A) Análisis de Redundancia (ADR).**

El Análisis de Redundancia, es uno de los análisis más comúnmente usados para examinar las relaciones entre la composición de especies; la medida en cuanto a la abundancia por cada una de las  $n$  especies, y las características ambientales, medidas en un conjunto de  $m$  variables ambientales (Legendre y Legendre, 1998 en Gotelli y Ellison, 2013). Los datos de la composición de especies representan la respuesta multivariable, y las variables ambientales representan las variables multi predictoras; sin embargo, el ADR, no restringe el tipo de análisis, pudiendo ser usado en múltiples regresiones que involucran múltiples respuestas y múltiples variables predictoras (Gotelli y Ellison, 2013).

### **1.6.4. Análisis para la prueba de hipótesis.**

Un procedimiento que conduce a una decisión sobre una hipótesis en particular recibe el nombre de prueba de hipótesis. Los procedimientos de prueba de hipótesis dependen del empleo de la información contenida en la muestra aleatoria de la población de interés (Azor, s/d).

A continuación, se describe un tipo de análisis para la corroboración de hipótesis.

### **A) Análisis de Similitud (ANOSIM).**

La prueba de Análisis de Similitud (ANOSIM), tiene cierta similitud con una prueba de hipótesis similar a ANOVA, sin embargo, se utiliza para evaluar una matriz de disimilitud en lugar de datos sin procesar. Además, las disimilitudes sin transformar, a menudo se clasifican antes de realizar un ANOSIM. Las diferencias en cuanto a la clasificación, alinean a la prueba ANOSIM con el procedimiento del análisis NMDS- NM (Buttigieg y Ramette, 2014).

En cuanto a la estadística del análisis, este compara la media de las desigualdades clasificadas entre los grupos con la media de las diferencias clasificadas dentro de los grupos. Un valor R cercano a 1, sugiere desemejanza entre los grupos, mientras que un valor R cercano a 0 sugiere una distribución uniforme de los rangos altos y bajos dentro y entre los grupos. Los valores R por debajo de 0 sugieren que las diferencias son mayores dentro de los grupos que entre los grupos (Buttigieg y Ramette, 2014).



## **2. ANTECEDENTES.**

A continuación, se describen los estudios que se han realizado acerca de la taberna, desde aspectos microbiológicos, fisicoquímicos, biotecnológicos y ecológicos.

### **2.1. Estudios microbiológicos en la taberna.**

Los estudios científicos que se han encargado de describir la microbiota asociada a la taberna son escasos, dentro de ellos se han descrito microorganismos como las bacterias (registradas al inicio del proceso fermentativo), como son las BAL y BAA; así como coliformes existentes en la bebida. De igual manera se ha registrado la diversidad de levaduras asociadas a la bebida en dos localidades del estado de Chiapas (Benito Juárez, Villaflores y Las Arreolas, Arriaga).

#### **2.1.1. La comunidad bacteriana en la taberna, una bebida tradicional del sureste de México (Alcántara et al., 2010).**

En este escrito se caracterizó la comunidad bacteriana de la taberna (bebida obtenida del municipio de Villaflores, Chiapas, México) producida por la fermentación de la savia de la palma de Coyol (*Acrocomia aculeata*).

Mediante la generación de una librería del ADNr bacteriano, construido del ADN metagenómico extraído de los microorganismos durante el proceso de fermentación a las 0, 60 y 108 horas. Un total de 154 clones fueron secuenciados y 13, 10 y 9 secuencias únicas fueron encontradas en cada tiempo de muestreo. Al inicio de la fermentación, fueron detectadas: *Zymomonas mobilis*, *Fructobacillus spp.*, *Pantoea agglomerans* y otras Gammaproteobacterias. Después de 60 horas, fueron encontradas bacterias ácido lácticas, el 30% de los clones de la librería relacionada con las especies *Lactobacillus nagelli*, *L. sucicola* y *L. sp.* Al final del proceso, después de 108 horas, la comunidad bacteriana incluyó a *Z. mobilis*, *L. nagelli* y *Acetobacter pasteurianus*.

Los resultados sugieren que *Z. mobilis* representa una población importante de la comunidad bacteriana (60- 80%). La comunidad bacteriana es baja y decrece conforme avanza el proceso fermentativo; así también, el pH, los azúcares totales y los azúcares

reductores decrecen durante el proceso fermentativo, en tanto que la acidez total y el contenido de etanol aumentan.

### **2.1.2. Influencia de la región productora sobre la diversidad de comunidades de levaduras asociadas a la “taberna”, bebida derivada de *Acrocomia mexicana* Karw. ex Mart (Molina, 2014).**

Durante este trabajo, se llevó a cabo el aislamiento de las levaduras involucradas durante el proceso de fermentación de la bebida “Taberna” de dos localidades muestreadas (Benito Juárez y Las Arreolas); obteniéndose un total de nueve cepas de la localidad de Benito Juárez, todas correspondientes a la especie *Saccharomyces cerevisiae*. Para la localidad de Las Arreolas, se aislaron 16 cepas, de las cuales 10 fueron identificadas (*Saccharomyces pastorianus*, *S. cerevisiae*, *Pichia nakasei*, *Rhodotorula minuta*, *Candida tropicalis*, *Candida incommunis*, *Candida stellata*, *Candida mesentérica*).

Así también, se obtuvo de cada localidad muestreada la riqueza (R), así como los índices de Simpson (D) y Shannon- Wiener (H'). En el caso de la localidad de Benito Juárez, se obtuvo una especie, con un grado de dominancia igual a uno y un índice de biodiversidad igual a cero. En el caso de Las Arreolas; la riqueza de especies fue igual a 11, el grado de dominancia igual a 0.30 y el índice de biodiversidad igual a 1.48. La comparación estadística entre las dos localidades indicó que existe diferencia significativa con base a los índices clásicos antes descritos.

### **2.1.3. Especies de levaduras asociadas a la fermentación espontánea en la taberna, tradicional vino de palma del sureste de México (Santiago et al., 2014).**

El estudio consistió en el aislamiento y la identificación de las levaduras presentes en la taberna, durante la fermentación espontánea de la misma; 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, municipio de Villaflores, Chiapas,

México. Las levaduras aisladas fueron identificadas usando los patrones de restricción de los espaciadores internos transcritos (ITS 5.8S), así como la secuenciación de los dominios D1/D2 del ARNr 26S. Nueve diferentes especies de levaduras fueron identificadas: *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Candida tropicalis*, *Candida intermedia*, *Kazachstania unispora*, *K. exigua*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Pichia kudriavzevii* (*Issatchenkia orientalis*) y *P. kluyveri*. Las levaduras no- *Saccharomyces* *H. guilliermondii* y *C. tropicalis* fueron detectadas en las muestras de las tres palmas, mientras que *S. cerevisiae*, se detectó en dos de las tres palmas. La frecuencia y la distribución de las especies de levaduras fueron diferentes en las muestras de cada palma, lo que indica que el inóculo en la savia de palma puede ser depositada aleatoriamente por diferentes vectores.

## **2.2. Estudios fisicoquímicos en la taberna.**

La taberna, se presenta como un líquido blanquecino por fermentación natural de la savia; la savia sin fermentar es limpia y dulce, jarabe inodoro que contiene alrededor de 10 a 12 % de azúcar, la cual principalmente es sacarosa (Bassir, 1962; Okafor,). En la fermentación por la flora microbiana natural, el nivel de azúcar disminuye rápidamente a medida que se convierte en alcohol y otros productos (Obire, 2005), mientras que la savia se vuelve de color blanco lechoso debido a que la suspensión microbiana aumenta como resultado del crecimiento prolífico de los organismos fermentadores (Okafor, 1975). El pH de la taberna al final del proceso de fermentación es aproximadamente de 3.5 (Escalante et al., 2008 en Bermudez, 2011).

Al igual que en los estudios concernientes a la microbiota, son escasas las investigaciones relacionadas a la fisicoquímica de la bebida, de los cuales; se puede mencionar en donde se ha dado a conocer las concentraciones de azúcares, ácidos orgánicos; así como la producción de etanol.

### **2.2.1. Producción de vino de coyol de *Acrocomia mexicana* (Arecaceae) en Honduras (Balick, 1990).**

En esta investigación, se evaluó el vino de palma de Coyol para conocer si se encontraba presente algún otro componente nutricional de utilidad. Reportándose así un contenido de alcohol de 12.86%, además de la presencia de diversos minerales, haciendo hincapié en la concentración de potasio, desde el punto de vista nutricional. Si el análisis se calcula sobre una base peso seco, aumenta el contenido de proteína, pero no lo suficiente para considerar al vino de Coyol como un alimento nutritivo (Bermúdez, 2011).

### **2.2.2. Cambios fisicoquímicos y microbiológicos durante la emanación de savia de palma para la producción de una bebida alcohólica llamada “taberna”, la cual es producida en el sureste de México (Santiago et al., 2013).**

En este trabajo se determinaron los cambios fisicoquímicos y microbiológicos durante la producción de taberna, fue colectada de tres palmas en la localidad de Benito Juárez, Villaflores, Chiapas; a lo largo de 15 días de muestreo, cada 12 horas; la principal microbiota recuperada fueron levaduras, bacterias ácido lácticas (BAL), bacterias ácido acéticas (BAA), bacterias mesofílicas (BMA) y coliformes totales, La cantidad inicial de levaduras encontradas fue de  $3.67 \times 10^{10}$  UFC/mL, mientras que la población bacteriana inicial fue de  $7.0 \times 10^{10}$  UFC/mL. El total de microorganismos (levaduras, BAL, BAA, BMA y coliformes totales) aumenta en muestras posteriores; hasta que las concentraciones de etanol y ácido láctico aumenta a 425 y 0.32 p/v, respectivamente; las poblaciones microbianas disminuyen, así como las poblaciones bacterianas coliformes se vuelven no detectables.

Para la determinación de azúcares, etanol y ácidos orgánicos, se realizó Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (HPLC). La sacarosa fue el principal azúcar en la savia de palma de Coyol (11.36 p/v), mientras que la glucosa y fructosa se encontraron en bajas concentraciones. En general, la concentración de azúcar disminuyó durante la extracción; los ácidos orgánicos y el contenido de etanol aumentaron, siendo esta última de 4.78% p/v, así como el ácido láctico de 0.48% p/v en la muestra final. Los

valores de pH de la savia en la primera muestra fueron casi neutros (7.25), sin embargo, durante la fermentación este valor disminuyó debido a la producción de ácidos orgánicos.

### **2.2.3. Selección de la bebida “taberna”, obtenida de la palma *Acrocomia aculeata* y análisis proximal (Coutiño et al., 2015).**

En este trabajo, se realizó el análisis proximal de los compuestos químicos presentes en la bebida denominada Taberna, recolectada en dos condiciones geográficas (palma de montaña y del valle) en el estado de Chiapas; analizando la concentración de proteínas, azúcares reductores y totales, cenizas, pH, °Brix, minerales, etanol, ácidos grasos de cadena corta. Así también evaluaron de manera sensorial mediante jueces no profesionales, el olor, sabor y color de la bebida.

Los resultados obtenidos señalan una concentración de proteínas en la palma de montaña de 33.583 µg/mL en el turno de la tarde, mientras que la palma del valle en el mismo turno obtuvo una concentración de 28.416 µg/mL. El mayor contenido de azúcares reductores se observó en la savia de la palma de montaña recolectada por la noche, seguida de la muestra recolectada de la palma del valle (muestra de la tarde). La concentración de cenizas más alta, se presentó en la palma de montaña obteniendo 0.88%, seguido de la palma del valle con 0.85%, ambas en el turno de la noche. El pH de la muestra de Taberna recolectada en la palma de montaña fue de 7.25, y en la muestra de la palma del valle fue de 7.02, en las primeras muestras colectadas en la mañana, sin embargo, este valor fue disminuyendo a medida que avanzaba la fermentación (3.99 en la muestra de la palma de montaña y 4.2 en la muestra de la palma del valle). El mayor contenido de sólidos solubles se registró en la muestra de la palma de montaña. Reportan así también algunos minerales existentes en la bebida como son calcio (353.0 mg/100g y potasio (106.9 mg/100g) en la muestra de la palma de montaña; así como 453.8 mg/100g y 136.8 mg/100g; para la muestra de la palma del valle. La concentración de etanol reportada es de 8.1% y 7.1% para la palma de montaña y del valle respectivamente. El contenido de ácidos grasos de cadena corta

para la muestra de la palma de montaña es de 0.211% de ácido acético y 0.020% de ácido propiónico.

Por último, el análisis sensorial denotó diferencia en cuanto a la apreciación de la bebida, tanto en el sabor como en el olor.

### **2.3. Estudios con enfoque biotecnológico en la taberna.**

Aunado a los estudios anteriores, las investigaciones a continuación descritas esbozan parte del conocimiento que se ha registrado con base a la identificación de la microbiota y el análisis fisicoquímico de la bebida, ello sin relacionar ambas cuestiones.

#### **2.3.1. La taberna ¿un posible probiótico? (Rodríguez et al., 2008).**

En esta investigación principalmente se caracterizó la bebida, la cual, durante su fermentación muestra que las concentraciones de proteínas aumentan el 30% en las 13 primeras horas, manteniéndose constante por 25 horas; en las primeras siete horas las cenizas y la acidez disminuye 44.0 y 19.7% respectivamente y se mantuvo constante hasta el final de la fermentación.

Así pues, la presencia de ácido láctico y de etanol aumentan poco a poco alcanzando su máxima concentración al final de la cinética.

En cuanto al aislamiento de los microorganismos, se caracterizaron 15 cepas de Bacterias Ácido Lácticas (BAL, cocos y bacilos), 22 cepas Gram negativas, catalasa positiva; así como 16 levaduras como *Schizosaccharomyces pombe*.

#### **2.3.2. Elaboración *in vitro* de una bebida tipo “taberna” (Bermúdez, 2011).**

En este trabajo, se obtuvieron muestras de una palma de coyol (*Acrocomia aculeata*) de la localidad de Benito Juárez, Villaflores, Chiapas; de éstas se registró un pH inicial de 7.5, los grados Brix fueron de 11.9 y la densidad de 1 g/ mL. La concentración de azúcares totales determinada por el método fenol- sulfúrico fue de 109 g/L, los cuales descendieron hasta 66.48 g/L durante las primeras 12 horas posteriores a la incisión y

drenado de la savia. La concentración de azúcares reductores obtenidos por la técnica de DNS en la savia fue de 1.02 g/L al inicio de la fermentación, posteriormente a las 12 horas la concentración aumentó hasta 23.61 g/L, esto posiblemente debido a la hidrólisis de la sacarosa durante la fermentación de la taberna.

La savia extraída durante el primer drenado de la canoa, no contenía alcohol, sin embargo, si se obtuvo una concentración de ácido acético de 0.1125 g/L. Desde el aspecto microbiológico, se observó la presencia de levaduras, mesofílicas, bacterias lácticas, bacterias del género de *Zymomonas* y bacterias acéticas, todas ellas en una concentración de  $1 \times 10^5$  UFC/mL.

#### **2.4. Estudios ecológicos de levaduras en bebidas fermentadas.**

Por último, no se tiene registro alguno de estudios basados en la ecología de levaduras, de tal manera lo más cercano es el realizado por Molina en el 2014 (trabajo descrito ya con antelación), en donde la autora únicamente hace el esbozo de índices de diversidad de las especies encontradas en las dos localidades que muestreo.

### **3. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN.**

El estudio de la microbiota con relación a las bebidas fermentadas es de vital importancia para el conocimiento de las especies que generan los componentes fisicoquímicos que caracterizan cada una de las bebidas; de esta manera, el estudio de las levaduras que fermentan la savia de coyol contribuye al conocimiento de las comunidades que pueden estar dando las características particulares a la taberna en cada localidad de estudio, de esta manera y con base a la manipulación del productor sobre la materia prima, se formulan a continuación los siguientes cuestionamientos:

¿Cuál es la diversidad de levaduras durante el proceso de elaboración artesanal de la taberna en cada una de las localidades muestreadas?

¿Cómo influye la diversidad y abundancia de levaduras durante el proceso fermentativo sobre la composición química de la bebida, en cuanto a la generación de compuestos volátiles y no volátiles?

¿Cómo contribuye la manera en que el productor manipula la bebida, durante la generación, manejo y extracción de la misma, sobre la diversidad de levaduras existentes en la Taberna?



#### **4. HIPÓTESIS.**

Si la riqueza de especies entre las palmas muestreadas es similar y la abundancia de cada especie se relaciona con la concentración de los compuestos químicos y el manejo humano de las palmas; entonces el manejo semejante en cuanto a la manipulación del proceso fermentativo, contribuirá a una abundancia semejante en cada una de las palmas.

## **5. OBJETIVOS.**

### **5.1. General.**

Conocer la diversidad de levaduras asociadas a la producción de taberna; y la composición de su microambiente con el fin de establecer relaciones ecológicas durante el proceso de producción de la bebida, contribuyendo con ello, al aprovechamiento integral de la palma.

### **5.2. Específicos.**

- Describir el proceso de producción de la taberna, bebida obtenida de *A. aculeata*.
- Caracterizar la morfología e identificar las levaduras relacionadas con el proceso de producción de la taberna.
- Determinar la composición química de la bebida a lo largo del proceso fermentativo.
- Asociar el proceso ecológico de las levaduras con el manejo de la palma y el procedimiento de elaboración de la bebida para contribuir al aprovechamiento integral de la misma.

## 6. MÉTODO.

### 6.1. Zona de recolecta.

El presente trabajo, se realizó en las localidades Tierra y Libertad (TyL), municipio de Jiquipilas y Benito Juárez (BJ), municipio de Villaflores; en el estado de Chiapas.

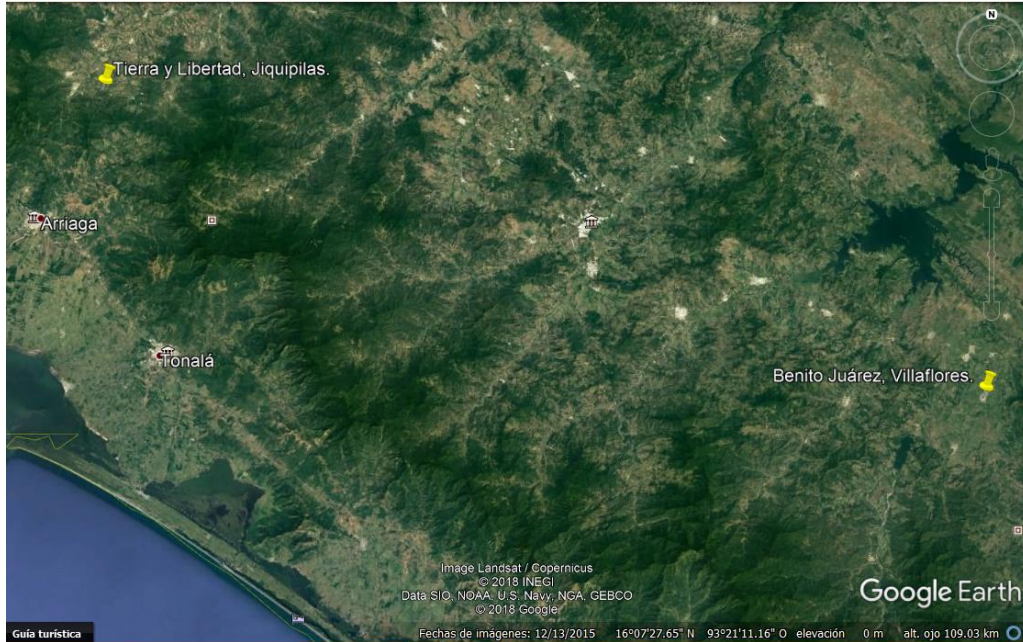


Figura 4. Zonas de muestreo. Ubicación geográfica del ejido Benito Juárez, Villaflores, Chiapas y el ejido Tierra y Libertad, Jiquipilas, Chiapas.

### 6.2. Trabajo de campo.

Se pidió la autorización del acceso a la comunidad con el Comisariado Ejidal, con la previa aprobación de los ejidatarios.

Obtenida la aprobación, se procedió a identificar a las familias encargadas de la elaboración de la Taberna, teniendo un primer encuentro con ellos para platicar sobre aspectos ecológicos, económicos, sociales, culturales. Todos los datos se integraron como información de vital importancia para el trabajo.

En un segundo acercamiento se pidió a los artesanos indicaran de manera práctica cómo se lleva a cabo el proceso de fabricación de la taberna, obteniéndose con ello, evidencias fotográficas; y las muestras que fueron analizadas en el laboratorio.

### **6.2.1. Colecta de muestras.**

Las muestras fueron obtenidas de tres palmas en cada una de las localidades; de cada una se obtuvieron dos muestras de 15 mL al día (durante 15 días), con una diferencia en tiempo de 12 horas entre cada muestra. De cada colecta se obtuvo el pH por colorimetría con tiras reactivas (Merck KGaA); así también se registró la temperatura del fluido. Ambos datos se registraron en una bitácora de campo.

Las muestras colectadas fueron preservadas en frío. El cultivo de la colonia fue por extensión; utilizando placas con agar Wallerstein (Fluka) + 0.5% de Cloranfenicol; efectuándose antes de cada cultivo diluciones decimales seriadas y cultivándose en cada placa 100  $\mu$ L de dos diluciones consideradas; con sus respectivas repeticiones; lográndose obtener entre 50 y 100 UFC (Unidades Formadoras de Colonias).

Las placas, fueron registradas con un número serial; así como el día y la hora de colecta, el número de palma al que pertenecía la muestra, el volumen y la dilución decimal que fue inoculada en caja, el número de réplica, las UFC en caja (dato obtenido una vez realizado el análisis de las morfologías en campo; así como las UFC/mL) (Formato 1, anexos).

Cada placa se incubó a temperatura ambiente durante 48 horas; posteriormente se caracterizaron cada una de las colonias diferentes con base a las características propuestas por Yarrow (1998) (Formato 2, anexos). Cada colonia fue registrada con una letra y número de control. Las cajas fueron conservadas en refrigeración para su posterior uso en laboratorio.

### **6.2.2. Conocimiento sobre el manejo y manipulación de la palma para la producción de taberna.**

Se realizaron entrevistas semi estructuradas a los productores, mismos que proveyeron de las muestras para el estudio; con el fin de evidenciar los conocimientos que se tienen sobre el manejo de la palma y el procedimiento de elaboración de la bebida (Formato 3, anexos). Toda la información fue transcrita y plasmada en la presente investigación.

### **6.3. Trabajo de laboratorio.**

#### **6.3.1. Aislamiento de morfotipos.**

De las colonias obtenidas en campo, se procedió a aislar cada uno de los morfotipos encontrados, considerándose como caracter primordial la abundancia de cada una de ellas.

Todos los morfotipos obtenidos, fueron aislados por duplicado en cajas con agar YPD (Por sus siglas en inglés: Yeast extract, peptone, dextrose Agar). De todos aquellos morfotipos que presentaron abundancias mayores a tres UFC, se eligieron al azar tres morfotipos representativos; de estos mismos se realizó la descripción microscópica, considerándose el total de aislados por morfotipo y la raíz cuadrada del mismo, la caracterización se basó en lo propuesto por Yarrow (1988).

#### **6.3.2. 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 (los cuales contienen una perla con 2.5 unidades de Taq Polimerasa; estabilizadores BSA, dATP, dCTP, dGTP, dTTP; la concentración de cada dNTP es de 200  $\mu$ M en 10 mM Tris- HCl con pH 9.0 a temperatura ambiente; así como 50 mM de KCl y 1.5 mM de  $MgCl_2$ ) (GE Healthcare UK: Illustra™ PuReTaq™ Ready- To- Go™ PCR beads); con una mezcla de reacción que contenía 23  $\mu$ L de agua destilada estéril; 1  $\mu$ L de ITS 1 (5´- TCC GTA GGT GAA CCT GCG G- 3´) y 1  $\mu$ L de ITS 4 (5- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC- 3´); quedando

un volumen final de 25  $\mu$ L. El inóculo de cada morfotipo fue tomado por picadura única de colonias frescas.

Las condiciones de reacción se basaron en lo descrito por Esteve-Zarzoso et al. (1999) con modificaciones de Verdugo (2013) (Cuadro 1, anexos).

Las muestras amplificadas se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa (UltraPure™, Invitrogen) al 1% durante 30 minutos a 80 Volts; en cada pozo, se depositaron 3  $\mu$ L de muestra amplificada y 2  $\mu$ L de buffer de carga 6X. El gel se tiñó con Bromuro de Etidio (BrEt) al 1% durante 30 minutos; la visualización del mismo se realizó en un fotodocumentado (Enduro™ GDS Labnet International, Inc.). La imagen se digitalizó mediante el programa Enduro GDS 2.0.

Las muestras amplificadas fueron digeridas usando las enzimas de restricción *HhaI*, *HaeIII* y *HinfI* (Cuadro 2, anexos); la digestión se llevó a cabo en un termociclador (Applied Biosystems Veriti 96 Well Thermal Cycler) 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 depositaron 10  $\mu$ L de muestra digerida y 2  $\mu$ L de buffer de carga. Para la tinción y observación de los patrones de digestión se siguieron los pasos antes descritos para visualización de muestras amplificadas.

El corrimiento de las muestras se realizó con buffer TAE 1X. Para la cuantificación de los pares de bases de los fragmentos amplificados como digeridos se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb (Promega).

### **6.3.3. Matriz Asistida Laser de Desorción/Ionización en Tiempo de Vuelo acoplado a Espectrofotómetro de Masas (MALDI-TOF/MS).**

La identificación se efectuó a partir de las cepas aisladas en agar YPD incubadas a 29°C durante 24- 48 horas; discriminando entre el número de perfiles que se obtuvieron mediante RFLP, siendo un total de cinco perfiles a identificar; todo ello, siguiendo el método propuesto por Relloso et al. (2015). La identificación de los morfotipos fue de manera directa tomando la biomasa con palillos estériles, cada muestra se distribuyó de manera uniforme en cada pozo de la placa de lectura y se cubrió con 1  $\mu$ L de ácido

fórmico al 70%, una vez seco se añadió 1 µL de matriz orgánica y nuevamente se dejó secar.

Las lecturas se realizaron en un espectrómetro de masas. El espectrofotómetro se calibró utilizando un extracto de proteínas de *Escherichia coli*.

Para la identificación, se utilizaron los siguientes criterios: puntuación o score  $\geq 2$ ; identificación a nivel de especie de las cepas con score entre 1.7 y 2. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado.

#### **6.3.4. Conservación de cepas.**

Las cepas aisladas se conservaron en una suspensión de agua destilada estéril, posteriormente fueron trasladadas a caldo YPD con glicerol al 20% y sometidas a congelamiento a -80°C en un tiempo indefinido, para su preservación.

#### **6.3.5. Determinación de compuestos no volátiles.**

Para conocer la generación de estos compuestos, se implementó el procedimiento sugerido por Santiago- Urbina et al. (2013) en ocho puntos de muestreo de cada uno de los procesos muestreados. Las muestras se descongelaron y se centrifugaron a 10, 000 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante se filtró a través de un filtro de membrana milipore de nylon de 0.45 µm (Agilent Captiva Econo Filter). Los carbohidratos (sacarosa, glucosa, arabinosa y xilosa), ácidos orgánicos (ácido propiónico, levulínico, succínico, málico, cítrico y acético) se analizaron con un sistema de cromatografía líquida (Waters Corporation, Milford, MA, USA), equipado con un detector de índice de refracción (Water 2414, Milford, MA, USA); se utilizó una columna de exclusión de iones aminex HPX-87H (300 x 7.8 mm) (Bio Rad, USA), empleando como fase móvil ácido sulfúrico (0.004 M) a una velocidad de flujo de 0.6 mL/ min. Los componentes individuales se identificaron por comparación de los tiempos de retención con estándares certificados; y las concentraciones fueron determinadas de acuerdo a un método de calibración externa.

Finalmente, se obtuvo la concentración de los compuestos químicos de un proceso completo de cada localidad.

### **6.3.6. Determinación de compuestos volátiles.**

En el caso de los compuestos volátiles mayoritarios se sometieron a análisis ocho puntos de muestreo de cada uno de los procesos fermentativos; tomándose así 2 mL de la muestra, la cual fue depositada en viales de 20 mL de capacidad, cubiertos con septas de silicón blanco de 20 mm; las muestras fueron congeladas hasta su posterior análisis. La inyección de los compuestos se llevó a cabo en un equipo Head Space Hewlett Packard modelo HP 7694E acoplado a un cromatógrafo de gases (Hewlett Packard modelo HP 6890), con un detector de ionización de flama. La separación de los compuestos se realizó en una columna capilar de polietilenglicol (HP Innowax) de 60 m x 0.32 mm x 0.25  $\mu$ m. La rampa de calentamiento del horno inicio a 55°C por 5 minutos, aumentando 5°C por minuto hasta llegar a 160°C y aumentando 25°C por minuto hasta llegar a los 220°C, manteniéndose durante ocho minutos. La temperatura del detector fue de 250°C, los flujos de los gases fueron: helio 30 mL por minuto, aire 300 mL por minuto y nitrógeno 30 mL por minuto.

El programa de preparación e inyección de muestras se inició con las siguientes condiciones: temperatura del vial de 80°C, temperatura del loop 110°C y temperatura de línea de transferencia de 115°C. Los tiempos de las condiciones fueron: el tiempo de ciclo del head-space y cromatógrafo de gases de 50 minutos, tiempo de equilibrio del vial de cinco minutos, tiempo de presurización de 50 segundos, tiempo de extracción de muestra 20 segundos, tiempo de inyección de 30 segundos. Los componentes individuales se identificaron por comparación de los tiempos de retención con estándares certificados; y las concentraciones fueron determinadas de acuerdo a un método de calibración externa (modificaciones de Segura, 2010). Los compuestos analizados fueron: octanoato de etilo, lactato de etilo, alcohol amílico, isobutanol, propanol, acetaldehído y acetato de etilo.

Finalmente, se obtuvo la concentración de los compuestos químicos de un proceso completo de cada localidad.



## **6.4. Trabajo de gabinete.**

### **6.4.1. Análisis de agrupamiento mediante caracteres morfológicos macroscópicos.**

A partir de los datos obtenidos en campo sobre caracteres morfológicos de las colonias, se procedió a realizar agrupamientos de esta matriz general con ayuda del programa R Studio versión 1.0.136, misma que fue utilizada para determinar los morfotipos aislados. De manera particular, la determinación de las cepas aisladas se considera como la muestra representativa del proceso fermentativo.

Una vez formados los grupos, se procedió a realizar una prueba de significancia entre los grupos (ADONIS, corroborado con la prueba Tukey HSD, 95% de confiabilidad, 999 permutaciones); así como un análisis PCA, para determinar los componentes principales que determinan las agrupaciones correspondientes.

### **6.4.2. Determinación de la diversidad alfa.**

Con base al conteo por UFC/mL y el número de especies aisladas se procedió a estimar la diversidad alfa en el software PAST 3.16, considerando los siguientes índices: Índice de Dominancia, Índice de Simpson e Índice de Shannon- Wiener (Cuadro 3, anexos). Se consideraron ocho puntos de muestreo representativos por cada proceso muestreado (dos al principio y final del proceso y cuatro intermedios). Finalmente se realizó el análisis de similitud entre las palmas y las localidades en el programa R Studio versión 1.0.136, con el fin de determinar el valor de similaridad entre los procesos fermentativos; tal análisis fue realizado con el 95% de confiabilidad y 999 permutaciones.

### **6.4.3. Descripción de la relación entre la microbiota y los compuestos químicos asociadas a la taberna.**

Primeramente, se relacionaron los perfiles idénticos en pares de base de cada morfotipo con los morfotipos representativos de cada localidad, los cuales fueron identificados mediante RFLP y Maldi- Tof. Enseguida, se realizó el análisis de similitud

entre las palmas y las localidades en el programa R Studio versión 1.0.136, tal análisis fue realizado con el 95% de confiabilidad y 999 permutaciones. Para la realización de los cuadros con los índices de diversidad y las concentraciones de los compuestos químicos por palmas y tiempos (ocho tiempos analizados por palma) se utilizó el programa Excel 2016; la descripción gráfica del consorcio levaduriforme y los compuestos fisicoquímicos (realizada con base a los datos del promedio de dos procesos fermentativos completos) fue realizada en el programa antes descrito. Finalmente, con el objetivo de establecer las relaciones entre las especies (riqueza y abundancia) y las concentraciones de los compuestos volátiles y no volátiles obtenidos mediante HPLC y CG-FID, se realizó un Análisis de Redundancia, el cual explica el comportamiento de tales compuestos químicos en cada uno de los puntos de muestreo considerados. Para lo anterior se utilizó el programa R Studio versión 1.0.136.

## **7. RESULTADOS.**

### **7.1. Conocimiento del proceso artesanal en la elaboración de la taberna.**

El proceso de producción de la taberna se ha transmitido de forma oral de generación en generación; por ello el conocimiento sobre el manejo que se tiene de la palma fue heredado desde la antigüedad.

Tal como señalan los productores, el árbol de coyol, posee racimos de frutos a los que les llaman “coyolares”, de allí la denominación del mismo. Por su parte, el fruto de color amarillo (cuando está maduro) es ingerido por el ganado, el cual lo digiere y lo defeca (a la estructura lisa defecada por el ganado se le llama “moyolita”); es por ello que la planta nace sola (principalmente germina en temporada de lluvias); las plantas que germinan, son trasplantadas y sembradas a orilla del terreno del ejidatario como cercos vivos, para así posteriormente ser utilizadas en la realización del denominado dulce de “Coyol” o para la producción de taberna.

Los árboles que tienen más de cinco metros de altura son utilizados para obtener la taberna; siendo así que el proceso de producción de la misma se realiza primordialmente cuando la temperatura es alta (clima cálido), de esta manera se evita que el líquido posea una consistencia ligosa.

#### **7.1.1. Materia prima para la elaboración de la taberna.**

La materia prima para la generación y producción de la taberna es la palma de Coyol (*Acrocomia aculeata*). Siendo así que la edad de la palma debe oscilar entre los 5 a 15 años de edad; es importante mencionar que entre más alta esté la palma, la producción de taberna se llevará a cabo por un mayor tiempo (alrededor de dos meses).

#### **7.1.2. Herramientas de uso común usadas durante el proceso de producción de la taberna.**

Generalmente para el corte y limpia de la palma; así como para la generación del boquete de donde emanará la savia el productor ocupa un machete pre lavado con

agua; en el caso de la extracción del licor ocupa una manguera para agua y una jeringa limpia para extraer el líquido de la palma; así también utiliza una cuchara pre lavada con agua para extraer residuos de palmito o tronco de la canoa.

### **7.1.3. Proceso de manipulación de *Acrocomia aculeata* para la producción de taberna.**

Proceso de corte y limpia: Consiste en elegir las palmas de edad considerable para la producción de taberna, una vez elegida, la palma es cortada desde la base del tronco; en el suelo se limpia procurando quitar de la mayor cantidad de espinas y hojas, dejando limpio el tronco, de donde se procederá a realizar la canoa para la generación de la savia. Anteriormente, la planta se excavaba desde la base y se procedía a cortarla.

Abertura de la canoa: Después de las 24 horas después del corte, se realiza un boquete denominado “canao”, con una extensión de 30 cm desde el ápice del tronco hacia el tallo y se realiza el primer corte paralelo a la base del tronco, los siguientes cortes son de manera perpendicular al primero del ancho del machete que se utiliza, y un último corte para obtener un cuadro del tallo, mismo que se extrae para verificar que los cortes se realizaron a la altura del denominado “palmito” (parte medular de la planta); de esta manera se deja reposar el tallo durante 24 horas más y se sigue con el proceso de extracción de la savia y limpia de la palma. Es importante señalar que la abertura es cerrada con un trozo de la misma palma, ello, únicamente por la superficie del mismo (ver figura 2, anexos).

### **7.1.4. Seguimiento del proceso fermentativo.**

Extracción de la savia: transcurridas las 24 horas, el campesino se dispone a extraer la savia que emana del tronco; con ayuda de una manguera de plástico, succiona el líquido el cual es trasladado a un recipiente de plástico, previamente lavado; tal líquido al inicio del proceso es de carácter dulce y con el pasar de los días se va convirtiendo

de carácter alcohólico, por lo que el productor debe dejar el contenedor entre abierto para evitar el exceso de gases y la explosión del mismo.

Raspado y limpieza de la canoa: Después de extraída la savia, se procede al raspado y limpieza de la canoa, el cual consiste en raspar en sus cuatro puntos cardinales, las paredes de la misma, con ayuda de un machete previamente limpio con agua; de esta forma, el raspado consiste en cortar entre un centímetro cada lado de la canoa, procurando no dejar residuos del tronco, ni del palmito dentro del boquete; el cual, a continuación, es lavado con agua y limpio con una cuchara previamente lavada.

Tanto la extracción de la savia; así como el raspado y limpia de la canoa, se realiza cada 12 horas (entre las seis de la mañana y las seis de la tarde; durante 15 a 30 días).

#### **7.1.5. Conocimientos relacionados con el proceso artesanal de producción.**

En el ejido Tierra y Libertad, municipio de Jiquipilas, Chiapas; los productores acostumbra a derribar las palmas cuando la luna está llena, con la creencia de que el tallo no se pudre durante el proceso de generación de la taberna; de igual manera, al llevarse a cabo el corte y la abertura de la canoa, debe realizarse en días con temperaturas cálidas, lo que evita que el líquido que fluye no se vuelva viscoso y la producción se vea perjudicada; en tal caso, el productor tuviese ese inconveniente, agrega entre 5 a 10 mL de savia de palma de coyol previamente fermentada de otras palmas o en su defecto una planta denominada espino; los cuales son utilizados para quitar la viscosidad y generar nuevamente una savia limpia y de sabor agradable al consumidor.

Por otra parte, también se puede elaborar otro tipo de taberna más comercial pero de menor calidad, es así que, se extrae el palmito de la palma; el cual es picado, se deposita en una olla de peltre, al cual se le agrega previamente agua y azúcar; se deja reposar de dos a tres días, trascurrido este tiempo, se deposita el líquido en otro contenedor y se le agrega más agua a la mezcla anteriormente descrita; otro método de elaboración es ocupando el líquido denominado “madre de la taberna”, el cual es colado para realizar la bebida.

Actualmente, la taberna es comercializada entre la población, a \$25.00 pesos por litro, debido al número de personas que la producen. Es relevante señalar, que al día se obtienen alrededor de 3 L.

## 7.2. Variables fisicoquímicas.

Las variables fisicoquímicas consideradas para este trabajo, fueron la temperatura y pH; a continuación, se muestran los registros del pH y la temperatura.

Cuadro 3. Oscilación de la temperatura y pH en ocho puntos de muestreo de seis palmas de las dos localidades estudiadas. P1: palma 1, P2: palma 2, P3: palma 3,  $\bar{X}$ : promedio,  $\sigma$ : Desviación estándar.

<b>Temperatura.</b>										
<b>Benito Juárez.</b>						<b>Tierra y Libertad</b>				
<b>Días</b>	<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>P3</b>	<b><math>\bar{X}</math></b>	<b><math>\sigma</math></b>	<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>P3</b>	<b><math>\bar{X}</math></b>	<b><math>\sigma</math></b>
<b>1</b>	31	31	31	31	0	23	24	24	24	0.6
<b>1.5</b>	22	22	22	22	0	23	23	22	23	0.6
<b>6</b>	35	35	35	35	0	28	28	29	28	0.6
<b>6.5</b>	35	35	35	35	0	33	32	32	32	0.6
<b>10</b>	32	32	32	32	0	31	30	31	31	0.6
<b>10.5</b>	29	29	29	29	0	34	33.5	34	34	0.3
<b>15</b>	30	30	30	30	0	24	24	25	24	0.6
<b>15.5</b>	29	29	29	29	0	26	26	27	26	0.6

pH										
Benito Juárez.						Tierra y Libertad				
Días	P1	P2	P3	$\bar{X}$	$\sigma$	P1	P2	P3	$\bar{X}$	$\sigma$
1	8	8	7	8	0.6	5	4	4	4	0.6
1.5	6	5.5	5	6	0.5	6	5	5	5	0.6
6	6	4	6	5	1.2	4	4	4	4	0
6.5	4	4	4	4	0	4	4	4	4	0
10	5	5	4	5	0.6	4	4	4	4	0
10.5	4	4	4	4	0	4	4	4	4	0
15	5	5	5	5	0	4	4	4	4	0
15.5	4	4	4	4	0	4	4	4	4	0

En el cuadro anterior se denota que la temperatura en la localidad Benito Juárez se mantuvo alrededor de los 30- 35°C durante el día en todas las palmas, disminuyendo por la tarde alrededor de los 22°C; para el ejido Tierra y Libertad, por las mañanas la temperatura oscila entre los 24- 31°C y por la tarde entre los 23- 34°C. Por su parte, se observó que en el caso del ejido Benito Juárez, la fermentación en la mayoría de las palmas comenzó con un pH básico (pH: 8) y a partir de las 12 horas se tornó neutro (pH: 7), para posteriormente mantenerse ácido a partir del sexto día y hasta el final del proceso (pH: 4); en el caso del ejido Tierra y Libertad, desde el inicio del proceso, el pH de la bebida en cada una de las palmas osciló entre 4 y 5 respectivamente, considerándose un medio ácido, siendo así que al sexto día del muestreo, permanece un pH ácido (4), hasta el final del proceso.

### 7.3. Descripción e identificación de levaduras asociadas a la taberna.

De las 993 colonias aisladas y descritas en campo de las dos localidades muestreadas (Benito Juárez: 598 colonias aisladas; Tierra y libertad: 395 colonias aisladas); a nivel morfológico en el ejido Tierra y Libertad se aislaron un total de 31 colonias representativas; organizadas en siete grupos terminales (silueta: 0.9240) y una agrupación general (esto debido a que la significancia entre dos grupos fue  $R: -0.024$ ,  $p: 0.6$ ) (figura 5).

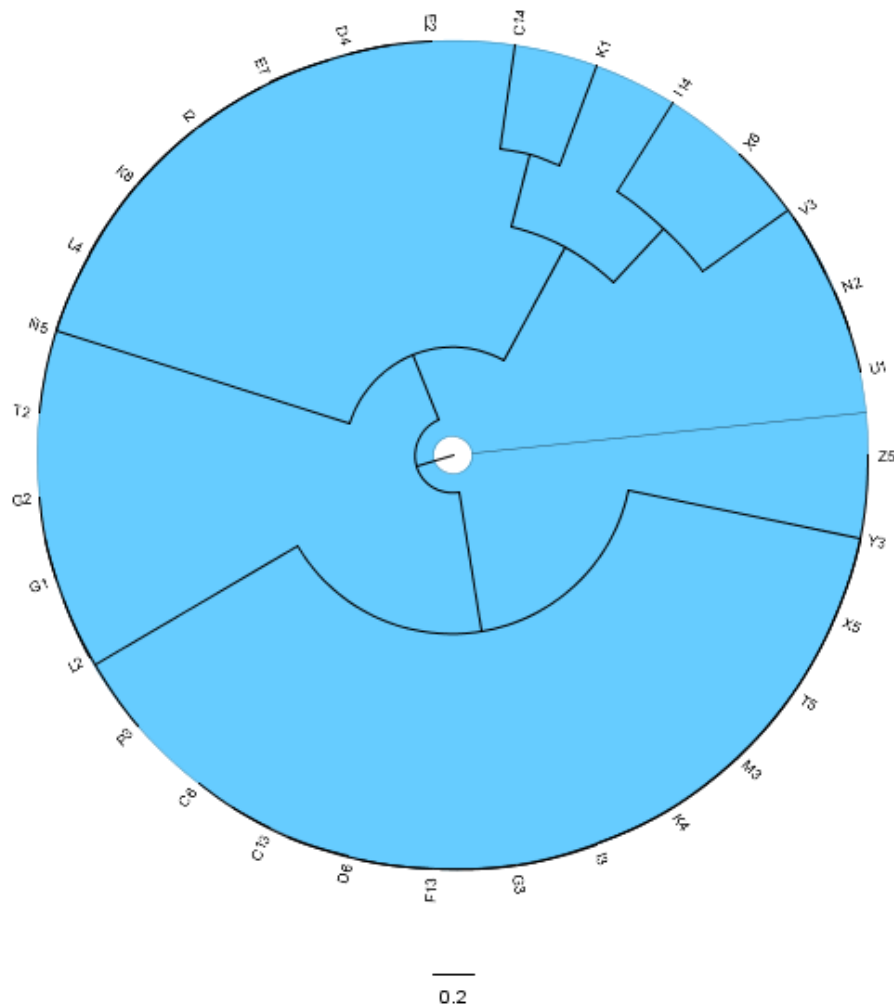


Figura 5. Análisis Cluster de los caracteres morfológicos obtenidos de las colonias de levaduras del ejido Tierra y Libertad, Jiquipilas, Chiapas (método UPGMA; valor cofenético: 0.9557; con un total de cinco grupos terminales y una agrupación general



(significancia entre dos grupos generales R: -0.02, p=0.6). Nota: Cada símbolo terminal, representa una colonia aislada.

El agrupamiento fue realizado con base a los componentes principales uno y dos (color directo del centro (0.865); forma del borde (0.725); elevación (0.364); forma de la colonia (0.362)) que representan el 94% de la variabilidad sugerido por el Análisis de Componentes Principales (figura 6).

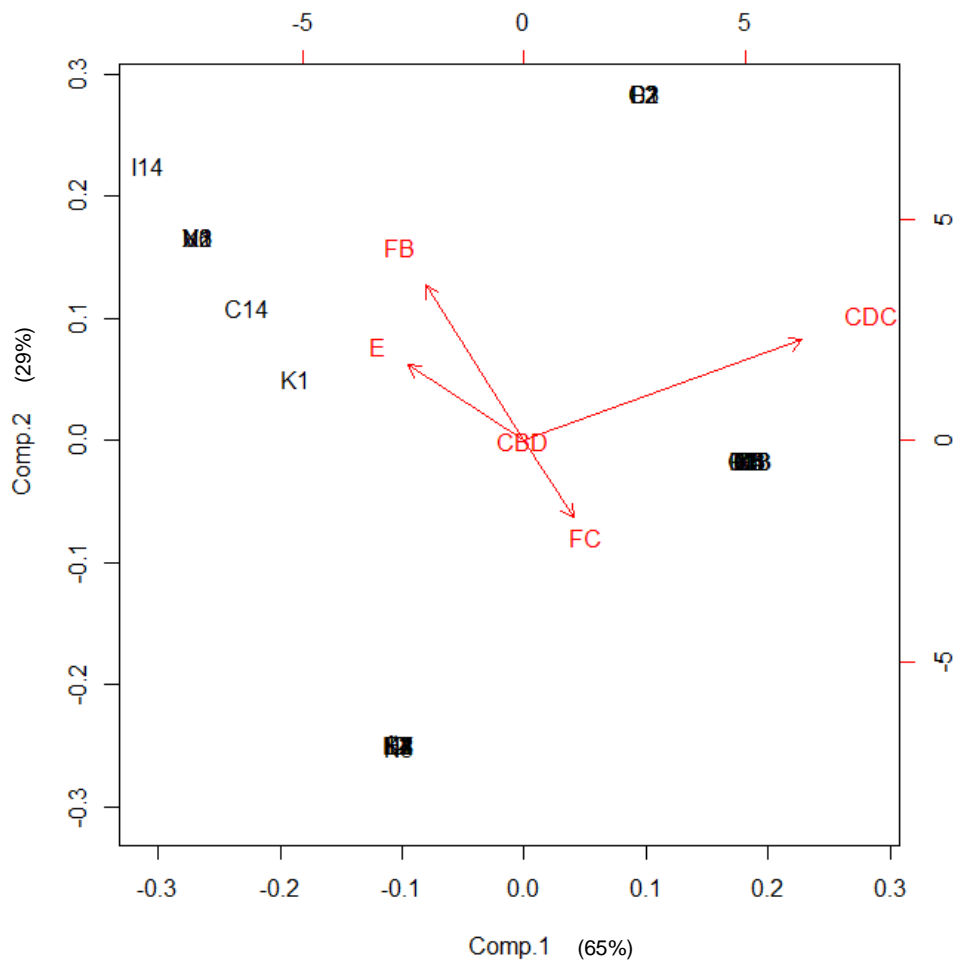


Figura 6. Análisis de Componentes Principales generado a partir de los caracteres morfológicos descritos de las colonias aisladas de la taberna en el ejido Tierra y Libertad (94% de variabilidad total explicada) (FC: Forma de la colonia; FB: Forma de borde; CDC: Color directo del Centro; CBD: Color de borde directo y E: Elevación).

Por su parte, en el ejido Benito Juárez, se aislaron de acuerdo a su morfología un total de 117 colonias; las cuales fueron agrupadas en 28 grupos terminales (silueta: 0.9487) y una agrupación general (R: 0.003, p: 0.401); el método utilizado para realizar el análisis cluster fue UPGMA con un valor cofenético igual a 0.8747 (figura 7).

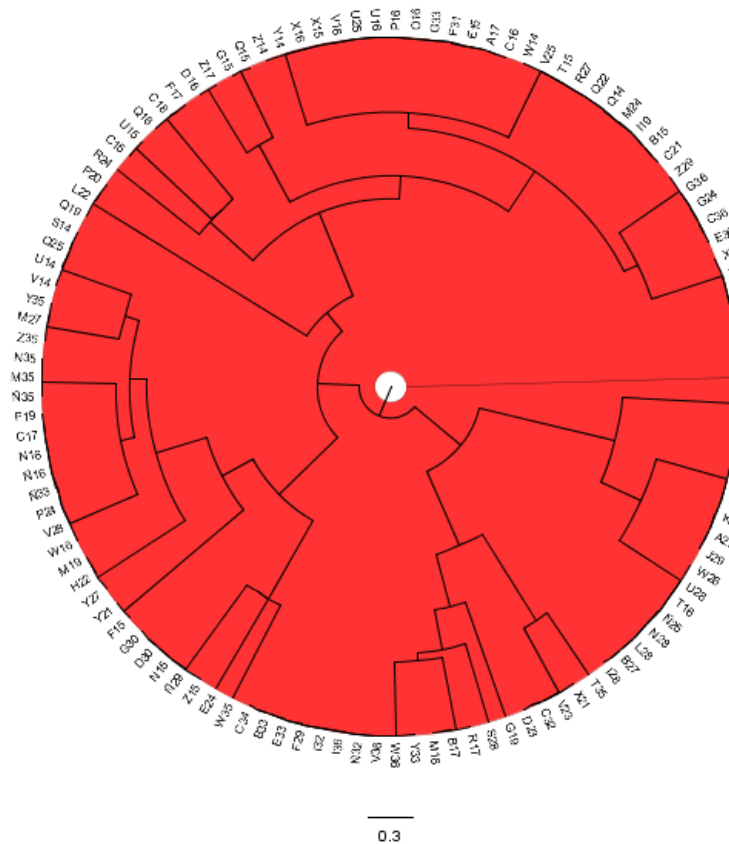


Figura 7. Análisis Cluster de los caracteres morfológicos obtenidos de los morfotipos de levaduras. Localidad Benito Juárez, Villaflores, Chiapas (método UPGMA; valor cofenético: 0.8747; 28 grupos terminales y una agrupación general (R; 0.003, p: 0.401 no habiendo significancia entre dos grupos). Nota: Cada símbolo terminal, representa una colonia aislada.

La ordenación por agrupamiento, según el análisis cluster se realizó con base al componente principal uno (forma de borde (0.511); brillo (0.502); forma de la colonia

(0.489); elevación (0.368)) y el componente principal dos (color directo de borde (0.821)) que representan el 62 % de la variabilidad sugerido por el Análisis de Componentes Principales (figura 8).

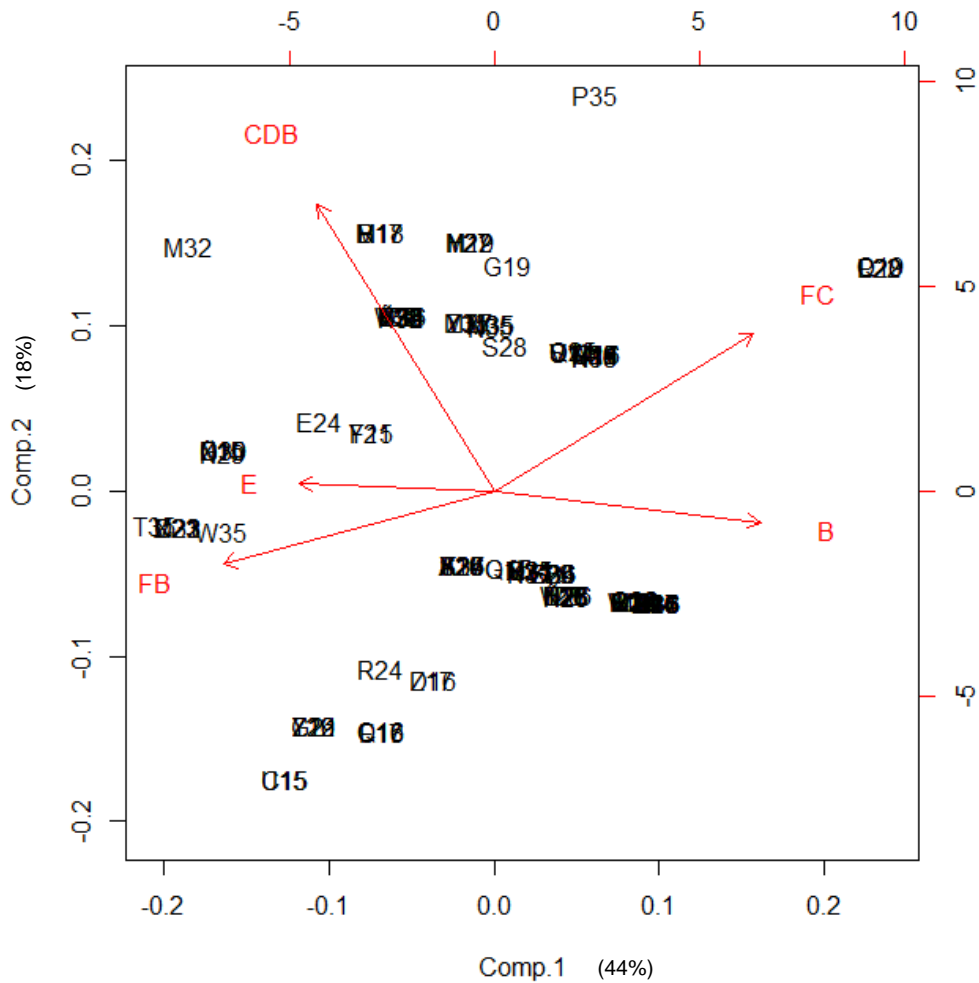


Figura 8 Análisis de Componentes Principales generado a partir de los caracteres morfológicos descritos de las colonias aisladas de la taberna en el Benito Juárez (62% de variabilidad total explicada) (FC: Forma de la colonia; FB: Forma de borde; CDB: Color directo de borde; B: Brillo y E: Elevación).

Por su parte, la identificación de los microorganismos mediante RFLP y Maldi-Tof, evidenciaron un total de cuatro especies representativas en la comunidad de Benito

Juárez, Villaflores, Chiapas; que incluyeron a: *Hanseniaspora opuntiae*, *Isstachenkia orientalis*, *Pichia manshurica* y *Saccharomyces cerevisiae*. En el caso de la localidad de Tierra y Libertad, Jiquipilas, Chiapas, las especies encontradas fueron: *H. opuntiae*, *Pichia kluyveri*, *Saccharomyces cerevisiae*.

A continuación, se muestra los perfiles de digestión de cada una de las especies identificadas (Cuadro 4); posteriormente en el apartado 7.3.1. se desglosan las características morfológicas y moleculares por especie.

Cuadro 4. Perfiles de Digestión de las cinco especies de levaduras, presentes en la Taberna, bebida extraída de la palma de coyol (*Acrocomia aculeata*); en dos comunidades del Estado de Chiapas.

Enzima de Restricción.					
Especie.	Amplicón (pb).	Hhal (pb).	HaeIII (pb).	Hinfl (pb).	Referencias
<i>H. opuntiae</i>	729.	327,105.	800.	366,204,167	Nisiotou et al., 2007.
<i>P. kluyveri</i>	452.	178,110.	395.	363,223.	López-Arboleda et al., 2010.
<i>P. manshurica</i>	524.	262,111.	344,141.	225,172,111	Sin registro.
<i>I. orientalis</i>	542.	221,194.	417,101.	244,165,153	Stringini et al.-2008.
<i>S. cerevisiae</i>	871.	393,364,153.	334,249,183,142.	389,132.	Santiago-Urbina et al., 2014.

**Nota.** Los patrones de restricción de cada una de las especies, incluyendo al amplicón, están expresados en pares de bases.

### 7.3.1. Descripción morfológica y molecular de *Hanseniaspora opuntiae*.

El aspecto macroscópico *Hanseniaspora opuntiae* presenta colonias circulares de coloración verde y blanco en medio WL, borde liso, textura cremosa, principalmente de aspecto brillante y tipo de elevación elevado (figura 9); microscópicamente sus células son apiculadas, únicas, las cuales oscilan entre  $30.027 \pm \mu\text{m}$  de largo y  $16.537 \pm \mu\text{m}$  de ancho; su tipo de reproducción es por gemación (figura 9).

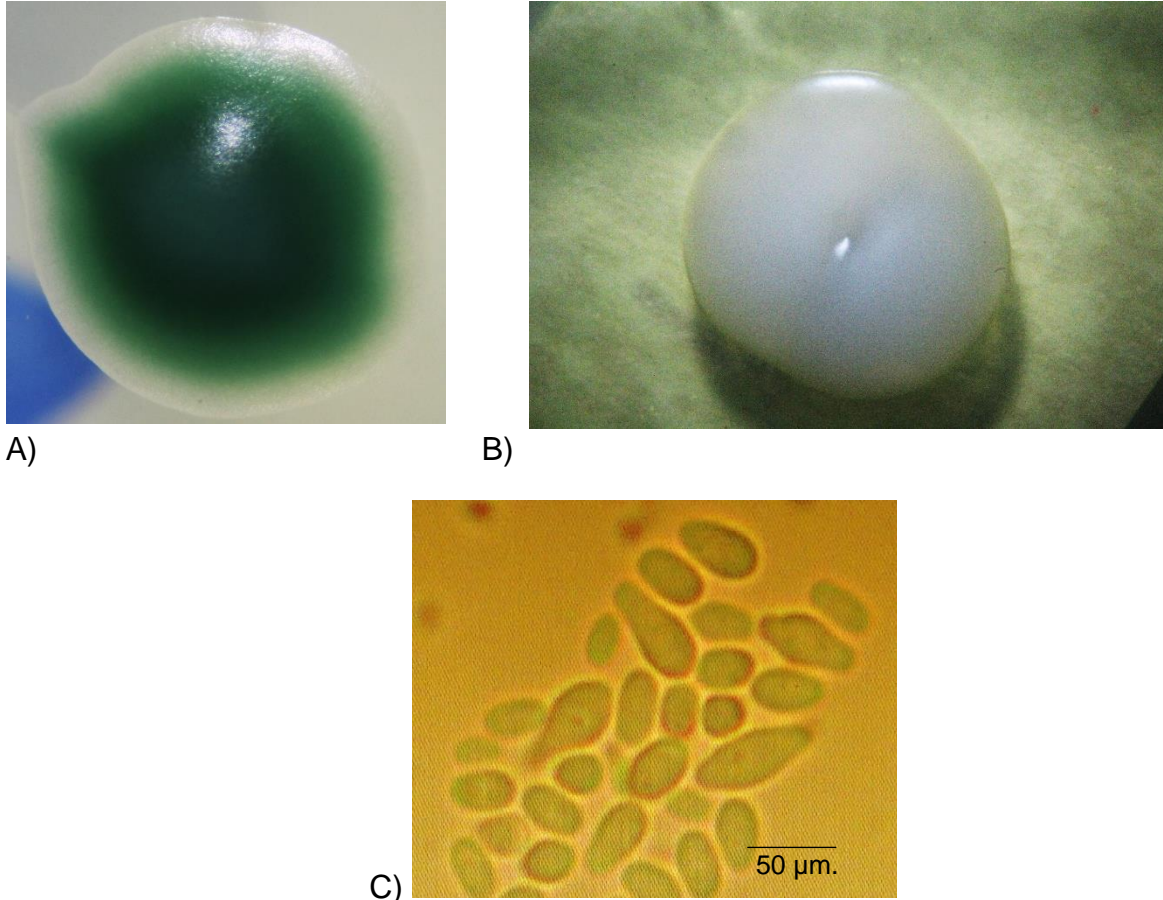


Figura 9. Morfología macro y microscópica de la especie *H. opuntiae*; A) Colonia sobre medio WL; B) Colonia sobre medio YPD; C) Células de *H. opuntiae* (Objetivo 100X).

En cuanto a los patrones de restricción obtenidos mediante RFLP se obtuvo lo siguiente (tamaño del amplicón: 729 pb; patrones de la enzima HhaI: 327 y 105 pb; patrones de la enzima HaeIII: 800 pb; patrones de la enzima HinfI: 366, 204 y 167 pb) (figura 10).

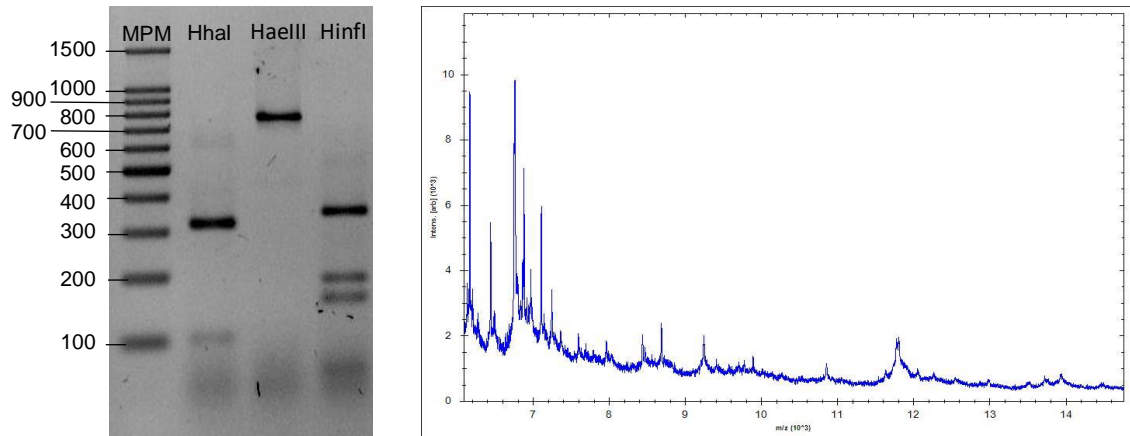


Figura 10. Análisis proteico y molecular de la especie *H. opuntiae*; a la derecha; espectro obtenido mediante Maldi Tof (score: 2.0); a la izquierda perfil de restricción obtenido mediante la técnica molecular de RFLP. MPM: Marcador de peso molecular.

### 7.3.2. Descripción morfológica y molecular de *Pichia kluyveri*.

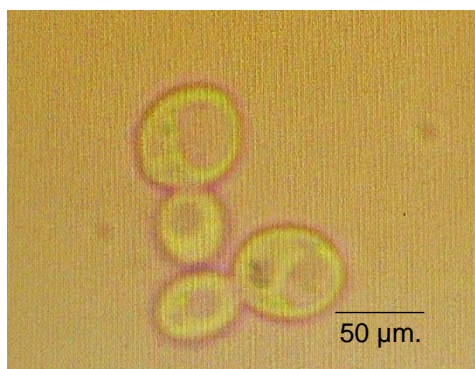
*Pichia kluyveri* presenta colonias amiboideas de textura seca, generalmente de color verde a blanco en medio WL, sin brillo; de borde y superficie ondulado, su tipo de elevación es variable pudiendo ser elevada, plana, pulvinada y umbeliforme (figura 11). Microscópicamente, las células son de forma ovoidea, únicas, las cuales pueden llegar a medir entre los  $23.142 \pm \mu\text{m}$  de largo y  $16.28 \pm \mu\text{m}$  de ancho; su tipo de reproducción es por gemación (figura 11).



A)



B)



C)

Figura 11. Morfología macroscópica de la especie *P. kluyveri*; A) Colonia sobre medio WL; B) Colonia sobre medio YPD; C) Células de *P. kluyveri* (Objetivo 100X).

Los patrones de restricción en el caso de esta especie fueron (tamaño del amplicón: 452 pb; patrones de la enzima HhaI: 178 y 110 pb; patrones de la enzima HaeIII: 395 pb; patrones de la enzima HinfI: 263 y 223 pb) (figura 12).

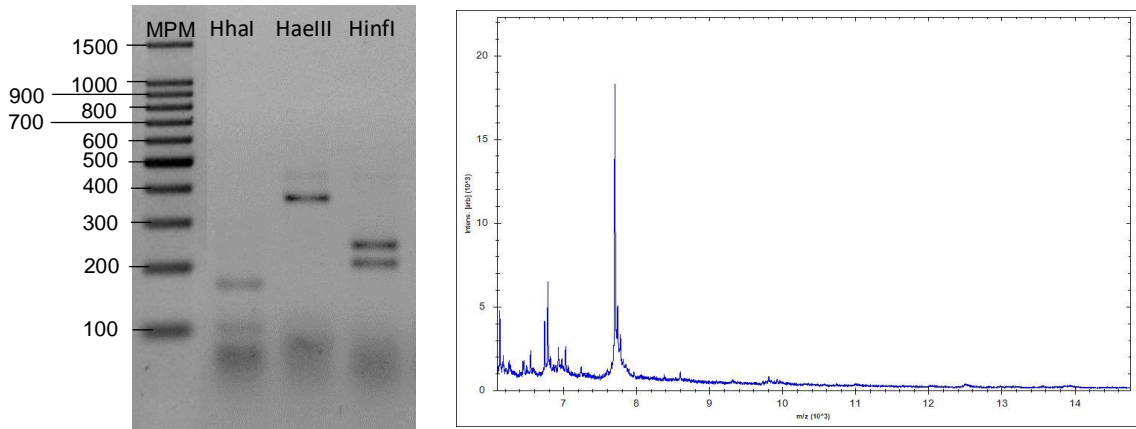


Figura 12. Análisis proteico y molecular de la especie *P. kluyveri*; a la derecha; espectro obtenido mediante Maldi Tof (score: 1.9); a la izquierda perfil de restricción obtenido mediante la técnica molecular de RFLP. MPM: Marcador de peso molecular.



### 7.3.3. Descripción morfológica y molecular de *Pichia manshurica*.

*Pichia manshurica*, presenta colonias circulares de textura cremosa, su coloración va de verde a blanco, de borde y superficie lisa, sin brillo y tipo de elevación elevada (figura 13). A nivel celular, presenta células con forma circular, únicas, las cuales miden alrededor de  $21.122 \pm \mu\text{m}$  de diámetro y se reproducen por gemación (figura 13).

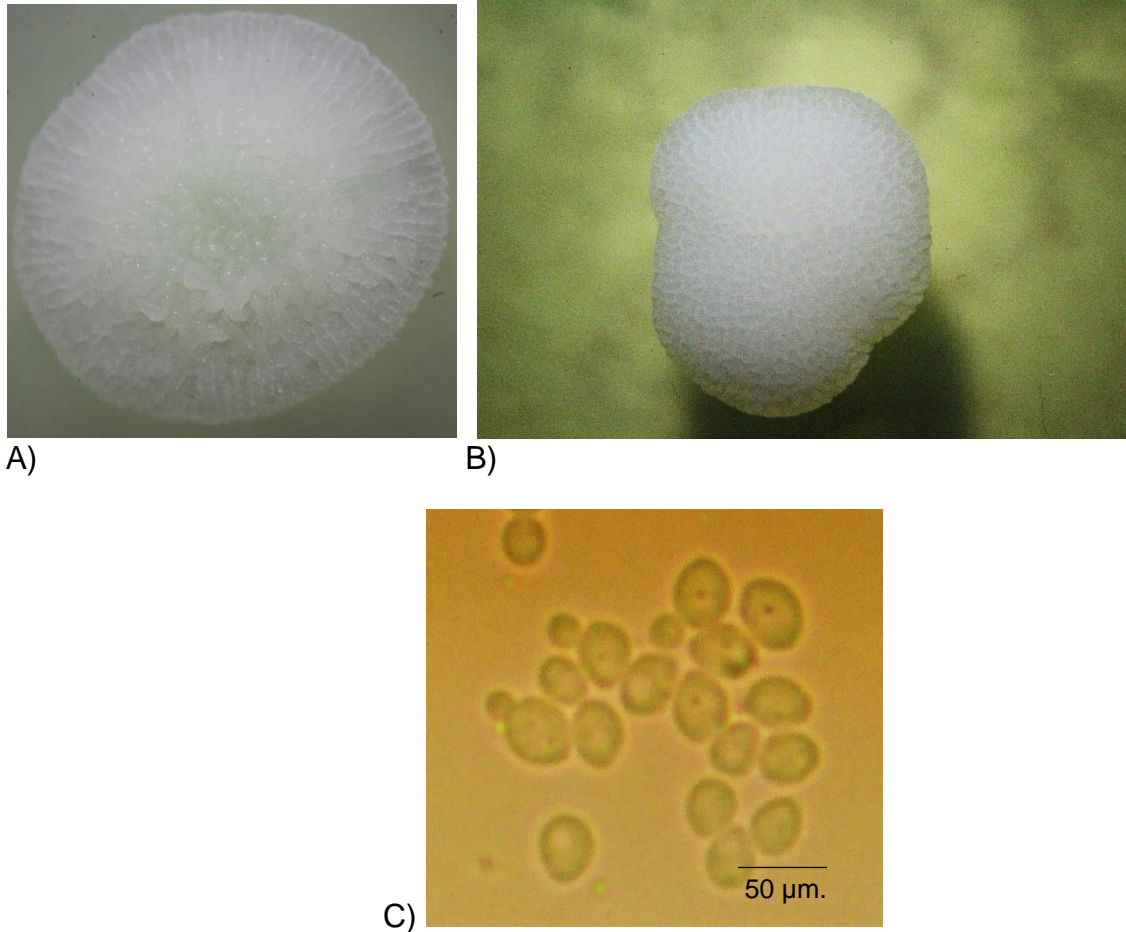


Figura 13. Morfología macroscópica de la especie *P. manshurica*; A) Colonia sobre medio WL; B) Colonia sobre medio YPD; C) Células de *P. manshurica* (Objetivo 100X).

Respecto a los patrones de restricción de esta especie, se tiene registrado lo siguiente (tamaño del amplicón: 524 pb; patrones de la enzima HhaI: 262 y 111 pb; patrones de la enzima HaeIII: 344 y 141 pb; patrones de la enzima HinfI: 225, 172 y 111 pb) (figura 14).

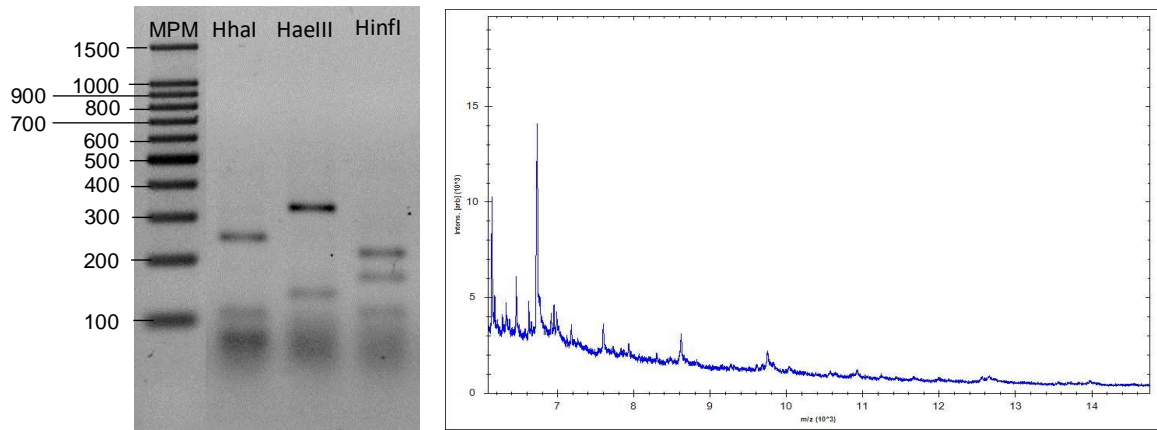


Figura 14. Análisis proteico y molecular de la especie *P. manshurica*; a la derecha; espectro obtenido mediante Maldi Tof (score: 2.1); a la izquierda perfil de restricción obtenido mediante la técnica molecular de RFLP. MPM: Marcador de peso molecular.

#### 7.3.4. Descripción morfológica y molecular de *Issatchenkia orientalis*.

La especie *Issatchenkia orientalis*, presenta colonias amiboideas, aunque algunas pueden ser de forma circular, de textura cremosa, con coloraciones que van de verde a blanco; borde liso, ondulado o filamentososo; en su mayoría presentan superficie ondulada y lisa, sin brillo; de elevación umbeliforme, convexa o elevada (figura 15). Sus células son de forma ovoide, únicas, llegando a medir alrededor de  $43.895 \pm \mu\text{m}$  de largo y  $16.536 \pm \mu\text{m}$  de ancho; su reproducción es por gemación; (figura 15).

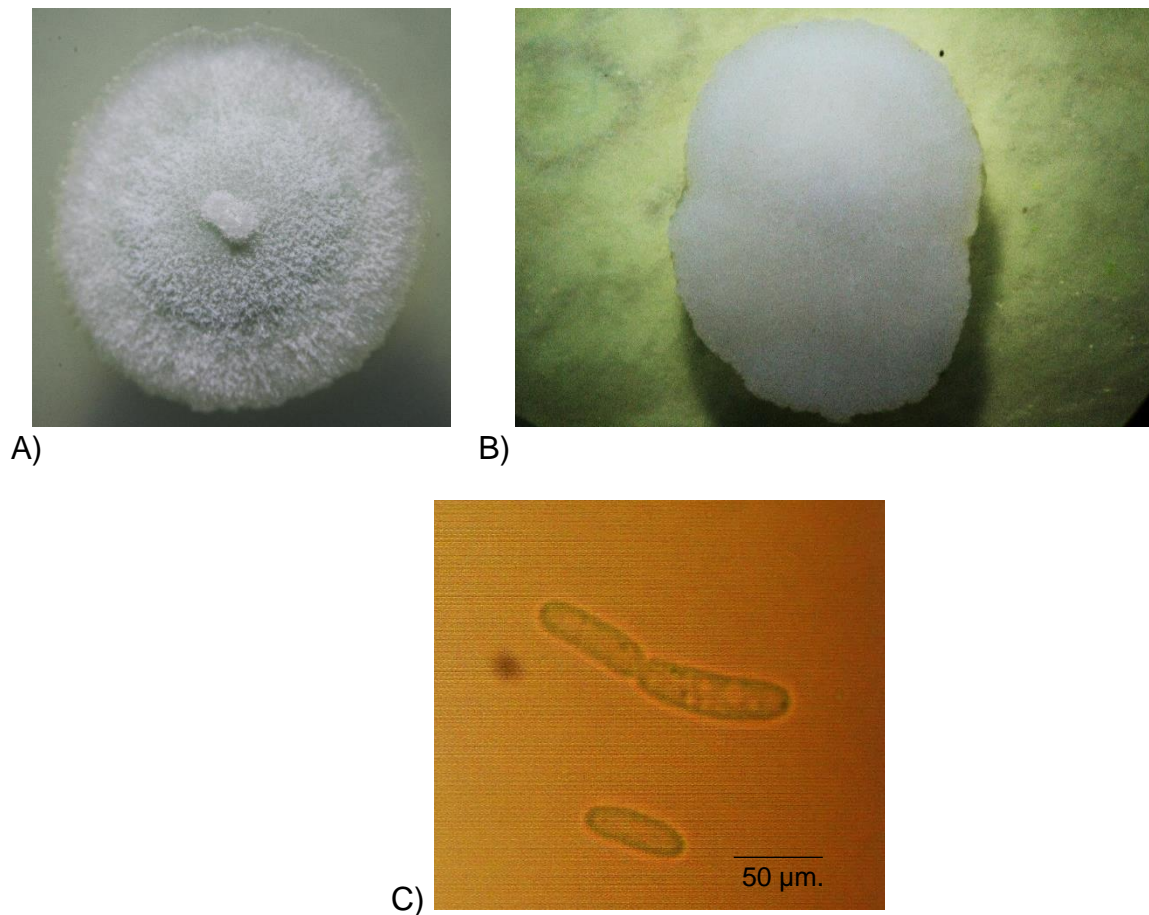


Figura 15. Morfología macroscópica de la especie *I. orientalis*; A) Colonia sobre medio WL; B) Colonia sobre medio YPD; C) Células de *I. orientalis* (Objetivo 100X).

En el caso de los patrones de restricción de dicha especie se obtuvo lo siguiente (tamaño del amplicón: 542 pb; patrones de la enzima HhaI: 221 y 194 pb; patrones de la enzima HaeIII: 417y 101 pb; patrones de la enzima HinfI: 244, 165 y 153 pb) (figura 16).

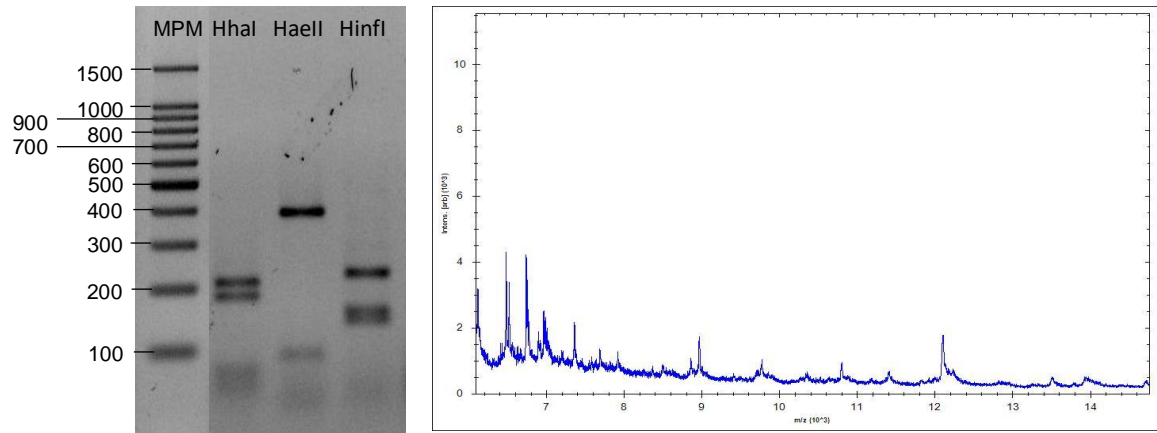


Figura 16. Análisis proteico y molecular de la especie *I. orientalis*; a la derecha; espectro obtenido mediante Maldi Tof (score: 2.4); a la izquierda perfil de restricción obtenido mediante la técnica molecular de RFLP. MPM: Marcador de peso molecular.

### 7.3.5. Descripción morfológica y molecular de *Saccharomyces cerevisiae*.

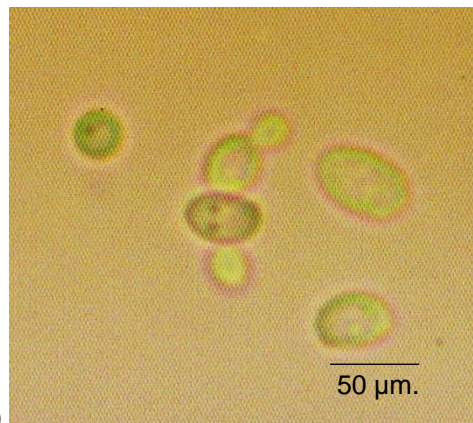
*Saccharomyces cerevisiae* presenta colonias circulares, de textura cremosa, color blanco a verde; borde liso al igual que su superficie, sin brillo y de elevación elevada (figura 17); a nivel microscópico presenta células circulares, únicas, las cuales miden alrededor de  $26.252 \pm \mu\text{m}$  de diámetro; su reproducción es por gemación (figura 17).



A)



B)



C)

Figura 17. Morfología macroscópica de la especie *S. cerevisiae*; A) Colonia sobre medio WL; B) Colonia sobre medio YPD; C) Células de *S. cerevisiae* (Objetivo 100X).

En el caso de *S. cerevisiae*; los patrones de restricción arrojaron lo siguiente (tamaño del amplicón: 871 pb; patrones de la enzima HhaI: 393, 364 y 153 pb; patrones de la enzima HaeIII: 334, 249, 183 y 142 pb; patrones de la enzima HinfI: 389 y 132 pb) (figura 18).

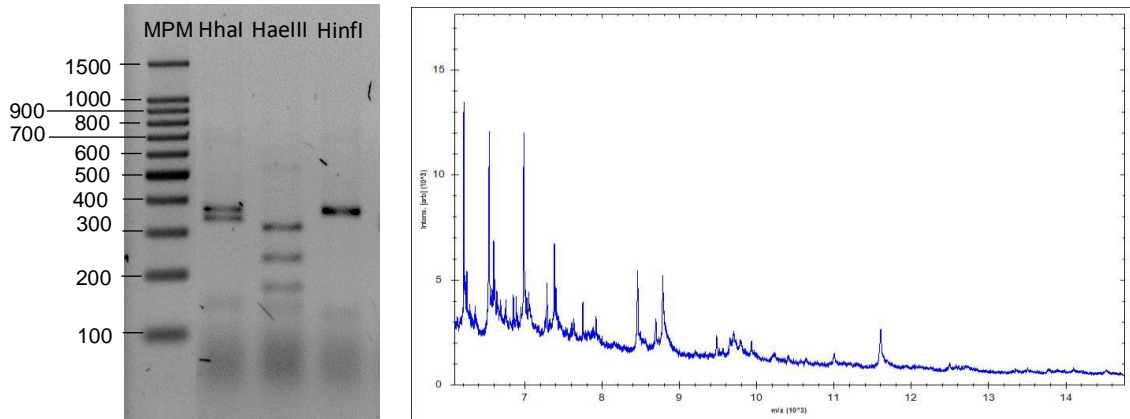


Figura 18. Análisis proteico y molecular de la especie *S. cerevisiae*; a la derecha; espectro obtenido mediante Maldi Tof (score: 2.0); a la izquierda perfil de restricción obtenido mediante la técnica molecular de RFLP. MPM: Marcador de peso molecular.

#### 7.4. Diversidad biológica del consorcio levaduriforme en la taberna.

La diversidad de especies de la taberna (determinada por los índices de Shannon y Simpson) en Benito Juárez, Villaflores, fue de 0.5 y de 0.2 en Tierra y Libertad (Cuadro 5). La especie mayoritaria en ambas localidades fue *S. cerevisiae*.

Cuadro 5. Índices de diversidad alfa del consorcio levaduriforme en la taberna, en ocho puntos de muestreo (inicial, intermedio y final) de las palmas de Benito Juárez, Villaflores, Chiapas y Tierra y Libertad, Jiquipilas, Chiapas. (I: Individuos; S: Número de especies; D: Dominancia; 1-D: Índice de Simpson, H: Índice de Shannon).

<b>Palma 1. Benito Juárez.</b>					
<b>Días</b>	<b>I (UFC/mL).</b>	<b>S</b>	<b>D</b>	<b>1-D</b>	<b>H'</b>
1	4.0E+02	1	1.00	0.00	0.00
1.5	6.7E+03	3	0.97	0.03	0.09
6	1.2E+07	1	1.00	0.00	0.00
6.5	6.0E+07	1	1.00	0.00	0.00
10	1.4E+07	1	1.00	0.00	0.00
10.5	1.9E+07	1	1.00	0.00	0.00
15	3.9E+08	1	1.00	0.00	0.00
15.5	4.3E+06	1	1.00	0.00	0.00
<b>Palma 2. Benito Juárez.</b>					
<b>Días</b>	<b>I (UFC/mL).</b>	<b>S</b>	<b>D</b>	<b>1-D</b>	<b>H'</b>
1	3.0E+01	1	1.00	0.00	0.00
1.5	1.7E+04	3	0.35	0.65	1.08
6	2.6E+07	2	0.53	0.47	0.67
6.5	8.6E+07	2	0.93	0.07	0.15

<b>10</b>	7.3E+06	1	1.00	0.00	0.00
<b>10.5</b>	7.7E+07	2	0.65	0.35	0.54
<b>15</b>	4.0E+08	2	0.78	0.22	0.37
<b>15.5</b>	3.3E+07	1	1.00	0.00	0.00

**Palma 3. Benito Juárez.**

<b>Días</b>	<b>I (UFC/mL).</b>	<b>S</b>	<b>D</b>	<b>1-D</b>	<b>H'</b>
<b>1</b>	6.1E+03	3	0.51	0.49	0.74
<b>1.5</b>	2.4E+04	3	0.62	0.38	0.58
<b>6</b>	2.0E+06	1	1.00	0.00	0.00
<b>6.5</b>	2.0E+07	2	0.91	0.09	0.19
<b>10</b>	2.0E+07	1	1.00	0.00	0.00
<b>10.5</b>	1.2E+08	1	1.00	0.00	0.00
<b>15</b>	1.8E+09	2	0.94	0.06	0.14
<b>15.5</b>	2.0E+06	1	1.00	0.00	0.00

**Palma 1. Tierra y Libertad.**

<b>Días</b>	<b>I (UFC/mL).</b>	<b>S</b>	<b>D</b>	<b>1-D</b>	<b>H'</b>
<b>1</b>	2.2E+04	3	0.95	0.05	0.12
<b>1.5</b>	8.8E+04	3	0.91	0.09	0.21
<b>6</b>	1.1E+08	2	0.96	0.04	0.09
<b>6.5</b>	6.5E+07	2	0.83	0.17	0.31
<b>10</b>	1.3E+07	1	1.00	0.00	0.00
<b>10.5</b>	2.0E+07	1	1.00	0.00	0.00
<b>15</b>	6.0E+06	1	1.00	0.00	0.00
<b>15.5</b>	9.9E+07	1	1.00	0.00	0.00



**Palma 2. Tierra y Libertad.**

Días	I (UFC/mL).	S	D	1-D	H'
1	0.0E+00	0	0.00	0.00	0.00
1.5	0.0E+00	0	0.00	0.00	0.00
6	4.1E+07	1	1.00	0.00	0.00
6.5	3.3E+07	2	0.63	0.37	0.56
10	1.1E+07	1	1.00	0.00	0.00
10.5	2.3E+07	1	1.00	0.00	0.00
15	2.3E+07	1	1.00	0.00	0.00
15.5	3.2E+08	1	1.00	0.00	0.00

**Palma 3. Tierra y Libertad.**

Días	I (UFC/mL).	S	D	1-D	H'
1	0.0E+00	0	0.00	0.00	0.00
1.5	3.1E+05	1	1.00	0.00	0.00
6	1.4E+08	2	0.82	0.18	0.33
6.5	0.0E+00	0	0.00	0.00	0.00
10	9.5E+06	1	1.00	0.00	0.00
10.5	1.5E+07	1	1.00	0.00	0.00
15	3.5E+07	1	1.00	0.00	0.00
15.5	9.6E+07	1	1.00	0.00	0.00

Al realizarse el análisis estadístico (ANOSIM), entre las palmas de cada localidad, se encontró que no existe diferencia significativa entre ellas (R: 0.03, p: 0.15; Benito Juárez y R: 0.03, p: 0.15; Tierra y Libertad). Así mismo, al realizar el análisis de similitud de las abundancias de las especies entre las localidades, tampoco se halló diferencia significativa (R: 0.04, p: 0.3).

### 7.5. Determinación de compuestos volátiles y no volátiles en la taberna.

El registro de los compuestos químicos generados a lo largo del proceso fermentativo durante los 15 días de muestreo, se muestra en el cuadro 6.

Cuadro 6. Compuestos químicos presentes en las seis palmas de las dos localidades muestreadas (Tierra y Libertad y Benito Juárez, Chiapas). AR: Azúcares reductores, ANR: Azúcares No Reductores, Et: Etanol, AS: Alcoholes Superiores, Ac: Acetaldehído, E: Ésteres y Aci: Ácidos orgánicos. Unidad utilizada para la medición de los compuestos: Azúcares y Etanol (g/L); demás compuestos mg/L.

<b>Palma 1. Benito Juárez.</b>							
<b>Días</b>	<b>AR</b>	<b>ANR</b>	<b>Et</b>	<b>AS</b>	<b>Ac</b>	<b>E</b>	<b>Aci</b>
<b>1</b>	0.00	0.00	0.63	8.39	0.00	10.61	196.32
<b>1.5</b>	0.00	0.00	0.59	6.36	0.00	8.03	179.04
<b>6</b>	3.31	0.00	7.46	129.07	473.30	261.23	74.49
<b>6.5</b>	9.25	0.00	4.58	32.06	49.03	132.68	100.04
<b>10</b>	17.53	0.00	35.29	0.00	0.00	698.19	116.62
<b>10.5</b>	43.30	0.00	15.81	0.00	0.00	84.56	172.43
<b>15</b>	0.00	0.00	27.73	0.03	0.00	327.26	74.90
<b>15.5</b>	30.49	0.00	26.16	0.02	0.00	361.28	294.24

<b>Palma 2. Benito Juárez.</b>							
<b>Días</b>	<b>AR</b>	<b>ANR</b>	<b>Et</b>	<b>AS</b>	<b>Ac</b>	<b>E</b>	<b>Aci</b>
<b>1</b>	0.00	0.00	0.30	7.80	0.00	9.79	94.88
<b>1.5</b>	40.46	0.00	0.69	9.00	0.00	10.70	103.15
<b>6</b>	0.00	0.00	54.54	0.00	0.00	233.80	95.20
<b>6.5</b>	5.12	0.00	41.02	0.00	0.00	103.34	33.45

<b>10</b>	20.42	0.00	27.94	0.00	0.00	428.66	87.50
<b>10.5</b>	24.06	0.00	5.28	2.94	0.00	11.13	206.24
<b>15</b>	17.26	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	90.60
<b>15.5</b>	0.00	0.00	28.56	0.00	0.00	284.41	92.82

**Palma 3. Benito Juárez.**

<b>Días</b>	AR	ANR	Et	AS	Ac	E	Aci
<b>1</b>	55.07	0.00	3.57	2.80	0.00	34.15	162.55
<b>1.5</b>	8.44	0.00	14.19	17.67	176.51	95.62	23.79
<b>6</b>	12.94	0.00	25.16	32.13	139.75	597.77	104.07
<b>6.5</b>	9.20	0.00	59.20	61.73	211.38	81.24	153.05
<b>10</b>	10.44	0.00	34.37	54.33	181.19	613.68	71.39
<b>10.5</b>	8.22	0.00	22.84	42.73	0.00	409.74	79.74
<b>15</b>	0.00	0.00	25.99	49.88	0.00	387.72	81.15
<b>15.5</b>	44.79	0.00	17.17	32.97	0.00	184.60	80.90

**Palma 1. Tierra y Libertad.**

<b>Días</b>	AR	ANR	Et	AS	Ac	E	Aci
<b>1</b>	9.19	279.24	1.24	4.11	0.00	7.45	99.38
<b>1.5</b>	8.88	0.00	1.54	0.00	0.00	3.48	74.85
<b>6</b>	20.31	173.05	65.43	0.03	0.00	295.93	54.89
<b>6.5</b>	11.55	0.00	63.82	0.00	0.00	93.50	119.82
<b>10</b>	4.84	0.00	58.30	0.00	0.00	950.50	71.23
<b>10.5</b>	22.19	0.00	63.60	11.84	0.00	512.86	92.21
<b>15</b>	4.35	0.00	57.35	0.00	0.00	849.74	23.67
<b>15.5</b>	9.82	0.00	47.51	0.00	0.00	459.10	81.35

**Palma 2. Tierra y Libertad.**

Días	AR	ANR	Et	AS	Ac	E	Aci
1	60.23	0.00	14.01	15.73	0.00	52.41	96.68
1.5	49.70	0.00	8.51	12.5	0.00	36.70	97.92
6	5.81	0.00	70.34	6.01	0.00	441.44	105.47
6.5	8.38	0.00	75.03	5.54	0.00	65.06	198.51
10	4.64	0.00	74.12	9.94	0.00	1516.85	118.77
10.5	8.12	0.00	77.00	7.64	0.00	663.52	172.51
15	27.40	36.83	62.54	17.01	0.00	1897.35	113.97
15.5	9.01	0.00	66.53	14.26	0.00	1286.20	86.15

**Palma 3. Tierra y Libertad.**

Días	AR	ANR	Et	AS	Ac	E	Aci
1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1.5	13.92	130.30	12.82	0.00	0.00	36.27	89.91
6	7.04	0.00	64.16	80.10	0.00	270.27	106.91
6.5	3.95	0.00	67.17	80.02	0.00	110.99	90.16
10	4.58	8.83	74.04	98.58	0.00	1298.75	84.36
10.5	24.62	0.00	42.05	63.68	0.00	446.67	189.87
15	0.00	0.00	65.58	84.27	0.00	1367.08	49.50
15.5	23.06	0.00	62.56	33.02	0.00	756.72	207.27

De forma general, los compuestos muestreados a lo largo de los procesos fermentativos, denotan la existencia primeramente de azúcares reductores al comienzo de la mayoría de las fermentaciones (Día uno), así también las concentraciones de azúcares no reductores, fueron registrados en la palma uno (Día uno), palma 2 (Día 15), y la palma 3 (Día 1.5 y 10); todas de la localidad de Tierra y Libertad.

Respecto a los alcoholes, el etanol, se presentó en mayor concentración entre el día sexto y decimo; para el caso de los denominados alcoholes superiores, las concentraciones trazas que se registran van en decremento a lo largo de la mayoría de los procesos muestreados.

Por su parte, las concentraciones de el acetaldehído, se registran mayormente en el sexto día. Los ésteres se presentan normalmente entre los días sexto y decimo, igual que los ácidos orgánicos.

Considerando el análisis de similitud (ANOSIM) se tiene que no hubo diferencias significativas entre las palmas de cada localidad (R: 0.09, p: 0.07; Benito Juárez y R: - 0.02, p: 0.60; Tierra y Libertad). Finalmente, el análisis de las palmas en conjunto, denota que no existe diferencia significativa entre las localidades muestreadas (R: 0.08, p: 0.06).

#### **7.6. La triada del proceso fermentativo en la taberna: El artesano, las levaduras y la cinética del proceso.**

El proceso de manejo y manipulación llevado a cabo por cada productor, exhibe diferencias en cuanto al manejo que el artesano realiza sobre la canoa (construida con el fin de que la savia emane de la palma previamente cortada); de esta manera, desde la selección de la palma (por edad), el corte y desempalme que se realiza, así como la abertura de la canoa; la manipulación de los utensilios que servirán para manejar la producción de taberna, es uno de los principales aportes que el productor lleva a cabo, de allí, que el manejo contribuya a la diversidad de levaduras que se asocian al proceso fermentativo.

La riqueza de especies que se identificaron en el ejido Tierra y Libertad es igual en las tres palmas muestreadas. En el caso del ejido Benito Juárez la riqueza de especies es similar entre las palmas muestreadas, con la única diferencia que durante el proceso de muestreo no se logró aislar a la especie *P. manshurica* en lo que concierne a la palma uno de tal localidad.

Por su parte, la descripción detallada del proceso fermentativo, que incluye a la diversidad biológica y bioquímica se presenta en las figuras 19 y 20.

En la figura 19 A, se describe la generación de etanol con base al consumo de azúcares totales, en donde la concentración inicial de azúcares fue de 27 g/L (xilosa y arabinosa), en contraposición se exhibe una concentración de etanol de 2 g/L. Al inicio del proceso fermentativo, la especie predominante es *H. opuntiae* ( $1.8 \times 10^3$  UFC/mL). Transcurridas doce horas (día 1.5), la concentración de azúcares, se eleva a 76 g/L, en este punto, la sacarosa se hace presente en 65 g/L y se registra un aumento de etanol (13 g/L), y de la abundancia de la especie predominante *H. opuntiae* ( $1.5 \times 10^5$  UFC/mL). Hacia el tercer día de muestreo, la concentración de azúcares desciende y permanecen constantes hasta el octavo día. Al sexto día, en el que se registra la concentración más alta de etanol (63 g/L); y la especie *S. cerevisiae* se vuelve dominante, desde este punto y hasta el final del proceso; alcanzando su valor más alto en el día 12 ( $3.2 \times 10^9$  UFC/mL).

En la figura 19 B, se ilustra la dinámica de generación de acetaldehído y alcoholes superiores; en donde la concentración inicial es de 6.3 mg/L y 1.4 mg/L, respectivamente, siendo el alcohol amílico el que se encuentra en menor concentración (1.4 mg/L). Los alcoholes permanecen normalmente en bajas concentraciones a lo largo del proceso, sin embargo, el propanol presenta una concentración de 63 mg/L hacia el día seis. Las concentraciones de acetato de etilo son altas, exhibiéndose la concentración mayor en el día 12 (958 mg/L). El acetaldehído por su parte presenta una concentración de 1.5 mg/L hacia el día 11. Conforme avanza el proceso fermentativo, los compuestos presentan un aumento significativo.

La figura 20, indica las concentraciones de ácidos orgánicos, inicialmente de 15 mg/L; hacia el día 2.5, las concentraciones de los ácidos principalmente málico y levulínico disminuye a 11 mg/L. Para el sexto día los ácidos orgánicos incrementan a 63 mg/L (ácidos levulínico, acético y málico). Finalmente, al sexto día *S. cerevisiae* entró en fase estacionaria; y se volvió la especie dominante del proceso ( $1.4 \times 10^8$  UFC/mL).

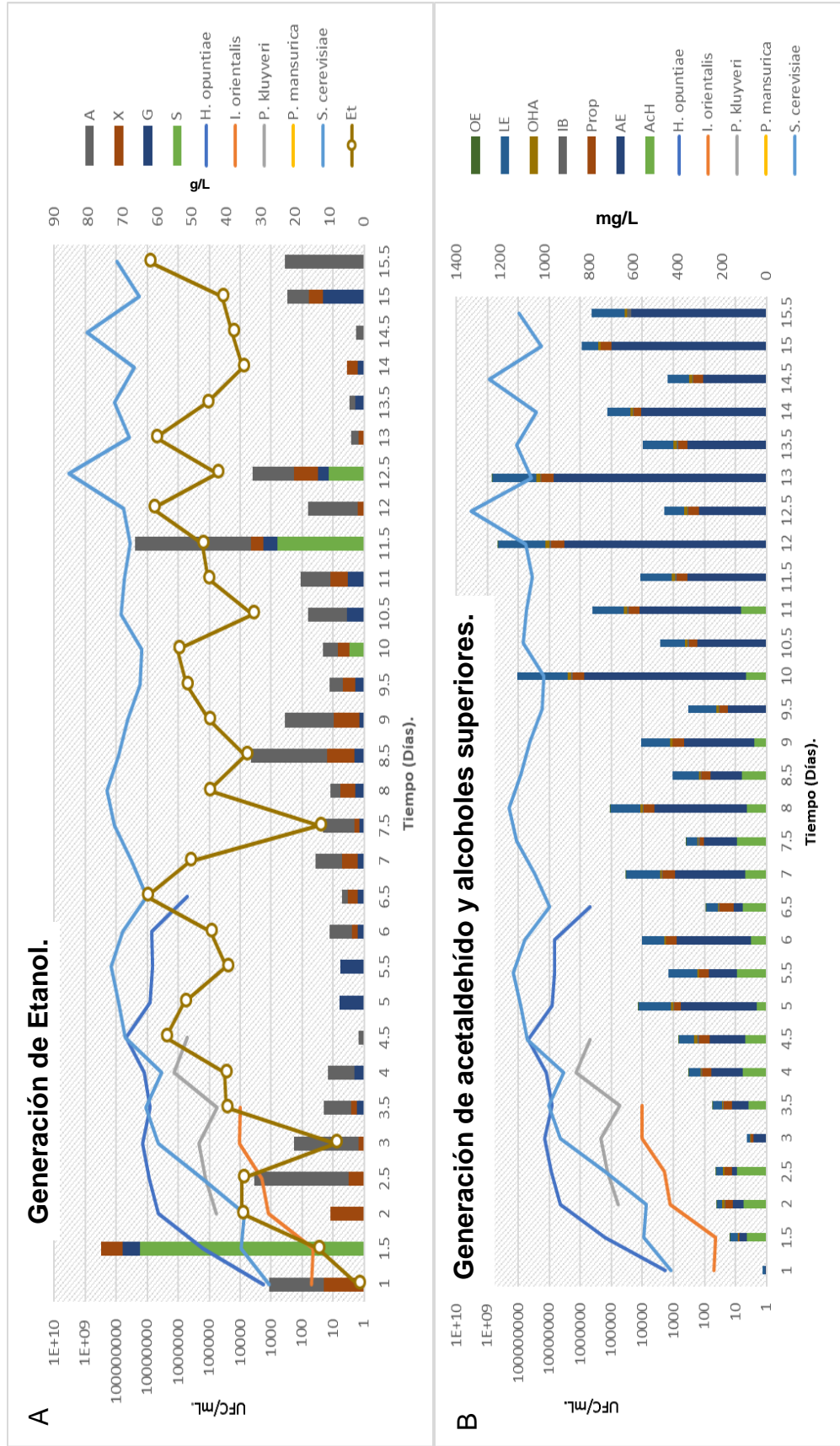


Figura 19. Proceso fermentativo completo, durante 15 días de muestreo (30 muestras); con base al promedio en cuanto a la abundancia por especies registradas a lo largo del proceso fermentativo y el promedio de los compuestos químicos de dos palmas (Benito Juárez, Villaflores y Tierra y Libertad, Jiquipilas, Chiapas). Figura A) Azúcares vs etanol. S: sacarosa; X: xilosa; A: arabinosa; Et: Etanol. Figura B) Acetaldehído y Alcoholes. Ach: acetaldehído; AE: acetato de etilo; Prop: propanol; IB: isobutanol; OHA: alcohol amílico; LE: lactato de etilo y OE: octanoato de etilo.

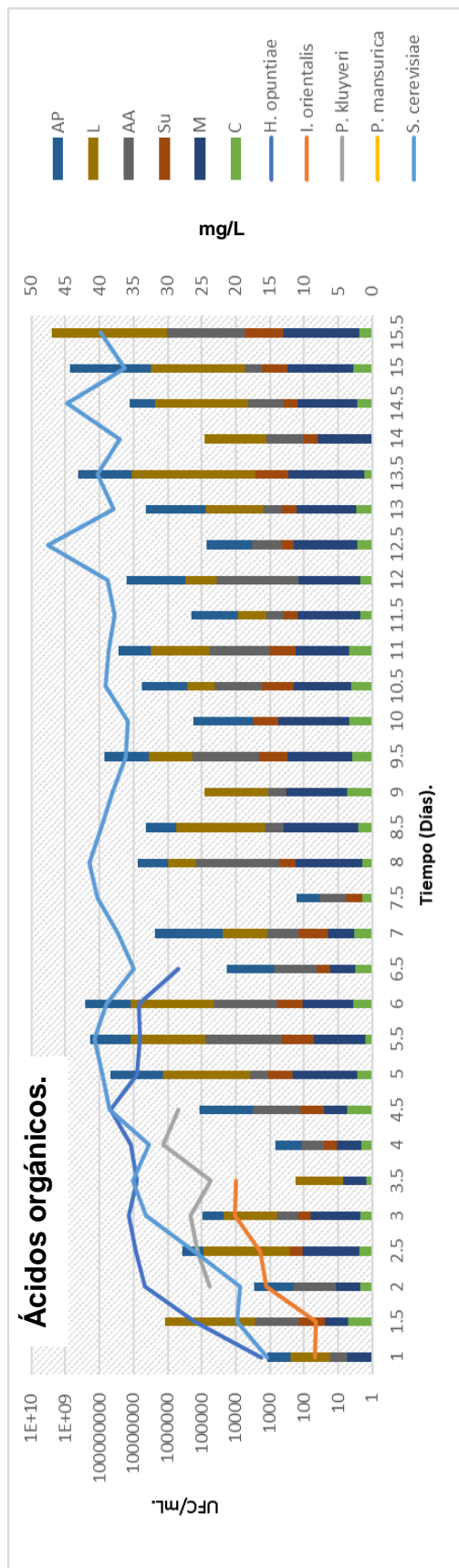


Figura 20. Proceso fermentativo completo, durante 15 días de muestreo (30 muestras); con base al promedio en cuanto a la abundancia por especies registradas a lo largo del proceso fermentativo y el promedio de los compuestos químicos de dos palmas (Benito Juárez, Villaflores y Tierra y Libertad, Jiquipilas, Chiapas). C: ácido cítrico; M: ácido málico; Su: ácido succínico; AA: ácido succínico; L: ácido acético; AP: ácido propiónico.



Finalmente, el Análisis de Redundancia (RDA) (figura 21), esboza que quizás, los azúcares no reductores son utilizados para la generación de azúcares reductores (glucosa, xilosa, arabinosa); estos últimos son utilizados para la generación de etanol y alcoholes superiores. Por otra parte, las especies apiculadas como lo son *H. opuntiae*, *I. orientalis*, *P. kluyveri* y *P. manshurica* promueven la generación de acetaldehído mediante la fermentación de los azucares, que a su vez se transforman en compuestos secundarios al inicio de la fermentación. *H. opuntiae* tiene una estrecha relación con los azúcares no reductores en los tiempos iniciales del proceso fermentativo. Los tiempos subsiguientes se ven asociados a las demás especies para la generación de compuestos secundarios, como son los ácidos orgánicos. Por su parte, la especie *S. cerevisiae* se asocia a la generación de etanol, ácidos orgánicos, acetaldehído y ésteres.

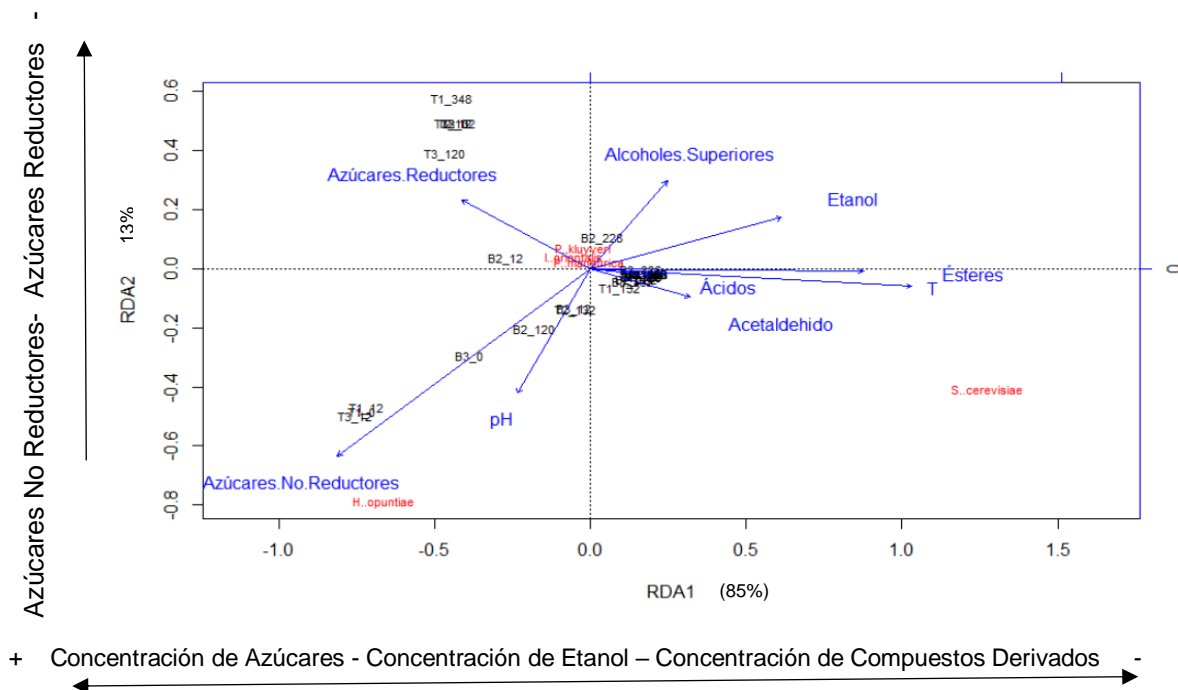


Figura 21. Análisis de Redundancia con base a las abundancias por especie y los compuestos químicos registrados mediante HPLC y CG en cada punto de muestreo en las dos localidades muestreadas (Benito Juárez, Villaflores y Tierra y Libertad, Jiquipilas). RDA1 y RDA2 (explican el 98% de la varianza total de los datos).

## **8. Discusión.**

### **8.1. Manejo de la palma y manipulación de la bebida para la generación de la taberna.**

La Taberna, bebida obtenida de la palma de *Acrocomia aculeata* en los ejidos de Benito Juárez (Villaflores, Chiapas) y Tierra y Libertad (Jiquipilas, Chiapas), es muy apreciada entre los pobladores donde la misma se produce; el conocimiento que se tiene sobre la elaboración de esta bebida es ancestral; desde la elección de la palma, el corte, la abertura de la canoa y la manipulación durante el proceso de extracción de la misma.

Las principales investigaciones sobre esta bebida, se han realizado en las localidades de las Arreolas (Molina, 2014), Villa Corzo (Coutiño et al., 2015) y Villaflores (ejido Benito Juárez) (Alcántara et al., 2010; Bermúdez, 2011; Santiago- Urbina et al., 2013 y Molina, 2014), siendo este último, el principal centro tabernero que se conoce en el estado de Chiapas. El tiempo de producción de la bebida principalmente se realiza en los meses de marzo y abril, lo que concuerda con la temporada de cuaresma y semana santa. El procedimiento que se lleva a cabo para la generación de la bebida, en esta investigación, es similar al descrito por Alcántara et al. (2010) y Santiago- Urbina et al. (2013), quienes mencionan que para obtener la savia de coyol, se talan las palmeras (entre 10 a 15 años) y el colector enseguida elimina las espinas; posteriormente realiza un corte rectangular en el corazón del tallo, a este boquete se le denomina “Canoa” (corte de 15 cm de largo, 10 cm de ancho y 30 cm de profundidad), y es en este donde se obtiene la taberna.

Con base a lo anterior, el líquido que emana del tronco, se almacena en la canoa y de manera natural se fermenta, presentando un pH inicial de 7, disminuyendo a 4 a lo largo del proceso fermentativo, lo cual concuerda con lo registrado por Bermúdez (2011) y Santiago-Urbina et al. (2013), quienes registraron un pH igual a 7 al principio del proceso fermentativo, el cual osciló entre 3.5 y 4 al finalizar el muestreo (en el caso de Santiago-Urbina, es importante mencionar que la toma de muestras se realizó durante 15 días); así pues, se denota inicialmente el comportamiento neutro o básico de la bebida, pasando a ser de carácter ácido durante y al final de la fermentación. Es importante mencionar que, con el paso del tiempo, el productor corta pequeñas

secciones de la cavidad con el fin de mantenerla aseada; así pues, tal como mencionan Santiago-Urbina et al. (2013), la canoa es raspada un centímetro cada día, ello para aumentar el tamaño de la misma, pero principalmente para mantener los vasos del palmito limpios, con el fin de que la savia fluya de forma libre.

Por su parte, la temperatura de la bebida oscila entre los 22-35 °C, tal oscilación está relacionada con la temperatura ambiental que se registra en la zona de muestreo; de esta manera Santiago-Urbina et al. (2013), señalan que la temperatura ambiental varía entre los 30-38 °C durante el proceso de muestreo.

El proceso fermentativo llevado a cabo por los microorganismos asentados en el líquido azucarado, son principalmente levaduras y bacterias; tales microorganismos son tomados del ambiente y depositados en la canoa quizás mediante los utensilios que el productor usa (principalmente el machete; con el cual corta y raspa diariamente la canoa, así como una cuchara con la cual limpia los residuos del corte del palmito y una manguera para extraer el líquido). Referente al asentamiento de los microorganismos, las especies de levaduras en la savia de la palma, son inoculadas aleatoriamente por vectores tales como insectos (moscas, hormigas, avispas, abejas, libélulas, mosquitos, escarabajos y otros), el material empleado para raspar la canoa y el mismo que se ocupa para llevar a cabo la recolección de la savia; así también, el aire, el polvo contribuyen en la diversidad de levaduras presentes en cada proceso fermentativo (Santiago-Urbina et al., 2013; Santiago-Urbina et al., 2014).

## **8.2. Caracterización morfológica, molecular y proteica de las especies asociadas a la taberna.**

Respecto a la identificación de las levaduras que llevan a cabo el proceso fermentativo de la taberna; esta se basó en tres aspectos principales; el primero, la caracterización morfológica, ya que ésta, es considerada como un abordaje de los múltiples descriptores que pueden ser utilizados para esbozar la forma, así como los caracteres particulares que determinan colonias diferentes a nivel macroscópico según Boekhout y Kurtzman (1996), las características morfológicas de las levaduras siguen siendo de

gran importancia taxonómica; puesto que, de manera macroscópica, se ha descrito su textura, color, superficie, elevación y margen.

La descripción morfológica a nivel microscópico, contribuye al igual que la caracterización macroscópica a realizar una clasificación general, así como conocer características que en algunos géneros de levaduras son particulares; siendo así que las formas microscópicas más representativas pueden ser desde esféricas a ovoide, en forma de limón, piriforme, cilíndrica, triangular, e incluso alargadas (Palacios, 2006; Camacho et al., 2009); así también la descripción en cuanto al tipo de reproducción asexual, particularmente en la realización del presente trabajo contribuye a ser un descriptor para la clasificación de las especies, las levaduras descritas se reproducen asexualmente por gemación, como lo describe García (2014).

En su mayoría la descripción morfológica de las especies registradas en el presente trabajo, concuerda con lo reportado en las diversas investigaciones (Kurtzman y Fell, 1998; Arratia, 2009; Cadez et al., 2013; González, 2014), la variación en cuanto a coloración de las colonias es debida al medio de cultivo donde se visualizó la misma, siendo así que hasta la actualidad, se ha descrito la morfología de diversas especies en variados medios de cultivo, especialmente en medios con compuestos asimilables para cada especie de levadura; o bien sea el caso, medios selectivos que promuevan el crecimiento de cierta clase de microorganismos en particular.

Aunado a la caracterización morfológica; la taxonomía de hongos se ha registrado como desafiante; ello debido a la plasticidad morfológica y fisiológica intra específica, al número limitado de marcadores morfológicos, así como el tiempo que consume el proceso de identificación basado en estos rasgos (González, 2014). Es por ello que, el uso de herramientas moleculares contribuye al rápido esclarecimiento en la identificación de las especies o los géneros propios a identificar, para ello, el uso de marcadores moleculares, como PCR- RFLP contribuye a discernir por comparación del perfil de digestión la identidad del microorganismo. Así bien, los productos de PCR de las cepas de la misma especie y de especies del mismo género muestran tamaños moleculares idénticos o muy similares; por su parte, cada región del gen del ADN<sub>r</sub> obtenida mediante el corte por enzimas de restricción como lo son HhaI, HaeIII y HinfI

mediante el estudio de RFLP, exhibe un patrón de restricción específica para cada especie (Carvalho et al., 2005).

Finalmente, la identificación mediante Maldi-tof, sirve para reafirmar la identidad de las especies, identificadas mediante RFLP.

### **8.3. Ecología de levaduras asociadas a la taberna.**

El proceso fermentativo que se realiza para la generación de la taberna es complejo, el cual, va acompañado de múltiples microorganismos que procesan los compuestos existentes en el medio para generar compuestos de interés organoléptico; los cuales, a su vez, dan pie a la sucesión de las especies a lo largo de la fermentación.

Tal como se sabe, algunos procesos de fermentación espontánea son llevados a cabo primordialmente por microorganismos iniciadores, como son las especies de los géneros *Hanseniaspora*, *Candida*, *Issatchenkia*, *Metchnikowia*, *Kluyveromyces*, *Pichia* y *Rhodotorula*, que le confieren ciertas características al producto final (Jespersion, 2003 en International Specialised Symposium on Yeast, 2011; Segura et al., 2010); así como especies representativas del género *Saccharomyces*, los cuales confieren a la bebida ese sabor alcohólico mediante la generación de etanol; Santiago- Urbina et al. (2013) enfatizan que la fermentación puede ser llevada a cabo de manera natural por microorganismos autóctonos y es así que entre las cepas más comúnmente encontradas en las bebidas tradicionales se encuentran las cepas de *S. cerevisiae*; sin embargo, las no-*Saccharomyces* crecen bien en las etapas iniciales y proporcionan características especiales a las bebidas.

Sin embargo, se ha registrado que en la taberna se llevan a cabo diversos procesos fermentativos. Inicialmente es producida una fermentación láctica; una fermentación alcohólica posterior y una fermentación acética final (Santiago- Urbina et al., 2013).

Aunado a lo anterior, es relevante señalar que microorganismos como las bacterias lácticas, son las pioneras durante el proceso fermentativo. La fermentación por bacterias ácido lácticas (BAL) se caracteriza por la acumulación de ácido láctico, ácido propiónico y ácido acético, así como la disminución del pH en el ambiente de

crecimiento; lo que contribuye con la inhibición de ciertos microorganismos, de esta manera, la actividad antimicrobiana se asocia a la disminución de pH, así como en la forma no disociada de las moléculas (Ouweland, 1993 en Ramírez, 2005).

El ácido láctico producido por la vía homofermentativa de las BAL como el principal metabolito, este mismo, puede interactuar con las membranas celulares y causar acidificación intracelular y desnaturalización de proteínas. Sin embargo, por la vía heterofermentativa se produce en pequeñas cantidades junto con el ácido acético, etanol y dióxido de carbono. En el caso del ácido acético y propiónico son producidos por las cepas de BAL por la vía heterofermentativa, pueden interactuar con las membranas celulares y causar acidificación intracelular y desnaturalización de proteínas. El ácido acético tiene una actividad sinérgica con el ácido láctico; el pH del medio disminuye por la acción del ácido láctico, aumentando la toxicidad del ácido acético (Yang, 2000 en Ramírez, 2005).

Particularmente, Alcántara et al. (2010) fue el primero en registrar la estructura bacteriana que se puede encontrar en la taberna, siendo los principales géneros: *Zymomonas*, *Fructobacillus*, *Lactobacillus*, *Enterobacteria*, *Sphingomonas*, *Brevundimonas*, *Acetobacter*, las cuales, contribuyen en la generación de compuestos secundarios durante los diversos procesos fermentativos.

Así pues, las especies de levaduras registradas en este documento (*H. opuntiae*, *P. manshurica*, *P. kluyveri*, *I. orientalis* y *S. cerevisiae*), son un claro ejemplo de la diversidad de levaduras que se presentan en bebidas tradicionales que se elaboran mediante un proceso espontáneo de fermentación. Algunas especies han sido registradas en otras investigaciones concernientes a la Taberna; como son *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kluyveri*, *Kluyveromyces unispora*, *Metchnikowia guilliermondii*, *Candida tropicalis*, *C. intermedia*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *K. exigua*, *P. kudriavzevii* (Santiago-Urbina et al., 2013); *S. cerevisiae*, *Turolopsis* y *Schizosaccharomyces* (Rodríguez et al., 2008); así como *S. cerevisiae*, *P. nakasei*, *Rhodotorula minuta*, *C. tropicalis*, *C. incommunis*, *C. stellata*, *C. mesentérica* (Molina, 2014).

La abundancia de las especies levaduriformes es variable a lo largo de la fermentación; debido a la estrecha relación que tienen tales microorganismos con la cantidad de compuestos asimilados, así como la cantidad de compuestos sintetizados; es lo que explica los cambios en cuanto a la riqueza de especies en cada tiempo de muestreo; Molina (2014) menciona que se ha registrado la visualización de una cantidad considerable de UFC/mL de levaduras durante los primeros días de muestreo en la taberna, sin embargo, conforme van pasando los días, las poblaciones van variando; observándose descensos y aumentos, esto debido a que durante el proceso de elaboración de la bebida se retira parte del sustrato de la palma, por lo que muchas poblaciones de los microorganismos responsables de la fermentación disminuyen incluso hasta llegar a cero UFC/mL.

Hablando de diversidad entre las palmas de la misma localidad, se registró una diversidad alfa similar; de cierta forma, las especies de levaduras fueron comunes a todas las muestras; tal y como señalan Santiago-Urbina et al. (2013), probablemente las especies fueron establecidas al inicio del proceso fermentativo, siendo estas mismas capaces de tolerar las condiciones de la savia de palma, pudiendo recolonizar la savia ya que parte de los microorganismos se encontraban en las paredes de la canoa y en el fondo de la misma.

Por su parte, la variabilidad en cuanto a la riqueza de especies que se pueden encontrar en localidades diferentes determinan la estrecha relación que posee la comunidad de levaduras, tanto con el macro y microambiente, así como con el productor que genera la bebida y la materia prima que se utiliza para la elaboración de la misma; tal como menciona Lambais et al. (2014), los procesos selectivos que determinan la comunidad microbiana, están basados en parte por la composición de compuestos orgánicos que se utilizan como fuente de carbono para el crecimiento; por ejemplo, los diferentes azúcares, ácidos orgánicos y la composición de aminoácidos de los exudados de la raíz; así también se ha demostrado que los perfiles fitoquímicos que son producidos por la especie vegetal utilizada, están relacionados con la filogenia de las levaduras; lo que sugiere que las comunidades microbianas que han sido seleccionadas para el crecimiento en estas sustancias también pueden mostrar similitudes en su estructura comunitaria que corresponde a la filogenia de la especie.

Así pues, el elenco taxonómico que se denota en el proceso fermentativo de la taberna, inicia principalmente con el asentamiento de especies tales como *H. opuntiae*, *I. orientalis*, *P. kluyveri*; seguida de la aparición esporádica de la especie *P. manshurica* y el dominio a mediados y hasta el final del proceso fermentativo por parte de *S. cerevisiae*; Rodríguez (2007) y Molina (2014) señalan que durante el proceso fermentativo se pueden diferenciar distintas especies de levaduras. En la primera fase, cuando el grado alcohólico es bajo, predominan las levaduras apiculadas, productoras de alcohol en bajo grado, capaces de generar importantes concentraciones de ácidos volátiles (ácido acético). En la segunda y tercera fase de la fermentación, las levaduras apiculadas son desplazadas en gran número por otras pertenecientes al género *Saccharomyces*, principalmente las cuales suelen tener forma elíptica e invaden rápidamente el medio, estas son bastantes resistentes al etanol producido durante el proceso fermentativo.

Es importante indicar que se ha reportado que las principales especies de levaduras responsables de la producción de alcohol son *Saccharomyces sake*, *S. cerevisiae*, *Aspergillus oryzae*, *Pichia polymorpha*, entre otras especies (Santiago-Urbina et al., 2015).

Sin embargo, se ha registrado que, en la taberna, se llevan a cabo diversos procesos fermentativos; inicialmente es producida una fermentación láctica; una fermentación alcohólica posterior y una fermentación acética (Santiago-Urbina et al., 2013).

Tal como ya se ha mencionado, el asentamiento de los microorganismos iniciadores del proceso fermentativo alcohólico, así como la sucesión de poblaciones de levaduras se ve involucrada en la variedad de procesos bioquímicos y procesos ecológicos debido a la capacidad de las levaduras para usar rápidamente los azúcares simples presentes en la materia prima (Kurtzman y Fell, 1998); siendo así que, para que las bebidas y alimentos sean fermentados debe haber una proliferación de microorganismos que consuman los carbohidratos presentes en la materia prima, y utilicen esos carbohidratos como fuente de energía, para generar diversos metabolitos como: etanol, metanol, glicerol, entre otros (Flanzy, 2003 en Casas et al., 2015).



Entre los compuestos que se sintetizan están las grandes familias de alcoholes superiores, carbonilos como los aldehídos, los ésteres, los ácidos orgánicos, las grasas y los compuestos con azufre. En la mayoría de las bebidas alcohólicas, los compuestos responsables del olor y el sabor son los volátiles. Los alcoholes y los ésteres son cualitativamente los más importantes, sin embargo, su impacto en el aroma no es el mismo. Los alcoholes son compuestos que individualmente no tienen un olor marcado, pero cuando están diluidos refuerzan el aroma. Los ésteres contribuyen fuertemente al aroma frutal, en especial los ésteres de ácidos grasos de cadena corta. La capacidad de generar alcoholes superiores es una propiedad de todas las levaduras, pero la cantidad varía en función del género, de las especies y de las cepas (Suárez, 2002; Álvarez- Anza et al., 2009).

En la taberna, específicamente se tiene registro de su caracterización fisicoquímica; según Okafor (1975) y Santiago et al. (2013), la savia sin fermentar es limpia y dulce, siendo ésta un jarabe incoloro que contiene alrededor de 10 al 12% de azúcar, de los cuales el principal es sacarosa; esta fue detectada durante el proceso fermentativo, en una concentración de 11.36 p/v, así como la fructosa que fue detectada en bajas concentraciones (0.27 p/v); evidenciando de esta manera la actividad enzimática con base a la generación de fructosa y glucosa, los cuales son azúcares reductores que asimilan las levaduras apiculadas para la producción de compuestos químicos. Tal como se denota en el apartado 7.6 (figuras 19, 20), las concentraciones de azúcares permanecen constantes, siendo los azúcares más importantes la sacarosa, la glucosa, la arabinosa y la xilosa; encontrándose así un promedio de 18.1 g/L de azúcares totales a lo largo de la fermentación.

Acorde a lo anterior, se puede mencionar que, al principio del proceso fermentativo de la taberna registrado en la presente investigación, el líquido que emana del tallo es de carácter dulce y transcurridos seis días, las características organolépticas van cambiando hasta ser un líquido de carácter avinagrado; tal como menciona Zambonelli (1988) en Coutiño et al. (2015).

Santiago et al. (2013) mencionan que las variaciones de azúcares durante el proceso fermentativo, oscilan debido a que las palmas constantemente producen savia de

palma, a la vez que los microorganismos consumen tales azúcares. La disminución de la sacarosa por su parte, se ve reflejada en la generación de azúcares reductores, que a su vez generan metabolitos como etanol, ácidos orgánicos, ésteres, aldehídos; sin embargo, puede suceder que la planta no produzca azúcares reductores debido a que el daño que se causa a la palma al cortar la raíz, el tallo y las hojas, evita que la palma realice la fotosíntesis y no produzca azúcares.

Es importante señalar que dentro de las especies iniciadoras del proceso fermentativo *H. opuntiae* es la que fermenta los azúcares reductores (principalmente la glucosa), entre los días 1- 6.5, al respecto, Esteve-Zarzoso et al. (1998) en Ocón (2015), señalan que algunas especies no-*Saccharomyces*, en comparación con *S. cerevisiae*, producen y secretan gran cantidad de enzimas: carboxilasas (celulasas, hemicelulasas, amilasas, pectinasas), glicosidasas ( $\beta$ - D- glucosidasas,  $\beta$ - D- xilosidasas), proteasas, lipasas, descarboxilasas, sulfito reductasa,  $\beta$ - glucanasas o esterasas; estas enzimas se liberan al espacio periplásmico y al medio fermentativo, donde pueden interaccionar con compuestos de la materia prima para mejorar, clarificar y estabilizar la bebida; fijando el color, o producir compuestos aromáticos activos, contribuyendo de esta manera al aroma varietal o fermentativo del vino resultante (Hernández- Orte et al., 2008).

Descrito lo anterior, y con base al cuadro 4 (anexos), se puede señalar que las especies apiculadas utilizan los azúcares no reductores para la generación de glucosa, xilosa y arabinosa; de los cuales se obtienen los compuestos subsecuentes. Por otra parte, *S. cerevisiae* es la especie responsable de la generación de etanol; aunque, Arratia (2009), ha reportado que las especies *H. opuntiae* y *P. kluyveri*, también contribuyen con la generación de pequeñas cantidades del mismo.

Así pues, en la actualidad se reconoce que las levaduras autóctonas proporcionan mejores resultados en la calidad de los licores, debido a que están mejor adaptadas a las condiciones medioambientales y aseguran el mantenimiento de las características de las bebidas fermentadas de una determinada región, aunque en general, los diversos resultados de las propiedades organolépticas en cada bebida son proporcionado gracias a la fuente de azúcares fermentables (Belda et al., 2014). Siendo así que, las características de mayor relevancia en cualquier tipo de fermentación son el

aroma y sabor, los cuales están estrictamente relacionados con la materia prima a fermentar y las especies de levaduras que realizan la fermentación. Los aromas y sabores son el resultado de los diferentes metabolitos que produce cada cepa; dentro de estos se encuentran los compuestos azufrados, ésteres (acetato de etilo, acetato de isoamilo y acetato de metilo), ácidos orgánicos (butírico, fórmico, propiónico), carbonilos (acetona, acetaldehído), alcoholes (butanol, sec-butanol, iso-butanol), entre otros (Enriquez y Acevedo, 2012 en Casas et al., 2015).

Particularmente, las especies apiculadas, son las encargadas de las características organolépticas de la bebida, el sabor, los olores específicos, son producto de los compuestos trazas que las mismas generan, tales como ácidos orgánicos, alcoholes minoritarios y ésteres de importancia, a ello, Santillana et al. (2004) en Casas et al. (2015) señalan que existen ciertos parámetros para determinar la importancia de una cepa de levadura en una fermentación; esta debe tener alto potencial para fermentar carbohidratos, así como producir una mezcla compleja de metabolitos generalmente volátiles, producidos por las levaduras en muy bajas concentraciones pertenecientes a ésteres, carbonilos y alcoholes de alto peso molecular, debe ser capaz de tolerar altas temperaturas, cambios osmóticos y flocular.

Los procesos de fermentación espontánea están mediados principalmente por levaduras no-*Saccharomyces*, y la especie de levadura que interviene en este proceso depende de la concentración etanólica del fermento y de la composición del sustrato (Casas et al., 2015); es así que especies como *H. opuntiae* y *P. kluyveri* pueden ser consideradas como especies resistentes al etanol; tal como señala Deak y Beuchat, (1996) en Casas et al. (2015), existen otros factores que también la temperatura y el oxígeno influyen en la tolerancia alcohólica de las levaduras; si la temperatura aumenta, la tolerancia alcohólica de la levadura disminuirá, debido a la perturbación que sufren los fosfolípidos que conforman la membrana; por otra parte, si existe un déficit de oxígeno disponible en el mosto, la levadura no producirá suficientes esteroides y ácidos grasos de cadena insaturada que forman parte de la pared celular y como resultado el microorganismo tendrá una pared celular débil, incapaz de tolerar cambios bruscos y concentraciones elevadas de etanol.

Por su parte, las concentraciones de ácidos orgánicos ya sea en altas o bajas cantidades, fungen primordialmente, tal como menciona Torija (2002) como los principales compuestos responsables de la acidez total del vino, teniendo por ello, una demostrada contribución a las características organolépticas finales del producto, así como a la estabilidad biológica y fisicoquímica posterior del mismo. Así también señala que, las concentraciones de cada ácido, depende de varios factores como son: el tipo de materia prima, la actividad microbiana de la cepa de levadura o las condiciones en las que se lleva a cabo la fermentación alcohólica (Ramón- Portugal, 1999 en Torija, 2002).

Así pues, la oscilación del ácido acético a lo largo del proceso fermentativo entre los 2 y 12 mg/L, con una concentración al final de 11 mg/L, le confiere un toque avinagrado al producto final, siendo *S. cerevisiae* ( $9.5 \times 10^7$  UFC/mL a las 348 horas), la levadura que contribuye al porcentaje final de ácido acético y otros compuestos de importancia. Tal como mencionan Boulton et al. (1996) en Torija (2002), la producción de ácido acético por *Saccharomyces* suele variar entre 100- 200 mg/L, dependiendo de la cepa utilizada, la temperatura de fermentación y la composición de la materia prima. A lo que Ribéreau- Gayon et al. (2000), añade, que está descrito que la producción de ácido acético depende principalmente de la concentración de azúcar en el medio y que es independiente de la cantidad que sea fermentada, es decir, que cuando mayor sea la concentración de glucosa en el medio, mayor será la producción de ácido acético. Lo que explica también las bajas concentraciones del mismo, debido a las bajas concentraciones de glucosa a lo largo del proceso (entre 1 a 12 mg/L); alcanzando su mayor concentración a los 15 días.

Así también, *S. cerevisiae*, especie dominante del proceso fermentativo de la taberna ha sido descrita en otras investigaciones como la especie de levadura responsable de la fermentación y el aroma de la taberna; ya que fermenta los monosacáridos y posee un alto grado de tolerancia al etanol, ya que cuenta con una pared celular rígida que oscila entre 100-200 nm de grosor constituida mayormente por mananos y glucanos (Hidalgo, 2003). Además de la pared celular, la membrana plasmática le ayuda a tolerar concentraciones altas de etanol. La membrana plasmática está constituida mayormente por fosfolípidos tales como: fosfatidil- serín, y su permeabilidad está directamente

relacionada a la composición y al acomodo fosfolipídico que posee (Vaughan y Martini, 1995 en Casas et al., 2015).

Con base a lo anterior, es visible que el papel predominante de *S. cerevisiae* en el proceso de fermentación alcohólica también es indicador de un contenido de etanol mayor, lo cual orilla a la sucesión de especies poco tolerante al etanol, ésteres y ácidos grasos, a ser desplazadas del proceso fermentativo (Amoa- Awua et al., 2007). Esta levadura se caracteriza por tener alto poder fermentativo, y posee baja capacidad de producir compuestos secundarios, que son los que brindan características organolépticas a las bebidas y alimentos fermentados. Sin embargo, Folch- Mallo (2004) en Arratia (2009) añade, que es esta levadura la que produce en segundo plano, las concentraciones de glicerol. Así también, en las diversas investigaciones ecológicas y tecnológicas se tienen la hipótesis de que *S. cerevisiae* es la principal especie responsable de la fermentación alcohólica en el jugo de las frutas. Así también se han realizado estudios, concernientes a la toxina “asesina”, la cual es letal para otros microorganismos de la misma especie (Kurtzman y Fell, 1998).

Ahora bien, en lo que concierne a la especie *I. orientalis* (también denominada *P. kudriavzevii*), se ha reportado posee un perfil deseable para los niveles más altos de alcohol y baja producción de acetaldehído durante la fermentación de la taberna (Clemente- Jiménez et al., 2004 en Santiago- Urbina et al., 2014); así pues, tal especie degrada casi totalmente el ácido málico y produce etanol, aumentando con ello el pH de la bebida (Comitini et al., 2011 en Ocón, 2015). Por su parte, el género *Pichia*; *Candida famata* y *Candida kefir* se consideran contaminantes en fermentaciones controladas; las cuales son responsables de formar un velo blanco en la superficie del fermento, produciendo una cantidad aceptable de compuestos secundarios (glicerol entre otros) que pueden ser percibidos al ingerir las bebidas alcohólicas fermentadas, lo que da una sensación de complejidad y mayor volumen (Escalante et al., 2011 en Casas et al., 2015).

Para finalizar, se puede decir que el proceso fermentativo llevado a cabo por las levaduras anteriormente descritas, esboza una sucesión o recambio entre las mismas a lo largo de la fermentación, posiblemente debido a la actividad “killer” que se ha

encontrado en los géneros *Saccharomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Willopsis* y *Zygosaccharomyces*; el interés enológico en este tipo de levaduras, se debe a que cuando están presentes pueden dominar el proceso de fermentación, cuando poseen características enológicas positivas pueden ser usadas como inóculo inicial y producir una bebida de excelente calidad (Arratia, 2009).

## 9. Conclusiones.

- La diversidad de levaduras formada por *H. opuntiae*, *I. orientalis*, *P. kluyveri*, *P. manshurica* y *S. cerevisiae*; puede ser considerada similar entre las regiones o zonas de colecta, debido a las especies compartidas entre ellas.
- Durante el proceso de fermentación espontánea, existe una sucesión constante de microorganismos, los cuales van modificando el microambiente y contribuyen a la existencia y coexistencia de los mismos; siendo así que las primeras especies asentadas durante el proceso pertenecen a los géneros *Hanseniaspora*, *Pichia* e *Issatchenkia*; siendo *S. cerevisiae* la levadura dominante hasta el final del proceso.
- La composición química depende de la riqueza de levaduras y su abundancia en cada punto de muestreo.
- El manejo de la palma, así como el proceso de manipulación por parte del productor para generar la bebida, no tiene relación con la riqueza y abundancia de las especies en cada proceso fermentativo.
- Los azúcares no reductores son metabolizados por las levaduras para la formación de azúcares reductores; mismos que a su vez son utilizados en la generación de etanol y compuestos secundarios a lo largo de la fermentación.

## **10. Perspectivas.**

- Estudiar la microbiota asociada a la taberna, considerando el estudio de bacterias (bacterias ácido lácticas, bacterias ácido acéticas, bacterias mesófilas), levaduras y coliformes, durante los diferentes procesos fermentativos.
- Determinar si el uso de herramientas por parte del productor influye sobre el asentamiento de una o algunas de las especies de microorganismos durante el proceso fermentativo.
- Caracterizar la microbiota durante los procesos subsecuentes de la taberna, como son, el almacenamiento en contenedores y su posterior proceso de fermentación durante la venta del mismo.



## 11. Literatura citada.

- Alcántara- Hernández, R. J.; Rodríguez- Álvarez, J. A.; Valenzuela- Encinas, C.; Gutiérrez- Miceli, F. A.; Castañón- González, H.; Marsh, R.; Ayora- Talavera, T. y Dendooven, L. (2010). The bacterial Community en ´taberna´a traditional beverage os Southern México.
- Amoa-Awua, W. K.; Sampson, E. y Tano-Debrah, K. (2007). Growth of yeasts, lactic and acetic acid bacteria in palm wine during tapping and fermentation from felled oil palm *Elaeis guineensis* in Ghana. *J Appl Microbiol* 102:599–606.
- Arratia M., J. M. (2009). Diversidad Genética de levaduras involucradas en la fermentación del mezcal tamaulipeco. Instituto Politécnico Nacional. Centro de Biotecnología Industrial. México. 103 pp.
- Atputharajah, J. D.; Widanapathirana, S. y Samarajeewa, U. (1986). Microbiology and biochemistry of natural fermentation of coconut palm sap. *Food Microbiol* 3:273–280.
- Azor M., J. R. (s/d). Prueba de hipótesis. Uuniversidad de Mendoza. 22 pp.
- Barquero Q., M. (2004). Mecanismos y Aplicaciones de la Cromatografía Líquida de Alto Desempeño. Editorial Universidad de Costa Rica. Costa Rica. 59 pp.
- Bassir O. (1962). Observation of Palm wine. *West Afr. J. Biol. Appl. Chem.* 6:20-25.
- Belda, I.; Navascués, E.; Alonso, A.; Marquina, D. y Santos, A. (2014). Microbiología del proceso de vinificación: Selección de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* autóctonas con óptimas propiedades enológicas. *Reduca Microbiología* 7 (1): 1-14.
- Bermúdez H., I. D. (2011). Elaboración *in vitro* de una bebbida tipo “taberna”. Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez. 67 pp.
- Boekhout, T. y Kurtzman, C. P. (1996). Principles and Methods Used in Yeast Classification and an Overview of Currently Accepted Yeast Genera. En *Nonconventional Yeast in Biotechnology: A Handbook* Springer Science & Business Media. 619 pp.

- Bolaños A., N. (2013). Diversidad, riqueza y abundancia de especies de murciélagos en el Corredor Biológico Regional Nogal- La Selva. Tesis de Licenciatura en Biología con énfasis en Zoología. Costa Rica. 60 pp.
- Borcard, D.; Gillet, P. y Legendre, P. (2011). Numerical Ecology whit R. Springer. EUA. 306 pp.
- Buttigieg, P. L. y Ramette, A. (2014). A guide to statistical analysis in microbial ecology: a community- focused, living review of multivariate data analyses. FEMS Microbiol Ecol. 90: 543- 550.
- Cadez, N.; Poot, G. A.; Raspor, P. y Smith, M. Th. (2003). *Hanseniaspora meyeri sp. nov., Hanseniaspora clermontiae sp. nov., Hanseniapor a lachancei sp. nov. and Hanseniapor a opuntiae sp. nov., novel apiculate yeast species. International Journal of Siystematic and Evolutionary Microbiology. 53: 1671-1690.*
- Calderón- Patrón, J. M.; Moreno, C. E. y Zuria, I. (2012). La diversidad beta: medio siblo de avances. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 83: 879- 891.
- Camacho, A.; Giles, M.; Ortegón, A.; Palao, M.; Serrano, B. y Velázquez, O. (2009). Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos. 2ª. edición. Facultad de Química, UNAM. México.
- Casas A., A.; Aguilar G., C. N.; De la Garza T., H.; Morlett C., J. A.; Montel, D. y Rodríguez H., R. (2015). Importancia de las levaduras no- *Saccharomyces* durante la fermentación de bebidas alcohólicas. Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. 65:73- 79.
- Cervantes- Contrera, M. y Pedroza, A. M. (2008). Caracterización microbiológica del pulque y cuantificación de su contenido de etanol mediante espectroscopia Raman. *Superf. Vacío* 21: 1- 5.
- Chiang, Y.; Chye, F. y Mohd, I. (2006). Microbial diversity and proximate composition of Tapai a Sabah's fermented beverage. *Malaysian Journal of Microbiology* 2 (1): 1-6.

- Cordero B., G.; Arollo, T.; Serrano, A.; Tello, J.; Aporta, I; Vélez, M. D. y Valero, E. (2001). Influence of the farming system and vine variety on yeast communities associated with grape berries. España. *International Journal of Food Microbiology* 145 (1): 132- 139.
- Coutiño, B.; Belmares, R.; Rodríguez, R.; Aguilar, C. y Ruelas, X. (s/d). Bebidas fermentadas obtenidas de palmas. Universidad Autónoma de Coahuila, México. 21 pp.
- Coutiño, B.; Rodríguez, R.; Belmares, R.; Aguilar, C. y Ruelas, X. (2015). Selección de la bebida “taberna” obtenida de la palma *Acrocomia aculeata* y análisis químico proximal. *Multiciencias*. 15 (4): 397- 409.
- De la Llata L., Ma. D. (2003). Ecología y medio ambiente. Editorial Progreso S. A. de C. V. México. 233 pp.
- Díaz M., Ma. G.; Farrera S., O. e Isidro V., Ma. A. (2011). Estudio etnobotánico e los principales mercados de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. *Lacandonia* 5 (2): 21-42.
- Dragone, G.; Mussato, S. I.; Oliveira, J. M. y Teixeira, J. A. (2009). Characterisation of volatile compounds in an alcoholic beverage produced by whey fermentation. *Food Chemistry*. 112: 929- 935.
- Escobedo G., J. y Trujillo R., L. J. (2016). Elaboración de Recetario de Productos a base del Dulce de Coyol (*Acrocomia mexicana*). Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Licenciado en Gastronomía. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. 86 pp.
- Espinosa, C. I. (2016). Análisis multivariante de la comunidad. s/d. 39 pp.
- Farrás, R. P. I. y Juárez G., A. (1997). Bioquímica de los microorganismos. Reverté. 404 pp.
- Farrera S., O. (1997). Plantas útiles en el ejido Quintana Roo, Jiquipilas, Chiapas. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Título de Licenciatura en Biología.

- Fernández-Espinar, M. T.; Martorell, P.; De Llanos, R. y Querol, A. (2006). Molecular Methods to Identify and Characterize Yeasts in Foods and Beverages en Amparo Querol, Graham H. Fleet. Yeast in Food and Beverages. Springer-Verlag. Berlín. 82 pp.
- Flores H., L. E. y Farrera-Sarmiento, O. (2007). Estudio etnobotánico de algunos cacaoatales en Pichucalco, Chiapas, México. En *Lacandonia*. Revista de Ciencias de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. 7(7).
- García A., B. (2014). Microbiología Residual en vinos tintos. Facultad de Ciencias, Estudios Agroalimentarios e Informática. 60 pp.
- García B., J. A.; Toledano C., J. D.; Domínguez C., A. J.; Zabala F., C. y Ocaña S., C. (2010). Cepa de *P. kluyveri* y sus aplicaciones. Universidad Pablo de Olavide, Grupo Hespérides Biotech, S. L.
- García L., D. (2010). Aislamiento de microorganismos probióticos a partir de bebidas fermentadas: (agua miel, pozol y sotol). Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Licenciatura en Ciencia y Tecnología de Alimentos. México.
- Garrido P., A. y Teijón R., J. Ma. (2006). Fundamentos de Bioquímica metabólica. 2ª. edición. Editorial Tébar, S. L. España. 422 pp.
- Gastronomía Costarricense. (2013). La chica y el vino de coyol. Consultado: 26 de febrero de 2017.
- Gil, J. (1997). Variables con Influencia Ecológica de interés Biotecnológico en la elaboración y fracción volátil del vino. Tesis de doctorado. Universidad de Valencia. España. 141 pp.
- Godoy, A.; Herrera, T. y Ulloa, M. (2003). Más allá del Pulque y el Tepache. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 107 pp.
- Gómez T., G. (2014). Método de extracción de la taberna. Trabajo de titulación (Licenciado en Gastronomía). Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas.

- Gómez- Zamora, O.; De Jesús- Fuentes, K. I.; Peñafiel- López, F. y Tovar- Hernández, P. (2016). Perfil químico y organoléptico de los compuestos volátiles del mezcal. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*. Vol. 1(1): 916- 923.
- González L., M. (2014). Caracterización bioquímica y biotecnológica de la levadura “*Saccharomyces cerevisiae*” GL15. Universidad de la Rioja. 60 pp. Banda S., P.; Barrera N., A.; Martínez C., J.; Pérez P., I.; Lezama R., N. Rayas B., M. D. Picon M., J. V.; Torres G., M. J.; Díaz S., S. y Sepúlvera A., J. (2015). Tepache: una bebida artesanal. Unidad Profesional Interdisciplinaria de Ingeniería Campus Guanajuato. México.
- González P., A. (2014). Identificación molecular y métodos de conservación de levaduras y hongos filamentosos de muestras provenientes de Antártida. Tesis de Licenciatura en Ciencias Biológicas. Departamento de Biociencias, Facultad de Química. Universidad de la República.
- Gotelli, N. J. y Ellison, A. M. (2013). *A primer of Ecological Statistic*. 2ª. edición. Sinauer Associates, Inc. EU. 614 pp.
- Guerrero, G. (2012). Enciclopedia Guerrerense. [en línea]. Disponible en web: <http://www.encyclopediagro.org>. [Consultado el: 10 de junio 2016].
- Gutiérrez L., C. (2017). Taxonomía de levaduras de origen enológico por espectrometría de masas. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Ciencias Químicas. Departamento de Química Analítica. España. 385 pp.
- Gutiérrez M., M. de J. (2006). Plantas comestibles y medicinales de una comunidad zoque de Copainalá. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Título de Licenciatura en Biología.
- Harris, D. C. (2007). *Análisis químico cuantitativo*. 3ª. edición. Editorial Reverté. España. 579 pp.
- Hernández, A. (2003). *Microbiología Industrial*. Editorial Universidad Estatal a Distancia. s/d. 269 pp.
- Hidalgo, T. J. (2003). *Tratado de Enología*. España: Mundi-Prensa, 478-494,

- Holguín H., M. S; Fula A., A.G. (2010). Desarrollo de una bebida fermentada con adición de cocción de maíz. Trabajo de grado presentado para obtener el título de especialista en ciencia y tecnología de alimentos, Bogotá, pp. 2-32. (Documento en línea). Disponible: <http://www.bdigital.unal.edu.co/2387/1/107391> 2010. pdf. [Consulta: 28/07/2016].
- Koleff, P. (2005). Conceptos y medidas de la diversidad beta en: Sobre Diversidad Biológica: El significado de las Diversidades alfa, beta y gamma. España. 39 pp.
- Korabecna, M. (2007). The variability in the Fungal Ribosomal DNA (ITS1, ITS2, and 5.8S rRNA gene): Its Biological MEaning and Application in Medical Mycology. Communicating Current Research and Educational Topics and Applied Microbiology. 783- 787.
- Kurztman, P. y Fell. J. W. (1998). The Yeast a taxonomic study. 4ª. edición. Elsevier. 1016 pp.
- Lambais, M. R.; Lucheta, A. R. y Crowley, D. E. (2014). Bacterial Community Assemblages Associated with the Phyllosphere, Dermosphere, and Rhizosphere of Tree Species of the Atlantic Forest are Host Taxon Dependent. *Microb Ecol.*
- Lentz, D. L. (1990). *Acrocomia mexicana*: Palm of the ancient Mesoamericans. *Etnobiol* 10(2): 183- 194.
- Linares Sicilia, Ma. J. y Solís Cuesta, F. (2007). Identificación de Levaduras. Revista Iberoamericana de Micología. 1-11.
- López- Arboleda, W.; 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. Vol. 2:2.
- López- González, E. e Hidalgo S., R. (2010). Escalamiento Multidimensional No Métrico. Un ejemplo con R empleando el algoritmo SMACOF. Estudios sobre educación, 18: 9- 35.

- Lozares C., C. y López R., P. (1991). El Análisis de Componentes Principales: Aplicación al análisis de datos secundarios. Universidad Autónoma de Barcelona. Papers 37, 31- 63.
- Luna A., J. (2017). De taberna y otros desvarios. Consultado: 26 de febrero de 2017.
- Madigan, M. T.; Martinko, J.M. y Parker, J. (1999). Brock. Biología de los Microorganismos. 8ª. edición. Prentice Hall. España. 986 pp.
- Maldonado-Mares G. (1992). Frutas Tropicales de Tabasco, Centro de Investigación de Ciencias Biológicas Unidad Sierra, Editorial Impresory Distribuidora S.A., Villahermosa, Tabasco. p.100.
- Margalef, R. (1998). Ecología. Edición Omega. España. 951 pp.
- Mariscal, A. (2013). La taberna, una bebida ancestral. *Chiapas Paralelo*.
- Martínez- Trujillo, A.; Aranda, J. S. y Aguilar- Osorio, G. (2012). Producción de Pectinasas por *aspergillus flavipes* FP- 500 en cultivo alimentado. *BioTecnología* 16 (2): 47- 66.
- Mayorga M., F. y De la Cruz, S. (2000). Recetario zoque de Chiapas: Cocina indígena y popular de México. Consejo Nacional para la Cultura y las Artes. 171 pp.
- Mayorga y Mayorga, F. (2012). De la Chicha al Ron Izapa. *Chiapas life* 2 (2): 32- 33.
- Mesas, J. M. y Alegre, M. T. (1999). El papel de los microorganismos en la elaboración del vino. *Ciencia y Tecnología Alimentaria* 2 (4): 174- 183.
- Molina R., Ma. 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. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Licenciatura en Biología. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. 62 pp.
- Mondragón R., M. A. (2015). Creación de 10 recetas con Taberna de la Palma de Coyol (*Acrocomia aculeata*). Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Licenciatura en Gastronomía. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. 60 pp.
- Moreno, C. E. (2001). Métodos para medir la biodiversidad. CYTED. España. 83 pp.

- NOTIMEX. (2011). Impulsan cultivo de palma de coyol en comunidades de Chiapas.
- Obire O. (2005). Activity of yeast species in palm sap obtained from three areas in Edo state, Nigeria. *J Appl Sci Environ Manage*; 9: 25-30.
- Ocón S., Ma. E. (2015). Diversidad de levaduras no- *Saccharomyces* en diferentes ecosistemas vitivinícolas. Universidad de la Rioja. 177 pp.
- Okafor, N. (1975). Preliminary microbiological studies on the preservation of palm wine. *Journal of Applied Bacteriology* 38, 1-7.
- Orantes- García, C.; Miceli M., C. L; Garrido R, E. R. y Pérez F., M. A. (2010). Estudios de latencia en la germinación de *Acrocomia mexicana* Karw (coyol). En Reyes E. F. Biodiversidad y Sustentabilidad. Colección jaguar. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. 91- 105.
- Orbera R., T. (2004) Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico. *Revista Iberoamericana de Micología*, 21: 15- 19.
- Palacios (2006). En: "Determinación del tiempo de crecimiento exponencial de levaduras *Saccharomyces carlsbergensis* , en tanques verticales cilindro cónico, en la fase de fermentación del proceso de elaboración de cerveza pilsener, cervecería nacional S. A. Planta Quito. Título de Ingeniería en Alimentos. Universidad Tecnológica Equinoccial. Quito. 64 pp.
- Parras H., R. A. (2010). Bacterias Ácido Lácticas: Papel Funcional en los Alimentos", Facultad de Ciencias Agropecuarias. Vol. 8. pp. 93-105.
- Ponce, M. y Bermeo, M. (2011). Aprovechamiento de levadura recuperada de la fermentación en destilería. Tesis de Ingeniería. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Ecuador. 67 pp.
- Puerta Quintero, G. I. (2010). Fundamentos del proceso de fermentación en el beneficio del café. Avances técnicos Cenicafé. Colombia. 12 pp.
- Relloso, Ma. S.; Nievas, J.; Fares T., S.; Farquharson, V.; Mujica, Ma. T.; Romano, V.; Zarate, M. S. y Smayevsky, J. (2015). Evaluación de la espectrometría de



masas: MALDI- TOF- MS para la identificación rápida y confiable de levaduras. *Revista Argentina de Microbiología* 47 (2): 103- 107.

Ríos A., A. (2006). Plantas medicinales del ejido Monterrey, municipio de Villa Corzo, Chiapas. México. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Título de Licenciatura en Biología.

Roca, P.; Oliver, J. y Rodríguez, A. Ma. (2003). Bioquímica, técnicas y métodos. Editorial Hélice. España. 347 pp.

Rodríguez- Álvarez Jane, A, Mancilla- Castillo Esmeralda A, Cruz- Rodríguez Rosa I. Martínez- Beltrán Ma. Magdalena, Ventura- Caseco L. Ma. Cristina, Hidalgo- Morales Madeleine, Vega- Villa Victor M, Ayora- Talavera Teresa del R. (2008). La Taberna ¿Posible probiótico? Laboratorio de Biotecnología, Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica, Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez. Facultad de Medicina Humana. UNACH.

Salgado-Delgado, J. A.; Francisco- Morales, J. Y.; Martínez- Ayala, I. G.; Navez- González, D. y Huerta- Beristain, G. (2016). Diversidad bacteriana durante la fermentación de la tuba. *Alimentos. Foro de Estudio sobre Guerrero* 2 (3): 65- 68.

Sánchez F. I.; Guerrero S., F. y Castellanos V., M. A. (2005). Ecología. Umbral Editorial S. A. de C. V. México. 32 pp.

Santiago-Urbina, J. A. y Ruíz- Terán, F. (2014). Microbiology and biochemistry of traditional palm wine produced around the world. *International Food Research Journal* 21(4): 1261- 1269.

Santiago-Urbina, J. A.; Arias- García, J. A. y Ruíz- Terán, F. (2014). Yeast species associated with spontaneous fermentation of taberna, a traditional palm wine from the southeast of Mexico. *Ann Microbiol.*

Santiago-Urbina, J. A.; Verdugo-Valdez, A. G. y Ruíz-Terán, F. (2013). Physicochemical and microbiological changes during tapping of palm sap to produce an alcoholic beverage called "taberna", which is produced in the south east of Mexico. *Food Control* 33: 58-62.

- Schuller, D., Alves, H., Dequin, S., Casal, M. (2005). Panorama ecológico de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* en un viñedo de la región Vino Verde en Portugal. *Revista internet de vinicultura y enología*. Braga, Portugal. 10(2):1-16.
- Segura, 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*, Vol. 8, 1- 12 pp.
- Skoog, D. S.; West, D. M. y Holler, F. J. (1997). *Fundamentos de química analítica volumen 2*. Editorial Reverte S. A. España. 604 pp.
- Stringini, M.; Comitini, F.; Taccari, M. y Ciani, M. (2008). Yeast diversity in crop- growing environments in Cameroon. *International Journal of Food Microbiology* 127: 184- 189.
- Toledo E., X. E. (2014). *Micropropagación y Genética del Paisaje de Acrocomia aculeata* (Jacq. Lodd. ex Mart.) en Chiapas, conocimiento para su manejo. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. 95 pp.
- Torija M., Ma. J. (2002). *Ecología de Levaduras: Selección y adaptación a fermentaciones vínicas*. Universitat Rovira I Virgili. 260 pp.
- Tortora, G. J.; Berdell, R. F. y Case, C. L. (2007). *Introducción a la microbiología*. Ed. Médica Panamericana. 959 pp.
- Valcárcel C., M. y Gómez H., A. (1988). *Técnicas Analíticas de Separación*. Editorial Reverté S. A. España. 779 pp.
- Vázquez, M. (2012). *La taberna, tradicional bebida de Chicomuselo*.
- Velázquez, L. I. (2012). *El último tabernero*.
- Verdugo V., A. G. (2013). *Caracterización de las levaduras asociadas al proceso fermentativo del mezcal*. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma de México. México. 159 pp.
- Villalobos C., W. (2014). *Coyoleros de Nambi: Luchando por la tradición*. La voz de Guanazaste. Consultado: 26 de febrero de 2017.

- Waters The Science of What's Possible. Guía para principiantes de Cromatografía Líquida. En línea: [http://www.waters.com/waters/es\\_MX/HPLC---High-Performance-Liquid-Chromatography-Explained/nav.htm?cid=10048919&locale=es\\_MX](http://www.waters.com/waters/es_MX/HPLC---High-Performance-Liquid-Chromatography-Explained/nav.htm?cid=10048919&locale=es_MX) Consultado el: 18 de octubre de 2017.
- Yarrow, D. (1998). Method of isolation, maintenance and identification of yeasts. En: Kurtzman, C. P. y J. W. Fell (eds.). *The Yeast. A Taxonomic Study*. Pp 77-100. Elsevier Science Publishers Amsterdam.
- Zuart- Macías, J. L.; Ponce- Díaz, P.; Santiago- Marroquín, G. y Quiroga- Madrigal, R. (1999). Coyol Palm (*Acrocomia mexicana*), a phylogenetic resource from Chiapas, México.
- Matus, L. (2010). Crean bebida sabor taberna para evitar extinción de palma. [Consultada en línea: 13 de marzo de 2016].
- Whitmore T.C. (1978). Gaps in the forest canopy. En: Tomlinson P. B. y Zimmerman M.H. Eds. *Tropical Trees as Living Systems*, pp. 639-655, Cambridge University Press, Nueva York.
- Pickett S.T.A., Collins S.L. y Armesto J.J. (1987). A hierarchical consideration of causes and mechanisms of succession. *Vegetation* 69:109-114.
- Esteve-Zarzoso, B. Belloch C., Uruburu F. y Querol A. (1999). Identification of yeast by RFLP analysis of the 5.8 S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Int J Syst Bacteriol* 49(1): 329- 337.
- Banda S., P.; Barrera N., A.; Martínez C., J.; Pérez P., I.; Lezama R., N. Rayas B., M. D. Picon M., J. V.; Torres G., M. J.; Díaz S., S. y Sepúlvera A., J. (2015). Tepache: una bebida artesanal. Unidad Profesional Interdisciplinaria de Ingeniería Campus Guanajuato. México.
- Valcárcel C., M. y Gómez H., A. (1988). *Técnicas Analíticas de Separación*. Editorial Reverté S. A. España. 779 pp.

Ramírez Hernández, B. C.; Zañudo Hernández, J.; García de Alba Verduzco, J. E.; Délano Frier, J. P. Pimienta Barrios, E. y García Martínez, M. A. 2013. Importancia agroecológica del coyul (*Acrocomia mexicana* Karw. ex Mart.) 21 (41): 57- 113.

## 12. Anexos.

### 12.1. Cuadros.

Cuadro 1. Ciclos de Reacción para PCR. Esteve- Zarzoso *et al.* (1999) con modificaciones de Verdugo (2011).

Reacción.	Ciclos.	Temperatura.	Tiempo.
Desnaturalización inicial.	1	95 °C.	20 minutos.
Desnaturalización.	35	94°C.	1 minuto.
Hibridación.	1	55.5 °C.	2 minutos.
Extensión final.	1	72 °C.	10 minutos.
Conservación.	-	-4 °C	∞

Cuadro 2. Enzimas de Restricción utilizadas para el análisis de los Polimorfismos de Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP). (Verdugo *et al.*, 2011).

Enzima.	Secuencia de corte.
HhaI.	<b>G CGvC</b> <b>CvGC G</b>
HaeIII.	<b>GGvCC</b> <b>CCvGG</b>
Hinfl.	<b>G vANT C</b> <b>C TNAv G</b>

Cuadro 3. Índices Clásicos para medir la diversidad alfa (Diversidad local). (Cordero et al., 2011; Moreno, 2001).

Índice.	Descripción.	Cálculo.
<b>Dominancia.</b>	Inverso del índice de Simpson.	$1-D=1- \sum pi^2$
<b>Simpson.</b>	Abundancia proporcional. Probabilidad de que dos individuos sacados al azar de una muestra correspondan a la misma especie (Dominancia).	$\lambda= \sum pi^2$
<b>Shannon-Wiener.</b>	Índica que tan uniformes están representadas las especies (Equitatividad).	$H' = \sum pi \ln pi$

Donde pi es la abundancia proporcional de cada especie;  $\sum$  es la sumatoria.

Cuadro 4. Cuadro descriptivo de los principales compuestos químicos que fermentan, asimilan o no son asimilables, por las especies identificadas en el presente estudio.

Especie.	Fermenta.	Asimila.	No asimila.	Fuente.
<b><i>P. kluyveri</i></b>	Glucosa.	Citrato.	Galactosa.	García et al., 2010.
		D- glucosamina.	Sacarosa.	
		N- acetil- D- glucosamina.	Maltosa.	
		Etanol.	Rafinosa.	
		Glicerol.	Trehalosa.	
			D- glucitol.	
			L- sorbosa.	
			Celobiosa.	
			Lactosa.	
			Melobiosa.	
			Inulina.	
			L- arabinosa.	

D. ribosa.  
 L- ramnosa.  
 Metanol.  
 Eritritol.  
 Ribitol.  
 Galactiol.  
 D- manitol.  
 Salicina.

***I. orientalis.*** Glucosa. Gkucosa. Galactosa.  
 D- L- sorbosa.  
 Glucosamina. Sacarosa.  
 N- acetyl- D- Maltosa.  
 glucosamina. Celobiosa.  
 Etanol. Trehalosa  
 Glicerol Lactosa.  
 DL- Lactato. Melibiosa. Kurtzman y  
 Succinato. Rafinosa. Fell, 1998.  
 Citrato. Meleziosa.  
 D- xilosa.  
 L- Arabinosa.  
 D- Arabinosa.  
 D- Ribosa.  
 L- Rhamnosa.  
 Metanol.  
 Erithritol.  
 Ribitol.  
 Galactitol.  
 D- Manitol.  
 D- Glucitol.

---

Salicinil.  
D- Gluconato.  
Inositol.  
Hexadecano.  
Nitrato.

***H. opuntiae***

Glucosa. Glucosa. Galactosa.  
Celobiosa. Celobiosa. L- Sorbosa.  
Salicina. Glucosamina.  
Arbutina. D- Ribosa.  
Glucono-  $\beta$ - D- Xilosa.  
lactona. L- Arabinosa.  
2- D- Arabinosa.  
cetogluconato. L- Ramnosa.  
D- Gluconato. Sacarosa.  
Maltosa.  
Trehalosa.  
Metil-  $\alpha$ - D-  
Glucosido.  
Melibiosa.  
Lactosa.  
Rafinosa.  
Melecitosa.  
Almidón.  
Glicerol.  
Eritritol.  
Ribitol.  
Xilitol.  
L- Arabinitol.  
D- Glucitol.  
D- Manitol.  
Galactitol.

Kurtzman y  
Fell, 1998.



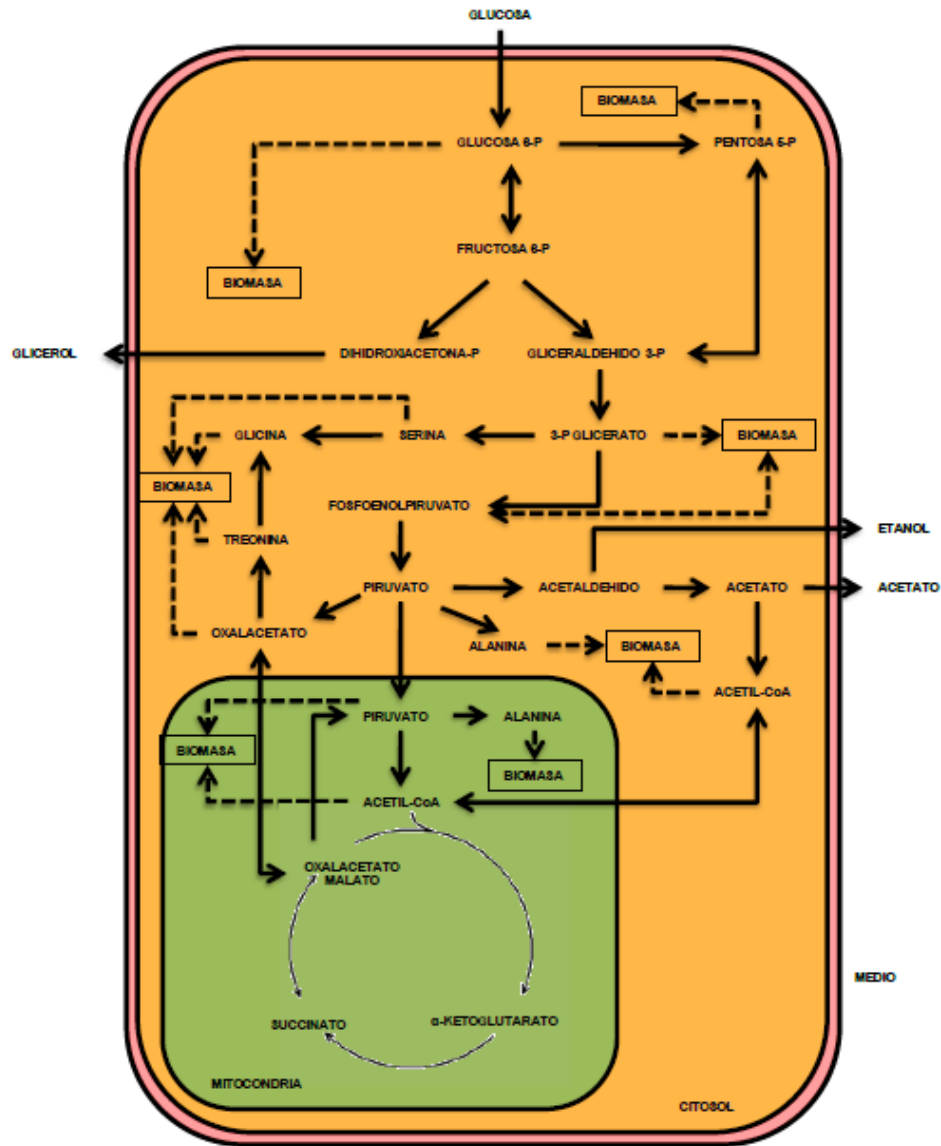
			Mioinositol.	
			D-	
			Glucuronato.	
			D-	
			Galacturonato.	
			D- lactato.	
			Succinato.	
			Citrato.	
			Metanol.	
			Etanol.	
<b>S.</b>	Glucosa.	Glucosa.	L- Sorbosa.	
<b><i>cerevisiae</i></b>	Galactosa.	Sacarosa.	Celobiosa.	
	Maltosa.	Maltosa.	Lactosa.	
	Sacarosa.	Trehalosa.	D- Xylosa.	
	Rafinosa.	Rafinosa.	L- Arabinosa.	
		Etanol.	D- Arabinosa.	
			D- Ribosa.	
			L- Rhamnosa.	
			D-	
			Glucosaina.	Kurtzman y
			N- Acetyl- D-	Fell, 1998;
			glucosamina.	González,
			Metanol.	2014.
			Glicerol.	
			Erythritol.	
			Ribitol.	
			Galactitol.	
			D- Manitol.	
			D- Glucitol.	
			Salicin.	
			Citrato.	

Inositol.  
Hexadecano.  
Nitrato.

Cuadro 5. Propiedades organolépticas (notas aromáticas) de compuestos químicos de interés en procesos fermentativos.

<b>Bebida.</b>	<b>Compuesto</b>	<b>Otras denominaciones.</b>	<b>Nota aromática</b>	<b>Referencia.</b>
<b>Mezcal.</b>	Ácido acético.		Vinagre.	Gómez-Zamora et al., 2016.
<b>Mezcal.</b>	Acetaldehído.	Etanal	Jerez, hojas verdes.	Gómez-Zamora et al., 2016.
<b>Mezcal.</b>	Octanoato de etilo.		Fruta madura, dulce, pera.	Gómez-Zamora et al., 2016.
-	Acetato de Etilo.		Solvente de frutas	Dragone et al., 2009.
-	Isobutanol.	2- metil-Propanol.	1- Alcohol, banana, medicinal, solvente.	Dragone et al., 2009.
-	Propanol	1- Propanol.	-	Dragone et al., 2009.

## 11.2. Figuras.



(Arratia, 2009).

Figura 1. Rutas metabólicas aeróbicas y anaeróbicas de la degradación de la glucosa y su excreción como etanol, glicerol y acetato en *Saccharomyces cerevisiae*.



A la izquierda corte de la palma de coyol; a la derecha limpieza de espinas y hojas para disponer al tallo a reposo con el fin de abrir posteriormente la canoa.



A la izquierda, abertura de la Canoa para la emanación de la savia; a la derecha, extracción de la Taberna.



A la izquierda, limpieza de la Canoa para la extracción de la savia; a la derecha, recipiente de plástico con Taberna.

Figura 2. Proceso de manipulación y seguimiento del proceso fermentativo para la obtención de Taberna.

### 11.3. Formatos.

Formato 1. Cuadro descriptivo de campo, para la toma de muestras, donde se especifica de manera general las abundancias en caja, pH y temperatura, así como otros datos de interés.

<b>Registro.</b>	<b>Descripción.</b>
<b>No. de muestra.</b>	
<b>Día de muestreo.</b>	
<b>Número de Palma.</b>	
<b>Dilución.</b>	
<b>Número de réplica.</b>	
<b>Volumen Inoculado.</b>	
<b>UFC en caja.</b>	
<b>UFC/mL.</b>	
<b>pH.</b>	
<b>Temperatura de la bebida</b>	
<b>Fecha.</b>	
<b>Hora.</b>	

Formato 2. Caracteres morfológicos macroscópicos y microscópicos utilizados para la identificación de levaduras de interés en procesos fermentativos espontáneos.

	<b>Caracteres</b>	<b>Estados</b>	<b>Descripción</b>
<b>MACROS-CÓPICOS</b>	<b>Textura</b>	Mucoide	Semejante a la mucina
		Fluido o Viscoso	
		Butiroso	Mantecoso
		Friable	Se desmenuza fácilmente
		Membranoso	
	<b>Color de colonia</b>	Amarillo	
		Naranja o rojo	
		Blanco	
	<b>Superficie</b>	Crema	
		Brilloso	

<b>MICROS-CÓPICOS</b>	<b>Elevación</b>	Opaco o mate				
		Liso				
		Áspera				
		Sectorizada				
		Doblada				
		Hirsuto	Áspero, duro y tieso			
		Plano				
		Hundido en el centro				
		Elevado				
		Cónico				
	<b>Margen</b>	Entero				
		Ondulado	Forma ondas			
		Lobulado	Forma de lóbulo			
		Eroso	Irregular con muescas o dentada como roída			
		Franjas con hifas o pseudohifas				
	<b>Anillo</b>	Presencia o ausencia				
		<b>Color de anillo</b>	Amarillo			
	Naranja o rojo					
	Blanco					
	Crema					
Verde						
<b>Reproducción</b>	<b>Gemación</b>					
	<b>Por posición del sitio donde se produce</b>				Monopolar	
					Dipolar	
					Multipolar	
	<b>Forma de las células</b>	<b>Fisión</b>				
			<b>Balistoconidios</b>			
			Globosas			
			Subglobosa			
			Elipsoidal			
			Ovoideo			
			Obvoideo			
			Cilíndrica			
			Botuliforme			
Baciliforme						
Alargada						
Apiculada						
Ogival						
Lunático						
Triangular						

<b>Agrupación</b>	Único
	Parejas
	Racimos

Formato 3. Entrevista realizada a productores de Taberna, principalmente para conocer el proceso fermentativo de forma detallada.

**Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Instituto de Ciencias Biológicas.  
Maestría en Ciencias en Biodiversidad de Ecosistemas Tropicales.**

**Lugar:** \_\_\_\_\_ **Fecha:** \_\_\_\_\_  
**Nombre:** \_\_\_\_\_  
**Edad:** \_\_\_\_\_ **Domicilio:** \_\_\_\_\_  
**Sexo:** \_\_\_\_\_ **Escolaridad:** \_\_\_\_\_ **Ocupación:** \_\_\_\_\_  
**Estado Civil:** \_\_\_\_\_ **Ejidatario:** SI NO

**Objetivo:** Evidenciar la importancia y percepciones de la especie vegetal y la bebida tradicional, respecto al manejo y aprovechamiento de la palma.

1. ¿Con que otro nombre conoce a la Palma de Coyal?
2. ¿Qué productos obtiene de la Palma de Coyal?
3. ¿Considera importante la palma de coyol?
4. Podría describirme, como se lleva a cabo cada uno de los productos que obtiene de la palma.
5. ¿Cómo produce la taberna?
6. ¿De dónde obtiene las palmas para elaborar la taberna?
7. ¿Existen muchas palmas para elaborar a mucho tiempo Taberna?
8. ¿En qué temporadas se elabora?
9. ¿Qué tiempo lleva producirla?
10. ¿Cuál es el mejor tiempo para elaborar la taberna?
11. ¿Qué instrumentos utiliza para su elaboración?
12. ¿Con que frecuencia lava las herramientas con las que elabora la taberna?
13. ¿Qué cantidad de taberna se produce al día?
14. ¿Cómo aprendió a elaborar la taberna?
15. ¿En qué estado debe estar la palma para elaborar la Taberna?
16. ¿Vende o consume la taberna que produce?
17. ¿En qué precio dá la taberna si la vende?
18. ¿Consume su familia la taberna?
19. ¿Sus familiares saben producir Taberna?
20. Una vez que termina la producción, ¿Qué hace con la palma?
21. ¿La producción de la taberna es afectada por algún motivo?
22. ¿Qué animales, insectos, plantas, son las que se encuentran mayormente durante la elaboración de la Taberna?
23. ¿Existe alguna creencia que se tenga a la hora de cortar, manejar o elaborar la Taberna?
24. ¿El corte de la palma, está relacionado con la etapa en la que está la luna?
25. ¿Qué problemáticas conoce usted que están relacionadas con el cuidado de la Palma?