



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS
PRESENTES DURANTE LA FERMENTACIÓN NATURAL
DE LA TABERNA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

ANA LAURA VALDÉS FLORES

MÉXICO, D.F.

2014





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Olga del Carmen Velázquez Madrazo

VOCAL: Gloria Díaz Ruíz

SECRETARIO: Francisco Ruíz Terán

1er. SUPLENTE: Martha Giles Gómez

2° SUPLENTE: Norma Angélica Camacho de la Rosa

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

CONJUNTO E, FACULTAD DE QUÍMICA

ASESOR DEL TEMA: DR. FRANCISCO RUÍZ TERÁN

SUSTENTANTE: ANA LAURA VALDÉS FLORES

Contenido

Resumen	1
Capítulo I	2
1. Introducción.....	2
2. Antecedentes	4
2.1 Vino de palma.....	4
2.1.1 Proceso para la obtención de la savia.....	5
2.1.2 Características fisicoquímicas y microbiológicas.....	7
2.2 Bacterias ácido lácticas	14
2.2.1 Metabolismo	15
2.2.2 Funciones.....	17
2.2.2.1. Cultivos iniciadores.....	17
2.2.2.1.1 Ácido láctico.....	18
2.2.2.1.2 Peróxido de hidrógeno.....	19
2.2.2.1.3 Bacteriocinas	19
2.3 Métodos empleados para la identificación y clasificación	20
2.3.1 Métodos tradicionales.....	20
2.3.1.1. Estudios microscópicos.....	20
2.3.1.2. Estudios macroscópicos.....	20
2.3.2.3. Identificación bioquímica	21
2.3.2 Métodos moleculares.....	21
2.3.2.1. Electroforesis en gel en campo pulsado (PFGE)	22
2.3.2.2. Amplificación de ADN polimórfico al azar (RAPD)	23
2.3.2.3 Análisis de restricción de ADN ribosomal amplificado	24
2.3.2.4 Amplificación de fragmentos largos polimórficos (AFLP).....	25
2.3.2.5 Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante	25
2.3.3 Aplicaciones del ARN ribosomal 16S	26
Capítulo II	28
3. Objetivos	28

3.1 Objetivo general	28
3.2 Objetivos particulares.....	28
4. Justificación.....	29
5. Hipótesis.....	30
Capítulo III.	31
6. Desarrollo experimental	32
6.1 Obtención de las cepas aisladas de Taberna	32
6.2 Selección de cepas puras	32
6.3 Extracción de ADN	32
6.4 Determinación de la concentración y pureza de ADN	34
6.5 Agrupamiento de las BAL por RAPD-PCR	34
6.6 Amplificación de la región V1 del gen ARNr 16S	36
6.9 Condiciones de electroforesis.....	38
6.8 Secuenciación de la región V1 del ARNr 16S.....	39
Capítulo IV.	40
7. Interpretación de resultados	40
7.1 Aislamiento de cepas de bacterias ácido lácticas	40
7.2 Extracción de ADN	41
7.3 Amplificación de la región V1 del gen ARNr 16S	47
7.4 Digestión del producto de PCR con enzimas de restricción.....	48
7.5 Secuenciación de la región V1 del gen ARNr 16S.....	51
7.5 Variación de la comunidad bacteriana	52
8. Conclusiones.....	58
9. Perspectivas.....	59
10. Bibliografía.....	60
Apéndice A	69
Apéndice B	70
Apéndice C	72
Apéndice D	75

Resumen

La Taberna es un vino de palma obtenido por medio de la fermentación natural de la savia extraída de la palma de coyol. Durante el proceso de producción participan diversos grupos microbianos, tales como levaduras, bacterias ácido lácticas y bacterias ácido acéticas. En este estudio se aislaron 210 cepas de bacterias ácido lácticas (BAL) durante 15 días de producción a partir de tres palmeras diferentes. Las BAL fueron seleccionadas mediante tinción de Gram, observación morfológica a partir de un medio selectivo Agar MRS y la prueba de catalasa. Posteriormente se agruparon por la técnica de amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD) utilizando dos cebadores (GTG)₅ y M13 y se comprobó su discriminación mediante análisis de restricción de amplificación ribosomal (ARDRA). Por medio de la secuenciación de la región V1 del gen ARNr 16S se encontraron las siguientes BAL: *Fructobacillus fructosus*, *Fructobacillus durionis*, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc citreum*, *Leuconostoc mesenteroides* y *Leuconostoc fallax*. La población de BAL en cada palmera fue diferente, así como también las cepas de BAL variaron de acuerdo al tiempo de fermentación en una misma palmera.

Capítulo I

1. Introducción

La Taberna es una bebida alcohólica tradicional que se produce y consume en el sureste de México y otras zonas de América Central. Esta bebida se obtiene por medio de la fermentación natural de la savia **extraída de la palma de "coyol" (*Acrocomia aculeata*)** y se caracteriza por su color blanquecino, sabor dulce y efervescencia (Alcántara-Hernández *et al*, 2010; Santiago-Urbina, *et al*, 2013).

La producción de Taberna se lleva a cabo en condiciones no asépticas, al aire libre; por esa razón, la microbiota involucrada en la fermentación es diversa, entre ellas se encuentran bacterias ácido lácticas (BAL), ácido acéticas (BAA) y levaduras responsables de la formación del ácido láctico, ácido acético y etanol, respectivamente (Alcántara - Hernández *et al.*, 2010; Santiago-Urbina, *et al.*, 2013). Los microorganismos presentes en la savia pueden tener diferente origen, tal como el ambiente, las herramientas que se utilizan para raspar la canoa, el tronco, los insectos que son atraídos por el azúcar de la savia. La supervivencia de microorganismos y su crecimiento están relacionados con diversos factores, tales como las variaciones ambientales como la temperatura que oscila entre 35-38°C, humedad; factores químicos, tales como pH que varía de 7 a 4, presencia de nutrientes, etc. (Santiago-Urbina, *et al.*, 2014).

Es importante el estudio de las BAL presentes en la Taberna debido a que algunos grupos de BAL pueden tener un enfoque biotecnológico. Se ha demostrado que las BAL son de gran importancia a nivel industrial como cultivos iniciadores para una serie de alimentos fermentados, tales

como leches fermentadas, productos cárnicos, bebidas alcohólicas, también para la producción de probióticos, biopolímeros y enzimas (Temmerman *et al.*, 2004); ya sea para mejorar la calidad del alimento o añadir beneficios para la salud humana.

Se ha reportado que las BAL se consideran responsables de la producción de ácido láctico, de la acidificación de la savia y la inhibición de las bacterias mesófilas presentes en los primeros días de producción de Taberna. La acción inhibitoria de las BAL se debe a sistemas antagonicos complejos como: la acidificación del medio, la producción de peróxido de hidrogeno, ácidos grasos, bacteriocinas y agotamiento de nutrientes (Vandame *et al.*, 1994).

La metodología clásica para la identificación de las BAL se basa en gran parte en su morfología, en la tinción de Gram, producción de ácido láctico, fermentación de azúcares, carencia para producir catalasa, crecimiento a distintas temperaturas, tolerancia a las sales y resistencia a pH bajo. Sin embargo, los métodos presentan una limitada capacidad discriminativa para algunas especies similares. Debido a esto se comenzó a emplear técnicas basadas en la detección de polimorfismos de ADN entre especies; y se diferencian por su capacidad discriminatoria del rango dinámico de taxonomía, reproducibilidad, facilidad de interpretación, y normalización (Vandame *et al.*, 1994).

2. Antecedentes

2.1 Vino de palma

El vino de palma es una bebida alcohólica fermentada tradicional que es consumido por más de 10 millones de personas en diversas zonas de África Occidental, en frecuencias bajas en Asia y América del sur (Mbuagbaw *et al.*, 2012). Para la producción del vino de palma en algunas zonas de África, se utilizan diversas especies del género *Palmae* (Okafor, 1978), tales como: *Elaeis guineensis*, *Raphia hookeri*, *Phoenix dactylifera*, *Borassus akeassi*, *B. aethiopum* y *Cocos nucifera*. En Asia se emplea la especie *B. flabellifer*, mientras que en América del sur se utiliza la palma de coyol *Acronomia aculeata* (Ouoba *et al.*, 2012).

El vino de palma recibe diferentes nombres de acuerdo al país de origen, por ejemplo, Matango, Fitchuk y Mbu en Camerún, Doka en Ghana, Toddy en la India, Emu en Nigeria, Lambanog en Filipinas, Culloo Panam en China, vino de "coyol" y Taberna en América del Sur, entre otras como, Ogogoro, Nsafufuo, Nsamba, Mnazi, Yongo, Tua o Tubak (Ouoba *et al.*, 2012; Mbuagbaw *et al.*, 2012).

Estas palmas además de emplearse para la producción del vino de palma, también producen frutas comestibles, azúcares, y se usan para producir materiales de construcción, aceite, cera, almidón, etc. (Umerie, 2000). En algunos lugares la savia es utilizada para la producción de ginebra y vinagre (Ouoba *et al.*, 2012).

En el sur de México, el vino de palma se conoce con el nombre de Taberna; una bebida alcohólica tradicional producida por la fermentación natural de la savia extraída de la palma de "coyol" (*Acrocomia aculeata*)

y se caracteriza por su color blanquecino, sabor dulce y efervescencia (Alcántara-Hernández *et al.*, 2010).

2.1.1 Proceso para la obtención de la savia

El proceso de producción de Taberna consiste en elegir a las palmas con una edad entre 10 y 14 años (Santiago-Urbina *et al.*, 2013).

En algunos países, la savia se extrae de palmeras vivas o en pie, de la inflorescencia, donde perforan la parte superior del árbol (Figura 1). Mientras que en otros lugares la palmera es cortada y colocada horizontalmente antes de la extracción de la savia (Ouoba *et al.*, 2012).



Figura 1. Proceso de obtención de la savia en palmas vivas o en posición vertical (Mbuagbaw *et al.*, 2012).

El proceso en posición horizontal lo detallan Santiago-Urbina *et al.* (2013) para obtener la savia de “coyol” (Figura 2).

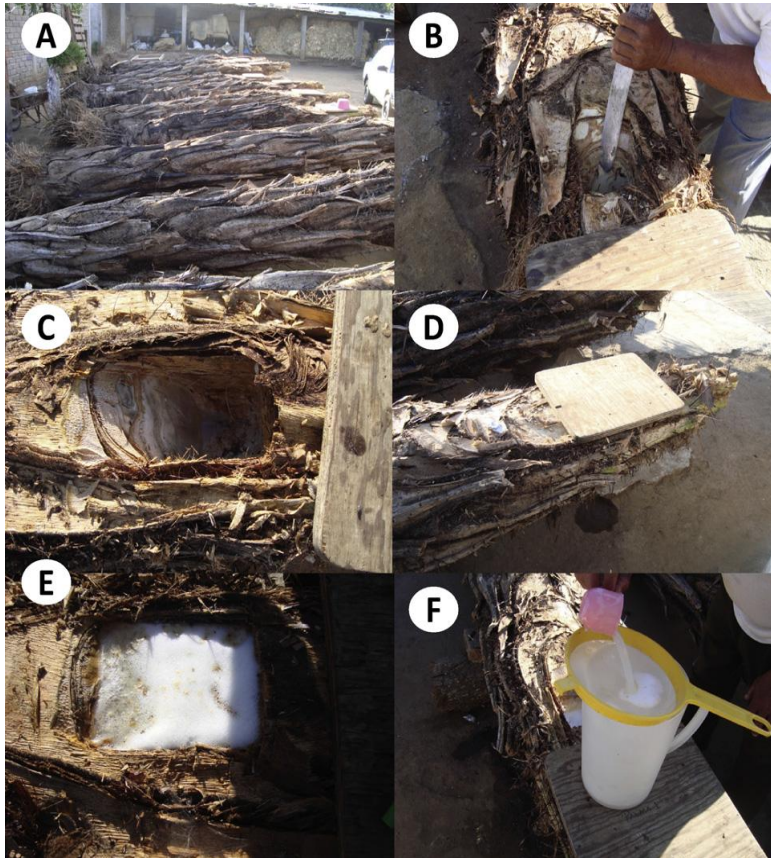


Figura 2. Proceso para la obtención de la savia. A) Tronco cortado colocado horizontalmente; B) corte rectangular; C) "canao"; D), "canao" cubierta con una tabla de madera; E) savia acumulada en la "canao"; F), colecta de savia (Santiago-Urbina *et al.*, 2013).

El proceso para la extracción de la savia inicia desde el momento del corte de la palma, posteriormente al tronco cortado se le retiran las hojas, se eliminan las espinas y se coloca en posición horizontal (Figura 2A). En la parte apical de la palmera se realiza un receptáculo llamado "canao" (Figura 2C). El receptáculo se hace eliminando la corteza del tallo hasta llegar al "palmito" o corazón. Al inicio de la producción la canoa tiene un tamaño de 5 a 7 cm². La cavidad es cubierta rápidamente con una tabla de madera para evitar la entrada de insectos (Figura 2D). El líquido fluye libremente hasta que la canoa se llena (Figura 2E). Después de 12 horas la savia es colectada de la canoa (Figura 2F), esta savia puede ser consumida inmediatamente o bien almacenarse para seguir con el proceso de fermentación para su posterior venta. Posteriormente, las paredes del receptáculo son raspadas, esta operación aumenta el tamaño de la canoa a 1cm² por día

hasta llegar a tener un hueco con dimensiones de 10 a 15 cm² (Santiago-Urbina *et al.*, 2013).

El proceso de producción de la Taberna es similar a una fermentación por lote alimentado; es decir, la savia se recolecta cada 12 horas (normalmente por la mañana y tarde) de la canoa y en seguida se inicia un nuevo lote de fermentación con una nueva alimentación de la savia, hasta que la cavidad se llena (Santiago-Urbina *et al.*, 2014). La duración del proceso de fermentación puede abarcar entre 2 y 8 semanas.

2.1.2 Características fisicoquímicas y microbiológicas de la savia de palma.

La savia de palma sin fermentar contiene 11.36% de sacarosa y un pH de 7.25 y presenta un color transparente. La composición fisicoquímica de la Taberna varía de acuerdo a la etapa en que se forma la savia (Tabla 1), puede contener de 0.21 a 4.78% de etanol, 0.05 a 0.48% de ácido láctico, 0.01 a 0.24% de ácido acético y presenta pH de 6 a 4 (Santiago-Urbina *et al.*, 2013).

En los vinos de palma además, del ácido láctico y acético pueden encontrarse otros ácidos orgánicos. Karamoko *et al.* (2012) estudiaron los ácidos orgánicos presentes en el vino de palma *Elaeis guineensis*, donde encontraron los ácidos: ácido oxálico (0.1 g/l), ácido cítrico (0.05 g/l), ácido tartárico (0.31 g/l), ácido málico (0.5 g/l), ácido ascórbico (0.05 g/l), ácido fumárico (0.01 g/l). El tartárico y málico por tener una concentración mayor podría sugerir que estos ácidos son nativos de la savia. Mientras que el ácido acético (0.1 g/l) y láctico (0.15 g/l) no son nativos, se producen durante el proceso fermentativo.

Tabla 1. Características fisicoquímicas de la Taberna durante la fermentación.

Muestras de Taberna	Parámetros						
	pH	Sacarosa (%p/v)	Glucosa (%p/v)	Fructosa (%p/v)	Etanol (% p/v)	Ácido láctico (%p/v)	Ácido acético (%p/v)
1	7.25	11.36	n.d.	0.27	n.d.	n.d.	n.d.
2	6.03	8.21	n.d.	0.3	n.d.	0.26	0.02
3	4.95	7.66	n.d.	0.52	n.d.	0.28	n.d.
4	4.55	5.72	0.23	1.28	n.d.	0.12	0.02
5	4.49	3.05	n.d.	1.87	0.58	0.28	0.09
6	4.47	0.62	0.07	1.21	0.24	0.05	0.01
7	4.64	1.33	0.22	2.61	0.21	0.19	0.04
8	4.55	2.63	0.71	2.35	0.25	0.27	0.03
9	4.34	2.54	2.15	3.3	0.59	0.25	0.09
10	4.3	0.69	2.01	3.54	1.21	0.3	0.14
11	4.18	0.43	0.12	0.91	4.25	0.32	0.13
12	4.21	0.44	0.18	0.75	4.56	0.29	0.16
13	4.24	0.22	0.05	0.58	4.67	0.32	0.2
14	4.07	0.45	0.18	0.72	4.56	0.32	0.14
15	4.04	0.46	0.2	0.84	4.78	0.48	0.24

n.d. no detectado. La muestra no. 1 es el tiempo 0; es decir, savia sin fermentar. La muestra no. 2 es el tiempo 2; tercera colecta de la canoa después de 24 horas de la primera colecta y 12 horas después de la segunda colecta. La muestra no. 3 es el tiempo 3; quinta colecta de la canoa después de 24 horas de la tercera colecta y 12 horas después de la cuarta colecta. Tomada de Santiago-Urbina et al. (2013).

También se han reportado otros azúcares además de la sacarosa, fructosa y glucosa en otros vino de palma, tales como maltosa, xilosa, celobiosa, arabinosa y ramnosa (Santiago-Urbina *et al.*, 2014). Faparusi (1981) menciona que en el vino de palma de *Raphia* los azúcares tales como, la sacarosa, maltosa, glucosa y fructosa están presentes en todas las muestras del vino de palma. Mientras que la xilosa se detecta alrededor del noveno día y la celobiosa se obtiene después de los once

días de producción. Por otro lado, la ramnosa, la arabinosa y el ácido galacturónico aparecen irregularmente durante pocos días.

La fructosa, glucosa y sacarosa son los azúcares presentes en las plantas comunes; sacarosa se ha identificado en el tubo criboso de la palmeras como *Cocos nucifera* y *Phoenix silvestris*. Otros azúcares son conocidos como constituyentes de polisacáridos de plantas. Por ejemplo, la maltosa es un producto de la hidrólisis del almidón, la celobiosa se obtiene de manera similar a partir de celulosa. El ácido galacturónico se puede obtener de una pectina. El xilano es un polisacárido estructural de los tejidos vegetales por lo general asociados con la celulosa que, por hidrólisis, se convierte a la xilosa (Faparusi, 1981).

La savia de palma es un medio rico que facilita el crecimiento de diversos tipos de microorganismos, como mesófilos aerobios, bacterias ácido lácticas, levaduras, coliformes y enterococos, también se han encontrado: *Bacillus spp.*, *Micrococcus spp.* y *Staphylococcus spp.* (Ouoba *et al.*, 2012). El origen de estos microorganismos pueden proceder de varias fuentes: de las frondas, inflorescencia, peciolo de la hoja, herramientas empleadas durante la manipulación y extracción de la savia, los insectos, etc. (Karamoko *et al.*, 2012). Por lo tanto, el crecimiento microbiano dependerá de la disponibilidad y transporte de nutrientes necesarios para la célula y del mantenimiento óptimo de los parámetros medioambientales tales como la temperatura, pH y la aireación (Smith, 2004).

Se han reportado en la Taberna que la población es de levaduras 10^3 y 10^7 y de BAA y BAL es de 10^7 y 10^8 UFC/mL. En la Tabla 2 se menciona cómo varía el crecimiento de la población microbiana durante el proceso de producción de Taberna (Santiago-Urbina *et al.*, 2013). Por esta rica microbiota presente en la savia de palma se llevan a cabo tres

fermentaciones: láctica, alcohólica y acética (Santiago-Urbina *et al.*, 2014).

Tabla 2. Crecimiento microbiano durante la fermentación natural de la Taberna.

Muestra de Taberna	Microorganismos (\log_{10} UFC/mL)				
	Bacterias ácido lácticas	Bacterias ácido acéticas	Levaduras	Mesófilos aerobios	Coliformes totales
1	6.91	7.04	3.67	6.69	5.79
2	7.38	7.01	4.9	6.78	6.08
3	7.82	7.73	6.03	7.25	4.97
4	8.08	7.84	6.94	7.83	4.48
5	7.87	7.85	6.65	7.72	5.07
6	8.17	8.02	6.26	8.12	4.97
7	8.09	7.84	5.93	7.96	5.32
8	7.92	7.67	5.97	7.65	5.11
9	7.09	7.04	6.34	6.98	5.24
10	7.24	6.78	5.97	6.63	4.74
11	6.39	6.5	5.81	5.77	3.65
12	6.19	5.96	4.36	5.78	n.d.
13	5.59	5.42	3.5	5.38	n.d.
14	5.87	5.12	3.39	5.63	n.d.
15	5.48	5.55	3.17	5.43	n.d.

n.d. no detectado. La muestra no. 1 es el tiempo 0; es decir, savia sin fermentar. La muestra no. 2 es el tiempo 2; tercera colecta de la canoa después de 24 horas de la primera colecta y 12 horas después de la segunda colecta. La muestra no. 3 es el tiempo 3; quinta colecta de la canoa después de 24 horas de la tercera colecta y 12 horas después de la cuarta colecta. Tomada de Santiago-Urbina *et al.* (2013).

Cuando la fermentación láctica se lleva a cabo el pH se reduce. El pH es un parámetro que se relaciona con el tiempo de fermentación y la población de BAL y otras bacterias que con sus ácidos contribuyen a reducir el pH. Las BAL predominantes reportadas en vinos de palma

estudiados son *Lactobacillus plantarum* y *Leuconostoc mesenteroides* (Ouoba *et al.*, 2012), estas bacterias se consideran responsables de la rápida acidificación de la savia de coyol por el aumento del ácido láctico, ya que el ácido acético se encuentra en cantidades muy bajas (Amoa-Awua *et al.*, 2006; Santiago-Urbina *et al.*, 2013).

En la Tabla 3 se menciona a las diferentes especies encontradas de BAL en la savia, la diversidad en cada tipo de palma se debe al tipo de palma, la composición química de la savia, tipo y temporada de producción, la naturaleza de la fermentación, la colecta de la savia, el análisis de las muestras (Amoa-Awua *et al.*, 2006, Ouoba *et al.*, 2012).

Tabla 3. BAL encontradas en diferentes palmas de vino

Vino de palma	Bacterias ácido lácticas presentes			
Toddy (<i>Phoenix sylvestris</i>) ¹	<i>Leuconostoc dextranicum</i>	<i>Micrococcus sp.</i>	<i>Pediococcus sp.</i>	
Ghana (<i>Elaeis guineensis</i>) ²	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>		
Taberna (<i>Acrocomia aculeata</i>) ³	<i>Lactobacillus nagelii</i>	<i>Lactobacillus sucicola</i>	<i>Lactobacillus sp.</i>	<i>Fructobacillus sp.</i>
Legmi (<i>Phoenix dactylifera</i>) ⁴	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>		
Banji (<i>Borassus akeassii</i>) ⁵	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Lactobacillus nagelii</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Streptococcus mitis</i>	<i>Fructobacillus sp</i>	

¹ Shamala *et al.*, 1988; ² AmoA-Awua *et al.*, 2007; ³ Alcántara-Hernández *et al.*, 2010; ⁴ Manel *et al.*, 2011;

⁵ Ouoba *et al.*, 2012

Estudios recientes de Ehrmann *et al.* (2009) identificaron una nueva cepa de BAL en la savia de palma de Senegal, a esta cepa la nombraron como *Leuconostoc palmae*. Estos microorganismos son anaerobios facultativos, produce mayor proporción ácido D-láctico (94%), se presentan en forma de cocos de 0.5 a 0.8 mm de diámetro, agrupados en cadenas largas, no móviles; en cultivo líquido las células muestran una fuerte tendencia a la floculación y la sedimentación.

En la Taberna y otras savias de palma la sacarosa es el principal azúcar que se encuentra en mayor cantidad, mientras tanto la fructosa se presenta en bajas concentraciones. Durante la fermentación, la concentración de sacarosa disminuye debido a la reacción de inversión causada por la actividad de la invertasa y el estado ácido del medio por la actividad metabólica microbiana (BAL y levaduras), formando dos monómeros: la glucosa y fructosa (Santiago-Urbina *et al.*, 2013).

El vino de palma cambia de consistencia y color de transparente a blanquecino durante el proceso de producción, debido a que la sacarosa también puede tener un papel en la formación de exopolisacáridos o dextranos en ciertas BAL (Salminen, 2005); además facilita la suspensión de levaduras y BAL dan un aspecto blanco lechoso (Santiago-Urbina *et al.*, 2014).

Así mismo, la disminución de la concentración de la sacarosa puede deberse a la presencia de *Leuconostoc mesenteroides* que participa en la síntesis de dextrano, es decir, la sacarosa se rompe por una enzima inducible asociada a la pared celular; la dextransacarasa que convierte el exceso de sacarosa en glucosa y libera fructosa al medio (Salminen, 2005). La fructosa producida como subproducto de la hidrólisis disminuye debido a que los microorganismos pueden producir a partir

de ella cantidades equimolares de ácido láctico, acético y etanol (Karamoko *et al.*, 2012).

Las BAL del género *Leuconostoc sp.* son microorganismos heterofermentativos de forma cocoide agrupados en pares o cadenas, juegan un papel importante en la fermentación de los productos lácteos, verduras y carnes, dada su capacidad de fermentar una amplia variedad de azúcares (sacarosa, fructosa y glucosa); se caracteriza también por la producción de CO₂, ácido láctico, glucanos y fructanos a partir de la sacarosa (Escalante *et al.*, 2008).

Los coliformes fecales tienden a desaparecer cuando el pH del medio disminuye (Santiago-Urbina *et al.*, 2013). Influye la presencia de BAL, debido que algunas producen peróxido de hidrógeno (Alcántara-Hernández *et al.*, 2010), bacteriocinas y otros compuestos secundarios, que pueden inhibir el crecimiento de otros microorganismos afectando la cinética de crecimiento y el metabolismo (Santiago-Urbina *et al.*, 2014).

La fermentación alcohólica se debe a las levaduras capaces de aprovechar la sacarosa en medio ácido por la vía de Embden-Meyerhof-Parnes para producir etanol y CO₂ (Jay, 2005). El contenido alcohólico de los vinos de palma en varios países varía de 4 a 6% de etanol. Se ha mencionado que *Saccharomyces spp.* es el principal productor de etanol junto con otras levaduras encontradas, tales como *Schizosaccharomyces pombe*, *Kodamaea ohmeri*, *Hanseniaspora occidentalis*, *Candida tropicalis*, *Kloeckera apiculata* y *Pichia ohmeri* (Amoa-Awua *et al.*, 2006; Ouoba *et al.*, 2012). Sin embargo, se sospecha que *Zymomonas mobilis* realiza una fermentación alcohólica altamente productiva, generando una mezcla equimolar de etanol y CO₂ con más de 95% de glucosa utilizada (Alcántara - Hernández *et al.*, 2010).

La presencia del ácido acético se debe a que las BAA predominantes en la savia como *Acetobacter* y *Gluconobacter* (Ouoba *et al.*, 2012), son capaces de utilizar el etanol como fuente de carbono para la conversión (oxidación de etanol a acético) en presencia de oxígeno. Si la Taberna u otros vinos de palma no se consumen dentro de 2-3 días o cuando su contenido de ácido acético excede a 0.6% se vuelven inaceptables para su consumo (Amoa-Awua *et al.*, 2006; Ouoba *et al.*, 2012; Santiago-Urbina *et al.*, 2013).

2.2 Bacterias ácido lácticas

La clasificación de las BAL fue iniciada en 1919 por Orland Jensen, comprende un diverso grupo de organismos Gram-positivos, no esporulados, cuyo principal producto de fermentación de carbohidratos es lactato, además carecen de catalasa. Su morfología puede ser coco, bacilo o cocobacilo. Son anaerobias facultativas, carecen del ciclo de Krebs, por lo que la generación de ATP ocurre mediante la fermentación de carbohidratos y compuestos relacionados, acoplada a fosforilación a nivel de sustrato. Tiene una composición de bases de ADN de menos de 50% de GC (Vandame *et al.*, 1994; Savadogo *et al.*, 2006).

Las BAL son mesófilas, aunque algunas cepas son capaces de crecer a temperaturas por debajo de 5°C y otras a temperaturas tan altas como 45°C. El pH óptimo de crecimiento de este grupo de bacterias se encuentran en el rango de 4.0 a 4.5; sin embargo, algunas especies pueden crecer a pH bajo de 3.2, mientras que otras crecen a pH de 9.6. Las BAL son débilmente proteolíticas y lipolíticas (Vandame *et al.*, 1994; Jay, 2009).

Este grupo de BAL está compuesto por 13 géneros de bacterias Gram positivas: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*,

Lactosphaera, Leuconostoc, Oenococcus, Pedicoccus, Paralactobacillus, Streptococcus, Tetragenococcus, Vagococcus y *Weissella* (Jay, 2009).

El género *Leuconostoc* se encontraba dividido en tres subgrupos por las secuencias del gen ARNr 16S. Estos tres subgrupos consistió en *Leuconostoc mesenteroides* (*L. carnosum, L. citreum, L. gasicomitatum, L. gelidum, L. inhae, L. lactis, L. kimchii, L. mesenteroides* y *L. pseudomesenteroides*), *Leuconostoc fructosum* (*L. durionis, L. ficulneum* y *L. fructosum pseudoficulneum*) y *Leuconostoc fallax*. Sin embargo, mediante las secuencias de la región espaciadora intergénica del gen ARNr 16S-23S, el gen *rpoC* o el gen *recA* indicaron que la especie *L. fructosum* es distinguible a *L. mesenteroides* y *L. fallax* (Endo *et al.*, 2008). Por las cuatro especies en el subgrupo *L. fructosum* fueron transferidos a un nuevo género: *Fructobacillus sp.* (Endo *et al.*, 2008).

2.2.1 Metabolismo

En base a los productos finales del metabolismo de la glucosa (Figura 3), las BAL se dividen en dos grupos: homofermentativas y heterofermentativas.

Las BAL homofermentativas producen ácido láctico como producto principal o único de la fermentación de la glucosa. Estas bacterias poseen las enzimas aldolasas y hexosas isomerasas, utilizan la vía de Embden-Meyerhof-Parnas para producir 2 moléculas de lactato por molécula de glucosa. Todos los representantes de los géneros *Pediococcus, Streptococcus, Lactococcus* y *Vagococcus*, son homofermentativos (Jay, 2005).

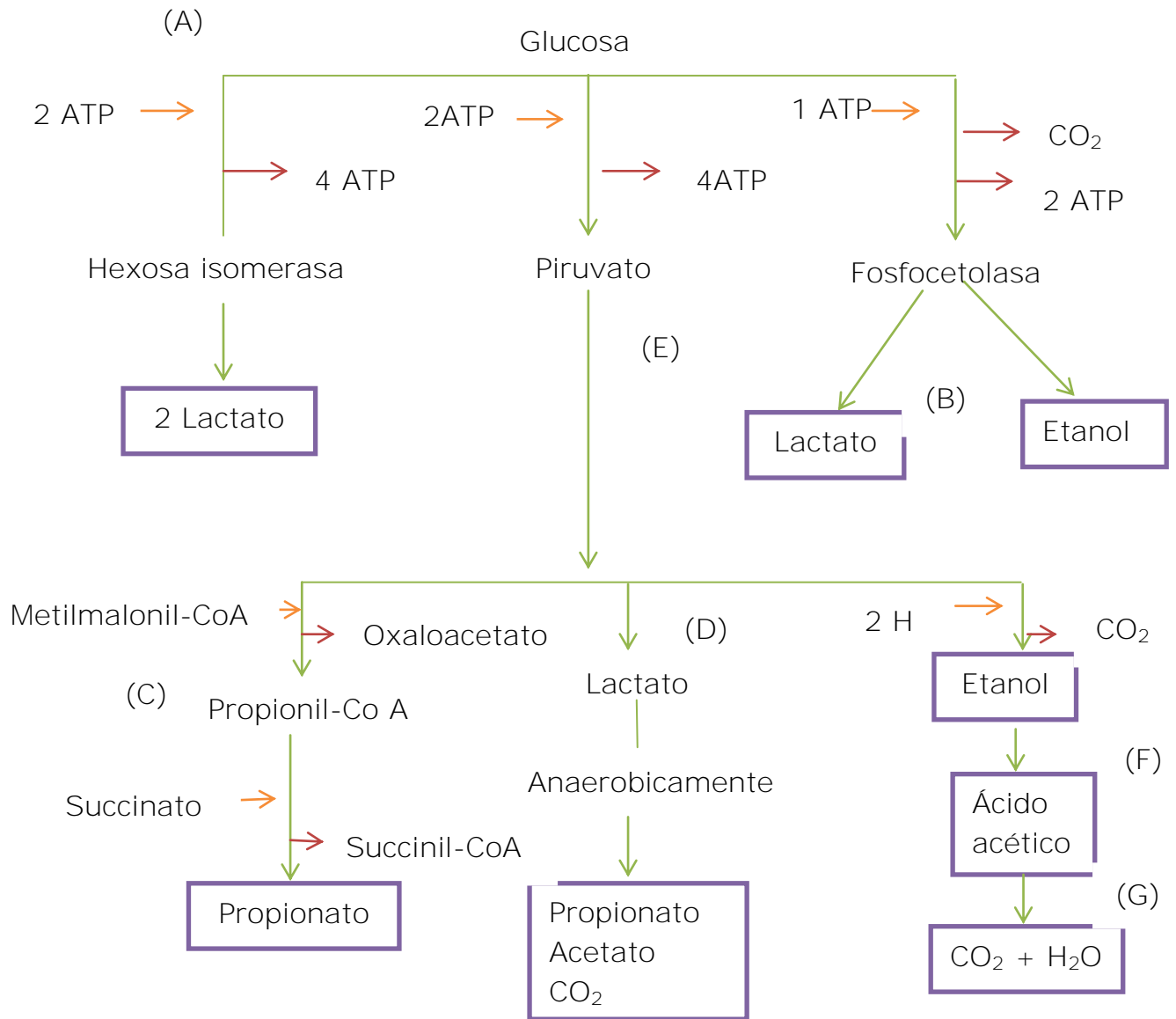


Figura 3. Productos de la vía fermentativa de la glucosa por varios microorganismos. (A) BAL homofermentativa; (B) BAL heterofermentativa; (C) y (D) *Propionibacterium*; (F) *Saccharomyces spp.*; (G) *Acetobacter spp.* (Jay, 2005).

Las BAL heterofermentativas por otra parte, poseen la enzima fosfocetolasa, la cual convierte hexosas a pentosas por las vías de la

hexosa monofosfato o de la pentosa, produciendo en el proceso cantidades equimolares de lactato, cantidades significantes de productos como acetato, etanol y CO₂. Todas las especies de *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Carnobacterium*, *Lactosphaera* son heterofermentivos (Jay, 2005).

2.2.2 Funciones

La función principal de las BAL en los productos alimenticios es la producción de ácido láctico, como consecuencia de su metabolismo. Sin embargo, no solo se limita al proceso de acidificación, sino que completa otras funciones como actividad proteolítica que participa en la maduración de los quesos, producción de compuestos aromáticos, producción de CO₂, producción de compuestos inhibidores, reducción del contenido de lactosa, síntesis de exopolisacáridos.

2.2.2.1. Cultivos iniciadores

Las BAL como cultivos iniciadores son especialmente aplicados en la elaboración de productos lácteos fermentados, contribuyendo a sus propiedades organolépticas y a su conservación por la producción *in situ* de sustancias antimicrobianas (Ross *et al.*, 2002). Los cultivos iniciadores mesófilos se utilizan para la formación de ácido láctico y a menudo para producir sabor, son utilizados en la producción de muchas variedades de queso, productos lácteos fermentados, en la crema madura. Los cultivos iniciadores termófilos son usados en una gran variedad de leches fermentadas incluyendo el yogurt y quesos que son sometidos a altas temperaturas (Salminen, 2005).

En la actualidad las preferencias del consumidor están virando hacia los alimentos que son mínimamente procesados y sin conservadores químicos. Por lo que últimamente, hay un gran interés en la llamada

“tecnología verde”, en los nuevos enfoques para reducir la adición de preservantes químicos así como la intensidad de tratamiento químico. Esto ha resultado en un creciente variedad de bioconservantes y sustancias antagonistas producidos por las BAL como ácido láctico, peróxido de hidrogeno, diacetaldehído, reuterina y bacteriocinas que pueden ser usados, ya sea individualmente o en combinación para proteger los alimentos y bebidas de los problemas de deterioro y de la acción de los patógenos (Ross *et al.*, 2002).

2.2.2.1.1 Ácido láctico

El ácido láctico fue descubierto en la leche cortada por Scheele (1780) y fue considerada como un componente de la leche. En 1789 Lavoiser **llamó a este componente de la leche “ácido láctico”**. En 1857, Pasteur descubrió que no era un componente de la leche, pero si un metabolito de la fermentación generado por ciertos microorganismos (Ghasemi *et al.*, 2009).

La acumulación de ácido láctico y otros ácidos orgánicos producidos por las BAL, reduce el pH del ambiente y debido a su forma no disociada poseen una actividad inhibidora de bacterias Gram positivas y negativas (Vandame *et al.*, 2004). Gracias a su naturaleza lipofílica pueden penetrar en la membrana celular y disociarse en el citoplasma, dando lugar a la liberación de iones hidrógeno y el anión correspondiente. Cuando la concentración de protones excede la capacidad tampón del citoplasma se transportan hacia el exterior mediante bomba de protones, reduciendo de esta manera las reservas energéticas de la célula. Cuando estas reservas se agotan la bomba de protones se detiene y provoca el descenso de pH interno, lo cual causa a su vez desnaturalización de otros componentes estructurales y funcionales de las células, interfiriendo así con la viabilidad (Vásquez *et al.*, 2009).

2.2.2.1.2 Peróxido de hidrógeno

Cuando el oxígeno está presente, las BAL por diferentes mecanismos pueden producir peróxido de hidrógeno, el cual genera radicales libres y aniones súper oxido (Salminen, 2005). Estos metabolitos del oxígeno poseen un efecto bacteriostático y bactericida frente a la flora láctica y no láctica. Los radicales libres causan peroxidación que ataca los componentes celulares esenciales, lípidos, proteínas y ADN. La acumulación del peróxido de hidrógeno en un medio de crecimiento puede ocurrir porque las BAL no sintetizan la enzima catalasa (Vásquez *et al.*, 2009).

2.2.2.1.3 Bacteriocinas

Bacteriocinas son moléculas que tienen estructura tipo péptido o proteína sintetizados en el ribosoma de las BAL. Su producción ocurre de forma natural durante la fase logarítmica del desarrollo bacteriano o al final de la misma, guardando relación directa con la biomasa producida. Son termoestables (Salminen, 2005.; Vásquez *et al.*, 2009). Estas presentan un estrecho rango de acción bactericida sobre receptores específicos de las células; actuando a través de la despolarización de la membrana de la célula diana o a través de la inhibición de la síntesis de la pared celular (Ross *et al.*, 2002).

Las bacteriocinas son muy eficaces en aplicaciones para la biopreservación de alimentos y bebidas, tales como, la inhibición de bacterias de descomposición durante la fermentación de la cerveza y el vino; prolongan la vida útil en una amplia gama de productos lácteos y no lácteos; para la mejora de vegetales fermentados; la conservación de productos cárnicos, etc. (Ross et al., 2002; Vásquez *et al.*, 2009).

2.3 Métodos empleados para la identificación y clasificación de las bacterias ácido lácticas

2.3.1 Métodos tradicionales

Los métodos fenotípicos o tradicionales se basan en el estudio de las características morfológicas y microscópicas, características bioquímicas (fermentación de hidratos de carbono), enzimáticas y fisiológicas, incluyendo resistencia a temperaturas de crecimiento, pH, sales a diferentes concentraciones; análisis de la pared celular y análisis total de proteínas citoplasmáticas solubles (SDS-PAGE), cromatografía de capa fina de ácidos orgánicos, análisis de ésteres metílicos de los ácidos grasos (FAME) (Günter *et al.*, 1998; Temmerman *et al.*, 2004); todos se han empleado en forma rutinaria para la identificación de las BAL.

2.3.1.1. Estudios microscópicos

Las BAL debido a su pared celular con un mayor contenido de peptidoglucano son identificadas como bacterias Gram positivas. Por lo que, al ser tratadas con el decolorante alcohol-acetona deshidratan y se reduce la permeabilidad de la pared por lo que no pierde el complejo cristal violeta-yodo (Tortora, 2007).

2.3.1.2. Estudios macroscópicos

Por su minúsculo tamaño, los microorganismos no pueden estudiarse como individuos, sino que es necesario manejarlos como poblaciones. Para ello es necesario cultivarlos, es decir favorecer su multiplicación *in vitro*, en un medio de cultivo, ya sea en estado sólido, semisólido o líquido; que cuente con los nutrientes necesarios para permitir, en condiciones favorables de pH y temperatura el crecimiento de microorganismos.

Las BAL son quimiorganotróficas, requieren una gran cantidad de factores nutritivos como nitrógeno proteico, aminoácidos, vitamina B, bases de purina y pirimidina y fuentes de carbono (Jay, 2005)

2.3.2.3. Identificación bioquímica

Es útil e indispensable el estudio de metabolismo de los carbohidratos fermentables para la identificación de BAL, para ser utilizadas como cultivos iniciadores, lo que permite tener un mejor control sobre los procesos de fermentación, y logra incrementar la vida de anaquel y la calidad microbiológica del producto terminado (Vandame *et al.*, 1994).

El estudio de su bioquímica se lleva a cabo ya sea por métodos convencionales o por tiras API´s, son fáciles de manejar, los resultados son obtenidos en corto tiempo e incluye una comparación de propiedades fenotípicas de un organismo con las mismas de otros considerados como referencia, a través de una amplia base de datos (Salminen, 2005).

2.3.2 Métodos moleculares

Las técnicas genotípicas exhiben diferentes niveles de poder discriminatorio, se utilizan para la identificación y clasificación desde el nivel de especies a nivel de cepa. Muchos métodos genotípicos se basan en el principio de la Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR), que permite la amplificación de fragmentos de ADN mediante el uso de primers específicos en condiciones controladas (Temmerman *et al.*, 2004). Estos métodos se basan en la detección de polimorfismos de ADN entre especies y se diferencian por su capacidad discriminatoria del rango dinámico de taxonomía, reproducibilidad, facilidad de interpretación y normalización (Amor *et al.*, 2007). Sin embargo, también las técnicas genotípicas no están exentas de limitaciones por su

alto costo en equipo. Se prefiere un enfoque polifásico para el estudio taxonómico, es decir, utilizar técnicas fenotípicas y genotípicas (Temmerman *et al.*, 2004).

El progreso de las técnicas moleculares ha dado lugar a cambios en la taxonomía de las BAL, estableciendo nuevas relaciones filogenéticas. Los métodos moleculares más conocidos para la identificación de las BAL dependientes de cultivo son: perfil de plásmidos, la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE), polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD), amplificación de fragmentos polimórficos (AFLP), análisis de restricción de amplificación ribosomal (ARDRA), entre otros (Ehrmann *et al.*, 2005; Randazzo *et al.*, 2009).

2.3.2.1. Electroforesis en gel en campo pulsado (PFGE)

La PFGE permite la separación de fragmentos de ADN obtenidos a partir de la digestión con enzimas de restricción. PFGE es crucial para la extracción de ADN cromosómico intacto. (Ehrman *et al.*, 2005; Amor *et al.*, 2007).

Los fragmentos son separados como un patrón de distintas bandas, usando una cámara que aplica campo eléctrico que cambia de posiciones en el gel de agarosa en tres juegos de electrodos que forman un hexágono alrededor del gel. Las bandas representan el genoma completo y por lo tanto puede detectar cambios específicos (inserciones, deleciones y reordenamientos) dentro de una cepa particular. Las bandas de ADN obtenidas dependen de la especificidad de la enzima de restricción y de la secuencia del genoma bacteriano. Esta técnica es útil para la diferenciación a nivel de cepa que pertenece a la misma especie. Sin embargo debido a la intensidad del trabajo, PFGE no es una técnica

viable para la tipificación a gran escala de varias cepas aisladas (Amor *et al.*, 2007; Randazzo *et al.*, 2009).

2.3.2.2. Amplificación de ADN polimórfico al azar (RAPD)

Es un método rápido, sensible y de bajo costo para la tipificación genética de las diferentes cepas de BAL. Esta técnica emplea un solo cebador corto (aprox. 10 nucleótidos, con 55-80% de GC) para amplificar fragmentos de ADN al azar y separados mediante una electroforesis en gel de agarosa, donde se visualiza bandas de diferentes pesos moleculares. El patrón de bandas se analiza mediante una matriz de ausencia y presencia de bandas que permite la diferenciación entre especies y subespecies (Randazzo *et al.*, 2009).

A pesar que RAPD es una técnica simple y rápida, para su reproducibilidad se deben estandarizar y optimizar las condiciones de reacción, la calidad y cantidad de enzima polimerasa y ADN extraído, concentración de cebadores, concentraciones de magnesio, y la precisión de pipetas ya puede causar variaciones en este método (Randazzo *et al.*, 2009).

Rosseti *et al.*, (2005) obtuvieron perfiles de RAPD-PCR de cepas de BAL mediante el cebador M13, los cuales fueron analizados por el software BioNumericsk. El análisis de agrupamiento de los perfiles de RAPD-PCR les permitió implementar la biblioteca una colección de patrones de banda representativos. Las cepas pertenecían a 11 unidades principales de la biblioteca de huellas dactilares RAPD-PCR identificadas como *Lactobacillus caseii*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus brevis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus thermophilus* y *Lactococcus lactis*. El mismo

enfoque podría aplicarse también para identificar la cepa LAB aislado de otros ecosistemas de alimentos.

Varios investigadores consideran que RAPD es la técnica más utilizada para la diferenciación entre las especies de BAL especialmente cultivos iniciadores, en los lactobacilos asociados a los alimentos como los productos lácteos, en la fermentación de varios tipos de queso y puede distinguir entre cepas de *L. plantarum* y *L. pentosus* entre *L. graminis* y especies *L. curvatus* (Smita *et al.*, 2009). Se han detectado *Streptococcus thermophilus* y especies de *Streptococcus macedonicus* en quesos italianos, franceses y españoles, así como también de *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*. Se ha realizado RAPD para revelar la heterogeneidad de *Lactobacillus kefir* y las especies *Lactobacillus paracasei* en el queso Ricotta forte (Randazzo *et al.*, 2009).

2.3.2.3 Análisis de restricción de ADN ribosomal amplificado (ARDRA)

Este método está basado en la obtención de ADN ribosomal mediante la amplificación por PCR de productos de ADN de microorganismos aislados usando cebadores universales. El producto se digiere con enzimas de restricción y los fragmentos se analizan en geles de agarosa, después se estudia el patrón de bandas (Díaz y Wachter, 2003).

Es eficiente para la identificación entre las especies de *Lactobacillus*. Se han diferenciado especies como *Lactobacillus alimentarius* y *L. farciminis* o especies muy relacionadas entre sí, como *L. casei* y *L. acidophilus*. Sin embargo, la naturaleza conservadora del ARNr 16S limita el poder discriminatorio de técnicas tales como ARDRA en comparación con los métodos que utilizan todo el genoma, tales como PFGE y RAPD (Singh *et al.*, 2009).

2.3.2.4 Amplificación de fragmentos largos polimórficos (AFLP)

Esta técnica consiste en tres etapas: (a) el ADN genómico se digiere con dos enzimas de restricción y la ligación de adaptadores específicos al sitio de restricción de todos los fragmentos, (b) amplificación preselectiva y selectiva de los fragmentos con dos cebadores complementarios al adaptador y al sitio de restricción, (c) separación de los productos de PCR por electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE). La introducción de alineaciones erróneas deliberados en los extremos 3' **del cebador** influye en el número de fragmentos amplificados y el poder discriminatorio de los patrones (Ehrmann *et al.*, 2005; Amor *et al.*, 2007).

2.3.2.5 Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE)

Las técnicas moleculares dependientes de cultivo pueden sobreestimar la diversidad microbiana. Esta última anomalía da origen a dos fenómenos: (*i*) la presencia de especies desconocidas y nuevas que no son cultivables a través de los métodos existentes; y (*ii*) la presencia de especies conocidas que son metabólicamente activas y viables, pero han entrado en un estado no cultivable. Para resolver este problema se han desarrollado métodos independientes de cultivo, entre ellos están: electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE), electroforesis en gel con gradiente de temperatura (TGGE), sondas radioactivas o fluorescentes, metagenómica (Randazzo *et al.*, 2009).

La técnica DGGE se basa en la separación de fragmentos de ADN de doble cadena del mismo tamaño con secuencias diferentes. La

separación de bandas dependen de la secuencia de nucleótidos y contenido de %G+C, diferentes secuencias tendrán como resultado diferentes orígenes de dominios de fusión y como consecuencia diferentes posiciones en el gel. Se preparan fragmentos de hasta 500 pares de bases amplificados por PCR para ser separados en un gel de gradiente desnaturante de urea y formamida a una temperatura constante de 55 a 60°C. (Ercolini, 2004; Temmerman *et al.*, 2004; Randazzo *et al.*, 2009).

Esta técnica se puede realizar en dos posiciones paralelo o perpendicular. En los geles perpendiculares solo un amplicón puede ser cargado, comúnmente se utilizan para detectar el comportamiento de fusión de los fragmentos de ADN. Los geles paralelos permiten cargar múltiples muestras en el mismo gel y el rango de concentración de gel desnaturante es estrecho, lo que permite una mejor separación de sus bandas. Cada banda visualizada está relacionada con una especie microbiana presente en la muestra, además la intensidad de cada banda probablemente representa la abundancia relativa de una especie en particular dentro de una población (Ercolini, 2004).

2.3.3 Aplicaciones del ARN ribosomal 16S y su utilización en filogenia y taxonomía

El RNA ribosómico es la macromolécula más ampliamente utilizada en estudios de filogenia y taxonomía bacterianas. También se utiliza para la construcción de árboles moleculares a partir de métodos taxonómicos basados en secuencias, solamente una secuencia de genes para la identificación de microorganismos en términos de su tipo filogenético.

Los ribosomas son orgánulos complejos, que utilizan los organismos para el complicado proceso de síntesis de proteínas, el ribosoma

bacteriano tiene un coeficiente de sedimentación 70S (expresado en unidades Svedberg), y se compone de dos subunidades desiguales en tamaño, con valores de sedimentación 30 y 50S. La subunidad pequeña consiste de una molécula de ARNr (ARN ribosomal) 16S y 21 proteínas diferentes, y la subunidad grande contiene una de ARNr 5S y otra de 23S, con 31 proteínas diferentes. Por lo que Carl Woese escogió el ARNr 16S como el más adecuado con seres procariotas para la construcción de un árbol filogenético, debido a su universalidad, su alta conservación en estructura y función (Rodicio *et al.*, 2004).

El ARNr 16S es un polirribonucleótido que contiene aproximadamente 1500 pares de bases, un tamaño relativamente largo que minimiza las fluctuaciones estadísticas. Las secuencias del ARNr 16S ha facilitado la identificación de bacterias, incluyendo microorganismos no cultivables. Dado que resulta relativamente fácil de secuenciar los ADNr existe una amplia base de datos, en continuo crecimiento. (Rodicio *et al.*, 2004).

Los genes del ARNr 16S contienen generalmente nueve "regiones hipervariables" (V1-V9) que muestran secuencia de diversidad considerable entre las diferentes especies de bacterias. Estudios han demostrado que al amplificar estas regiones por PCR utilizando cebadores específicos y universales para cada región identifican una sola especie bacteriana (Chakravorty *et al.*, 2007). La región variable V1-V3 del ARNr 16S se ha convertido en una opción viable para la identificación de las BAL (Singh *et al.*, 2009). Una vez determinada la secuencia de nucleótidos y establecidas comparaciones, será el grado de similitud entre secuencias de los ADNr 16S de dos bacterias lo que indique su relación evolutiva (Rodicio *et al.*, 2004).

Capítulo II.

Planteamiento del problema

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Identificar las cepas de bacterias ácido lácticas aisladas en la fermentación de la savia de palma para la producción de Taberna, procedente de Chiapas, México.

3.2 Objetivos particulares

- Determinar que las cepas aisladas en Agar MRS de la Taberna pertenecen al grupo de bacterias ácido lácticas mediante métodos tradicionales.
- Por medio de la técnica RAPD agrupar las cepas de bacterias ácido lácticas de acuerdo a sus diferencias moleculares y comprobar la diferenciación de grupos a través de la técnica ARDRA.
- Identificar las bacterias ácido lácticas por secuenciación en la región V1 del ARNr 16S.
- Evaluar y conocer la diversidad de las bacterias ácido lácticas en cada lote de fermentación de la Taberna.

4. Justificación

La Taberna es una bebida alcohólica que se produce y consume localmente en el sureste de México pero carece de popularidad en el resto del país. La savia de palma es un medio rico que facilita el crecimiento de varios microorganismos, entre ellos, las BAL.

Las BAL se consideran responsables de la rápida acidificación de la savia de coyol. Las BAL predominantes en la fermentación son: *Lactobacillus plantarum* y *Leuconostoc mesenteroides*. Sin embargo, no hay información publicada sobre las BAL presentes en los diferentes lotes de fermentación durante la producción de Taberna. Es por ello, es relevante la asignación de grupos de acuerdo a sus características fenotípicas y genotípicas para facilitar la identificación de las BAL; así mismo, nos permitirá conocer mejor el comportamiento fisicoquímico y microbiológico de esta bebida en un proceso de fermentación *in vivo*.

5. Hipótesis

Si durante el proceso de producción de la Taberna hay mucha diversidad de BAL, estas se pueden identificar y su diversidad va a ser diferente en las muestras de esta bebida.

Capítulo III.

Materiales y métodos

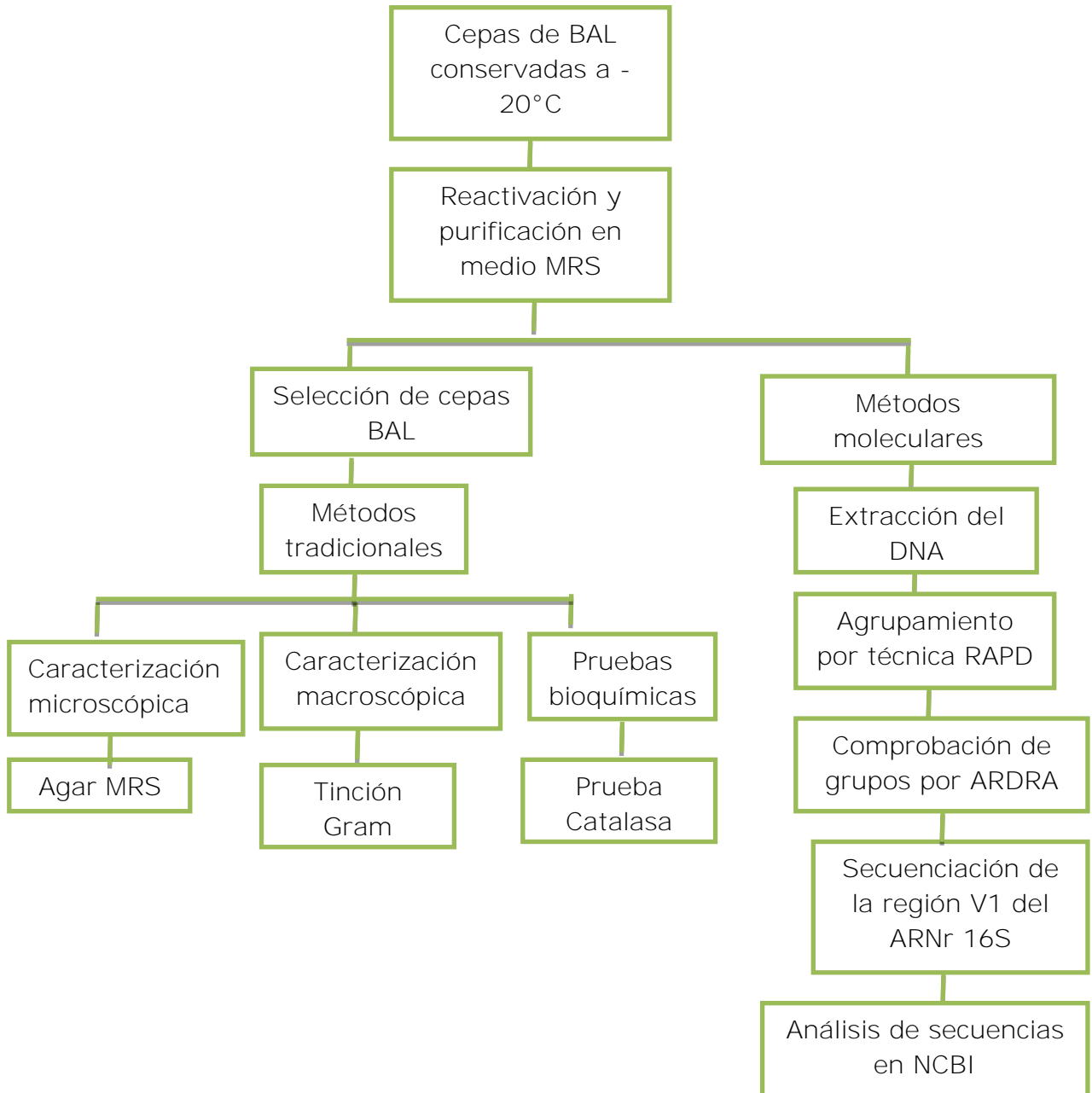


Figura 4. Diagrama de flujo de la estrategia experimental

6. Desarrollo experimental

6.1 Obtención de las cepas aisladas de Taberna

Un total de 43 muestras de Taberna se recolectaron directamente de la canoa de tres palmas de coyol. Las muestras se colectaron en tubos Falcón de 50 mL previamente esterilizados durante los primeros días del proceso de producción en el mes de marzo de 2012, en la comunidad de Benito Juárez del estado de Chiapas, México.

Para el aislamiento de BAL, se utilizó medio selectivo Agar MRS suplementado con 0.05% de cicloheximida para inhibir el crecimiento de levaduras. Los cultivos se incubaron bajo condiciones anaerobias a 30°C durante 24 horas.

6.2 Selección de cepas puras

Cinco cepas de BAL fueron seleccionadas de cada muestra en base a la tinción gram y prueba de catalasa (gram positivas, catalasa negativa) y se verificó que las bacterias estuvieran puras (metodología en Apéndice A). Las cepas fueron conservadas en medio líquido MRS con 20% de glicerol y almacenadas a -20°C.

6.3 Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó empleando un procedimiento químico-enzimático.

De las cepas seleccionadas provenientes del medio agar MRS y con características de las BAL se reactivaron en 5 mL de Caldo MRS; se incubaron a 30°C bajo condiciones anaerobias durante 12-16 horas o hasta observar turbidez en el medio. Posteriormente, una muestra de 1.5 mL de cada cultivo se colocó en tubos eppendorf, para recuperar el

pellet se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 min a 4°C, se decantó el sobrenadante y el pellet se lavó con 200 µL de buffer TE (ver Apéndice B), agitando con vortex, se centrifugó y se decantó el sobrenadante. A continuación, el pellet lavado se resuspendió con 200 µL de buffer TES (ver Apéndice B), después se le adicionó la lisozima ultra pura con la punta de la espátula, se incubó a 37°C por un periodo de 1 hora con agitación. Posteriormente, a la mezcla con lisozima se le agregaron 8 µL de ARNasa al 10% se incubó a 37°C por 15 min. A esta misma mezcla se le adicionaron 10 µL de proteinasa K al 20% y 30 µL de SDS al 10%, se incubó a 60°C por 40 minutos con agitación. Una vez terminado el tiempo de incubación se dejó enfriar la mezcla a 10°C y se adicionaron 200 µL de mezcla de fenol-cloroformo-isoamílico, 0.3g de perlas de vidrio y se agitó con vortex a máxima velocidad durante 40 segundos hasta formar una emulsión blanca. Después, se le añadieron 100 µL de NaCl 5 M y 200 µL de buffer TE, se centrifugó a 14, 000 rpm por 10 minutos a 4°C. Se obtuvieron tres fases de las cuales se recuperó se la fase acuosa que contiene el ADN (aprox. 400µL) con mucho cuidado. Esta fase se transfirió a un tubo eppendorf nuevo y estéril. Para precipitar el ADN se le añadió al tubo nuevo etanol absoluto a -20°C, se invirtió suavemente, se dejó 1 h en baño de hielo y se volvió a centrifugar a las mismas condiciones. Posteriormente, se retiró el etanol por decantación y se lavó con 50 µL etanol al 70% sin agitar y se centrifugó. Por último, se resuspendió el precipitado con 100 µL de agua desionizada estéril y se dejó reposar durante 1h. Las muestras de ADN se almacenaron a -20°C hasta su uso.

6.4 Determinación de la concentración y pureza de ADN

La densidad óptica se midió en un espectrofotómetro UV-visible. En una celda de cuarzo se colocaron 10 μL de ADN y 490 μL de agua destilada y se realizó la lectura a 230, 260 y 280 nm.

Para conocer la concentración de ADN se utilizó la siguiente fórmula

$$[\text{ADN}] = \text{DO}_{260\text{nm}} * 5 * \text{factor dilución} * 50 \text{ ng}/\mu\text{L}$$

Donde:

[ADN]= Concentración de ADN en $\mu\text{L}/\text{mL}$ o $\text{ng}/\mu\text{L}$

$\text{DO}_{260\text{nm}}$ = Densidad óptica leída a 260nm

Factor de dilución = $\text{Volumen}_{\text{total}}$ en el tubo (μL) / $\text{Volumen}_{\text{ADN extraído}}$ (μL)

Factor de ADN **de doble cadena**= $50\mu\text{g ADN}/\text{mL}$

Para la determinación de la pureza del ADN fue necesario determinar las relaciones $\text{DO}_{260\text{nm}}/\text{DO}_{230\text{nm}}$ y $\text{DO}_{260\text{nm}}/\text{DO}_{280\text{nm}}$ donde se buscó que la relación fuese 1.8 a 2.0, ya que si:

$\text{DO}_{260\text{nm}}/\text{DO}_{230\text{nm}} > 1.7 \Rightarrow$ contaminación guanidina o compuestos solubles de fenol.

$\text{DO}_{260\text{nm}}/\text{DO}_{280\text{nm}} > 1.7 \Rightarrow$ contaminación proteica.

6.5 Agrupamiento de las BAL por RAPD-PCR

Las BAL previamente seleccionadas se agruparon mediante la técnica RAPD con el cebador $(\text{GTG})_5$ y su agrupación se justificó nuevamente con RAPD con el cebador M13 (Tabla 4).

Tabla 4. Cebadores utilizados para RAPD-PCR

Cebador	Secuencia 5´-3´	Referencia
(GTG) ₅	GTGGTGGTGGTGGTG	Svec <i>et al.</i> , 2010
M13	GAGGGTGGCGGTTCT	Rossetti <i>et al.</i> , 2005

La mezcla de reacción (50 µL) se describe en la Tabla 5.

Tabla 5. Mezcla de reacción

Reactivo	(GTG) ₅	M13
Agua desionizada	50 µL	50 µL
Buffer 10X	1X	1x
MgCl ₂ 50Mm	1.5 Mm	3mM
Cebador	0.8 µM	2µM
dNTPs 100mM	200 µM	200µM
Polimerasa Taq	1U	1.5U
ADN	15 ng/µL	30 ng/µL

La reacción de amplificación se llevó a cabo bajo las condiciones mostradas en la Tabla 6.

Tabla 6. Condiciones de reacción para la obtención de productos RAPD-PCR

Cebador	1 ciclo de desnaturalización	Ciclos de amplificación	1 ciclo de extensión final
(GTG) ₅	94°C por 7 min	30 ciclos Desnaturalización, 94°C por 1 min Alineamiento, 40°C por 1 min Extensión, 65°C por 8 min	65°C por 16min.
M13	94°C por 2 min	40 ciclos Desnaturalización, 94°C por 1 min Alineamiento, 45°C por 20 s Extensión, 72°C por 2 min	72°C por 10min.

Los productos de RAPD-PCR se almacenaron en congelación a 4°C

Las bandas resultantes se analizaron mediante el software Kodak MI. Para un análisis de agrupamiento se hizo estudios de variabilidad dentro de la especie, se analizaron los patrones de bandas transformándolos en matrices de presencia o ausencia y se obtiene un dendograma usando un software bioinformático Past 3.0.

6.6 Amplificación de la región V1 del gen ARNr 16S

Se realizó la PCR para la amplificación de la región V1 del gen que codifica para la subunidad ARNr 16S se emplearon los cebadores: pA y 3 (Tabla 7).

Tabla 7. Secuencias de los cebadores empleados para amplificar la región V1 del ARNr 16S

Cebadores	Secuencia 5´-3´	Posición	Orientación
pA	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	9-28	Reverse
3	GTTGCGCTCGTTGCGGGACT	1109-1090	Forward

Para llevar a cabo la reacción se emplearon las siguientes concentraciones usando 50 µL de volumen final con 10 ng/µL de ADN y 49 µL de mezcla de PCR: H₂O desionizada, 10x Buffer, 25mM MgCl₂, 1ng/µL de ambos cebadores, 200µM dNTP´s, 1U polimerasa Taq. Las condiciones de amplificación fueron: una desnaturalización inicial a 94°C por 3 min, 34 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min, alineamiento a 65°C por 1.3 min, extensión a 72°C por 2 min, y una extensión final a 72°C por 15 min. Los productos de PCR se almacenaron en congelación a 4°C.

6.7 Digestión del producto de PCR con enzimas de restricción

Se siguió el protocolo recomendado (Thermo Scientific FastDigest) para la digestión de los amplicones obtenidos por PCR (Tabla 8). En la Tabla 9 se menciona las enzimas que se utilizaron y su sitio de corte.

Tabla 8. Mezcla de reacción

Reactivos	Cantidad
Agua (libre de nucleasas)	17 µL
Buffer Green 10x	2 µL
Producto PCR	10 µL
Enzimas	1 µL

Después de mezclarse se dio un spin y se incubaron a 37°C por 20 minutos. Los productos se almacenaron a 4°C.

Tabla 9. Sitio de corte de enzimas de restricción

Enzima	Sitio de corte
HaeIII	GG ↓ CC
HindIII	A ↓ AGCTT
HhaI	G ↓ CGC

6.8 Purificación de los productos de PCR

Para la purificación de los productos de PCR, se siguió la metodología descrita por el kit **DNA Clean & Concentrator™-5**, siguiendo las instrucciones del fabricante.

6.9 Condiciones de electroforesis

Para observar los fragmentos de ADN, de RAPD-PCR, amplicones de la región V1 y de digestión de enzimas (Tabla 10) se empleó la técnica de electroforesis.

Por cada 50 mL de agarosa se le adicionaron 3 µL de bromuro de etidio. Se utilizó buffer TBE 0.5x (ver Apéndice B). Para todos los productos excepto la digestión con enzimas de restricción, la cantidad de producto y buffer de carga en los pozos fueron 8 µL y 1.5 µL, respectivamente. Se utilizó un marcador de peso molecular de 1 kpb. Los geles fueron fotografiados en una cámara KODAK.

Tabla 10. Condiciones de electroforesis para la visualización de ADN extraído y productos amplificados por PCR.

	Concentración gel agarosa	Condiciones
ADN	1%	100 volts/ 1 h
Producto (GTG) ₅	1.5%	80 volts/ 4 hrs
Producto (M13)	1.5%	80 volts/ 4 hrs
Producto región V1	1%	90 volts/1 h
Digestión con enzimas	1.5%	90 volts/30 min

6.8 Secuenciación de la región V1 del ARNr 16S

Por último, se envió a secuenciar la región V1 de los amplificados del gen ARNr 16S con el cebador gamma (Tabla 11).

Tabla 11. Cebador utilizado para la secuenciación

Cebador	Secuencia 5´-3´	Posición	Orientación
Gamma	ACTGCTGCCTCCCGTAGGAG	358-339	Forward

Los resultados obtenidos se compararon con la base de datos GenBank del NCBI (National Center for Biotechnology Information) (www.ncbi.nlm.nih.gov) utilizando el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

Capítulo IV.

7. Interpretación de resultados

7.1 Aislamiento de cepas de bacterias ácido lácticas

Un total de 225 cepas de BAL se aislaron de las muestras de Taberna. A estas cepas aisladas se les realizaron pruebas de identificación preliminar mediante morfología micro y macroscópica, así como prueba de catalasa.

Las BAL aisladas en placas de agar MRS, fueron colonias puntiformes, superficie convexa, con bordes definidos, apariencia cremosa, color de blanquecino y crema, consistencia húmeda y seca, las cuales son características predominantes de estas bacterias.

Para verificar la pureza de las BAL se realizó tinción de Gram. Al observarse al microscopio se encontraron entre los diversos aislamientos cocobacilos, bacilos, con agrupamiento racimos y en cadena, respectivamente; siendo todas Gram positivas, por lo que se consideraron como cepas puras (Tabla 12). También se clasificaron como BAL aquellas cepas con resultado de catalasa negativa debido a que no hay producción de gas al adicionar el peróxido de hidrogeno al 3%.

Por medio de la observación micro y macroscópica se diferenciaron 4 grupos de BAL y dentro de estos cuatro grupos podría haber más de un género o especie.

Tabla 12. Características microscópicas y macroscópicas de algunas BAL aisladas de muestras de Taberna (ver todas Apéndice C)

Cepa	Microscópica		Macroscópica	
	Forma	Descripción	Color	Consistencia
C3t7p2	Cocobacilos	Cadenas	Blanca	Seca
C2t5p3	Cocobacilos	Racimos	Cremosa	Seca
C1t13p2	Bacilos	Largos, gruesos	Blanca	Húmeda
C1t2p3	Bacilos	Cortos, gruesos	Cremosa	Húmeda

C: número de cepa; t: tiempo de tapping; p: número de palma

La identificación de las BAL usando métodos tradicionales y pruebas rápidas tienen sus desventajas; por si solas no son suficientes para la diferenciación a nivel de cepa y deben complementarse con métodos moleculares para obtener una identificación más fiable y reproducible.

7.2 Extracción de ADN

Un total de 200 cepas de BAL fueron empleadas para la extracción de ADN. El ADN extraído se visualizó en un gel de agarosa (Figura 5), con la finalidad de comprobar su pureza y concentración.

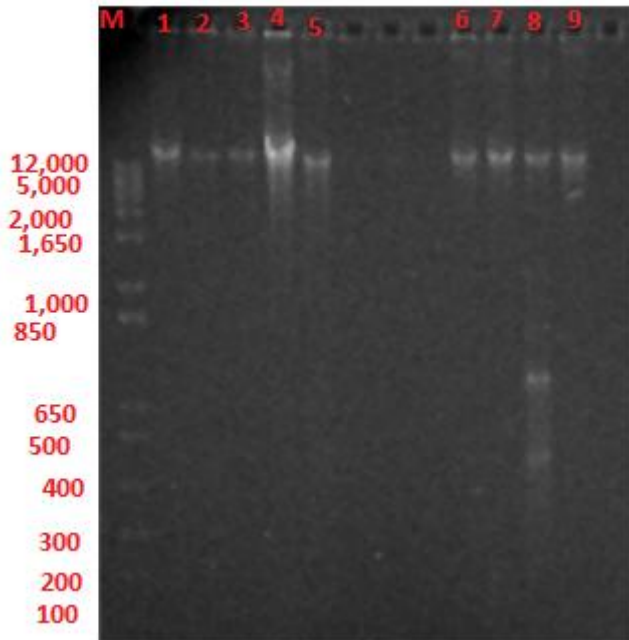


Figura 5. Fragmentos de ADN visualizados en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio; M) marcador molecular 1kb; 2) c4t4p2; 3) c3t11p2; 4) c3t11p2; 5) c5t11p1; 6) c2t3p1; 7) c4t14p3; 8) c2t8p1; 9) c4t13p1

En los carriles 1, 4 y 9, se observan bandas de ADN acompañadas con un barrido, lo anterior sugiere que el ADN podría estar ligeramente degradado o presenta residuos de fenol. En el carril 8 se observan tres bandas, la banda con un peso molecular aproximadamente 12,000pb corresponde al ADN, mientras que las bandas de menor peso molecular pertenecen al ARN que no fue degradado completamente por la ARNasa. En los carriles restantes se observa una sola banda nítida, indicando que el ADN se encuentra puro. La intensidad de las bandas muestra la cantidad ADN. Sin embargo, para determinar su concentración se realizó la medición de absorbancia a una longitud de onda de 260 nm y para verificar la pureza se emplearon las mediciones de 230 y 280 nm. Los resultados obtenidos de algunas cepas se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13. Ejemplo de algunas mediciones de absorbancia y su relación para determinar pureza y concentración de ADN.

Cepa	Absorbancia			Relación		[ADN] ng/μL
	230nm	260nm	280nm	260nm/ 230nm	260nm/ 280nm	
c2t3p3	0.14831	0.25424	0.16949	1.7	1.5	63.6
c4t3p3	0.16949	0.3178	0.19068	1.9	1.7	79.5
c5t3p3	0.3178	0.7839	0.38136	2.5	2.1	196.0
c4t4p3	0.55085	1.10169	0.59322	2.0	1.9	275.4
c2t9p1	0.29661	0.72034	0.36017	2.4	2.0	180.1
c3t7p2	0.21186	0.38136	0.23305	1.8	1.6	95.3
c2t5p3	0.4661	0.88983	0.4661	1.9	1.9	222.5
c2t7p2	0.21186	0.38136	0.23305	1.8	1.6	95.3
c4t5p2	0.48729	0.97458	0.48729	2.0	2.0	243.6
c1t13p2	0.25424	0.44492	0.29661	1.8	1.5	111.2
c2t3p1	0.4661	0.95339	0.52966	2.0	1.8	238.3
c3t11p1	0.3178	0.48729	0.25424	1.5	1.9	121.8

La concentración de ADN fue muy variada, se obtuvieron concentraciones desde 63 ng/μL hasta 275.4 ng/μL. En algunos casos se puede decir que el DNA extraído es puro, libre de proteínas, residuos de fenol y guanidina ya que se obtuvieron cocientes DO_{260nm}/DO_{230nm} y DO_{260nm}/DO_{280nm} un valor equivalente de 1.7-2.0.

Aunque no es necesaria gran cantidad de ADN, si es recomendable trabajar con ADN de calidad, limpio y de peso molecular elevado. La baja calidad y la contaminación de ADN es uno de los motivos más frecuentes de obtención de patrones RAPD-PCR poco precisos, pueden provocar la aparición de un patrón de bandas conduciendo a un resultado erróneo. Suelen emplearse cantidades entre 5 y 50 ng de ADN por reacción (Regli-Davin *et al.*, 1995).

7.3 Agrupamiento por RAPD-PCR

RAPD-PCR es un método rápido y fiable para la diferenciación inter e intra específica de la mayoría de las especies bacterianas asociadas con alimentos, especialmente para la identificación de cepas de BAL (Gevers *et al.*, 2001; Rossetti *et al.*, 2005; Owusu-Kwarteng *et al.*, 2012; Abriouel *et al.*, 2012). Esta técnica genera un patrón complejo de múltiples productos de amplificación de *loci* distribuidos por todo el genoma (Smita *et al.*, 2009).

La calidad y cantidad de ADN extraído que se observó en el gel de agarosa y la cuantificación en el espectrofotómetro, el ADN se consideró apto para usarlos en el método PCR-RAPD y para que éste fuera reproducible. Los productos amplificados con (GTG)₅ se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa 1.5% (Figura 6). En la imagen se observan diversas bandas que varían de 12,000 hasta 530pb. En todas las cepas de BAL, se detectaron bandas muy intensas y bandas de baja intensidad.

Algunas de las cepas presentaron problemas de reproducibilidad a pesar de que las condiciones de concentración de agarosa, de voltaje y tiempo de electroforesis fueron las mismas; se debe a que RAPD-PCR es propenso a la mala reproducibilidad, con el fin de mantener una alta reproducibilidad, es recomendable el uso de puntas con filtro, misma cantidad de reactivos de PCR, y el mismo termociclador para todas las reacciones de PCR (Gevers *et al.*, 2001; Smita *et al.*, 2009). Así como también, un ADN purificado y a una concentración conocida (Bardakci, 2001).

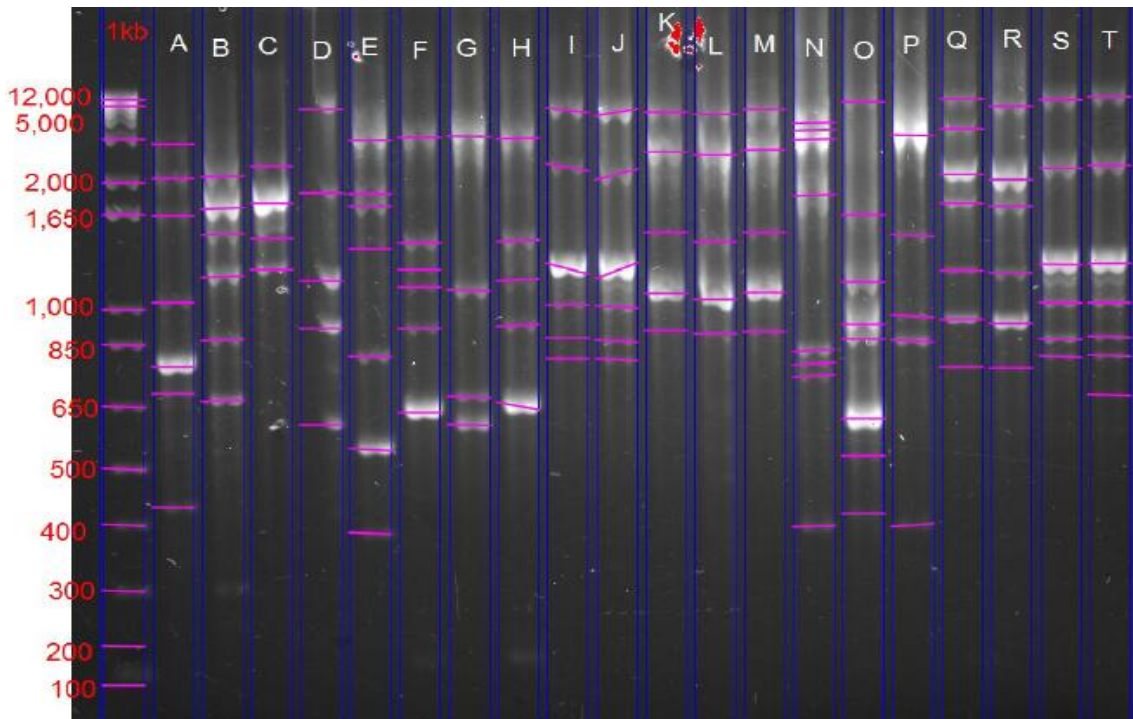


Figura 6. Ejemplos de algunos patrones RAPD obtenidos a partir del ADN de BAL, amplificados con cebador $(GTG)_5$. A. c1t2p3; B.c2t2p3; C.c4t3p3; D.c4t3p3; E.c5t3p3; F.c4t13p1; G.c4t4p3; H.c2t9p1; I.c3t7p2; J.c2t5p3; K.c2t7p2; L.c4t11p3; M.c4t5p2; N.c1t13p2; O.c5t11p3; P.c2t3p1; Q.c3t11p1; R.c3t14p1; S.c2t3p2; T.c3t4p2.

Con la finalidad de comprobar el agrupamiento de las BAL por RAPD-PCR usando el cebador $(GTG)_5$, se usó la misma técnica con el cebador M13. Los resultados para M13 (Figura 7) se observaron en gel de electroforesis varias bandas de amplificación por M13 de 7,000 a 350 pares de bases.

Para el análisis del patrón de bandas se empleó una matriz haciendo un registro de la presencia (1) o ausencia (0) de cada banda. La selección de bandas se basó de acuerdo a su nivel de intensidad, es decir, se seleccionaron las bandas más intensas ubicadas en diferente posición de peso molecular y se descartaron las bandas menos intensas y de muy bajo peso molecular. La diferencia en las intensidades de las bandas probablemente, se deba a que algunos cebadores no coinciden con la

secuencia del ADN, por lo que la amplificación de algunos ciclos puede no ocurrir y por lo tanto las bandas son débiles (Bardakci, 2001).

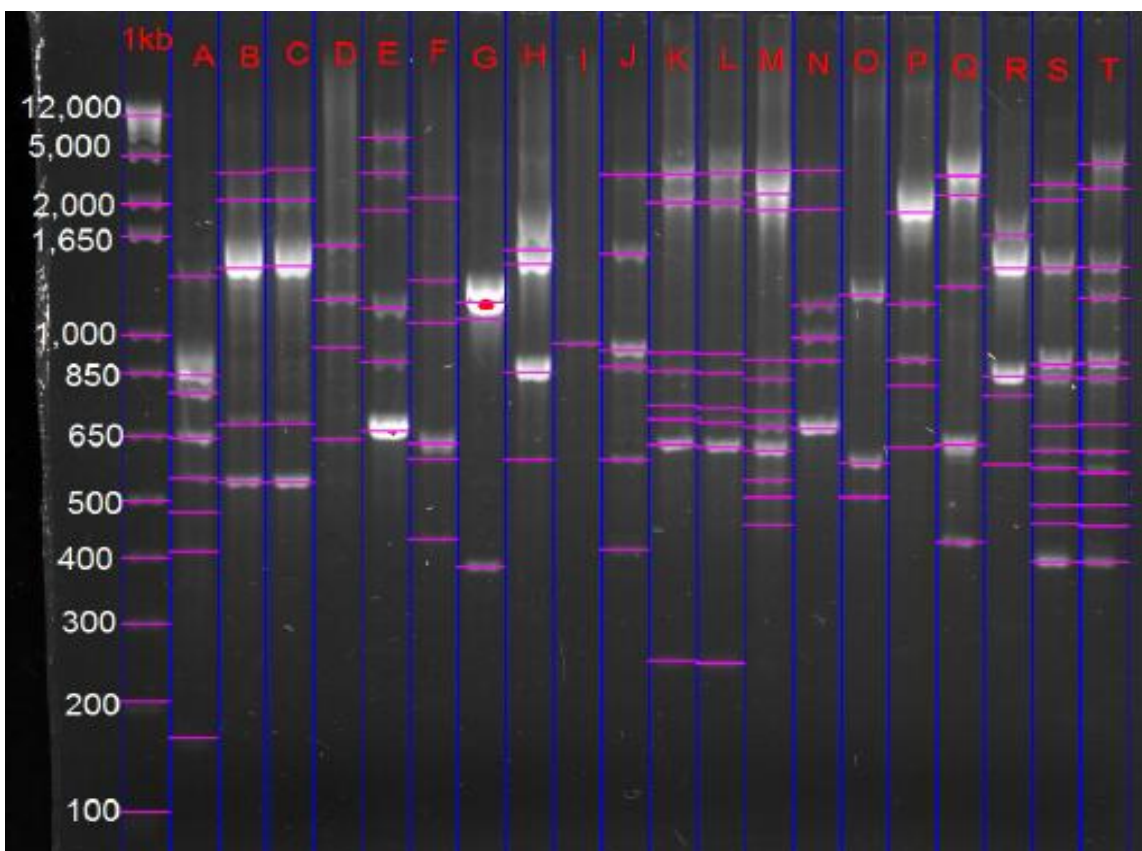


Figura 7. Ejemplos de algunos patrones RAPD obtenidos a partir del ADN de BAL, amplificados con cebador M13. A. c1t2p3; B.c2t2p3; C.c4t3p3; D.c4t3p3; E.c5t3p3; F.c4t13p1; G.c4t4p3; H.c2t9p1; I.c3t7p2; J.c2t5p3; K.c2t7p2; L.c4t11p3; M.c4t5p2; N.c1t13p2; O.c5t11p3; P.c2t3p1; Q.c3t11p1; R.c3t14p1; S.c2t3p2; T.c3t4p2.

Con la matriz generada se construyó un dendograma usando el índice de similitud de Jaccard por el método UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages), utilizando el software Past 3.0 para ambos cebadores (GTG)₅ y M13.

Estudios de RAPD-PCR han tomado grupos de BAL que caen en un rango 55-89% de coeficiente de similitud. Dentro de este rango, casi todos los subgrupos similares (Gevers *et al.*, 2001; Giraffa *et al.*, 2004; Giraffa *et al.*, 2005). Si se corta el dendograma del cebador (GTG)₅ mediante una línea horizontal en el coeficiente de similitud de 0.5, se determina 10 grupos y en el dendograma del cebador M13 se observan 11 grupos. Observando las características del patrón de bandas de grupos similares y con la ayuda de sus características microscópicas y macroscópicas se tomó un representante de cada cluster cortado en la similitud 0.5 del dendograma agrupados con (GTG)₅ para su asignación de una identidad a las cepas de BAL.

Estudios recientes han demostrado que el cebador (GTG)₅ es útil para la diferenciación de lactobacilos en especies y a nivel de cepa (Temmerman *et al.*, 2004). También, los patrones de bandas de RAPD de un ADN desconocido pueden ser fácilmente agrupados con las huellas dactilares existentes en la base de datos de un software BioNumerics (Rossetti *et al.*, 2005; Abriouel *et al.*, 2012). El desarrollo de softwares de bioinformática ha permitido un mejor análisis e integración de ácidos nucleicos, secuencias, huellas digitales y datos fenotípicos. Sin embargo, la adquisición de estos programas son costosos y demanda un alto nivel de conocimientos técnicos para su uso (Rossetti *et al.*, 2005).

7.3 Amplificación de la región V1 del gen ARNr 16S

Se ha encontrado que la región V1 y V3 de ARNr 16S es una opción viable para la identificación de la cepa y el análisis filogenético de las BAL (Smita *et al.*, 2009).

Con el fin de secuenciar se logró una adecuada amplificación de la región V1 del gen ARNr 16S. Antes de mandar a secuenciar, se

comprobó el producto PCR purificado mediante electroforesis en gel de agarosa (Figura 8) para asegurar la presencia de una única banda sin barrido. El tamaño resultante de cada una de las bandas se encuentra entre 1,200 pb.

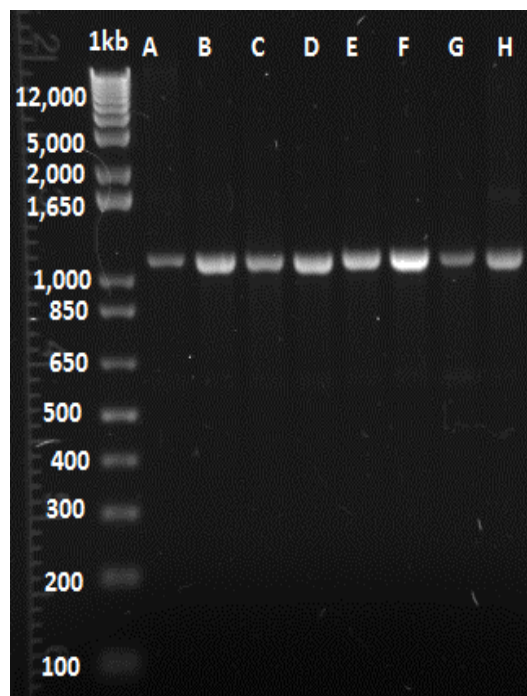


Figura 8. Amplicones de la región V1 del gen RNA 16S ribosomal purificados, visualizados en gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio A. c5t14p3; B. c3t14p1 ; C. c2t8p3; D. c3t15p1 ; E. c1t13p2; F. c4t15p3; G. c2t6p3; H.c4t13p1.

7.4 Digestión del producto de PCR con enzimas de restricción

Una cepa de cada grupo fue seleccionada, las cepas se amplificaron en la región V1 y se sometieron a digestión con las enzimas de restricción HaeIII, HhaI, HindIII. El resultado de la digestión se cargo en un gel de agarosa al 1.5%. Los patrones obtenidos en el gel se visualizaron en

una cámara Image Lab. Todos los amplicones se cortaron excepto con HindIII. Los resultados se muestran en la Figura 9.

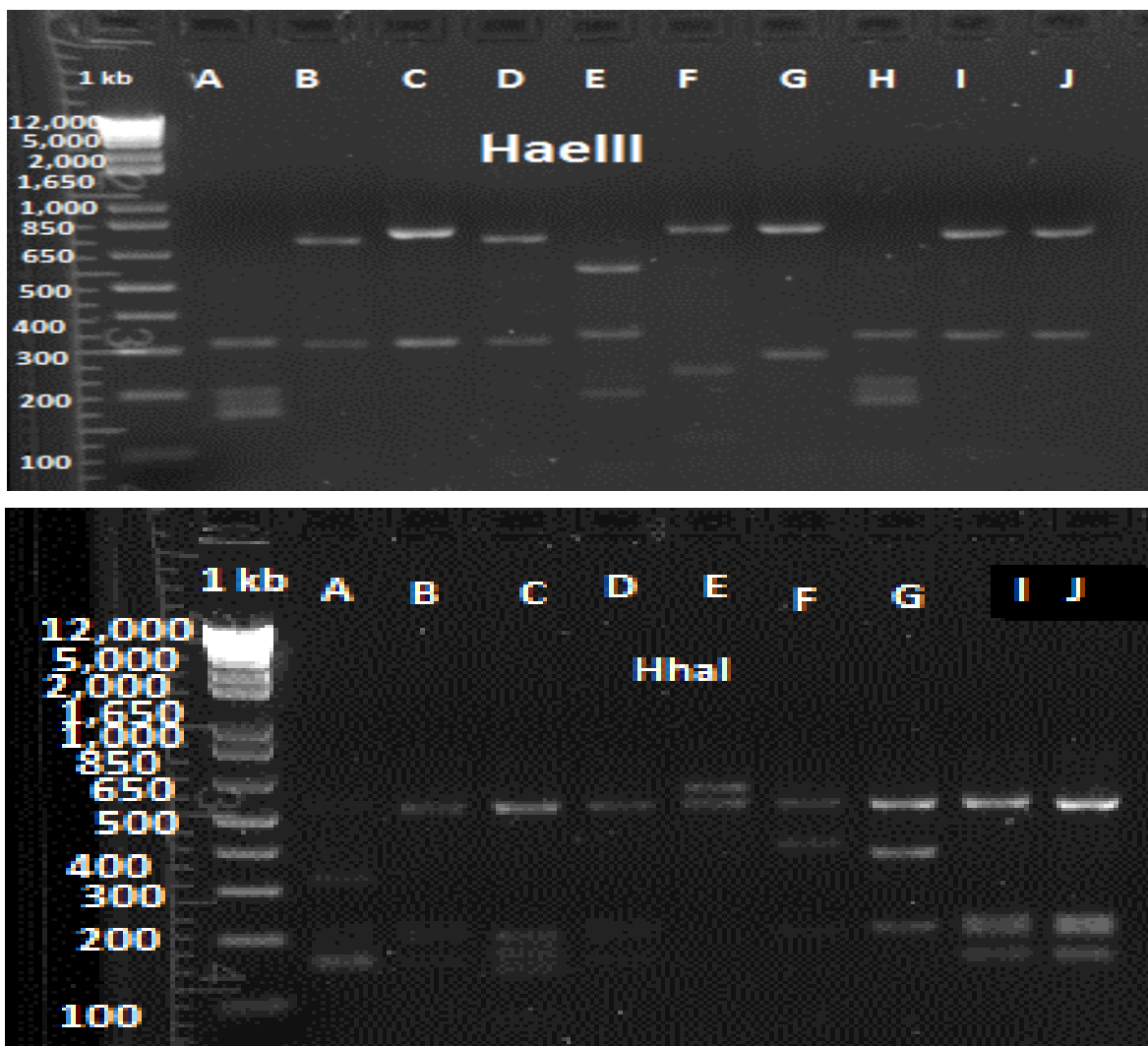


Figura 9. Patrón de restricción obtenido para la región V1 del gen 16S con HaeIII, HhaI. A. Grupo IX; B. Grupo V; C. Grupo IV; D. Grupo I; E. Grupo X; F. Grupo VI; G. Grupo III; H. Grupo VII; I. Grupo II; J. Grupo VIII.

Se analizaron las bandas de acuerdo a su tamaño en pb, los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14. Patrón de restricción de la región V1 del gen ARNr 16S. Se muestran fragmentos (pb) obtenidos del análisis de restricción.

GRUPO	BAL	Tamaño de los fragmentos generados (pb)	
		HaeIII	HhaI
I	<i>Fructobacillus durionis</i>	928.4+427.0	566.8+219.2+162.2
II	<i>Fructobacillus sp.</i>	954.6+443.6	579.9+227.9+173.0
III	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	981.6+393.3	573.3+404.5+225.0
IV	<i>Leuconostoc citreum</i>	954.6+424.7	560.4+205.3+173.0
V	<i>Fructobacillus fructosus</i>	919.8+420.1	560.4+213.5+159.6
VI	<i>Leuconostoc fallax</i>	981.6+353.3+223.6	586.6+432.5+216.3
VII	<i>Bacteria no cultivable</i>	446.0+330.2+293.0	570.0+230.3+175.7
VIII	<i>Fructobacillus sp.</i>	963.5+446.0	573.3+227.9+173.0
IX	<i>Bacteria no cultivable</i>	422.4+305.1+265.2	547.8+332.7+187.5+159.6
X	<i>Lactobacillus plantarum</i>	764.6+446.0+303.4	650.0+579.9

Las diez cepas utilizadas para obtener fragmentos de restricción son genéticamente diferentes de acuerdo al método PCR-RAPD. Con las enzimas HaeIII y HhaI no se encontró diferencia entre los dos grupos de *Fructobacillus* y *Leuconostoc citreum*. Sin embargo, de acuerdo a la morfología microscópica del grupo II y VIII son bacilos largos por lo que se confirma que es del género *Fructobacillus sp.*

Endo *et al.* (2008) han reportado que *Leuconostoc* y *Fructobacillus* son genéticamente similares en la región del 16S, por lo que para su posible diferenciación es recomendable usar la región intergénica como punto de corte. O seleccionar una enzima de restricción que permita obtener fragmentos de restricción distintos para cada especie, realizando un

análisis de restricción *in silico* utilizando programas como Web Cutter 2.0 o Hypertext DNA Sequence Display, una herramienta “on-line” para determinar los sitios de restricción en secuencias de nucleótidos conocidas. Sin embargo, con la enzima HaeIII si se encontró diferencia a nivel de cepa entre *Leuconostoc mesenteroides* y *Leuconostoc fallax*, pero no con la enzima HhaI.

Las enzimas de restricción HaeIII y HhaI son comúnmente utilizadas para la diferenciación a nivel de cepa para el género *Lactobacillus*. Las dos enzimas de restricción fueron adecuadas para la discriminación de *Lactobacillus plantarum* de los demás grupos.

7.5 Secuenciación de la región V1 del gen ARNr 16S

Las secuencias obtenidas para cada una de las cepas de BAL aisladas de la producción de la Taberna se muestran en Apéndice D. En la Tabla 15 se presenta la identidad de cada cepa según la comparación de sus secuencias con el programa BLAST de la base de datos del NCBI.

La calidad de los resultados de secuenciación dependen en gran medida de la pureza y correcta cuantificación de las muestras de ADN analizadas. Por lo que se recomienda utilizar protocolos de extracción, purificación y cuantificación fiables que permitan verificar la integridad y concentración de la muestra (Rodicio *et al.*, 2004).

Sin embargo, para el grupo VII y IX la base de datos se detecto bacteria incultivable, por lo que para estas bacterias se recomienda amplificar con otros cebadores universales y/o una región intergénica.

Tabla 15. Secuencia e identidad de las cepas de BAL estudiadas

Cepa	Grupo	Secuencia relativa cercana	Identidad (%)	No. de palma
C3t15p1	I	<i>Fructobacillus durionis</i>	99	3
C2t6p3	III	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	99	1,2,3
C2t8p3	IV	<i>Leuconostoc citreum</i>	99	1,2,3
C3t14p1	V	<i>Fructobacillus fructosus</i>	99	1
C4t15p3	VI	<i>Leuconostoc fallax</i>	99	1,2,3
C3t3p3	VII	<i>Bacteria no cultivable</i>	99	1
C4t3p3	IX	<i>Bacteria no cultivable</i>	99	2
C1t13p2	X	<i>Lactobacillus plantarum</i>	100	2

7.5 Variación de la comunidad bacteriana en las diferentes muestras de Taberna

Los grupos de BAL más comunes y abundantes en las muestras Taberna de las tres palmeras fueron *L. mesenteroides*, *L. citreum* y *L. fallax*, mientras que las demás especies de BAL solo están presentes en una palmera específica.

Para conocer mejor la abundancia de las BAL, la frecuencia se calculó basándose en el número total de muestras (tiempos) positivas de diferentes especies identificadas para cada palma. *L. mesenteroides* (67.9%) fue la especie más común en la palmera 1, seguido de *L. fallax* (64.3%), *L. citreum* (42.9%), *F. fructosus* (35.7%), una especie sin identificar y otra especie de *Fructobacillus sp.* En las muestras de la palmera 2, *L. mesenteroides* (100%) es la especie dominante, seguida de *L. plantarum* (75%); se detectaron bajos porcentajes especies de *L. fallax*, *L. citreum* y *Fructobacillus sp.* En las muestras de la palmera 3, *L.*

mesenteroides (85.7%) fue la especie más abundante, seguida de *Fructobacillus sp.* (57.1%), *L. citreum* y *L. fallax* (46.4%), en bajo porcentaje *F. durionis*.

Estos resultados son similares a los reportados por Santiago-Urbina *et al.* (2014) en el caso de levaduras; la población de levaduras en las muestras de tres palmas son diferentes. Los autores sugieren que se debe a que la fermentación de la Taberna es un proceso heterogéneo que depende de la inoculación al azar, el aire, el polvo y la microbiota que se desarrolla en las paredes de la canoa.

La distribución de las diferentes especies de BAL en las muestras (tiempos de fermentación) de Taberna tomadas de cada palmera se muestra en la Figura 10. Los resultados de este estudio muestran que la composición de las especies de BAL en las muestras (tiempos) varió entre los diferentes palmeras.

Okafor (1978) reporta que no hay un patrón consistente de la distribución de las diversas BAL; los cuatro géneros de BAL (*Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* y *Pediococcus*) no se encontraron en cualquier muestra. En una palmera *Streptococcus* se encuentra en todo el período de 7 días, mientras que los lactobacilos se mantienen sólo durante los primeros 3 días de fermentación. Por otro lado, en otra palmera se observó *Leuconostoc* después de 2 días de incubación pero no se detectó presencia de *Streptococcus*.

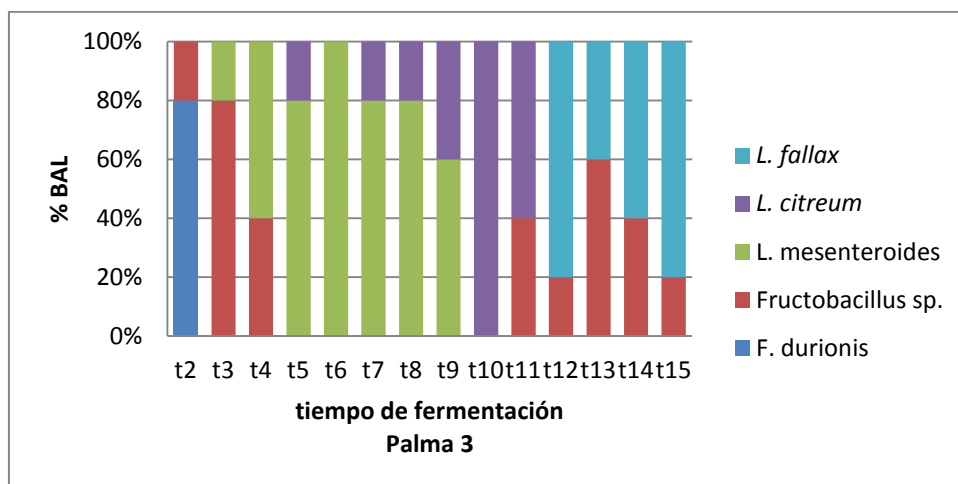
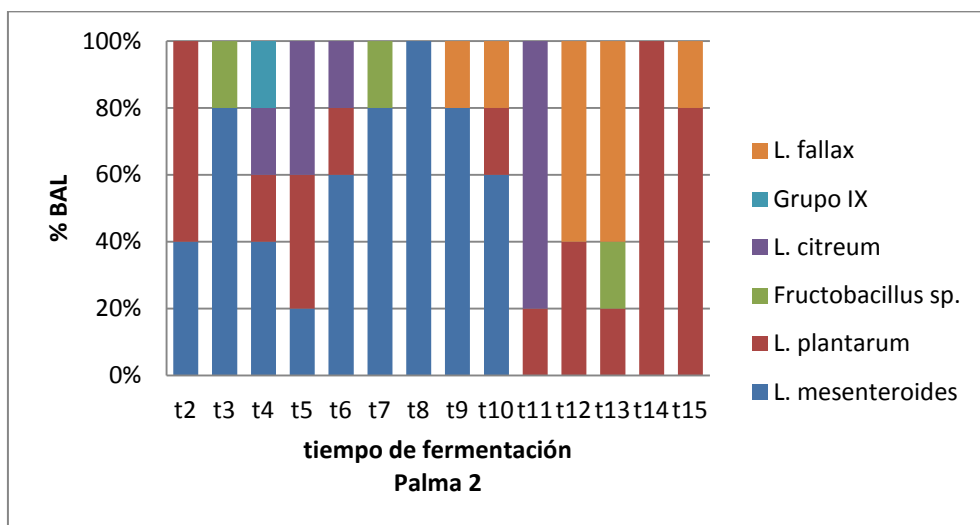
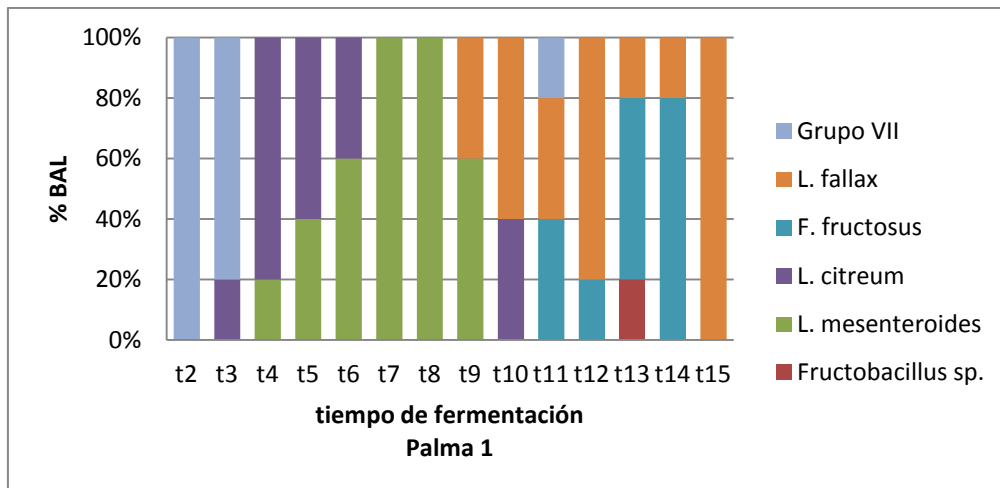


Figura 10. Frecuencia de aislamiento de especies de BAL aislada en la Taberna en diferentes lotes de fermentación.

Fructobacillus durionis y *Fructobacillus fructosus* han sido reportados en la Taberna de Alcántara-Hernández *et al.* (2010); este género proviene de una fermentación *in vitro* de la savia y para su identificación los autores usaron un método independiente de cultivo: metagenómica. Las muestras fueron tomadas en 60 y 108 horas, donde se detectaron clones de *Fructobacillus durionis* y *F. fructosus* al inicio del experimento, mientras en la etapa final de fermentación no se encontraron estos clones.

Fructobacillus fructosus y *F. durionis* son microorganismos en forma de vara, prefieren la fructosa para su crecimiento, producen ácido acético y láctico a partir de D-glucosa o D-fructosa en lugar de etanol y prefieren condiciones aeróbicas, no producen dextrano a partir de sacarosa, son heterofermentativos, no hay reducción de nitrato, Ambos géneros se diferencian por la producción de gas (*F. fructosus* puede producir gas a partir de la glucosa y fructosa, mientras que *F. durionis* produce gas en combinación con glucosa y fructosa) y contenido de GC de ADN (*F. fructosus* contiene 43% mol y *F. durionis* 44% mol) (Antunes *et al.*, 2002; Leisner *et al.*, 2005; Endo *et al.*, 2008; Endo *et al.*, 2014).

El género *Lactobacillus plantarum* no se ha reportado en la Taberna de Alcántara-Hernández *et al.* (2010), pero si en otros vinos de palma como el Ghana de Amoa-Awua *et al.* (2006) y Banji de Ouoba *et al.* (2012) como la especie predominante, juega un papel importante en la fermentación láctica. Se ha informado que estos lactobacilos son facultativamente heterofermentativos, tienen alta tolerancia a bajo pH y son capaces de producir exopolisacáridos (Kauli *et al.*, 2009). Estos datos explican su presencia en los tiempos 10 al 11 en la palmera 2, donde el contenido de etanol fue alto, valores de pH y contenido de azúcar fueron bajos. Por otra parte, al final de la fermentación de la

Taberna, Alcántara-Hernández *et al.* (2010) encontraron clones de *Lactobacillus nagelii* y *Lactobacillus sucicola* representando a la mayoría de la población de BAL. *Lactobacillus nagelii* y *Lactobacillus sucicola* son BAL anaerobias facultativas, productoras del ácido láctico a partir de la glucosa sin formación de gas, producen dextrano a partir de la sacarosa, *Lactobacillus nagelii* hidroliza esculina (Edwards *et al.*, 2000; Irisawa *et al.*, 2009). Otro estudio de la comunidad microbiana en el pulque se encontró *L. acidophilus* es homofermentativo al final del proceso de fermentación, estos lactobacilos fermentan la glucosa y fructosa pero no sacarosa y producen ácido láctico (Escalante *et al.*, 2008).

En mas muestras de Taberna la especie más abundante fue *Leuconostoc: L. mesenteroides, L. citreum* y *L. fallax*. *Leuconostoc mesenteroides* se ha reportado en los vinos de palma: Toddy de Shamala *et al.* (1988), Ghana de Amoa-Awua *et al.* (2007), Legmi de Manel *et al.* (2011), Banji de Ouoba *et al.* (2012) como la especie predominante responsable de la acidificación y del aspecto viscoso de la savia por ser productor de exopolisacaridos tipo dextranos. Por otro lado, *Leuconostoc citreum* y *Leuconostoc fallax* se detectaron por primera vez en el vino de palma; y por su abundancia parece ser que juegan un papel importante en la producción de exopolisacaridos en la Taberna.

Leuconostoc citreum es una BAL heterofermentativa que juega un papel importante en muchos alimentos fermentados, tales como los lácteos, vegetales, el pozol. Este microorganismo es utilizado como inóculo para la producción del kimchi (plato tradicional de verduras fermentadas en Corea). Produce dextranos y fructanos a partir de sacarosa (Laguerre *et al.*, 2012). *Leuconostoc fallax* aparece en los tiempos 11 al 15, crece con el género *Fructobacillus*. Se debe a que *L. fallax* ha demostrado ser

un microorganismo que crece en concentraciones bajas de azúcar, es resistente a altas concentraciones de ácido láctico y es capaz de resistir a un 9% de etanol (Middelhoven *et al.*, 1999).

En base a los resultados de la Figura 10, *Leuconostoc mesenteroides* es capaz de crecer junto con *Leuconostoc citreum* pero no con *Leuconostoc fallax*. Probablemente, sea porque *Leuconostoc fallax* tiende a competir por los nutrientes y/o es capaz de producir sustancias antagónicas que tiende a afectar la cinética de crecimiento y el metabolismo de *Leuconostoc mesenteroides* y *Leuconostoc citreum*. En un estudio sobre la presencia de *Leuconostoc fallax* durante la fermentación de sauerkraut (col agria), Barrangou *et al.* (2002) revelan que una variedad de cepas de *L. mesenteroides* que contiene la enzima malato descarboxilasa son consideradas como las especies preponderantes durante la primera semana de la fermentación, mientras que las cepas de *L. fallax* carecen de la enzima malato descarboxilasa son dominantes al final de la etapa de fermentación.

La supervivencia de los microorganismos y su posterior crecimiento están relacionados estrechamente a la suma de varios factores fisicoquímicos y bióticos, tales como temperatura, humedad (Santiago-Urbina *et al.*, 2014). La población microbiana también tiende disminuir por la reducción de azúcar, por la falta de nutrientes en la savia; cuando la concentración de estos factores cae, también lo hará el potencial de crecimiento del organismo (Smith, 2004). En consecuencia, las diferencias en la diversidad de especies en taberna frente a la diversidad de especies en otros vinos de palma podrían contribuir a las características particulares de la taberna.

8. Conclusiones

Con las pruebas de identificación preliminar mediante morfología microscópica, macroscópica, así como prueba de catalasa se comprobó que las cepas aisladas de la Taberna pertenecen al género de BAL.

Por medio de la técnica RAPD se demostró la diferenciación genotípica de las cepas. El uso de dos cebadores (GTG)₅ y M13 jugaron un papel importante en la asignación de diez grupos de BAL.

Fue posible determinar la diferencia entre *Leuconostoc* y *Fructobacillus* por medio de RAPD, lo que no se pudo observar en ARDRA. Sin embargo, con ARDRA fue posible la discriminación del género *Lactobacillus* del *Leuconostoc*. Demuestra que RAPD es una opción más confiable para la asignación de grupos de las BAL.

Por medio de la secuenciación de la región V1 del gen ARNr 16S se encontraron las siguientes BAL: *Fructobacillus fructosus*, *Fructobacillus durionis*, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc citreum*, *Leuconostoc mesenteroides* y *Leuconostoc fallax*.

Así mismo, se encontró que la población de BAL es diferente en las tres palmas de coyol. Por último, se demostró que la diversidad de las BAL va variando durante el tiempo de fermentación. Las diferentes condiciones ambientales, diferentes especies de palmeras, tipo de proceso de producción son probables causas de las variaciones observadas en las poblaciones de BAL en vinos de palma de diferentes países.

9. Perspectivas

Para comprender la microbiología y bioquímica durante la fermentación natural de la Taberna es necesario estudiar cada una de las cepas identificadas, determinando:

- Su metabolismo fermentativo mediante pruebas bioquímicas con tiras API50CH o métodos convencionales.
- Su tolerancia a diferentes condiciones de estrés: alcohol y acidez.
- Su tipo de exopolisacaridos producidos por las cepas *Lactobacillus plantarum* y las 3 especies encontradas del género *Leuconostoc*.

Estudiar la diversidad de BAL mediante un método independiente de cultivo, así como cuantificarlas.

10. Bibliografía

- Abriouel, H., Ben Omar, N., Cobo, A., Caballero, N., Fernández, M., Perez, R. y Galvez, A. (2012). Characterization of lactic acid bacteria from naturally-fermented Manzanilla Aloreña green table olives. *Food Microbiology*. 32, 308-316.
- Alcántara-Hernández, R., Rodríguez-Álvarez, J., Valenzuela-Encinas, F., Gutiérrez-Miceli, F., Castañón-González, H., Marsch, R. (2010). The bacterial community in "taberna" a traditional beverage of Southern Mexico. *Letter in Applied Microbiology*. 51, 558-563.
- Antunes, A., Rainey, F., Nobre, F., Schummann, P., Ferreira, A., Ramos, A., Santos, H y Costa, M. (2002). *Leuconostoc ficulneum* sp. nov., a novel lactic acid bacterium isolated from a ripe fig, and reclassification of *Lactobacillus fructosus* as *Leuconostoc fructosus* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 52, 647-655.
- Amoa-Awua, W., Sampson, E., & 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. *Journal of Applied Microbiology*. 102, 599-606.
- Amor, K., Vaughan, E. & Vos, M. (2007). Advanced Molecular Tools for the Identification of Lactic Acid Bacteria. *The Journal of Nutrition*. 137, 741S-747S.
- Ampe, F., Omar, N., Moizan, C., Wachter, C. y Guyot, J. (1999). Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in mexican Pozol, and fermented maize dough, demonstrates the need for cultivation-independent methods to investigate traditional

- fermentations. *Applied and Environmental microbiology*. 5464-5473.
- Balick, M. (1999). Production of coyol vine from *Acrocomia Mexicana* (*Arecaceae*) in Honduras. *Economic Botany*. 44, 84-93.
- Bardakci, F. (2001). Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers. *Turkish Journal of Biology*. 25, 185-196.
- Barrangou, R., Yoon, S., Breidt, F., Fleming, H. y Klaenhammer, T. (2002). Identification and Characterization of *Leuconostoc fallax* Strains Isolated from an Industrial Sauerkraut Fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*. 68(6), 2877.
- Cabeci, A. y Gürakan G. (2008). Molecular methods for identification of *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* using methionine biosynthesis and 16S rRNA genes. *Journal Dairy Research*. 75, 392-398.
- Chakravorty, S., Helb, D., Burday, M., Connell, N. y Alland, D. (2007). A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *Journal Microbiology Methods*. 69(2), 330-339.
- Choi, H., Cheigh, C., Kim, S., Lee, J., Lee, D., Choi, S., Park, J. y Pyun, Y. (2002). *Weissella Kimchii* sp. Nov., a novel lactic acid bacterium from kimchi. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 52, 507-511.
- Díaz, G. y Wachter, C. (2003). Métodos para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 45, 30-40.

- Dolci, P., Alessandria, V., Zeppa, G., Rantsiou, K. y Cocolin, L. (2008). Microbial characterization of artisanal Raschera PDO cheese: Analysis of its indigenous lactic acid bacteria. *Food microbiology*. 25, 392-399.
- Duboc, P. y Mollet, B. (2001). Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. *International Dairy Journal*. 11, 759-768.
- Edwards, C., Collins, M., Lawson, P., Rodriguez, A. (2000). *Lactobacillus nagelii* sp. Nov., an organism isolated from a partially fermented wine. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 50, 699-702.
- Ercolini, D. (2004). PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *Journal of Microbiological Methods*. 56, 297-314.
- Ehrmann A. y Vogel, R. (2005). Molecular taxonomy and genetics of sourdough lactic acid bacteria. *Trends in food Science & technology*. 16, 31-42.
- Ehrmann M., Freiding S., Vogel R. (2009). *Leuconostoc palmae* sp. nov., a novel lactic acid bacterium isolated from palm wine. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 59, 943-947.
- Endo, A. y Okada, S. (2008). Reclassification of the genus *Leuconostoc* and proposals of *Fructobacillus fructosus* gen., *Fructobacillus durionis* comb. nov., *Fructobacillus ficulneus* comb. nov. and *Fructobacillus pseudoficulneus* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 58, 2195–2205.

- Endo, A., Tanaka, N., Oikawa, Y., Okada, S., Dicks, L. (2014). Fructophilic Characteristics of *Fructobacillus spp.* may be due to the Absence of an Alcohol/Acetaldehyde Dehydrogenase Gene (adhE). *Current Microbiology*. 68, 531-535.
- Escalante, A., Giles-Gómez, M., Hernández, G., Córdova-Aguilar, M., López-Munguía, A., Gosset, G., Bolívar, F. (2008). Analysis of bacterial community during the fermentation of pulque, a traditional Mexican alcoholic beverage, using a polyphasic approach. *International Journal of Food Microbiology*. 124, 126-134.
- Faparusi, S. (1981). Sugars identified in *Raphia* palm wine. *Food Chemistry* 7, 81-86
- Gevers, D., Huys, G. y Swings, J. (2001). Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of Lactobacillus species. *FEMS Microbiology letters*. 205, 31-33.
- Ghasemi, M., Najafpour, G., Rahimnejad, M., Beigi, P., Sedighi, M. y Hashemiyeh, B. (2009). Effect of different media on production of lactic acid from whey by Lactobacillus bulgaricus. *African Journal of Biotechnology*. 8, 081-084.
- Giraffa, G., Rosseti, L., Neviani, E. (2000). An evaluation of chelex-based DNA purification protocols for the typing of lactic acid bacteria. *Journal of Microbiological Methods*. 42, 175-184.
- Giraffa, G., Rosseti, L. (2004). Monitoring of the bacteria composition of dairy starter cultures by RAPD-PCR. *FEMS Microbiology Letters*. 237, 133-138.

- Irisawa, T., Okada, S. (2009). *Lactobacillus sucicola* sp. nov., a motile lactic acid bacterium isolated from oak tree (*Quercus* sp.) sap. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 59, 2662-2665.
- Jay, J. Loessner, M. y Golden, D. (2005). *Modern Food Microbiology*. Editorial Springer. Séptima edición, New York, USA.
- Karamoko, D., Djeni, N., N'guessan, K., Bouatenin, K., & Dje, K. (2012). The biochemical and microbiological quality of palm wine samples produced at different periods during tapping and changes which occurred during their storage. *Food Control*. 26, 504-511.
- Kalui, C., Mathara, J., Kutima, P., Kiiyukia, C. y Wongo, L. (2009). Functional characteristics of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* from ikii, a Kenyan traditional fermented maize porridge. *African Journal of Biotechnology*. 8(18), 4363-4373.
- Laguerre, S., Amari, M., Vuillemin, M., Robert, H., Loux, V., Klopp, C., Morel, S., Gabriel, B., Remaud-Simeon, M., Gabriel, V., Moulis, C. y Fontagne-Faucher, C. (2012). Genome sequences of three *Leuconostoc citreum* strains, LBAE C10, LBAE C11, and LBAE E16, isolated from wheat sourdoughs. *Journal of Bacteriology*. 194(6), 1610.
- Leisner, J., Vancanneyt, M., Van der Meulen, R., Lefebvre, K., Engelbeen, K., Hoste, B., Laursen, B., Bay, L., Rusul, G., De Vuyst, L y Swings J. (2005). *Leuconostoc durionis* sp. nov., a heterofermenter with no detectable gas production from glucose.

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.
55, 1267-1270.

Manel, Z., Sana, M., Nedia, K., Moktar, H. y Ali, F. (2011).
Microbiological analysis and screening of lactic acid bacteria from
Tunisian date palm sap. *African Journal of Microbiology Research.*
5, 2929-2935.

Mbuagbaw, L., Noorduy, S. (2012). The Palm Wine Trade:
Occupational and Health Hazards. *The International Journal of
Occupational and Environmental Medicine.* 3, 157-164.

Middelhoven, W., Klijn, N. (1999). *Leuconostoc fallax* and Acid and
Ethanol Tolerant Lactic Acid Bacterium. *Journal of the Science a
Food and Agriculture.* 75, 57-60.

Okafor, N. (1978). Microbiology and Biochemistry of Oil-Palm wine.
Advances in Applied Microbiology. 24, 237-257

Ouoba, L., Kando, C., Parkouda, C., Sawadogo-Lingani, H., Diawara, B.
y Sutherland, P. (2012). The microbiology of Bandji, palm wine of
Borassus *akeassii* from Burkina Faso: identification and genotypic
diversity of yeast, lactic acid and acetic bacteria. *Journal of
Applied Microbiology.*

Owosu-Kwarteng, J., Akabanda, F., Nielsen, D. y Tano-Debrah, K.
(2012). Identification of lactic acid bacteria isolated during
traditional fura processing in Ghana. *Food Microbiology.* 32, 72-78.

Plessis, H., Dicks, L., Pretorius, I., Lambrechts, M., Toit, M. (2004).
Identification of lactic acid bacteria isolated from South African

- brandy base wines. *International Journal of Food Microbiology*. 91, 19-29.
- Randazzo, C., Caggia, C., Neviani, E. (2009). Application of molecular approaches to study lactic acid bacteria in artisanal cheeses. *Journal of Microbiological Methods*. 78, 1-9.
- Regli-Davin, A., Abed, Y., Charrel, R.N., Bollet, C. y Micco, P. (1995). Variations in DNA concentrations significantly affect the reproducibility. *Research microbiology*. 146, 561-568.
- Rodicio M., Mendoza, M. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16s: fundamente, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica*. 22(4), 238-45.
- Ross, P., Morgan, S., Hill, C. (2002). Preservation and fermentation: past, present and future. *International Journal of Food Microbiology*. 79, 3-16.
- Rossetti, L. y Giraffa, G. (2005). Rapid identification of dairy lactic acid bacteria by M13-generated, RAPD-PCR fingerprint databases. *Journal of Microbiological Methods*. 63, 135-144.
- Santiago-Urbina, J., Verdugo-Valdez, A., Ruiz-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.
- Santiago-Urbina, J., Arias-García, J., Ruíz-Terán, F. (2014). Yeast species associated with spontaneous fermentation of taberna, a

traditional palm wine from the southeast of Mexico. *Annals Microbiology*.

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

Salminen, S., Wright, A. (2005). Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects. Tercera edición. Marcel Dekker, Inc. New York.

Savadogo, A., Ouattara. C., Bassole, I. y Traore, A. (2006). Bacteriocins and lactic acid bacteria. *African Journal of Biotechnology*. 5, 678-683.

Shamala, T. & Sreekantiah, S. (1988). Microbiological and biochemical studies on traditional Indian palm wine fermentation. *Food Microbiology*. 5, 157-162.

Smita, S., Goswami, P., Singh, R. y Heller, K. (2009). Application of molecular identification tools for *Lactobacillus*, with a focus on discrimination between closely related species: A review. *LWT-Food Science and Technology*. 42, 448-457.

Smith (2006). Biotecnología. Editorial Acribia. Zaragoza, España.

Temmerman, R., Huys G. & Swings, J. (2004). Identification of lactic acid bacteria: culture-dependent and culture independent methods. *Trends in Food Science & Technology*. 15, 348–359.

Tortora, G., Funke, B. y Case, C. (2007). Introducción a la microbiología. Ed. Médica Panamericana, 9a ed. Buenos Aires, Argentina.

- Umerie, C. (2000). Caramel production from saps of African oil palm (*Elaeis guineensis*) and wine palm (*Raphia hookeri*) trees. *Bioresource Technology*. 75, 167-169.
- Vandame, E. y De Vuyst, L. (1994). Bacteriocins of lactic acid bacteria: microbiology, genetics and application. Chapman & Hall, Ltd. London.
- Vásquez, S., Suarez, H. y Zapata, S. (2009). Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. *Revista Chilena Nutrición*. 36, 64-71.
- Versalovic, J., Schneider, M., Bruijn, F., Lupski, J. (1994). Genomic Fingerprinting of Bacteria Using Repetitive Sequence-Based Polymerase Chain Reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology*. 5, 25-40.
- Vuys, L., Camu, N., Winter, T., Vandemeulebroecke, K., Van de Perre, V., Vancanneyt, M., De Vos, P., Cleenwerck, I. (2008). Validation of the (GTG)₅-rep-PCR fingerprinting technique for rapid classification and identification of acetic acid bacteria, with a focus on isolates from Ghanaian fermented cocoa beans. *International Journal of Food Microbiology*. 125, 79-90.

Apéndice A

Procedimientos y preparación de reactivos

Tinción de gram

Se colocó una gota de agua sobre un portaobjetos, se extendió con la ayuda de un asa la colonia BAL, mezclando uniformemente con el agua. Se fijó la muestra a la flama, se le adicionó una solución de cristal violeta que la cubriera dejándola reaccionar por 1 minuto, se eliminó el exceso y se añadió lugol a un minuto. Posteriormente se decoloró con 4 gotas de alcohol-acetona, se lavó con agua y se añadió safranina un minuto, eliminando el exceso de ésta con agua, secando finalmente la muestra al aire. Se observó al microscopio características tales como tipo de tinción y morfología.

Prueba de catalasa

Se tomó con el asa estéril una colonia de cultivo de 18 horas de incubación. Se colocó la colonia directamente sobre un portaobjetos sin añadir agua agregándole una gota de peróxido. La interpretación se realizó observando que no existiera formación de burbujas para considerarlas como catalasa negativa, siendo esta una característica propia de las BAL.

Apéndice B

Composición de reactivos

⌘ Man Rogosa Sharpe (MRS, Difco™ Le pont de Claix, France)

Tabla 16. Composición del medio de cultivo MRS

Fórmula (g/L)		Instrucciones
Proteosa peptona no. 3	10.0	Suspender 70g del medio en un litro de agua destilada. Reposar 5 minutos y mezclar calentando a ebullición durante 1 o 2 minutos. Esterilizar en autoclave durante 15 min a 121°C.
Extracto de carne	8.0	
Extracto de levadura	4.0	
Glucosa	20.0	
Monoleato de sorbitán	1mL	
Fosfato dipotásico	2.0	
Acetato de sodio	5.0	
Citrato de amonio	2.0	
Sulfato de magnesio	0.2	
Sulfato de manganeso	0.05	

⌘ Cicloheximida (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, EE.UU.)

Extracción de ADN

⌘ Buffer TE

10mM Tris-HCl (USBiological, Swampscott, MA)

1mM EDTA (Sigma® St. Louis, MO USA)

⌘ Buffer TES

10% sacarosa (Reasol^{MR}, México)

25Mm Tris-HCl (USBiological, Swampscott, MA)

10mM EDTA (Sigma® St. Louis, MO USA)

pH 8

- ⊗ lisozima (Affymetrix[®], Inc. Cleveland, OH USA),
- ⊗ RNAsa (20mg/mL; Sigma[®] St. Louis, MO USA)
- ⊗ proteinasa K (20mg/mL; Sigma[®] St. Louis, MO USA)
- ⊗ SDS (10%; Sigma[®] St. Louis, MO USA)
- ⊗ fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1; Sigma-Aldrich[®])
- ⊗ NaCl 5M (Fermont, Monterrey, NL)

Electroforesis

- ⊗ Buffer 0.5x TBS

89Mm Tris-HCl (USBiological, Swampscott, MA)

89mM Ácido Bórico (Sigma[®] St. Louis, MO USA)

2Mm EDTA (Sigma[®] St. Louis, MO USA)

- ⊗ Buffer carga 2x

Sacarosa

Azul de bromofenol

Agua desionizada

- ⊗ Agarosa

- ⊗ Bromuro de etidio (10mg/mL, Sigma[®] St)

Apéndice C

Palma 1

Tiempo	Microscópica			Macroscópica
	Cepa	Forma	Descripción	
2	3	bacilos	cortos, gruesos	cremosa, húmeda
	4	bacilos	cortos, gruesos	cremosa, húmeda
3	2	bacilos	cortos, gruesos	cremosa, húmeda
	3	bacilos	cortos, gruesos	cremosa, húmeda
	4	cocobacilos	racimos	blanca, seca
4	5	bacilos	cortos, gruesos	cremosa, húmeda
	1	cocobacilos	racimos	blanca, seca
	2	cocobacilos	racimos	blanca, seca
	3	cocobacilos	gruesos, cadenas	cremosa, seca
	4	cocobacilos	racimos	blanca, seca
5	5	cocobacilos	racimos	blanca, seca
	1	cocobacilos	gruesos, cadenas	cremosa, seca
	2	cocobacilos	racimo	blanca, seca
	3	cocobacilos	racimo	blanca, seca
	4	cocobacilos	gruesos, cadenas	cremosa, seca
6	5	cocobacilos	racimo	blanca, seca
	1	cocobacilos	racimo	cremosa, seca
	2	cocobacilos	cortos, gruesos y grupo	cremosa, seca
	3	cocobacilos	cortos, gruesos y grupo	cremosa, seca
	4	cocobacilos	racimos y tétrada	blanca, seca
7	5	cocobacilos	racimos y cadena	blanca, seca
	1	cocobacilos	racimos	cremosa, seca
	2	cocobacilos	cadena corta y racimos	cremosa, seca
	3	cocobacilos	racimo	cremosa, seca
	4	cocobacilos	racimo	cremosa, seca
8	5	cocobacilos	racimo	cremosa, seca
	1	cocobacilos	cortos, gruesos, grupo	cremosa, seca
	2	cocobacilos	racimo	cremosa, seca
9	3	cocobacilos	racimo	cremosa, seca
	4	cocobacilos	racimo	cremosa, seca
	5	cocobacilos	racimo	cremosa, seca
	1	cocobacilos	racimo	cremosa, seca
	2	cocobacilos	racimo	cremosa, seca
	3	cocobacilos	racimo	cremosa, seca
	4	cocobacilos	racimo	cremosa, seca
	5	cocobacilos	racimo	cremosa, seca
	1	cocobacilos	racimo	blanca, seca
	2	cocobacilos	racimo	blanca, seca
	3	cocobacilos	racimo y diplococo	cremosa, seca
	4	cocobacilos	delgados, en grupo	cremosa, seca
	5	cocobacilos	racimos cortos, delgados, cadena corta	cremosa, seca
	10	1	cocobacilos	racimo y cadena corta
2		cocobacilos	racimo y cadena corta	cremosa, seca
3		bacilos	largos, cadena	blanca, húmeda
4		bacilos	delgados, cadena	blanca, húmeda
5		bacilos	cortos, gruesos	cremosa, húmeda
11	2	cocobacilos	racimo	cremosa, seca
	3	cocobacilos	racimo	cremosa, seca
	4	cocobacilos	racimo	cremosa, seca
	5	bacilos	largos, cadena largas	blanca, húmeda
	1	bacilos	delgados, cadena	blanca, húmeda
12	2	bacilos	cortos, gruesos	cremosa, húmeda
	3	bacilos	delgados, cadena	blanca, húmeda
	4	bacilos	largos, gruesos	blanca, húmeda
	5	cocos	racimo, diplococos	cremosa, seca
	1	bacilos	cortos, gruesos	cremosa, húmeda
13	2	bacilos	delgados, cortos, grupo	blanca, húmeda
	3	bacilos	delgados, cortos, grupo	blanca, húmeda
	4	bacilos	delgados, cortos, grupo	blanca, húmeda
	5	bacilos	delgados, cortos, grupo	blanca, húmeda
	1	bacilos	cortos, gruesos	cremosa, húmeda
14	2	bacilos	delgados, cortos, grupo	blanca, húmeda
	3	bacilos	delgados, cortos, grupo	blanca, húmeda
	4	bacilos	delgados, cortos, grupo	blanca, húmeda
	5	bacilos	delgados, cortos, grupo	blanca, húmeda
	1	bacilos	cortos, gruesos	cremosa, húmeda

Palma 2

Tiempo	Cepa	Forma	Microscópica	Macroscópica
2	2	bacilos	Cortos, gruesos	blanca, húmeda
	4	bacilos	Cortos, gruesos	blanca, húmeda
	5	bacilos	Cortos, gruesos	blanca, húmeda
	4	cocobacilos	Racimos	cremosa, seca
	5	cocobacilos	Racimos	cremosa, seca
	3	1	bacilos largos, gruesos	blanca, húmeda
3	2	cocobacilos	racimos	cremosa, seca
	3	cocobacilos	racimos	cremosa, seca
	4	cocobacilos	diplococos, solos	cremosa, seca
	5	cocobacilos	Racimos	cremosa, seca
	4	1	bacilos cortos, gruesos	blanca, seca
4	2	cocobacilos	racimos	Blanca, seca
	3	cocobacilos	racimos, solos	Blanca, seca
	4	cocobacilos	racimos, solos	cremosa, seca
	5	cocobacilos	Racimos	cremosa, seca
	5	1	bacilos gruesos, grupos	blanca, húmeda
5	2	cocobacilos	racimos	blanca, seca
	3	cocobacilos	racimos	blanca, seca
	4	bacilos	gruesos, grupos	blanca, húmeda
	5	cocobacilos	diplo, tetrados	cremosa, seca
	6	1	bacilos cortos, gruesos	blanca, húmeda
6	2	cocobacilos	solos, tetrados	cremosa, seca
	3	cocobacilos	Solos, tetrados	cremosa, seca
	4	cocobacilos	racimos	blanca, seca
	5	cocobacilos	Racimos	cremosa, seca
	7	1	bacilos largos, gruesos	blanca, húmeda
7	2	cocobacilos	racimos	cremosa, seca
	3	cocobacilos	cadena larga	cremosa, seca
	4	cocobacilos	racimos	cremosa, seca
	5	cocobacilos	racimos	cremosa, seca

8	1	cocobacilos	tetrados	cremosa, seca
	2	cocobacilos	tetrados	cremosa, seca
	3	cocobacilos	solos, diplo	cremosa, seca
	4	cocobacilos	solos, diplo	cremosa, seca
9	5	cocobacilos	diplo, tétrada	cremosa, seca
	1	cocobacilos	racimos, cadena	cremosa, seca
	2	cocobacilos	racimos, cadena	cremosa, seca
	3	cocobacilos	racimos, cadena	cremosa, seca
10	4	cocobacilos	racimos, cadena	cremosa, seca
	5	cocobacilos	cadena larga	blanca, seca
	1	cocobacilos	racimos, cadena	cremosa, seca
	2	cocobacilos	cadena larga	blanca, seca
	3	bacilos	cortos y grupos	blanca, húmeda
11	4	cocobacilos	racimos, diplo	cremosa, seca
	5	cocobacilos	racimos, diplo	cremosa, seca
	1	bacilos	grupos pequeños	blanca, húmeda
	2	cocobacilos	racimos	blanca, seca
	3	cocobacilos	Racimos	blanca, seca
12	4	cocobacilos	racimos	blanca, seca
	5	cocobacilos	solos, racimos	blanca, seca
	1	bacilos	cortos, cadena	blanca, húmeda
	2	cocos	racimos	blanca, seca
	3	bacilos	cortos, cadena	blanca, húmeda
13	4	cocobacilos	cadena	blanca, seca
	5	cocobacilos	cadena	blanca, seca
	1	bacilos	cadena corta	blanca, húmeda
		cocobacilos	cadena	blanca, seca
	3	bacilos	largos, diplo	blanca, húmeda
14	4	cocos	racimos	blanca, seca
	5	cocos	racimos	blanca, seca
	1	bacilos	cortos, cadena	blanca, húmeda
	2	bacilos	cortos, cadena	blanca, húmeda
	3	bacilos	cortos, cadena	blanca, húmeda

15	4	bacilos	cortos, cadena	blanca, húmeda
	5	bacilos	cortos, cadena	blanca, húmeda
	1	bacilos	cortos, cadena	blanca, húmeda
	2	bacilos	cortos, cadena	blanca, húmeda

Palma 3

Tiempo	Cepa	Forma	Microscópica	Macroscópica
2	1	bacilos	cortos, gruesos	cremosa, húmeda
	2	bacilos	cortos, gruesos	cremosa, húmeda
	3	bacilos	cortos, gruesos	cremosa, húmeda
	4	bacilos	cortos, gruesos	cremosa, húmeda
3	2	bacilos	largos, gruesos	blanca, húmeda
	3	bacilos	largos, gruesos	blanca, húmeda
	4	bacilos	largos, gruesos	blanca, húmeda
	5	cocobacilos	diplo y grupos	cremosa, seca
	1	cocobacilos	diplo, cadena corta	cremosa, seca
	2	cocobacilos	racimos	cremosa, seca
4	3	cocobacilos	racimos	cremosa, seca
	4	bacilos	largos, gruesos	blanca, húmeda
5	1	cocobacilos	cadena corta, diplo, grupo	cremosa, seca
	2	cocobacilos	racimos	cremosa, seca
	3	cocobacilos	racimos, cadena corta	cremosa, seca
	4	cocobacilos	racimos, cadena corta	blanca, seca
6	5	cocobacilos	solos, racimos	cremosa, seca
	1	cocobacilos	racimos	cremosa, seca
	2	cocobacilos	racimos	cremosa, seca
	3	cocobacilos	racimos	cremosa, seca
	4	cocobacilos	racimos	cremosa, seca
	5	cocobacilos	tétrada, diplo	cremosa, seca
7	1	cocobacilos	racimos, cadena corta	cremosa, seca
	2	cocobacilos	racimos	blanca, seca
	4	cocobacilos	racimos	blanca, seca
	5	cocobacilos	racimos	blanca, seca
8	1	cocobacilos	racimo y diplococos	blanca, seca

	2	cocobacilos	racimo	blanca, seca
	3	cocobacilos	racimo	blanca, seca
	4	cocobacilos	racimo, tétrada	blanca, seca
9	5	cocobacilos	racimo	cremosa, seca
	1	cocobacilos	solos, cadena	cremosa, seca
	2	cocobacilos	racimos, cadena	cremosa, seca
10	3	cocobacilos	cadena corta, diplo	blanca, seca
	1	cocobacilos	cadena corta, diplo	blanca, seca
	2	cocobacilos	racimo	blanca, seca
	3	cocobacilos	racimo	blanca, seca
	5	cocobacilos	racimo, diplo	blanca, seca
11	3	cocobacilos	racimo	blanca, seca
	4	bacilos	grupos cortos, cadena	blanca, húmeda
	5	bacilos	cortos, gruesos	blanca, húmeda
12	1	bacilos	largos, gruesos	blanca, húmeda
	2	cocobacilos	racimos	cremosa, seca
	3	cocobacilos	cadena y racimo	cremosa, seca
	4	cocobacilos	racimos	cremosa, seca
13	1	bacilos	largos, gruesos	blanca, húmeda
	2	cocobacilos	racimos	cremosa, seca
	3	cocobacilos	racimos	cremosa, seca
	4	bacilos	largos, gruesos	blanca, húmeda
	5	bacilos	largos, gruesos	blanca, húmeda
14	1	bacilos	largos, gruesos	blanca, húmeda
	2	cocobacilos	racimos	cremosa, seca
	3	cocobacilos	cadena	cremosa, seca
	4	cocobacilos	racimos	cremosa, seca
	5	bacilos	largos, gruesos	blanca, húmeda
15	1	cocobacilos	racimos	cremosa, seca
	2	bacilos	largos, gruesos	blanca, húmeda
	3	cocobacilos	racimos	cremosa, seca
	4	cocobacilos	racimos	cremosa, seca

Apéndice D

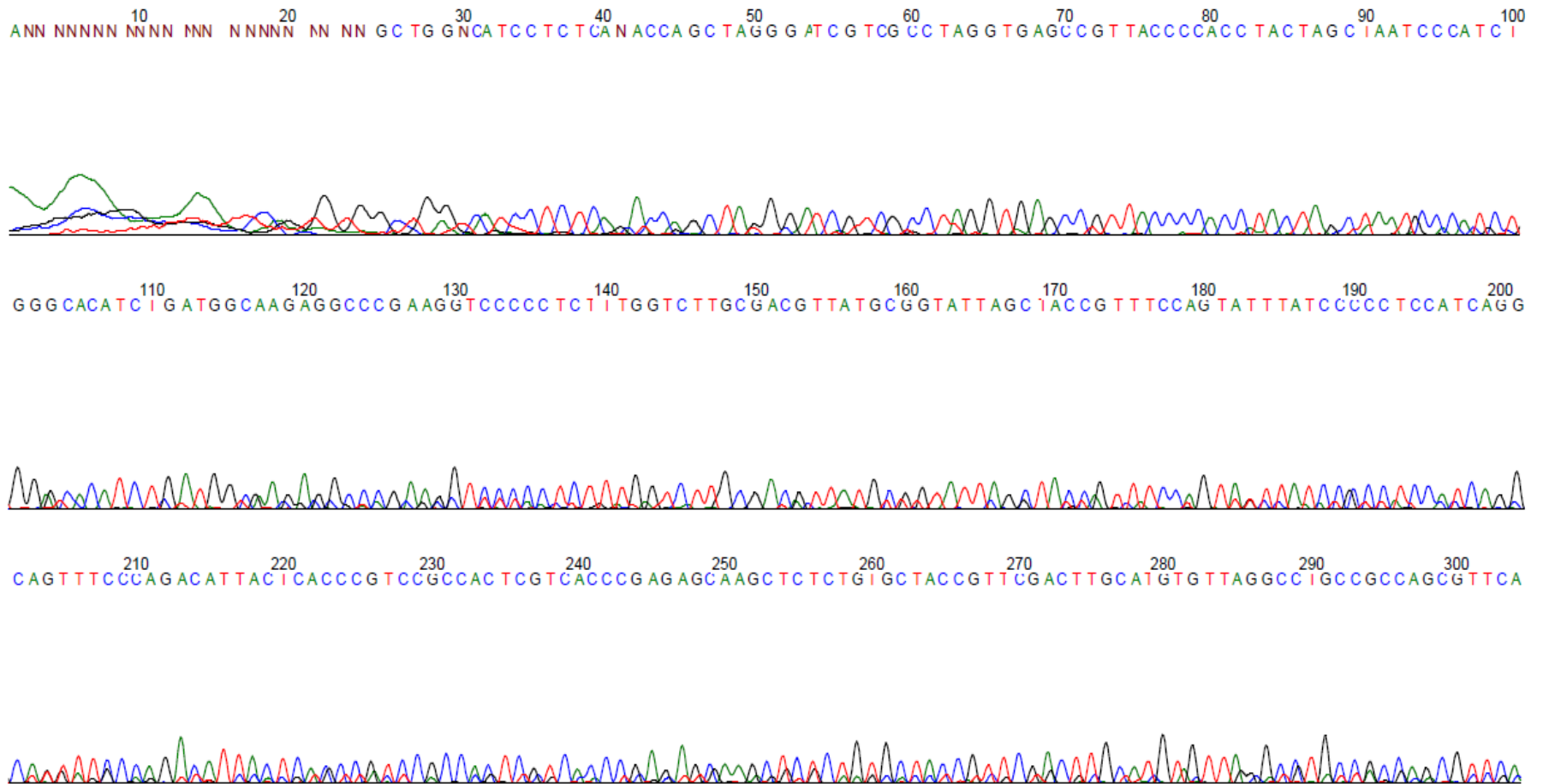


Figura 11. Secuencias de nucleótidos de Bacteria incultivable

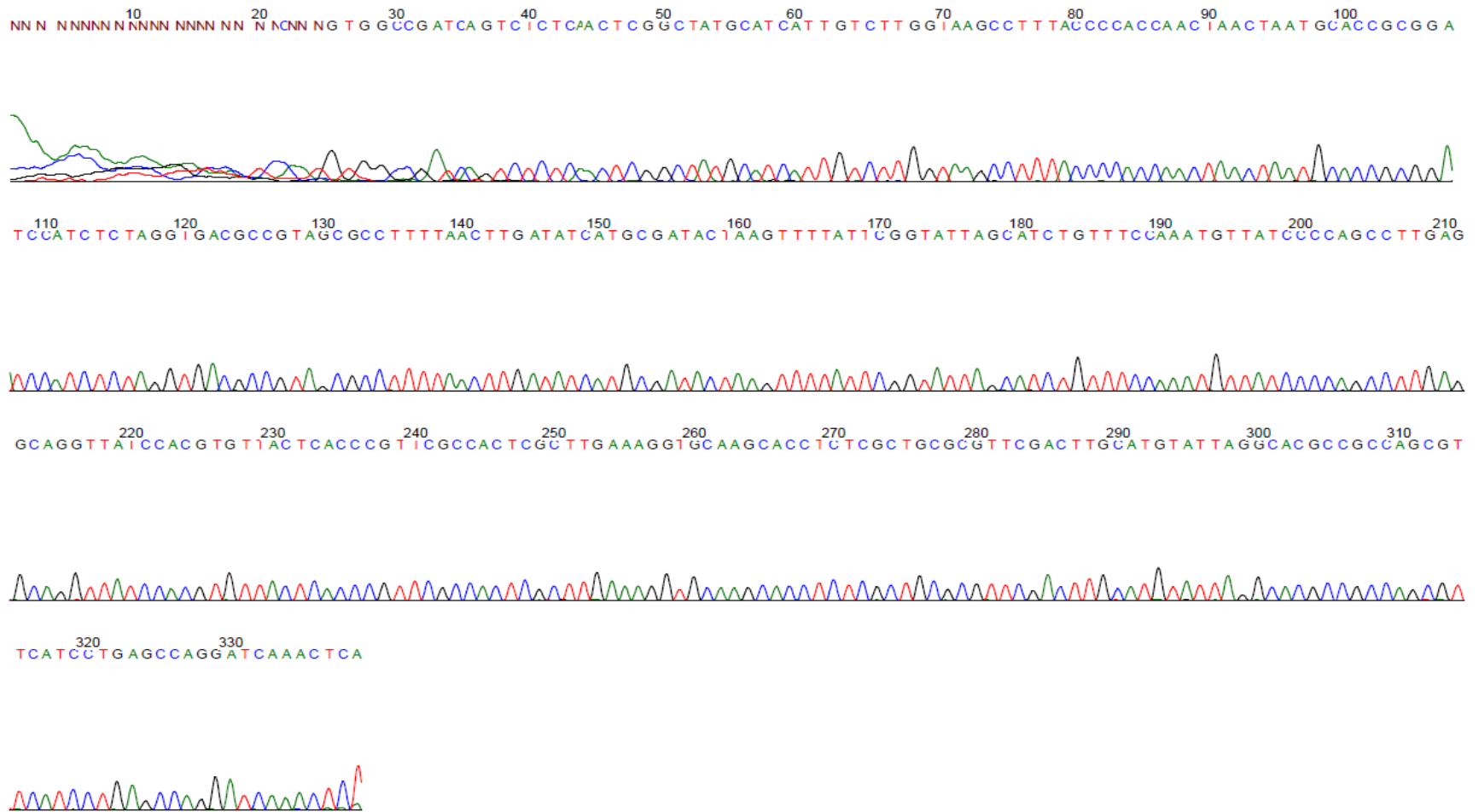


Figura 13. Secuencias de nucleótidos de *Leuconostoc citreum*

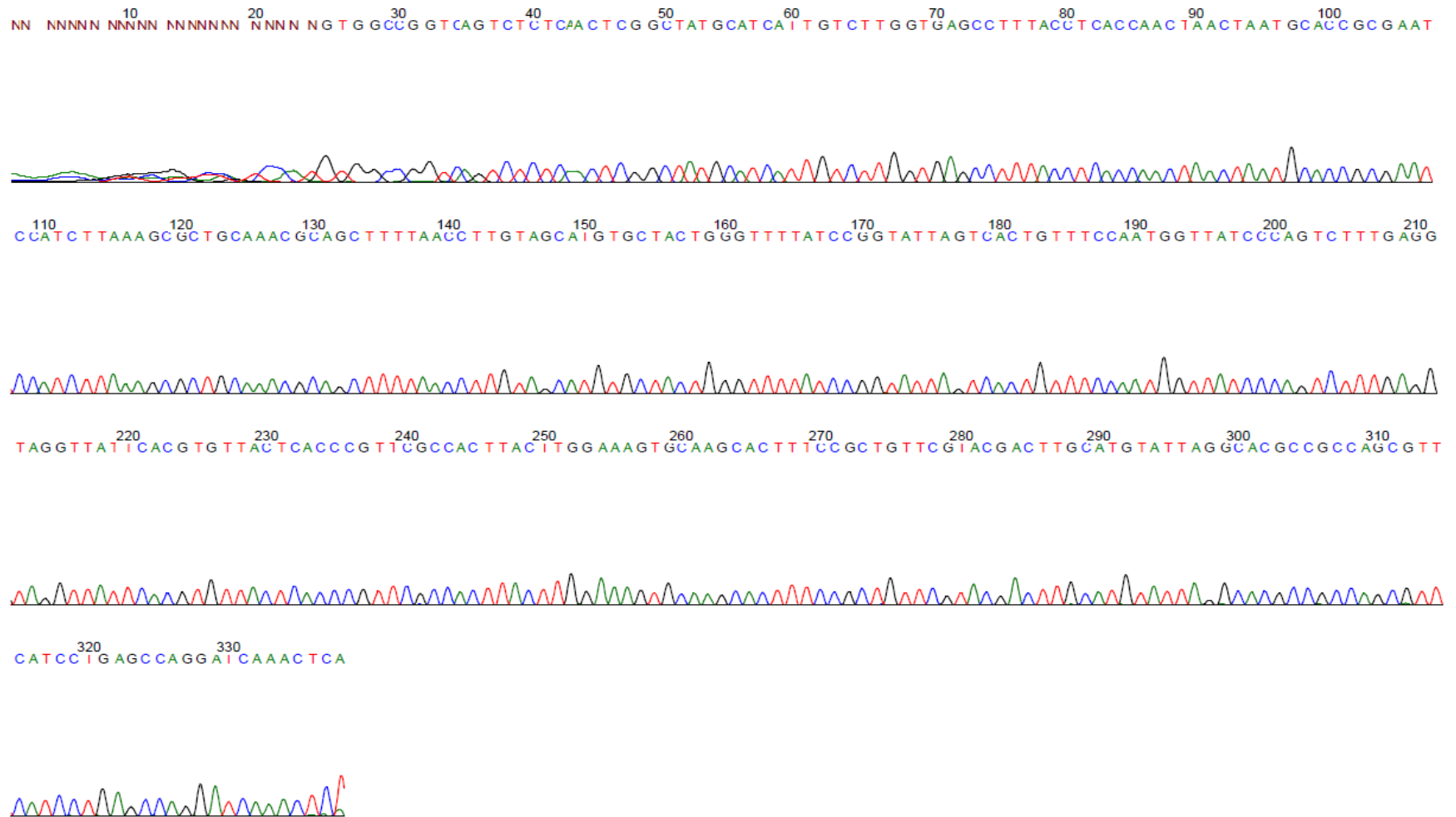


Figura 14. Secuencias de nucleótidos de *Fructobacillus durionis*

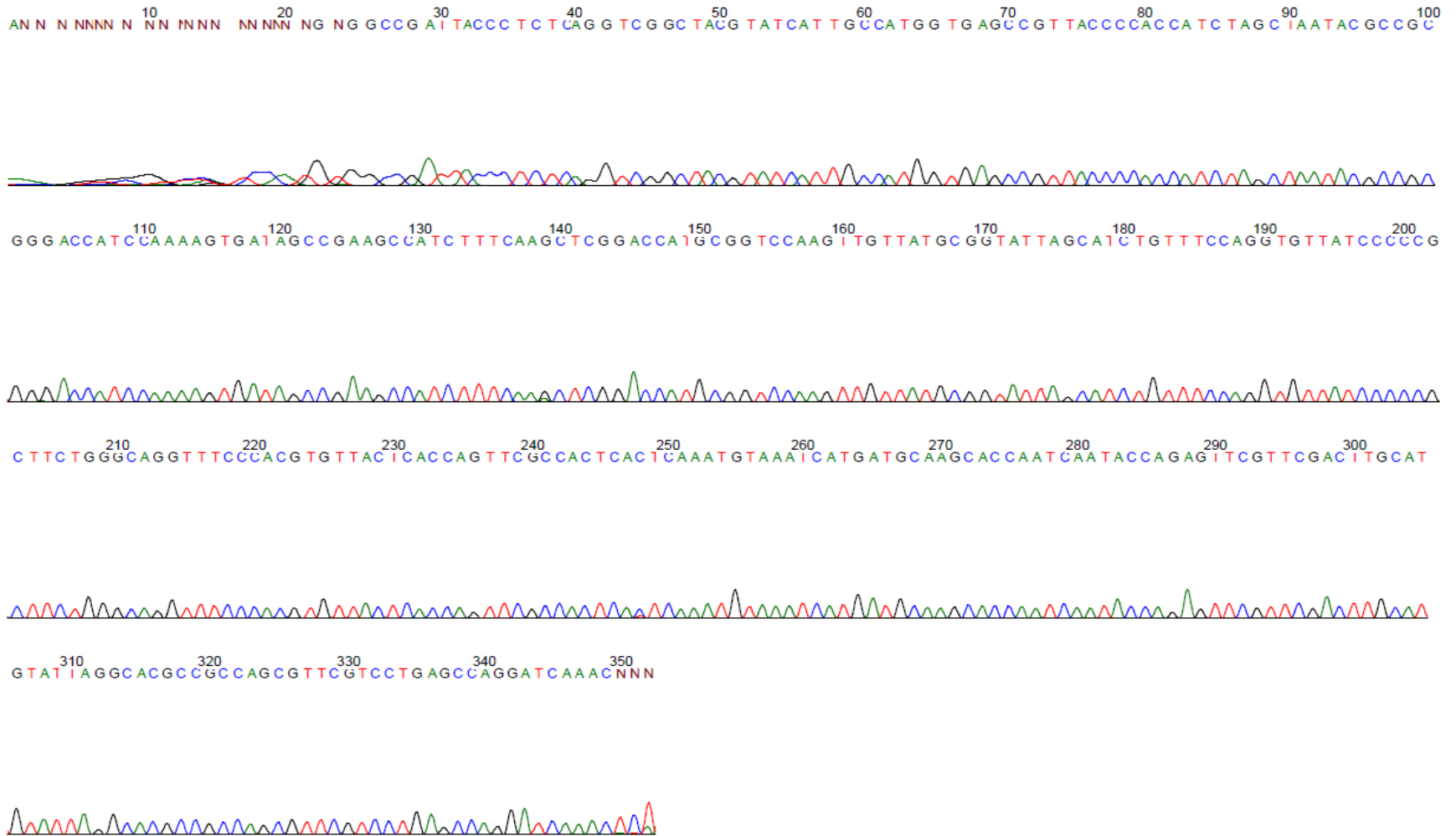


Figura 15. Secuencias de nucleótidos de *Lactobacillus plantarum*

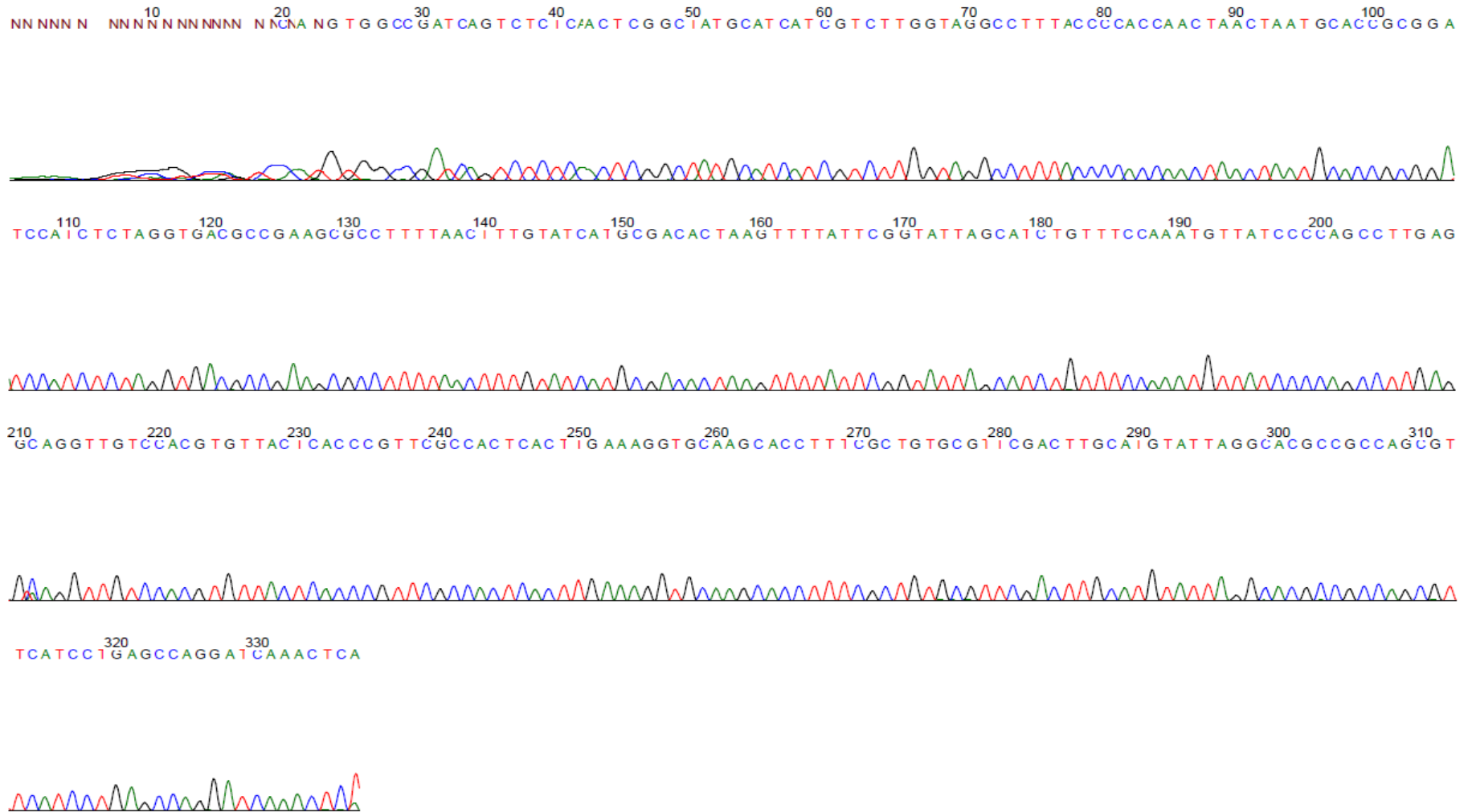


Figura 17. Secuencias de nucleótidos de *Leuconostoc mesenteroides*

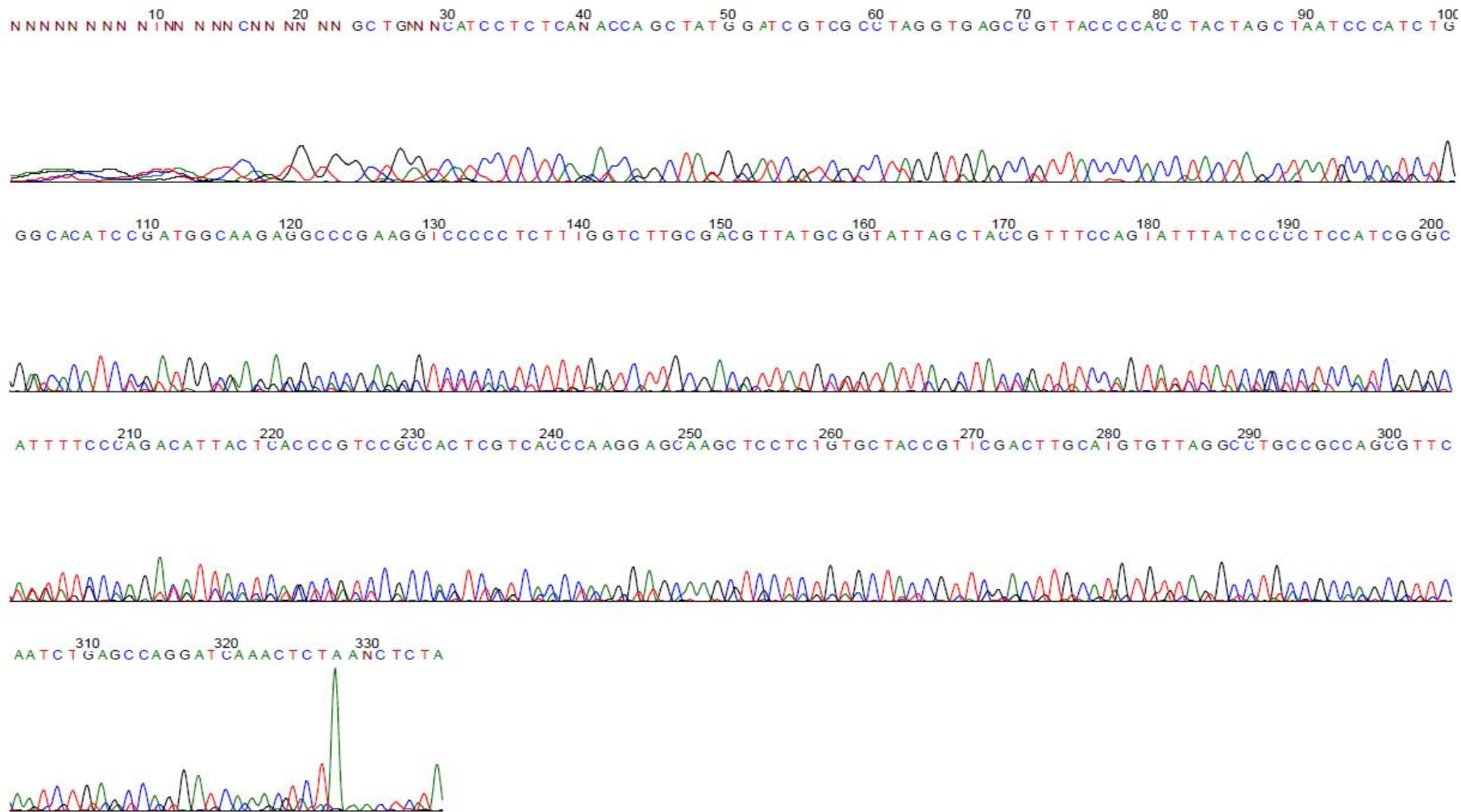


Figura 18. Secuencias de nucleótidos de *Bacteria incultivable*