



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y MICROBIOLÓGICA DE TABERNA,  
UNA BEBIDA TRADICIONAL DE PALMA DE COYOL (*Acrocomia aculeata*)

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M. EN C. JORGE ALEJANDRO SANTIAGO URBINA

TUTOR PRINCIPAL

DR. FRANCISCO RUÍZ TERÁN  
Facultad de Química, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DR. JOSÉ ADELFO ESCALANTE LOZADA  
Instituto de Biotecnología, UNAM

DRA. MARÍA DEL CARMEN WACHER RODARTE  
Facultad de Química, UNAM

MÉXICO, D. F. Noviembre, 2015



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **Agradecimientos**

Al **Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas** de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por la formación académica y los apoyos que me brindaron durante mis estudios de doctorado.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por otorgarme la beca (CVU/becario: 270429/218069) para realizar mis estudios de doctorado.

Al **Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP)** por los apoyos otorgados para la asistencia a dos congresos nacionales.

A mi tutor: **Dr. Francisco Ruiz Terán** (FQ, UNAM)

A los integrantes de mi comité tutor:

**Dra. María del Carmen Wachter Rodarte** (FQ, UNAM)

**Dr. José Adelfo Escalante Lozada** (IBT, UNAM)

A los integrantes del jurado de examen:

**Dr. Antonio Peña Díaz** (IFC, UNAM)

**Dr. Agustín López-Munguía Canales** (IBT, UNAM)

**Dra. Maricarmen Quirasco Baruch** (FQ, UNAM)

**Dra. Romina Rodríguez Sanoja** (IIB, UNAM)

**Dr. Sergio Sánchez Esquivel** (IIB, UNAM)

A mis tutores del subprograma 121 formación de profesores de la Facultad de Química (UNAM):

**Dra. Gloria Díaz Ruíz** (FQ, UNAM)

**QFB. Aurora Irma Ortegón Ávila** (FQ, UNAM)

A la ***Dra. Hilda Elizabeth Calderón VillaGómez***, técnico-académico del laboratorio 321 del departamento de alimentos y biotecnología de la Facultad de Química.

Al ***Dr. Arturo Navarro Ocaña*** por su apoyo en el laboratorio.

A las asistentes de procesos del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas:

***Leticia García Gutiérrez***

***Adelina González Pérez***

Al ***Sr. Horacio Serrano Macías*** por las muestras de Taberna proporcionadas.

# Índice

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>3</b>
1.1. Vinos de palma .....	3
1.2. Características microbiológicas de los vinos de palma .....	4
1.2.1. Bacterias asociadas a la producción de vinos de palma .....	4
1.2.2. Levaduras asociadas a la producción de vinos de palma .....	5
1.3. Importancia de las levaduras no- <i>Saccharomyces</i> en la producción de bebidas alcohólicas .....	9
1.4. Producción de Taberna.....	10
1.4.1. Características fisicoquímicas de la Taberna .....	13
1.4.2. Características microbiológicas de la Taberna.....	14
1.5. Métodos moleculares empleados en el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados .....	15
1.5.1. Métodos dependientes del cultivo empleado para determinar las características microbiológicas de alimentos fermentados .....	15
1.5.2. Métodos independientes del cultivo empleado para determinar las características microbiológicas de alimentos fermentados.....	19
<b>2. HIPOTESIS .....</b>	<b>24</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>25</b>
3.1. Objetivo general.....	25
3.2. Objetivos particulares.....	25
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>26</b>
4. 1. Muestras de Taberna.....	26
4. 2. Conteo de microorganismos .....	27
4.3. Aislamiento de levaduras .....	28
4.4. Determinación de ácidos orgánicos, azúcares y etanol en las muestras de Taberna .....	28
4.5. Hidrólisis de exopolisacáridos producidos en la fermentación de Taberna .....	29
4.6. Análisis de la población de levaduras mediante métodos dependiente del cultivo..	29
4.6.1. Extracción de ADN.....	29
4.6.2. Identificación molecular de las levaduras.....	30
4.6.3. Análisis de las secuencias del dominio D1/D2 del ADN ribosomal 26S.....	31

4.6.4. Número de acceso de la secuencias de nucleótidos.....	32
4.6.5. Análisis del porcentaje de frecuencia.....	32
4.6.6. Análisis estadístico.....	32
4.7. Análisis de la población de levaduras mediante métodos independientes del cultivo .....	33
4.7.1. Extracción de ADN total microbiano de las muestras de Taberna.....	33
4.7.2. Protocolo PCR-DGGE .....	33
4.7.2.1. DGGE perpendicular empleado para determinar las condiciones desnaturalizantes del DGGE paralelo.....	34
4.7.3. Análisis de imágenes de los perfiles DGGE .....	35
4.7.4. Identificación de bandas DGGE.....	35
4.7.5. Clonación de los productos de PCR de las bandas DGGE.....	36
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>38</b>
5.1. Características químicas de la Taberna.....	38
5.2. Hidrólisis de exopolisacáridos producidos en la fermentación de Taberna .....	41
5.3. Crecimiento microbiano durante la producción de Taberna.....	42
5.4. Análisis dependiente del cultivo de la población de levaduras durante la fermentación de Taberna .....	43
5.4.1. Aislamiento e identificación de las levaduras .....	43
5.5. Análisis independiente del cultivo de la población de levaduras durante la fermentación de Taberna .....	47
5.5.1. Optimización de las condiciones desnaturalizantes empleando DGGE perpendicular.....	47
5.5.2. Perfiles DGGE de la comunidad de levaduras presentes en las muestras de Taberna.....	47
5.5.3. Secuenciación e identificación de las bandas .....	51
5.6. Comparación de la distribución de la población de levaduras en las muestras de Taberna a partir de los análisis PCR-RFLP y PCR-DGGE .....	54
<b>6. DISCUSIÓN .....</b>	<b>57</b>
6.1. Azúcares presentes en la savia de la palma de coyol.....	57
6.2. pH y producción de metabolitos en las muestras de Taberna .....	58
6. 3. Población microbiana en las muestras de Taberna.....	59
6.4. Análisis de la población de levaduras mediante métodos dependientes e independientes de cultivo.....	60
<b>7. CONCLUSIONES .....</b>	<b>66</b>

<b>8. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>68</b>
<b>9. Anexo. ....</b>	<b>81</b>

## Resumen

La Taberna una bebida alcohólica tradicional de palma, producida por la fermentación natural de la savia extraída de la palma de coyol, nombre regional de la especie *Acrocomia aculeata*. La población de levaduras y los cambios ocurridos en su estructura durante la fermentación de la savia se estudió empleando la combinación de métodos dependientes e independientes del cultivo. Las muestras fueron colectadas de 14 lotes de producción, además de una muestra de savia no fermentada. La identificación de las levaduras se evaluó mediante el análisis del Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP) de los espaciadores transcritos internos y el gen ribosomal 5.8S (5.8S-ITS), y la secuenciación del dominio D1/D2 del gen ribosomal 26S de cepas aisladas. Se empleó el ADN total aislado directamente de las muestras de savia fermentada para amplificar el dominio D1 del gen ribosomal 26S y determinar la estructura de la población mediante una electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE). Los azúcares, ácidos orgánicos y etanol producidos en la fermentación se determinaron utilizando HPLC. Se realizó además la enumeración de diversos grupos microbianos. La savia sin fermentar fue sacarosa y un pH alrededor de 7. Este sustrato permitió el desarrollo de bacterias ácido lácticas (BAL), bacterias ácido acéticas (BAA) y levaduras. La población de levaduras en el primer lote fue de  $7.9 \times 10^4$  ufc/mL, mientras que la población bacteriana fue  $10^7$  ufc/mL, aproximadamente. En general, la población microbiana (levaduras, BAL, BAA, bacterias mesofílicas aerobias y coliformes totales) aumentó a través de las diferentes muestras. Sin embargo, al aumentar la concentración de, etanol y ácido láctico a valores de 4.25 y 0.32% p/v, respectivamente, así como la disminución del pH (aproximadamente 4), originaron una reducción en las poblaciones microbianas. El contenido de etanol, acidez y azúcares en la Taberna depende de la etapa de la fermentación a la cual se consume. La concentración de etanol y ácido láctico variaron entre 0.21 a 4.78% (p/v) y 0.05 a 0.48 (%) p/v, respectivamente.



El enfoque múltiple permitió la identificación de 12 especies de levaduras, de las cuales, *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Candida tropicalis*, *Candida intermedia*, *Meyerozyma guilliermondii* (*Pichia guilliermondii*), *Kazachstania unispora*, *Kazachstania exigua*, *Pichia kluyveri* y *Pichia kudriavzevii* fueron identificadas mediante métodos dependientes del cultivo. Además, *Candida akabanensis*, *Candida blattae* y *Trichosporon moniliiforme* fueron detectadas empleando métodos independientes del cultivo. Por otro lado, la identificación de las levaduras predominantes varió de una técnica a otra. *H. guilliermondii* y *C. tropicalis* fueron las principales especies aisladas, usando métodos dependientes del cultivo, mientras que *S. cerevisiae*, *H. guilliermondii* y *P. kudriavzevii* fueron las predominantes reveladas por el análisis DGGE de las tres palmeras evaluadas. La presencia de *S. cerevisiae* en las muestras de Taberna coincide con el incremento en la producción de etanol, como mostraron los resultados del estudio dependiente del cultivo y confirmado por los perfiles DGGE. *S. cerevisiae* fue aislada en las muestras donde el contenido de etanol fue de 4%, aproximadamente. La técnica PCR-DGGE complementada con la clonación y secuenciación de bandas fueron buenas herramientas para la caracterización de la estructura de la población de levaduras. En los perfiles DGGE se observó la formación de bandas múltiples que representan a una misma especie, así como la comigración de fragmentos de ADN diferentes, lo que indica que esta técnica requiere de una interpretación cuidadosa, considerando que el número de bandas en el gel no necesariamente están relacionadas con el número de especies diferentes. Las técnicas dependientes e independientes del cultivo se complementan entre sí, mostrando diferencias en las especies predominantes en las muestras de Taberna.

El estudio realizado mostró la población y distribución de levaduras presentes en la fermentación de Taberna, encontrando similitud con el número de especies reportadas en los vinos de palma de otros países, así como en otras bebidas fermentadas de México, predominando tanto especies no-*Saccharomyces* como *Saccharomyces cerevisiae*.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Vinos de palma

Vino de palma es el nombre colectivo para un grupo de bebidas alcohólicas producidas por la fermentación natural de la savia obtenida de diversas plantas tropicales de la familia *Palmae* (Okafor, 1978), por ejemplo, *Borassus akeassii*, *Cocos nucifera*, *Elaeis guineensis*, *Raphia hookeri*, *Borassus aethiopum*, *Acrocomia aculeata*, entre otras (Alcántara-Hernández *et al.*, 2010; Amoa-Awua *et al.*, 2007; Kadere *et al.*, 2008; Stringini *et al.*, 2009; Sambou *et al.*, 2002). El vino de palma se produce y consume en diferentes regiones del mundo, y esta bebida recibe diferentes nombres que dependen de su país de origen: es conocido como Bandji en Burkina Faso, Mnazi en Kenia, Tuba en Filipinas, Mimbo en Camerún, Toddy en Malasia, vino de palma en Ghana, vino de coyol en Honduras y Taberna en México (Alcántara-Hernández *et al.*, 2010; Amoa-Awua *et al.*, 2007; Atputharajah *et al.*, 1986; Balick, 1990; Kadere *et al.*, 2008; Jepersen, 2003; Ouoba *et al.*, 2012; Stringini *et al.*, 2009).

La savia se extrae de las palmeras por medio de una serie de pasos que estimulan su flujo. En general, existen dos métodos empleados en la obtención de esta materia prima; en el primero, el proceso implica escalar los árboles y realizar una perforación en la parte superior del tallo, o bien cortar el extremo del espádice en inflorescencia y fijar un recipiente de barro, calabaza, plástico o vidrio para la acumulación constante de la savia, y su posterior cosecha cada 24 h (Ouoba *et al.*, 2012). En el segundo método, los árboles se talan, y se separan las hojas o palmas, luego los tallos se colocan en posición horizontal y se realiza un corte profundo en la parte apical, formando una cavidad en forma de recipiente, donde se colecta la savia que fluye a lo largo del tallo, y fermentada de manera natural. Por último, la savia fermentada se colecta dos veces al día (Amoa-Awua *et al.*, 2007). El flujo y colección de la savia varía de acuerdo con la especie de palmera, al diámetro y largo del árbol. Así, la producción puede durar de 2 hasta 8 semanas (Amoa-Awua *et al.*, 2007; Balick, 1990).

La savia de palma no fermentada es dulce, contiene de 9 a 17% de sacarosa (Naknean *et al.*, 2010). Este sustrato experimenta una fermentación natural, promoviendo la proliferación de levaduras y bacterias que producen metabolitos tales como etanol, ácidos láctico y acético, principalmente (Amoa-Awua *et al.*, 2007; Ouoba *et al.*, 2012; Stringini *et al.*, 2009). Así, las levaduras, bacterias ácido lácticas y ácido acéticas son considerados los grupos microbianos más importantes en la producción de vinos de palma (Amoa-Awua *et al.*, 2007; Ouoba *et al.*, 2012; Stringini *et al.*, 2009).

## **1.2. Características microbiológicas de los vinos de palma**

### **1.2.1. Bacterias asociadas a la producción de vinos de palma**

La savia de las palmeras es un sustrato que provee los nutrientes necesarios para el desarrollo de diferentes grupos microbianos. La población de BAL en los vinos de palma varía entre  $10^7$  y  $10^9$  ufc/mL; las BAA se han encontrado entre  $10^5$  y  $10^8$  ufc/mL, las bacterias mesofílicas aerobias totales entre  $10^6$  y  $10^9$  ufc/mL, y las bacterias coliformes totales entre  $10^3$  y  $10^8$  ufc/mL (Atputharajah *et al.*, 1986; Amoa-Awua *et al.*, 2007; Stringini *et al.*, 2009; Karamoko *et al.*, 2012; Ouoba *et al.*, 2012). Las BAL encontradas en los vinos de palma son *Lactobacillus plantarum*, *L. fermentum*, *L. paracasei*, *L. nagelii*, *L. sucicola*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Fructobacillus fructosus* y *F. durionis* (Amoa-Awua *et al.*, 2007; Alcántara-Hernández *et al.*, 2010; Ouoba *et al.*, 2012). La presencia de estas bacterias en la bebida confiere el sabor ácido y a la disminución de los valores de pH, por la producción de ácidos orgánicos (ácido láctico) (Amoa-Awua *et al.*, 2007; Ouoba *et al.*, 2012). Las BAL tienen la capacidad de producir metabolitos tales como ácido láctico y  $H_2O_2$ , los cuales controlan el crecimiento de microorganismos indeseables, como las enterobacterias (Amoa-Awua *et al.*, 2007; Alcántara-Hernández *et al.*, 2010; Naknean *et al.*, 2010). Por otro lado, las BAA que se han reportado en los vinos de palma pertenecen a los géneros *Acetobacter* y *Gluconobacter* (Amoa-Awua *et al.*, 2007; Kadere *et al.*, 2008), tal como

*Acetobacter pasteurianus* en Taberna (Alcántara-Hernández *et al.*, 2010), *Acetobacter indonensis*, *A. tropicalis*, *A. estunensis*, *Gluconobacter oxydans*, *G. suboxydans*, y *G. saccharivorans* en Bandji (Ouoba *et al.*, 2012). El papel de las BAA durante la fermentación del vino de palma está relacionado con la producción de ácido acético, el cual forma parte del aroma de los compuestos volátiles. Sin embargo, las BAA pueden considerarse como microorganismos de descomposición cuando el contenido de ácido acético en el vino de palma llega a ser inaceptable para los consumidores. Además, las BAL y BAA también contribuyen con la acidificación e inhibición de los microorganismos indeseables (Ouoba *et al.*, 2012).

### **1.2.2. Levaduras asociadas a la producción de vinos de palma**

En general, las levaduras se han utilizado por cientos de años en la producción de cerveza, vino y pan (Walker, 2009). La elaboración de estos productos se realizó inicialmente por fermentaciones naturales, dependiente de la microbiota natural, principalmente bacterias y levaduras presentes en la materia prima, herramientas o insectos (Steensels y Verstrepen, 2014). *Saccharomyces cerevisiae* es la levadura empleada comúnmente en las fermentaciones controladas a nivel industrial para la producción de cervezas, vinos, pan, tequila, cachaça entre otros productos. Sin embargo, los resultados de diversas investigaciones (González-Robles *et al.*, 2015; Segura-García *et al.*, 2015; Domizio *et al.*, 2007) han demostrado que la diversidad microbiana determina la complejidad del producto final y las características sensoriales (Steensels y Verstrepen, 2014). Lo anterior ha aumentado el interés por el uso de levaduras no-*Saccharomyces* para intensificar la variedad de sabores, proponiéndose el uso de cultivos iniciadores que proporcionen mayor complejidad y autenticidad a los productos, lo que ha motivado a realizar estudios enfocados a la identificación de levaduras asociados a alimentos y bebidas fermentadas naturalmente y evaluación de su potencial biotecnológico.

En los vinos de palma se ha reportado la población de levaduras, entre  $10^4$  y  $10^7$  ufc/mL. *S. cerevisiae* es la especie de levadura dominante y responsable de la fermentación alcohólica de los vinos de palma obtenidos a partir de la savia de *Elaeis guineensis* en Ghana y Camerún, y *Borassus akeassii* en Burkina Faso (Amoa-Awua *et al.*, 2007; Stringini *et al.*, 2009; Ouoba *et al.*, 2012). Asimismo, *S. chevalieri* ha sido reportada como la especie predominante en Toddy, un vino de palma de Sri Lanka (Atputharajah *et al.*, 1986). La predominancia de *S. cerevisiae* en la fermentación de los vinos de palma se atribuye a su tolerancia a las condiciones selectivas en el medio con respecto al pH, contenido de etanol y condiciones anaeróbicas, que favorecen su capacidad fermentativa (Uzochukwu *et al.*, 1999). Sin embargo, se han reportado otras especies de levaduras, tales como *Candida tropicalis*, *Issatchenkia orientalis* y *Hanseniaspora uvarum* (Ezeronye y Ekerentugba, 2001; Ouba *et al.*, 2012) (Tabla 1). Por ejemplo, se ha reportado *Pichia kudriavzevii* (*I. orientalis*) como un microorganismo termotolerante capaz de producir etanol a 40° y 42°C, y resistente a condiciones ácidas (valores de pH 5.0-2.5) (Dhaliwal *et al.*, 2011; Kodama *et al.*, 2013). *Issatchenkia orientalis* puede llegar a producir hasta 7.86% (v/v) de etanol a una temperatura óptima de 40°C (Yuangsaard *et al.*, 2013). Asimismo, *C. tropicalis* tiene la capacidad de producir etanol a temperaturas alrededor de 40°C, por lo que en fermentaciones naturales donde predominan las especies de levaduras no-*Saccharomyces*, esta especie es la responsable de la producción de etanol. Por ejemplo en una región productora de mezcal del estado Durango, las levaduras no-*Saccharomyces* fueron las más abundantes y *Torulospira delbrueckii* permaneció hasta el final de la fermentación (Páez-Lerma *et al.*, 2013). Por otro lado, durante la fermentación de los mostos de uva para la producción de vino, al inicio de la fermentación predominan las especies no-*Saccharomyces*, principalmente las levaduras apiculatas, tales como *Hanseniaspora guilliermondii* y *H. uvarum*, estos microorganismos dominan la fermentación hasta que la concentración de etanol en los mostos alcanza 6% (v/v) (Moreira *et al.*, 2011); bajo estas condiciones, el número de *S. cerevisiae* empieza a incrementar y a dominar la siguiente etapa de la fermentación. Sin embargo, Clavijo *et al.* (2010) reportaron que durante la fermentación del vino de uva en la

región de Málaga, España, las levaduras corresponden sólo a las especies no-*Saccharomyces*. Así también, este grupo de microorganismos fermentan el jugo de maguey al igual que *S. cerevisiae*, demostrando de esta manera su capacidad fermentativa (Segura-García *et al.*, 2015).

En general, la presencia de las levaduras en los vinos de palma depende de la capacidad de las especies para tolerar los diferentes factores estresantes en el medio ambiente. Así, considerando que la temperatura ambiente en la región de la frailesca en el estado de Chiapas varía aproximadamente entre 35 y 42°C, durante los meses de febrero a junio (Serrano-Altamirano *et al.*, 2006; Ramos-Hernández y Morales-Iglesias, 2010), periodo en el se produce la Taberna, y que el contenido de etanol en los vinos de palma oscila entre los 4.75% (v/v) (Amoa-Awua *et al.*, 2007; Stringini *et al.*, 2009), podría esperarse que durante la fermentación natural de la savia de la palma de coyol, predominen las especies de levaduras no-*Saccharomyces*.

**Tabla 1.** Levaduras identificadas en diversos vinos de palma

Microorganismos	Bandji <sup>1</sup>	Vino de palma de Camerún <sup>2</sup>	Vino de palma de Ghana <sup>3</sup>	Vino de palma de Nigeria <sup>4</sup>	Toddy <sup>5</sup>	Toddy <sup>6</sup>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	x	x	x	x		x
<i>Saccharomyces ludwigii</i>		x			x	
<i>Saccharomyces bayanus</i>				x		
<i>Saccharomyces uvarum</i>				x		
<i>Saccharomyces bailii</i>					x	
<i>Saccharomyces chevalieri</i>					x	
<i>Candida tropicalis</i>	x			x	x	
<i>Candida pararugosa</i>	x					
<i>Candida quercitrusa</i>	x					
<i>Candida parapsilopsis</i>		x			x	
<i>Candida fermentati</i>		x				
<i>Candida krusei</i>			x			
<i>Candida utilis</i>				x		
<i>Candida guilliermondii</i>					x	
<i>Candida valida</i>					x	
<i>Pichia etchellsii</i>					x	
<i>Pichia farinosa</i>					x	
<i>Pichia membranaefaciens</i>					x	
<i>Pichia ohmeri</i>					x	
<i>Pichia guilliermondii</i>					x	
<i>Pichia fermentans</i>		x				
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>		x				
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	x			x	x	x
<i>Issatchenkia orientalis</i>	x					
<i>Arthroascus fermentans</i>	x					
<i>Trichosporon asahii</i>	x					
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	x	x				
<i>Kodamaea ohmeri</i>	x					
<i>Trichosporon asteroides</i>	x					
<i>Trigonopsis variabilis</i>	x					
<i>Galactomyces geotrichum</i>	x					
<i>Kloeckera apiculata</i>			x			
<i>Kloeckera javanica</i>					x	
<i>Rhodotorula glutinis</i>					x	
<i>Kluyveromyces lactis</i>				x		

1: Ouoba *et al.*, 2012; 2: Stringini *et al.*, 2009; 3: Amoa-Awua *et al.*, 2007; 4: Ezeronye y Ekerentugba, 2001; 5: Atputharajah *et al.*, 1986; 6: Shamala y Sreekantiah, 1988. x: microorganismos identificados.

### 1.3. Importancia de las levaduras no-*Saccharomyces* en la producción de bebidas alcohólicas

La fermentación de azúcares por las levaduras produce además del etanol y dióxido de carbono, una amplia variedad de compuestos volátiles, sensorialmente importantes, tales como alcoholes superiores, ésteres, compuestos carbonílicos, ácidos grasos volátiles y compuestos azufrados, derivados del metabolismo de azúcares y aminoácidos (Swiegers *et al.*, 2005). Estudios recientes han demostrado que la fermentación del jugo de agave para la producción de tequila empleando las levaduras *Pichia kluyveri* y *Kluyveromyces marxianus*, produce una cantidad de etanol similar a la obtenida con *S. cerevisiae*. Además, *K. marxianus* produce los alcoholes superiores isobutanol (107 mg/L) y alcoholes amílicos (188 mg/L) a niveles mayores que *S. cerevisiae* (19 mg/mL de isobutanol y 70 mg/mL de alcoholes amílicos) (Segura-García *et al.*, 2015). Estas dos especies de levaduras no-*Saccharomyces* son viables tecnológicamente para la producción de Tequila a nivel industrial, ya que tienen un rendimiento en la producción de etanol ( $Y_{p/s}$ ) mayor a 0.45 (g de etanol/g de glucosa), y la concentración de compuestos volátiles producidos está dentro de los límites permitidos por las normas que regulan la producción de esta bebida (Amaya-Delgado *et al.*, 2013). Por otro lado, las levaduras apiculatas, tales como *H. guilliermondii* y *H. uvarum* pueden sobrevivir a través de la fermentación alcohólica con concentraciones de etanol de hasta 12.5% (v/v) (Moreira *et al.*, 2011). *H. guilliermondii* produce cantidades significativas de 2-feniletil acetato (Moreira *et al.*, 2011; Moreira *et al.*, 2008), este compuesto contribuye significativamente al aroma del vino, generando olores a rosas, miel, frutas y flores (Lambrechts y Pretorius, 2000). También se ha reportado que estos microorganismos producen concentraciones altas de acetato de etilo, que posee un olor desagradable (acético) (Moreira *et al.*, 2011). Sin embargo, los cultivos mixtos de levaduras apiculatas con *S. cerevisiae* reducen el contenido de este metabolito en los vinos (Moreira *et al.*, 2008). Otras levaduras como *Pichia anómala* y *P. caribbica* tienen la capacidad de crecer en 12% de etanol y cuando crecen en cultivos mixtos con *S. cerevisiae* mejoran la fermentación de los azúcares del jugo de caña de azúcar (Ferreira-Duarte *et al.*,



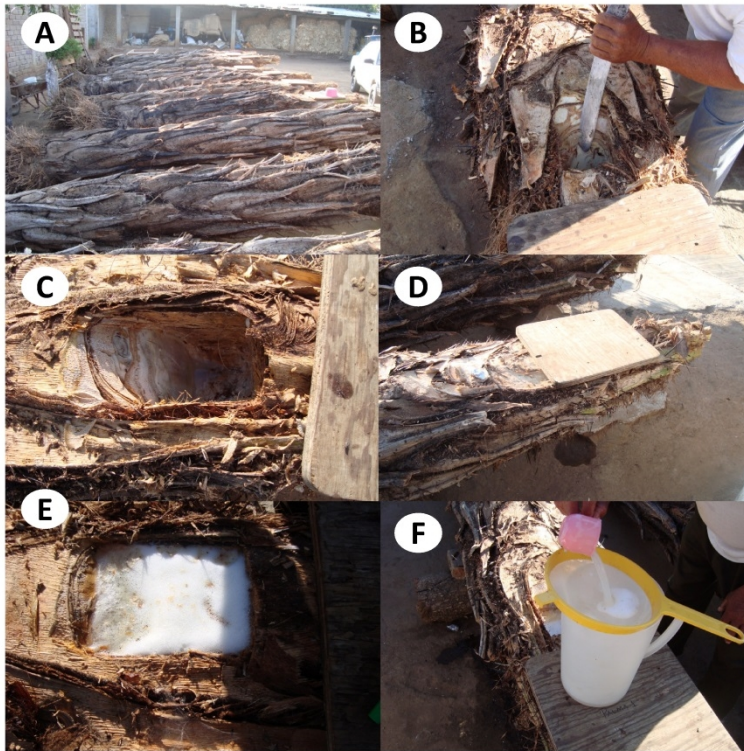
2013). El cultivo mixto de *S. cerevisiae* y *P. caribbica* produce cantidades de etanol mayores a las obtenidas con cultivos puros. Además, aumentan las concentraciones de compuestos volátiles deseables tales como hexanoato de etilo, 2-feniletanol, linalool, butirato de etilo, feniletil acetato, dietilsuccinato y geraniol (Ferreira-Duarte *et al.*, 2013). Las levaduras no-*Saccharomyces* también contribuyen en la producción de alcoholes superiores. Por ejemplo, *P. fermentans* en cultivo mixto con *S. cerevisiae* producen mayores cantidades de los alcoholes superiores, 1-propanol, n-butanol y 1-hexanol en comparación con los cultivos puros de *S. cerevisiae* (Clemente-Jiménez *et al.*, 2005). *H. guilliermondii* también produce concentraciones altas de 1-propanol (Moreira *et al.*, 2011). De esta manera, diversos estudios han mostrado la importancia de las levaduras no-*Saccharomyces* en las fermentaciones, mejorando la calidad del producto final.

#### **1.4. Producción de Taberna**

La Taberna es una bebida alcohólica tradicional que se produce mediante la fermentación natural de la savia extraída de las palmeras de coyol (*Acrocomia aculeata*), en algunas regiones del sureste de México y otras áreas de América central (Alcántara-Hernández *et al.*, 2010; Balick, 1990). Por ejemplo, en la región de la frailesca del estado de Chiapas, la Taberna es producida durante los meses de febrero a junio. Este vino de palma es consumido como una bebida refrescante, y se caracteriza por su color blanquecino, su efervescencia y dulzor (Alcántara-Hernández *et al.*, 2010).

La savia se extrae de las palmeras de coyol adultas, es decir, de árboles entre 10 y 14 años de edad. Para su obtención, las palmeras son arrancadas conteniendo la raíz, luego se realiza una limpieza del tallo que consiste en eliminar sus hojas y espinas. Posteriormente, el tronco se coloca en posición horizontal (Fig. 1A), y en la parte apical se realiza un corte rectangular para formar un receptáculo llamado regionalmente como canoa, lugar que permite la acumulación de la savia (Fig. 1C y 1E). En la mañana, el productor realiza la canoa con la ayuda de un machete (Fig. 1B), cortando la corteza del tallo hasta encontrar el corazón o palmito; la

cavidad formada en este paso es muy pequeña (aproximadamente 7 cm de longitud). Posteriormente, las canoas se tapan con tablas de madera y se dejan en reposo durante 12 h, mientras la savia se acumula. En la tarde, cuando la canoa se ha llenado, el productor colecta la savia fermentada (Taberna) con la ayuda de utensilios tales como vasos, jarras, cucharas y coladores (Fig. 1F). Después de colectar completamente el contenido de las canoas, se vuelven a tapar y el flujo de savia continúa llenando nuevamente esta cavidad. Luego de 12 h (en la mañana) la savia se colecta por segunda vez. En este paso, el productor realiza un raspado de las paredes del receptáculo (Fig. 1B), y lo realiza diariamente cortando aproximadamente 1 cm de la corteza, hasta que la canoa alcanza un tamaño de 10 x 15 cm. El raspado del receptáculo permite que la savia fluya libremente a través de los vasos del palmito. El productor realiza esta operación cuidadosamente, considerando que el palmito limita el flujo de la savia (Balick, 1990), y un corte demasiado grande provocaría una velocidad de flujo elevada que reduciría el tiempo de producción o aprovechamiento de la savia.



**Fig. 1.** Proceso de elaboración de Taberna a partir de la savia de palmeras de coyol (*Acrocomia aculeata*). Tallos en posición horizontal (A); raspado de la canoa (B); canoa (C); canoa cubierta con tablas de madera (D); savia acumulada en la canoa (E); recolección de la savia fermentada (Taberna) (F).

En general, el proceso de producción de Taberna es similar a una fermentación por lote alimentado, considerando que hay una corriente de entrada de alimentación, que corresponde a la savia que fluye a través del tallo y se acumula constantemente en la canoa, después de 12 h cuando el receptáculo se ha llenado completamente y ha ocurrido la fermentación natural, la savia fermentada es colectada, dejando la canoa vacía. Luego, el flujo de savia continua, iniciando así un nuevo lote de fermentación. De esta manera la Taberna recolectada representa al producto final de una fermentación, la que dura 12 h.

La Taberna puede consumirse inmediatamente después de su recolección, aunque algunos consumidores prefieren tomarla directamente de las canoas con la ayuda de un carrizo. Por otro lado, el producto recolectado puede almacenarse en contenedores de vidrio o plástico y posteriormente distribuirse en envases PET

reciclados (Serrano-Macías, comunicación personal). Actualmente no hay reportes acerca del volumen de producción y el consumo de este vino de palma. El procedimiento tradicional empleado para la producción de Taberna se muestra en la Fig. 2. La elaboración de este bebida es similar al procedimiento empleado en el vino de palma obtenido de la savia de *Elaeis guineensis* (Amoa-Awua *et al.*, 2007; Stringini *et al.*, 2009).

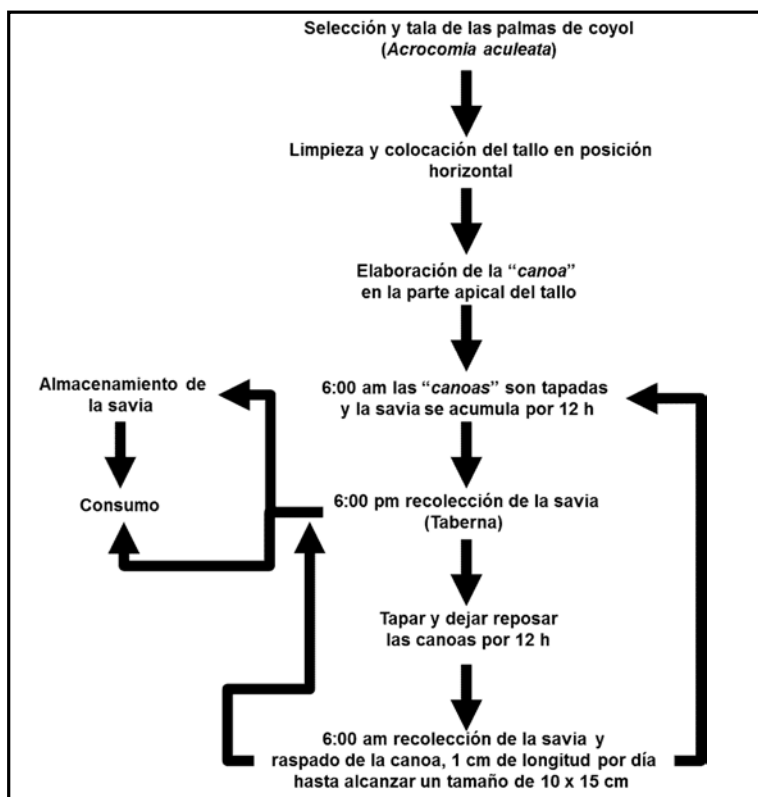


Fig. 2. Diagrama de flujo de la producción de Taberna

#### 1.4.1. Características fisicoquímicas de la Taberna

La composición química de la Taberna depende de la etapa de la fermentación en la cual la muestra se colecta y analiza. Alcántara-Hernández *et al.* (2010) reportaron que la savia almacenada y fermentada en un contenedor de vidrio (fermentación *in vitro*) alcanza hasta 10.80% (v/v) de etanol, una acidez de 8.70 g/L, valores de pH entre 3 y 4, y puede contener de 7 a 10% de azúcares totales.

Actualmente no hay información sobre las características fisicoquímicas de la Taberna producida *in vivo*, es decir del vino producido directamente en las canoas.

#### **1.4.2. Características microbiológicas de la Taberna**

La fermentación de la savia para la producción de Taberna ocurre de manera natural, iniciada por la microbiota autóctona de la palmera, los microorganismos asociados con los utensilios usados durante la preparación y recolección de la bebida y del ambiente local. Al presente no hay información suficiente sobre la comunidad microbiana involucrada en este proceso. Los estudios reportados son exclusivamente de la población de bacterias. Así, diversas especies de bacterias ácido lácticas (BAL) se han descubierto, tales como *Lactobacillus nagelii*, *L. succicola*, *L. sp.* (Alcántara-Hernández *et al.*, 2010), *L. plantarum*, *Leuconostoc citreum*, *L. mesenteroides* y *L. fallax* (Valdés-Flores, 2014). Asimismo se han identificado *Fructobacillus fructosus* y *F. durionis* (Alcántara-Hernández *et al.*, 2010; Valdés-Flores, 2014). También se ha revelado la aparición de bacterias ácido acéticas (BAA) como *Acetobacter pasteurianus*. Por otro lado, *Zymomonas mobilis* se ha reportado como una bacteria importante que podría contribuir significativamente en la producción de etanol de este vino de palma (Alcántara-Hernández *et al.*, 2010). Aparte de estos grupos microbianos, también se han encontrado microorganismos indeseables como las enterobacterias, *Pantoea agglomerans*, *Enterobacter hormaechei*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii* y *Kluyvera georgiana* (Alcántara-Hernández *et al.*, 2010). Las levaduras juegan un papel importante en la fermentación alcohólica de los vinos de palma (Amoa-Awua *et al.*, 2007; Stringini *et al.*, 2009; Ouoba *et al.*, 2012), sin embargo, no hay estudios reportados sobre la población de este grupo microbiano en la fermentación de la Taberna.

## **1.5. Métodos moleculares empleados en el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados**

El análisis microbiológico de los alimentos puede tener diferentes objetivos; por ejemplo, el conteo de las poblaciones, el conteo e identificación de los microorganismos, monitoreo de especies y cepas en el alimento, o bien determinar la estructura y dinámica de la población microbiana (Ercolini, 2014; Ercolini y Cocolin, 2014). Sin embargo, dependiendo de los fines, se pueden seleccionar los métodos más apropiados para obtener la información necesaria de manera rápida, precisa y confiable (Ercolini, 2014). Anteriormente, para realizar los estudios de identificación microbiológica se empleaban métodos basados en las características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas de los microorganismos previamente aislados; sin embargo, estos análisis no pueden diferenciarlos a un nivel útil en el estudio de biodiversidad (Head *et al.*, 1998), además de que pueden proporcionar resultados incorrectos (Barata *et al.*, 2012). Para establecer las comunidades microbianas es importante hacer una identificación precisa (Barata *et al.*, 2012). Actualmente los estudios dependientes del cultivo se han complementado con las técnicas moleculares. Estas herramientas permiten un análisis directo del genoma, independientemente del estado fisiológico de la célula, proporcionando información más exacta (Barata *et al.*, 2012). Además, ofrecen la posibilidad de identificar a las especies presentes en el estado viable pero no cultivable (Head *et al.*, 1998; Rappe y Giovannini, 2003). Así como a las células que se encuentran estresadas y dañadas y que frecuentemente son incapaces de crecer en medios de cultivo sintéticos que contienen algún agente selectivo, tal como antibióticos (Cocolin y Ercolini, 2008).

### **1.5.1. Métodos dependientes del cultivo empleado para determinar las características microbiológicas de alimentos fermentados**

Los métodos dependientes del cultivo implican el aislamiento, purificación e identificación de los microorganismos de interés. La identificación se basa en el análisis de sus características morfológicas, bioquímicas o genéticas. Estos

métodos consumen mucho tiempo, debido a los largos periodos de cultivo, así mismo las técnicas laboriosas. Si las condiciones de cultivo son pobres y el número de aislados demasiado bajo, la colección de microorganismos no será representativa de la comunidad, y la diversidad microbiana será malinterpretada (Jany y Barbier, 2008). Los métodos dependientes del cultivo no permiten describir la diversidad de un ecosistema complejo, debido a la falta de conocimiento de las condiciones reales bajo las cuales la mayoría de las bacterias crecen en su habitat natural, y la dificultad para desarrollar medios de cultivo con estas características (Ercolini y Cocolin, 2014). Sin embargo, el empleo de los métodos dependientes del cultivo, junto con los métodos independientes, ha permitido reducir los sesgos asociados con cualquiera de estas metodologías (Escalante *et al.*, 2008), y existen muchos reportes sobre el empleo de ambos métodos (Tabla 2). Para hacer una identificación confiable de los microorganismos aislados, se han desarrollado y aplicado diversas técnicas de identificación molecular (Giraffa y Carminati, 2008); algunas de ellas se señalan en la Tabla 2. El empleo de la información de las secuencias de nucleótidos de los genes ribosomales, hace posible la identificación y la inferencia filogenética. El gen ribosomal 16S (subunidad pequeña) en bacterias, el 26S en levaduras y el 18S en hongos son las secuencias utilizadas comúnmente para la identificación, por varias razones, están presentes en todos los miembros del grupo microbiano de interés, tienen regiones conservadas en las cuales se pueden diseñar cebadores universales, y la presencia de regiones variables que permiten la diferenciación e identificación a nivel de especie (Cocolin *et al.*, 2013), además, la disponibilidad de las secuencias de dichas regiones (principalmente 16S y 26S) en las bases de datos, facilita la asignación de una especie a un microorganismo desconocido (Fernandez-Espinar *et al.*, 2006). Así, mediante el alineamiento de las secuencias con la información disponible en las bases de datos, la especie más cercana es detectada. Esta técnica permite una identificación relativamente rápida y confiable de los aislados microbianos, comparado con los tiempos largos y la identificación incierta de las pruebas bioquímicas (Ercolini, 2014). Por otro lado, el análisis de restricción del ADN ribosomal amplificado es un método empleado para agrupar a un conjunto de

microorganismos en base a sus patrones o perfiles de restricción, y además permite la identificación a nivel de género o especie cuando los perfiles son comparados con información disponible en bases de datos (<http://yeast-id.com/>) o referencias bibliográficas. Los genes ribosomales son amplificados por PCR y luego cortados con más de una enzima de restricción. Los fragmentos obtenidos son separados por electroforesis en gel. Las enzimas tienen la capacidad de reconocer secuencias de nucleótidos específicas y fragmentar el ADN. Especies diferentes producen perfiles diferentes; por el contrario, si los organismos son parte de la misma especie analizada, los patrones obtenidos son idénticos. Para el agrupamiento e identificación de levaduras se ha empleado comúnmente el análisis de restricción del gen ribosomal 5.8S y las regiones de los espaciadores transcritos internos, usando las enzimas *Hae* III, *Hinf* I y *Cfo* I (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999). La identificación microbiana por métodos moleculares también puede realizarse por medio de sondas moleculares, como la hibridación *in situ* fluorescente (FISH). Por otro lado, la tipificación de cepas puede ser importante en la microbiología de alimentos, para el desarrollo de cultivos iniciadores. Los métodos empleados para este fin, se basan en el análisis de las huellas genéticas, comparando los perfiles obtenidos a partir de cada ADN genómico obtenidos mediante diferentes técnicas, tal como las descritas en la Tabla 2, dichos patrones son sometidos a un análisis de similitud usando software específicos para identificar la relación entre cepas (Ercolini, 2014).



**Tabla 2.** Ventajas y limitaciones del uso de las principales técnicas moleculares para la identificación y tipificación microbiana

	Ventajas	Limites
<b>Identificación</b>		
Hibridación ADN-ADN (sondas de oligonucleótidos dirigidos a ARNr; dot-blot, hibridación de colonias, etc.)	Nivel de discriminación alto; fácil interpretación; reproducibilidad alta	Difícil; consume mucho tiempo; costo alto
Métodos basados en PCR (ARDRA-PCR, ITS-PCR; amplificación de genes metabólicos)	Rapidez; reproducibilidad alta; fácil de usar e interpretar; costo bajo o moderado	Nivel de discriminación moderado
Secuenciación de ADN	Nivel de discriminación alto; exactitud y reproducibilidad; base de datos disponibles	Costo alto
<b>Tipificación</b>		
Métodos RFLP		
Ribotipificación	Nivel de discriminación alto; fácil interpretación; Reproducibilidad alta;	Difícil; consume mucho tiempo; costo alto
REA-PFGE	Nivel de discriminación excelente; reproducibilidad excelente; fácil interpretación; costo bajo	Difícil; dificultad para usar; largos periodos de tiempo para obtener resultados; costos moderados a altos
Métodos basados en PCR		
RAP-PCR; Rep-PCR	Nivel de discriminación alto; rapidez; uso e interpretación fácil; costo bajo	Reproducibilidad moderada; bases de datos no disponibles
ITS (o RISA)-PCR	Rapidez; uso e interpretación fácil; reproducibilidad alta; costo bajo	Moderado nivel de discriminación; bases de datos no disponibles
AFLP	Moderadamente fácil de usar e interpretar; poder de discriminación alto; reproducibilidad alta	Costo alto; bases de datos públicas no disponibles

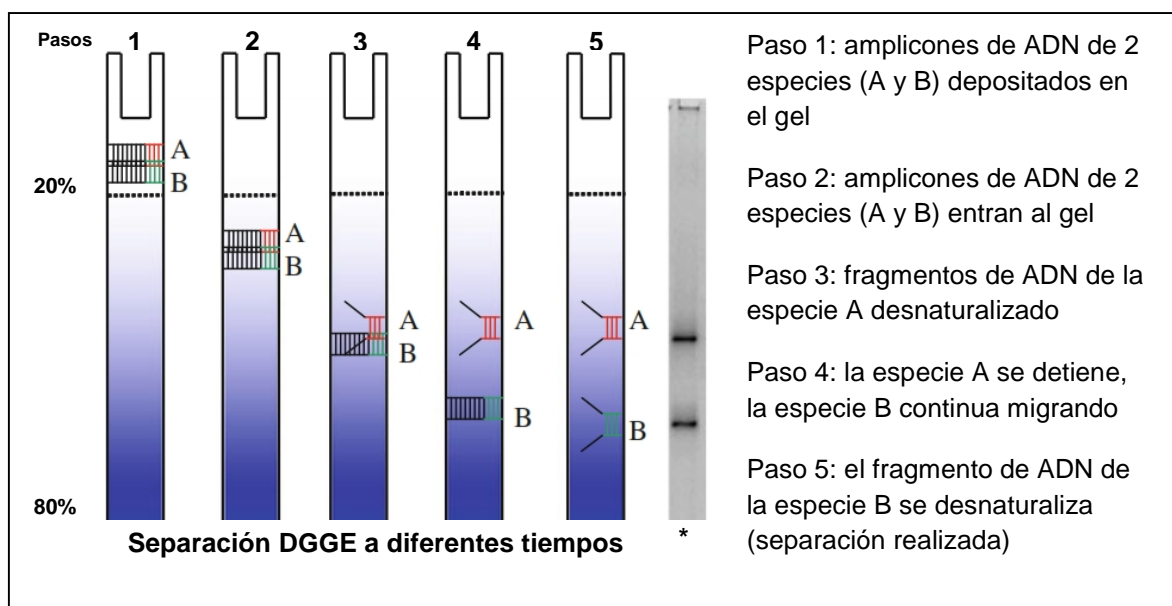
ARDRA-PCR, Amplification Ribosomal DNA Restriction Analysis-PCR (Análisis de restricción del ADN ribosomal amplificado-PCR); ITS-PCR, Internal Transcribed Spacer-PCR (Espaciadores transcritos internos-PCR); RISA-PCR, rRNA gene Internal Spacer Analysis-PCR (análisis de los espaciadores internos del gen ARN ribosomal-PCR); RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphism (Polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción); REA-PFGE, Restriction Endonuclease Analysis-Pulsed Field Gel Electrophoresis (Análisis de electroforesis en gel de campos pulsados con endonucleasas de restricción); RAPD-PCR, Randomly Amplified Polymorphic DNA-PCR (ADN polimórfico amplificado al azar-PCR); Rep-PCR, Repetitive element sequence-based-PCR (PCR de elementos repetitivos); AFLP, Adaptor Fragment Length Polymorphism (Polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados). Tomado de Giraffa y Carminati (2008).

### **1.5.2. Métodos independientes del cultivo empleado para determinar las características microbiológicas de alimentos fermentados**

Los métodos independientes del cultivo se han desarrollado para determinar la diversidad de microorganismos en ambientes naturales, y para monitorear los cambios de las poblaciones microbianas en el espacio o tiempo (Giraffa y Carminati, 2008). Mediante estas técnicas se obtiene información de la población microbiana sin la necesidad de cultivar y aislar a los microorganismos, gracias a que los métodos se basan en el aislamiento del ADN/ARN de la comunidad (Giraffa y Carminati, 2008).

En el análisis de las poblaciones microbianas presentes en alimentos fermentados, la técnica más usada es PCR-DGGE. En los últimos años, la aplicación principal de DGGE ha sido el estudio de alimentos fermentados de Asia, África y América del Sur (Cocolin *et al.*, 2013). Esta técnica consiste de una separación electroforética de los productos de PCR en un gel de poliacrilamida que contiene un gradiente de desnaturalizantes químicos (urea y formamida). Los genes ribosomales 18S y 26S son los principales blancos utilizados para el estudio de las poblaciones de levaduras (Stringini *et al.*, 2009; Oguntoyinbo, 2011; Wang *et al.*, 2011; Cocolin *et al.*, 2013), por sus características y ventajas descritas en la sección 1.5.1. Sin embargo, debido a la disponibilidad de información en la bases de datos (por ejemplo GenBank), el dominio D1 del gen ribosomal 26S es el blanco comúnmente empleado en DGGE. La desnaturalización parcial de la molécula de ADN de doble hebra ocurre cuando ésta encuentra la concentración de desnaturalizantes apropiada (Cocolin *et al.*, 2013) (Fig. 3). El cambio en la conformación de la estructura del ADN causa una reducción en la velocidad de migración de la molécula (Ercolini, 2004). Para evitar una separación completa entre las dos hebras, uno de los cebadores contiene una grapa de guaninas (G) y citosinas (C). Este fragmento contiene 40 pares de bases de G-C. De esta manera, la riqueza de G y C en la grapa genera moléculas más resistentes a los desnaturalizantes, manteniendo juntas las dos hebras de ADN complementarias (Van der Kraan *et al.*, 2011).

Así, es posible separar, mediante DGGE los fragmentos de ADN del mismo tamaño pero diferentes secuencias (basado en el contenido de G y C de la molécula) (Ercolini, 2004 y Van der Kraan *et al.*, 2011), originando un patrón de bandeado característico. Las bandas en el DGGE pueden ser reveladas por tinción con bromuro de etidio, plata, o SYBER Green I (Ercolini, 2004). Las bandas representan a miembros de la microbiota y pueden identificarse mediante la escisión, elución, reamplificación y secuenciación del ADN contenidas en ellas (Cocolin *et al.*, 2013).



**Fig. 3.** Esquema general de un carril DGGE seguido a través del tiempo incluyendo el resultado final (\*). Modificado de Van der Kraan *et al.*, 2011.

DGGE es una técnica que se ha aplicado a diversas áreas de la microbiología de alimentos tales como, fermentación, contaminación y seguridad de alimentos (Cocolin *et al.*, 2013), siendo ampliamente útil para el estudio de la ecología microbiana de fermentaciones naturales (Cocolin *et al.*, 2013). En la Tabla 3 se presenta la diversidad de alimentos y microorganismos que se han identificado mediante esta técnica.

La información presentada en la Tabla 3, muestra que el estudio de las poblaciones microbianas puede abordarse desde un enfoque múltiple, es decir, empleando métodos dependientes e independientes del cultivo. Por ejemplo, para la identificación de levaduras se ha reportado el uso de PCR-RFLP, PCR-DGGE acompañado de la secuenciación del ADN ribosomal (Tabla 3). PCR-RFLP se basa en la amplificación de regiones del ADN ribosomal seguida de un análisis de restricción de los productos amplificados empleando enzimas tales como, *Hae* III, *Hinf* I, *Cfo* I, *Dde* I (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999; Fernández-Espinar *et al.*, 2000; de Llanos *et al.*, 2004). Con frecuencia se estudia la región del gen 5.8S y las regiones intergénicas adyacentes ITS1 e ITS2 (espaciadores transcritos internos). Los fragmentos amplificados y los perfiles de restricción obtenidos con las enzimas mencionadas arriba, están disponibles en <http://yeast-id.com/> o en la literatura reportada. Cuando los perfiles de restricción obtenidos no se encuentran en las bases de datos, la solución es secuenciar el ADN ribosomal (Barata *et al.*, 2012). Los dominios D1 y D2 del gen 26S (Kurtzman y Robnett, 1998) y el gen 18S (James *et al.*, 1996), son las regiones empleadas con mayor frecuencia en la identificación de levaduras. Sin embargo, en las bases de datos existe mayor información disponible sobre la región D1/D2 del gen ribosomal 26S (Barata *et al.*, 2012).

**Tabla 3.** Uso de técnicas moleculares para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados

Alimentos	Especies identificadas	Técnica empleada	Referencia
<b>Vino de palma de Camerún</b>	<i>S. cerevisiae</i> , <i>S. ludwigii</i> , <i>Z. bailii</i> , <i>H. uvarum</i> , <i>C. parapsilopsis</i> , <i>C. fermentati</i> y <i>P. fermentans</i>	PCR-DGGE; PCR-RFLP	Stringini <i>et al.</i> , 2009
<b>Mezcal</b>	<i>S. cerevisiae</i> , <i>Kl. marxianus</i> , <i>P. kluyveri</i> , <i>Z. bailii</i> , <i>Cl. lusitaniae</i> , <i>To. delbrueckii</i> , <i>C. ethanolica</i> , <i>S. exiguous</i>	PCR-DGGE; PCR-RFLP	Verdugo-Valdez <i>et al.</i> , 2011
<b>Koumiss:</b> bebida ligerante alcohólica fermentada de leche de yegua	<i>C. pararugosa</i> , <i>D. anomala</i> , <i>Geotrichum sp.</i> , <i>I. orientalis</i> , <i>K. exigua</i> , <i>Kl. marxianus</i> , <i>P. deserticola</i> , <i>P. fermentans</i> , <i>P. manshurica</i> , <i>P. membranaefaciens</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>To. delbrueckii</i>	PCR-DGGE; PCR-RFLP	Mu <i>et al.</i> , 2012
<b>Ogi y mawè:</b> productos fermentados de maíz; <b>gowè y tchoukoutou:</b> productos fermentados de sorgo	<i>C. krusei</i> , <i>Cl. lusitaniae</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>Kl. marxianus</i> , <i>C. rugosa</i> , <i>D. bruxellensis</i> , <i>De. hansenii</i>	PCR-DGGE	Greppi <i>et al.</i> , 2013
<b>Vino de arroz glutinoso</b>	<i>P. guilliermondii</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>S. fibuligera</i> , <i>P. fabianii</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>Cr. heveanensis</i> , <i>Cr. albidus</i> , <i>S. malanga</i> , <i>R. mucilaginosus</i> Spor. <i>nylandii</i> , <i>Wi. anomalus</i> , <i>Rh. toruloides</i> , <i>M. purpureus</i>	PCR-DGGE; PCR-RFLP	Lv <i>et al.</i> , 2013
<b>Doenjang y kanjang:</b> alimentos de soya fermentada	<i>De. hansenii</i> , <i>Z. pseudorouxii</i> , <i>C. versatilis</i> , <i>C. etchellsii</i> , <i>De. castellii</i> , <i>St. halophilus</i> , <i>Ma. restricta</i> , <i>Cr. magnus</i> , <i>P. triangularis</i>	librerías del ARNr 26S	Haque <i>et al.</i> , 2015
<b>Tarubá:</b> bebida fermentada de yuca	<i>L. plantarum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>To. delbrueckii</i> , <i>P. exigua</i> , <i>C. rugosa</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>P. kudriavzevii</i> , <i>Wi. anomalus</i> , <i>C. ethanolica</i>	PCR-DGGE	Ramos <i>et al.</i> , 2015
<b>Granos de Kefir de leche</b>	<i>L. kefiranofaciens</i> , <i>L. kefiri</i> , <i>L. lactis</i> , <i>L. buchneri</i> , <i>L. sunkii</i> , <i>L. otakiensis</i> , <i>K. unispora</i> , <i>K. servazzii</i> , <i>K. solicola</i> , <i>K. aerobia</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>S. cariocanus</i> , <i>K. turicensis</i> , <i>D. anomala</i> , <i>Acetobacter</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>L. plantarum</i>	PCR-DGGE; pirosecuenciación	Garofalo <i>et al.</i> , 2015
<b>Cheonggukjang:</b> Alimento fermentado de soya	<i>B. licheniformis</i> , <i>B. sonorensis</i> , <i>B. thermoamylovorans</i> , <i>B. vallismortis</i> , <i>B. coagulans</i> , <i>Strep. rangoonensis</i>	PCR-DGGE; pirosecuenciación	Nam <i>et al.</i> , 2012

S: *Saccharomyces*; Z: *Zygosaccharomyces*; H: *Hanseniaspora*; C: *Candida*; P: *Pichia*; Kl: *Kluyveromyces*; Cl: *clavispora*; To: *Torulasporea*; D: *Dekkera*; I:

*Issatchenkia*; K: *Kazachastania*; De: *Debaryomyces*; Cr: *Cryptococcus*; R: *Rhodotorula*; Spor: *Sporobolomyces*; Wi: *Wickerhamomyces*; Rh:

*Rhodospiridium*; M: *Monascus*; St: *Sterigmatomyces*; Ma: *Malassezia*; Leuc: *Leuconostoc*; B: *Bacillus*; Strep: *Streptomyces*.

En la Tabla 3 se presentan otras técnicas conjuntamente con PCR-DGGE que se han empleado en el estudio de las comunidades microbianas de alimentos

fermentados, tales como construcción de librerías de clonas del RNA ribosomal 26S para levaduras (Haque *et al.*, 2015) y el 16S para bacterias (Alcántara-Hernández *et al.*, 2010), polimorfismo de conformación de cadena sencilla de los productos de PCR (SSCP-PCR), polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción terminal (T-RFLP), microarreglos de ADN, y actualmente se han empleado nuevas técnicas como la pirosecuenciación (Jany y Barbier, 2008; Garofalo *et al.*, 2015).

En el presente estudio la estructura de la población de levaduras asociadas a la producción de Taberna, se determinó empleando un enfoque múltiple, mediante métodos dependiente e independiente del cultivo. Además se documentó el proceso tradicional empleado para la producción de esta bebida, así como los cambios fisicoquímicos durante la fermentación.

## 2. HIPOTESIS

Debido a que la taberna es una bebida producida durante los meses de febrero-junio, época donde la temperatura ambiental es alta (35-42°C), la diversidad de levaduras en este ambiente será baja y predominarán las especies no-*Saccharomyces*.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo general**

Determinar los cambios fisicoquímicos y microbiológicos ocurridos en muestras de Taberna colectadas durante el proceso de fermentación *in vivo*.

#### **3.2. Objetivos particulares**

- Determinar y cuantificar los metabolitos producidos durante el proceso de fermentación de la “Taberna”, y la composición de azúcares de la savia de la palma de coyol.
- Identificar a las levaduras presentes en las muestras de “Taberna” obtenidas mediante un método dependiente del cultivo.
- Identificar a las levaduras presentes en las muestras de “Taberna” empleando un método independiente del cultivo.



## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4. 1. Muestras de Taberna

Las muestras de Taberna fueron proporcionadas por el productor Horacio Serrano Macías, en el municipio de Villaflores (Ejido Benito Juárez), Chiapas, durante el mes de marzo de 2012, temporada en la que la temperatura ambiental osciló alrededor de 30 y 38°C. El plan de muestreo abarcó un total de tres palmeras, las cuales se etiquetaron como palmera I, palmera II y palmera III. Las muestras se tomaron durante los primeros 15 días consecutivos de producción.

Con la finalidad de determinar los azúcares y su concentración en la savia de la palma de coyol, una muestra de “savia fresca” se colectó, la cual consistió de savia sin fermentar tomada inmediatamente después de que el productor abriera las canoas. El tiempo necesario para que las canoas acumularan un pequeño volumen de savia fue de 2 h. Sin embargo, el volumen colectado de cada palmera fue insuficiente para realizar los análisis fisicoquímicos y microbiológicos, por lo que las muestras se juntaron en un solo tubo Falcon estéril para tener mayor volumen.

Como se describió en la introducción el proceso de producción de Taberna consiste en una fermentación natural de la savia que se lleva a cabo en las canoas de los tallos, la savia fermentada es colectada por el productor, en la mañana y en la tarde, cada 12 h aproximadamente. En la mañana, el productor recoge la savia fermentada y luego raspa las paredes de la cavidad para agrandar su tamaño y permitir el flujo de esta, por la tarde cuando las canoas se vuelven a llenar, la savia se vuelve a recoger. Posteriormente, las canoas se tapan y se dejan reposar durante toda la noche para que en la mañana el productor recoja el producto fermentado. De esta manera, en un día se cosechan 2 lotes de producción.

La recolección de las muestras de savia fermentada para nuestro estudio, se realizó de los lotes cosechados en la mañana, cuando las canoas estaban llenas. Las muestras analizadas se denominaron lotes (1 a 14). Aproximadamente 50 mL de savia se colectaron en tubos Falcon de 50 mL estériles. Las muestras se

transportaron en una hielera (4°C) al laboratorio de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas (UNICACH) inmediatamente después de su colección.

#### **4. 2. Conteo de microorganismos**

Las muestras se analizaron después de tres horas de su colección y conservación sobre hielo. Los tubos Falcon que contenían las muestras de Taberna se agitaron manualmente y se realizaron diluciones decimales seriadas empleando una solución de agua peptonada (0.1%) estéril. Luego, las diluciones se sembraron por duplicado mediante la técnica de dispersión en placa (Osorio-Cadauid *et al.*, 2008) en diferentes medios de cultivo. Para determinar la población de bacterias mesofílicas aerobias se empleó agar cuenta en placa (ACP, Oxoid LTD, Hampshire, England), las placas se incubaron a 30°C durante 5 días. La enumeración de bacterias coliformes totales se llevó a cabo en placas de agar lactosa, bilis y rojo violeta, que se incubaron por 48 horas a 30 °C (Karamoko *et al.*, 2012). Las bacterias ácido lácticas fueron contadas en agar MRS conteniendo 0.005% de cicloheximida para inhibir el crecimiento de levaduras (Stringini *et al.*, 2009) e incubadas bajo condiciones anaeróbicas a 30°C durante 3 días. La población de bacterias ácido acéticas se enumeró en placas de agar GEY (2% de glucosa, 1% de extracto de levadura, 2% de carbonato de calcio, 5% de etanol y 2% de agar) suplementado con 0.005% de cicloheximida (Sigma-Aldrich, Misuri, USA) (Stringini *et al.*, 2009). La enumeración de la población de levaduras se determinó empleando agar nutritivo WL (Difco<sup>tm</sup> Le Pont de Clax, France) suplementado con 0.01% de cloranfenicol (Sigma-Aldrich) para inhibir el crecimiento de bacterias, las placas se incubaron a 30°C durante un periodo de 3 a 5 días (Cocolin *et al.*, 2000; Verdugo-Valdez *et al.*, 2011). Después del periodo de incubación, se contaron las unidades formadoras de colonias.

### **4.3. Aislamiento de levaduras**

Se seleccionaron diez colonias de cada muestra cultivada en placas de agar WL con base en sus características morfológicas y su coloración en el medio. Las colonias elegidas se purificaron en placas de agar YEPD (10 g/L de extracto de levadura; 20 g/L de peptona; 20 g/L de glucosa; 20 g/L de agar), incubadas a 30°C durante 48 h. Las cepas purificadas se conservaron en caldo YEPD conteniendo 30% de glicerol y almacenadas a -20°C hasta su identificación.

### **4.4. Determinación de ácidos orgánicos, azúcares y etanol en las muestras de Taberna**

Las muestras se descongelaron y se centrifugaron a 12 000 x g durante 10 min; el sobrenadante obtenido se filtró a través de una membrana millipore de 0.45 µm (EMD Millipore, Massachusetts, USA). Las concentraciones de azúcares (sacarosa, glucosa y fructosa), ácidos orgánicos (ácido láctico y acético) y etanol se determinaron empleando un sistema de cromatografía de líquidos (Waters Corporation, Massachusetts, USA) equipado con un detector de índice de refracción (Waters 2414, Massachusetts, USA) y una columna de exclusión de iones aminex HPX-87H (300 x 7.8 mm) (BIO-RAD, USA), acoplada a un detector de índice de refracción (Waters 2414). Se empleó como fase móvil una solución de ácido sulfúrico (0.004 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), a una velocidad de flujo de 0.6 mL/min. Bajo estas condiciones se determinaron los tiempos de retención de cada uno de los estándares certificados de los compuestos a determinar (sacarosa, glucosa, fructosa, ácido láctico, ácido acético y etanol) y se realizaron curvas estándar. La identificación de los compuestos se realizó por comparación de los tiempos de retención, y las concentraciones se determinaron mediante la interpolación de los resultados con las curvas estándar. Las muestras se analizaron por duplicado.

El pH de cada muestra se determinó usando un potenciómetro (pH-meter AB15, Accumet, Cole-Parmer, Chicago). Todas las muestras se analizaron por triplicado.

## **4.5. Hidrólisis de exopolisacáridos producidos en la fermentación de Taberna**

Para determinar la presencia de exopolisacáridos, se realizó una hidrólisis ácida de algunas muestras seleccionadas (muestras colectadas de los lotes 4, 5, 6, 13 y 14). Un mililitro de muestra se centrifugó a 12 000 x *g* durante 10 min. Luego, el sobrenadante fue hidrolizado empleando una solución de HCl 1 N, ajustando las muestras a una concentración final de 0.3 N, e incubado a 105°C durante 1 h. Posteriormente, las muestras se neutralizaron con NaOH 0.1 N (Escalante *et al.*, 2008). Los azúcares producto de la hidrólisis se determinaron mediante HPLC, usando las condiciones descritas anteriormente en la sección 4.4.

## **4.6. Análisis de la población de levaduras mediante métodos dependiente del cultivo**

### **4.6.1. Extracción de ADN**

Se aislaron un total de 430 cepas de levaduras. Las cepas se cultivaron en 5 mL de caldo YEPD, se incubaron a 30°C con una velocidad de agitación de 200 rpm durante 18 h. Luego, aproximadamente 1.5 mL de cultivo se colocaron en un tubo Eppendorf y se centrifugó a 20 000 x *g* por 5 min a 4°C, y se eliminó el sobrenadante. Este paso se realizó tres veces con la finalidad de recuperar más biomasa. El pellet celular obtenido se usó para la extracción de ADN mediante el método reportado por Cocolin *et al.* (2000) con algunas modificaciones. Las células se resuspendieron en 200 µL de buffer de ruptura (2% de triton X-100, 1% de SDS, 100 mM de NaCl, 10 mM de Tris pH 8, 1 mM de EDTA pH 8), luego se añadieron 0.3 g de perlas de vidrio (0.42-0.6 mm de diámetro) y 200 µL de solución fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1, v/v) (Sigma-Aldrich). Los tubos se agitaron en un vortex por un minuto y se centrifugaron a 20 000 x *g* durante 10 min. Posteriormente se añadieron 200 µL de buffer TE (10 mM de Tris, 1 mM de EDTA pH 7.6). La mezcla se centrifugó a 20 000 x *g* a 4°C durante 10 min y el sobrenadante se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 mL estéril.

Finalmente el ADN se precipitó añadiendo 1 mL de etanol frío al 96%; los tubos se mantuvieron en congelación por 20 min y después se centrifugaron a 20 000 x *g* a 4°C por 10 min. El pellet de ADN recuperado se lavó con etanol frío al 70%, y se dejó secar durante la noche. El ADN se resuspendió en 100 µL de agua desionizada estéril durante 1.5 h a temperatura ambiente y se almacenó a -20°C para su uso posterior.

#### **4.6.2. Identificación molecular de las levaduras**

La región 5.8S-ITS (espaciadores transcritos internos) del ADN ribosomal de las levaduras aisladas se amplificó mediante PCR empleando los cebadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 ('-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 50 µL conteniendo buffer 1x (20 mM de Tris-HCl pH 8.4, 50 mM de KCl), 2.25 mM de MgCl<sub>2</sub>, 100 µM de una mezcla de dNTPs, 0.5 µM de cada cebador (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999), 1.25 U de ADN polimerasa *Taq* (Invitrogen) y 2 µL del ADN extraído (aproximadamente 50 ng). La reacción de amplificación se llevó a cabo en un termociclador PIKO 24 (Thermo Scientific, Vantaa, Finland) bajo las condiciones descritas por Esteve-Zarzoso *et al.* (1999). Los productos de PCR obtenidos se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa (Invitrogen) al 1.5% conteniendo 0.7 µg/mL de bromuro de etidio (Bio-Rad). Diez microlitros de amplicón se mezclaron con 1.5 µL de buffer de carga 2x (Invitrogen) y se cargaron en los pozos del gel. Los geles se corrieron en buffer TBE 0.5x (44.5 mM de Tris, 44.5 mM de ácido bórico, 1 mM de EDTA) a 100 V durante 90 min y se fotografiaron bajo luz ultravioleta transiluminada. El tamaño de las bandas se estimó por su comparación con un marcador de peso molecular (100 pb DNA ladder; Invitrogen), usando el programa Kodak molecular imaging software versión 5.0 (Carestream Health, Inc, Rochester, NY, USA).

El fragmento de ADN amplificado (5.8S-ITS ADN ribosomal) se digirió en un volumen final de reacción de 15 µL conteniendo 11.5 µL de los productos de PCR, 1.5 µL de buffer 10x, 0.2 µL de enzima de restricción (2 U) y 1.8 µL de agua

desionizada estéril. Las enzimas de restricción empleadas fueron *Hae* III, *Hinf* I, y *Hha* I (Invitrogen). La mezcla de reacción se incubó por 3.8 h a 37°C. Los fragmentos de restricción se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 2% conteniendo 0.7 µg/mL de bromuro de etidio (Bio-Rad), en buffer TBE 0.5x. Los geles se corrieron en buffer TBE 0.5x durante 90 min a 90 V y fotografiados bajo luz ultravioleta transiluminada. El tamaño de los fragmentos se estimó por comparación contra un marcador estándar (100-pb DNA ladder, Invitrogen). Los patrones de restricción se compararon con información previamente publicada por Esteve-Zarzoso *et al.* (1999), Granchi *et al.* (1999), Las Heras-Vazquez *et al.* (2003), Osorio-Cadavid *et al.* (2008), Stringini *et al.* (2008), Pham *et al.* (2011), y Wang y Liu (2013).

Las cepas aisladas se agruparon con base en sus patrones del polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción, usando un análisis de agrupamiento UPMGA en base al índice de similitud de Jaccard mediante al software PAST versión 2.17c (Jeyaram *et al.* 2008).

#### **4.6.3. Análisis de las secuencias del dominio D1/D2 del ADN ribosomal 26S**

La secuenciación del dominio D1/D2 de la subunidad 26S del ADN ribosomal se realizó para las cepas representativas de cada grupo creado, mediante PCR-RFLP. Se emplearon los cebadores NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') y NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') para la amplificación de la región señalada (Kurtzman y Robnett, 1998). Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador PIKO 24 (Thermo Scientific) bajo las condiciones siguientes: desnaturalización inicial a 95°C por 5 min; 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min, alineamiento a 55.5°C por 2 min, y extensión a 72°C por 2 min; y una extensión final a 72°C por 10 min. Los fragmentos amplificados fueron secuenciados por la compañía Laragen Sequencing and Genotyping (Culver, CA, USA). Las secuencias se editaron usando el software Mega 5.1 (Tamura *et al.* 2011) y comparadas con las secuencias de la base de datos del GenBank en

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide> usando BLAST (basic local alignment search tool).

#### **4.6.4. Número de acceso de la secuencias de nucleótidos**

Las secuencias del dominio D1/D2 del gen ribosomal 26S se depositaron en la base de datos del GenBank bajo los siguientes números de acceso, KF241559, KF241560, KF241561, KF241562, KF241563, KF241564, KF241565, y KF241567.

#### **4.6.5. Análisis del porcentaje de frecuencia**

Para estudiar la distribución de las especies en las muestras, se empleó el método propuesto por Solieri *et al.* (2006). Este método evalúa el número de veces que se detecta cada especie en una muestra, sin considerar la cantidad de cepas que pertenecen a la especie. De esta manera, se determinó el número de muestras positivas para cada especie y la frecuencia correspondiente, se definió como el número de muestras positivas para una especie dividida entre el número total de muestras y expresadas como porcentaje.

#### **4.6.6. Análisis estadístico**

Las muestras de Taberna de cada palma de coyol se analizaron por duplicado y se reportan los valores de las medias  $\pm$  desviación estándar. Para evaluar la diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ) entre las medias de las muestras, se empleó el procedimiento de comparación múltiple de Duncan's y Fisher's LSD usando el software Statgraphics Centurion XV (Statpoint technologies Inc, USA).

## **4.7. Análisis de la población de levaduras mediante métodos independientes del cultivo**

### **4.7.1. Extracción de ADN total microbiano de las muestras de Taberna**

Se filtraron 50 mL de muestra a través de una gasa estéril, con la finalidad de remover los residuos sólidos. Luego, 10 mL de cada muestra filtrada se centrifugaron a  $12\ 000 \times g$  a  $4^{\circ}\text{C}$  por 10 min. Posteriormente, los pellets se lavaron empleando 3 soluciones, solución de lavado 1 (50 mM de Tris-HCl, pH 8.3; 200 mM de NaCl; 5 mM de  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ; 0.05% de Triton X-100), solución de lavado 2 (50 mM de Tris-HCl, pH 8.3; 200 mM de NaCl; 5 mM de  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ) y solución de lavado 3 (10 mM de Tris-HCl, pH 8.3; 0.1 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ) siguiendo el protocolo descrito por Fortin *et al.* (2004). Finalmente, el ADN fue extraído usando el kit MasterPure<sup>™</sup>Yeast DNA Purification kit (epicentre® an illumina® company, Wisconsin, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **4.7.2. Protocolo PCR-DGGE**

Se utilizaron 20 nanogramos del ADN total como molde en la reacción de amplificación de la región D1 del gen ribosomal 26S, usando los cebadores NL1GC y LS2 (Cocolin *et al.*, 2000). La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen total de reacción de 50  $\mu\text{L}$  conteniendo buffer 1x, 2.5 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 0.2 mM de cada DNTP, 0.2  $\mu\text{M}$  de cada cebador y 2.5 U de polimerasa *Taq*. Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador (PIKO 24 thermal cycler, Thermo Scientific, Vantaa, Finland) bajo las siguientes condiciones:  $95^{\circ}\text{C}$  por 5 min, 35 ciclos de reacción que consistieron en una temperatura de desnaturalización de  $95^{\circ}\text{C}$  durante 1 min, alineamiento a  $55^{\circ}\text{C}$  por 45 s, y extensión de  $72^{\circ}\text{C}$  por 1 min, seguidos de una extensión final de  $72^{\circ}\text{C}$  por 10 min. Se analizaron 5 microlitros de cada producto de PCR por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 1%, conteniendo 0.7  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de bromuro de etidio (Bio-Rad), y corridos en buffer TBE 0.5x (44.5 mM de Tris (Sigma-Aldrich, Missouri, USA); 44.5 mM de ácido bórico (Sigma-Aldrich); 1 mM de  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$



(Sigma-Aldrich)) a 100 V durante 50 min. El tamaño de los amplicones se estimó por su comparación con un marcador de peso molecular estándar (1 kb plus DNA ladder; Invitrogen, California, USA). Los geles se fotografiaron bajo luz ultravioleta transiluminada. Posteriormente, los productos de PCR se analizaron mediante DGGE usando el equipo Bio-Rad Dcode<sup>tm</sup> Universal Mutation Detection System (Bio-Rad). Las muestras se aplicaron directamente en geles de poliacrilamida (0.8 mm) al 8% en buffer TAE 1x conteniendo 0.04 mM de Tris base, 0.02 M de ácido acético glacial, 1 mM de EDTA, pH 8. Los geles se prepararon con un gradiente de desnaturalizantes de 25 a 60% de urea y formamida y una relación de acrilamida y bis-acrilamida de 19:1 (poliacrylamide mixing powder, Sigma-Aldrich), las condiciones desnaturalizantes fueron previamente determinadas como se describe en la sección siguiente (4.7.2.1). La electroforesis se llevó a cabo a un voltaje y temperatura constante de 70 V y 60°C, respectivamente, durante 17 h. Después de la electroforesis, los geles se tiñeron usando el método de tinción con plata descrito por Byun *et al.* (2009), fotografiados y analizados con el software Kodak molecular imaging software versión 5.0 (carestream Health, Inc.).

#### **4.7.2.1. DGGE perpendicular empleado para determinar las condiciones desnaturalizantes del DGGE paralelo**

Para determinar las condiciones desnaturalizantes empleadas en el DGGE paralelo, se realizó un DGGE perpendicular, usando un gradiente desnaturalizante de 0 a 100% (100% corresponde a 7 M de urea y 40% de formamida). La muestra evaluada consistió de una mezcla de amplicones del dominio D1 del gen ribosomal 26S, amplificados a partir del ADN extraído previamente de levaduras aisladas e identificadas mediante PCR-RFLP y secuenciación. Se depositaron 3 µg de esta mezcla en el único pozo del gel de poliacrilamida (acrilamida y bis-acrilamida de 19:1 (poliacrylamide mixing powder, Sigma-Aldrich)). La electroforesis se realizó a temperatura y voltaje constante de 130 V y 60°C, respectivamente, durante 2 h. Después de la electroforesis, los geles se tiñeron usando el método de tinción con plata descrito por Byun *et al.* (2009), y

fotografiados y analizados con el software Kodak molecular imaging software versión 5.0 (Carestream Health, Inc.).

#### 4.7.3. Análisis de imágenes de los perfiles DGGE

El análisis de las imágenes de los geles DGGE se realizó empleando el software PyElph 1.4 (Pavel y Vasile, 2012). Una matriz de agrupamiento fue obtenida con base en la presencia (1) o ausencia (0) de bandas, sin considerar la intensidad. Esta información fue empleada para calcular la matriz de similitud empleando el coeficiente Dice, el cual expresa el nivel de similitud entre dos patrones de ADN. Para las muestras  $S_i$  y  $S_j$  la similitud es:

$$\text{Dice}(S_i, S_j) = \frac{2 * \text{número de bandas comunes en las líneas } i \text{ y } j}{\text{número de bandas en las líneas } i + \text{número de bandas en la línea } j} (\%)$$

Los dendogramas fueron construidos usando el software PAST versión 2.17c, mediante el método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean).

#### 4.7.4. Identificación de bandas DGGE

Las bandas seleccionadas en el DGGE fueron extraídas de los geles usando un bisturí estéril, y transferidos a 50  $\mu$ L de agua desionizada estéril e incubado a 4°C durante la noche, para permitir la difusión de ADN. Luego, diez nanogramos del ADN eluído se reamplificaron usando los cebadores NL1GC y LS2 y las condiciones mencionadas en el apartado 4.7.2. Los amplicones fueron analizados por DGGE para confirmar la presencia de una sola banda. Luego, los productos de PCR fueron reamplificados con los mismos pares de cebadores sin la grapa GC, y se purificaron usando el kit DNA Clean and Concentrator<sup>tm</sup>-5 (Zymo Research, California, USA). Finalmente, los amplicones purificados se enviaron para su secuenciación a la compañía Laragen Sequencing and Genotyping (Culver, CA,

USA). Las secuencias fueron alineadas para su identificación en GenBank usando el programa Blast (Altschul *et al.* 1997).

#### **4.7.5. Clonación de los productos de PCR de las bandas DGGE**

Cuando las secuencias obtenidas contenían muchos picos ambiguos, las bandas se clonaron usando el kit CloneJet PCR cloning Kit (Thermo scientific, Massachusetts, USA). Los productos de PCR amplificados de las bandas DGGE eluidas fueron ligadas en el vector pJET1.2/blunt (Cloning Vector) siguiendo las instrucciones de los fabricantes (CloneJet PCR Cloning kit), y transformadas en las células *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ . Para confirmar la presencia de los insertos, 5 colonias representativas de cada placa se seleccionaron aleatoriamente. Las colonias tomadas se resuspendieron en 20  $\mu$ L de mezcla de reacción (PCR) conteniendo buffer 1x, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de cada dNTP, 0.2  $\mu$ M de cada cebador (pJET1.2, CloneJET PCR Cloning Kit) y 0.5 U de polimerasa *Taq*. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador (PIKO 24 thermal cycler) bajo las siguientes condiciones: 95°C por 5 min, 35 ciclos a 95°C por 1 min, 55°C por 45 s, 72°C por 1 min, y una extensión final de 72°C por 7 min. Luego, cinco microlitros de cada producto de PCR se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TBE 0.5x conteniendo 0.7  $\mu$ g/mL de bromuro de etidio (Bio-Rad) a 100 V durante 50 min. El tamaño de las bandas se estimó mediante un marcador de peso molecular estándar (1kb plus DNA ladder; Invitrogen). Los insertos positivos en las clonas fueron identificados por su tamaño de aproximadamente 350 pb, el cual contenía la región D1 del gen ADN ribosomal 26S. Posteriormente, diez nanogramos de cada amplicon obtenido directamente de PCR de colonias, se emplearon como ADN molde para amplificar únicamente la región del dominio D1, usando los cebadores NL1 y LS2 y las condiciones descritas arriba. Los productos de PCR fueron purificados usando el kit DNA Clean and Concentrator<sup>tm</sup>-5 (Zymoresearch), y enviados para su secuenciación a la compañía Laragen Sequencing and Genotyping (Laragen company). Las

secuencias fueron alineadas para su identificación en GenBank usando el programa Blast (Altschul *et al.*, 1997).

## 5. RESULTADOS

Se ha mencionado que el proceso de producción de Taberna es similar a una fermentación por lote alimentado. De esta manera, en el presente estudio cada muestra analizada (1-14) a excepción de la savia fresca, corresponde a la savia fermentada colectada en el momento que las canoas estaban llenas. Es decir, en el momento en que el lote alimentado había alcanzado el volumen de operación del bioreactor (canao), obteniéndose el producto final. La cuantificación de los azúcares (sacarosa, glucosa y fructosa), metabolitos acumulados (etanol, ácido láctico y ácido acético) y valores de pH, correspondientes al producto final se reportan como mediciones separadas de cada muestra.

### 5.1. Características químicas de la Taberna

Para determinar los azúcares y su concentración en la savia de la palma de coyol, se tomó una muestra de savia fresca después de que el productor abrió las canoas. La savia fresca contiene 11.36% (p/v) de sacarosa (Tabla 4). Las muestras de savia fermentada o Taberna se colectaron diariamente a las 7 am, cuando las canoas estaban llenas y la bebida lista para su consumo o almacenamiento. La muestra de Taberna del lote 1 resultó ser una bebida muy dulce, conteniendo aproximadamente 8% (p/v) de sacarosa y 0.3% de fructosa. Estos valores fueron similares entre palmeras (no existe diferencia estadística significativa entre las medias de las palmeras). A partir de la muestra del lote 5, la Taberna presentó una concentración de sacarosa alrededor de 1% (p/v). Mientras que la concentración de fructosa y glucosa aumentaron (Tabla 4). En la Tabla 4 se señala que sólo algunas muestras de Taberna presentaron diferencias estadísticamente significativas entre palmeras (I, II y III), indicando que los azúcares en la savia y su consumo fue similar en las tres palmeras.

**Tabla 4.** Cuantificación de azúcares presentes en las muestras de Taberna colectadas de 14 lotes durante los primeros días del proceso de producción

Muestra/ lote	Sacarosa (% p/v)			Fructosa (% p/v)			Glucosa (% p/v)		
	Palmera I	Palmera II	Palmera III	Palmera I	Palmera II	Palmera III	Palmera I	Palmera II	Palmera III
Savia fresca*	11.36 ± 0.51 <sup>a</sup>	11.36±0.51 <sup>a</sup>	11.36±0.51 <sup>a</sup>	0.27±0.03 <sup>a</sup>	0.27±0.03 <sup>a</sup>	0.27±0.03 <sup>a</sup>	nd	nd	nd
1	8.03±0.34 <sup>a</sup>	8.02±0.32 <sup>a</sup>	8.58±0.43 <sup>a</sup>	0.31±0.03 <sup>a</sup>	0.33±0.25 <sup>a</sup>	0.28±0.03 <sup>a</sup>	nd	nd	nd
2	8.95±0.18 <sup>a</sup>	6.84±0.11 <sup>b</sup>	7.20±0.01 <sup>b</sup>	0.5±0.00 <sup>ab</sup>	0.46±0.00 <sup>a</sup>	0.60±0.00 <sup>b</sup>	nd	nd	nd
3	5.77±0.00 <sup>a</sup>	5.77±0.00 <sup>a</sup>	5.65±0.00 <sup>a</sup>	1.31±0.00 <sup>a</sup>	1.32±0.00 <sup>a</sup>	1.23±0.00 <sup>a</sup>	0.23±0.00 <sup>a</sup>	0.23±0.00 <sup>a</sup>	0.23±0.00 <sup>a</sup>
4	3.12±0.00 <sup>a</sup>	2.92±0.30 <sup>a</sup>	3.13±0.00 <sup>a</sup>	2.14±0.01 <sup>a</sup>	1.34±0.05 <sup>b</sup>	2.14±0.01 <sup>a</sup>	nd	nd	nd
5	0.62±0.02 <sup>a</sup>	0.62±0.02 <sup>a</sup>	0.62±0.02 <sup>a</sup>	1.21±0.03 <sup>a</sup>	1.21±0.03 <sup>a</sup>	1.21±0.03 <sup>a</sup>	0.08±0.00 <sup>a</sup>	0.08±0.00 <sup>a</sup>	0.08±0.00 <sup>a</sup>
6	0.89±0.06 <sup>a</sup>	1.10±0.00 <sup>b</sup>	1.99±0.03 <sup>c</sup>	2.39±0.22 <sup>a</sup>	2.02±0.02 <sup>a</sup>	3.43±0.09 <sup>b</sup>	0.15±0.02 <sup>a</sup>	0.17±0.01 <sup>a</sup>	0.36±0.04 <sup>b</sup>
7	2.09±0.11 <sup>a</sup>	2.08±0.09 <sup>a</sup>	3.74±0.05 <sup>b</sup>	3.03±0.04 <sup>a</sup>	1.98±0.11 <sup>b</sup>	2.05±0.04 <sup>b</sup>	0.75±0.02 <sup>a</sup>	0.67±0.10 <sup>a</sup>	0.71±0.10 <sup>a</sup>
8	1.04±0.00 <sup>a</sup>	3.15±0.21 <sup>b</sup>	3.43±0.33 <sup>b</sup>	3.7±0.02 <sup>a</sup>	3.11±0.20 <sup>b</sup>	3.02±0.14 <sup>b</sup>	2.35±0.02 <sup>a</sup>	1.92±0.21 <sup>a</sup>	2.18±0.26 <sup>a</sup>
9	0.64±0.00 <sup>a</sup>	1.08±0.03 <sup>b</sup>	0.37±0.01 <sup>c</sup>	3.02±0.01 <sup>a</sup>	3.98±0.10 <sup>b</sup>	3.51±0.01 <sup>c</sup>	1.65±0.00 <sup>a</sup>	2.64±0.09 <sup>b</sup>	1.73±0.03 <sup>a</sup>
10	0.71±0.00 <sup>a</sup>	0.34±0.00 <sup>b</sup>	0.32±0.00 <sup>b</sup>	1.10±0.10 <sup>a</sup>	0.98±0.07 <sup>a</sup>	0.66±0.01 <sup>b</sup>	0.08±0.00 <sup>a</sup>	0.11±0.00 <sup>a</sup>	0.18±0.00 <sup>b</sup>
11	0.64±0.04 <sup>a</sup>	0.36±0.01 <sup>b</sup>	0.32±0.00 <sup>b</sup>	1.03±0.01 <sup>a</sup>	0.79±0.00 <sup>b</sup>	0.46±0.00 <sup>c</sup>	0.24±0.00 <sup>a</sup>	0.25±0.01 <sup>b</sup>	0.07±0.00 <sup>c</sup>
12	nd	0.34±0.00 <sup>a</sup>	0.34±0.00 <sup>a</sup>	0.57±0.05 <sup>a</sup>	0.79±0.02 <sup>b</sup>	0.38±0.01 <sup>c</sup>	0.05±0.00 <sup>a</sup>	0.10±0.00 <sup>b</sup>	0.01±0.00 <sup>c</sup>
13	0.68±0.09 <sup>a</sup>	0.34±0.00 <sup>b</sup>	0.33±0.00 <sup>b</sup>	0.97±0.02 <sup>a</sup>	0.82±0.09 <sup>a</sup>	0.36±0.02 <sup>b</sup>	0.15±0.05 <sup>a</sup>	0.19±0.01 <sup>a</sup>	0.01±0.00 <sup>b</sup>
14	0.63±0.00 <sup>a</sup>	0.41±0.00 <sup>b</sup>	0.33±0.00 <sup>b</sup>	1.00±0.07 <sup>a</sup>	1.04±0.01 <sup>a</sup>	0.48±0.02 <sup>b</sup>	0.17±0.00 <sup>a</sup>	0.37±0.00 <sup>b</sup>	0.07±0.00 <sup>c</sup>

Los datos son las medias de dos repeticiones de cada una de las muestras colectadas de tres palmeras ± desviación estándar. La comparación de medias se realizó entre el mismo parámetro entre palmeras; el valor de las medias seguida por letras diferentes en superíndice son estadísticamente diferentes (Fisher's LSD a  $P \leq 0.05$ ). \*La información es idéntica para las tres palmeras, porque la savia de cada palmera fue mezclada (para mayor volumen) y solo una muestra fue analizada. p/v: peso/volumen. nd: no detectado.

La savia sin fermentar presentó un pH de 7.25 (Tabla 5), demostrando así su frescura. En el primer lote de Taberna cosechado, el pH estuvo alrededor de 6, con una diferencia estadística significativa entre las medias de las tres palmeras. A partir del lote 3, la Taberna se convierte en una bebida ácida con valores de pH alrededor de 4. La disminución de este parámetro en cada lote de producto final (Taberna) ocurrió de manera paralela al aumento de las concentraciones de los ácidos orgánicos: láctico y acético, detectados en cada lote cosechado de cada palmera. Las concentraciones de ácido láctico y acético variaron en un rango de 0.05 a 0.50% y de 0.01 a 0.29% (Tabla 5), respectivamente. Por otro lado, la Taberna resultó ser una bebida no alcohólica en los primeros lotes producidos (el etanol no fue detectado en los lotes 1-3). Sin embargo, en las muestras de Taberna tomadas de los lotes 4-9, la concentración de etanol varió de 0.35 a 1.5% (p/v) (Tabla 5). La Taberna cosechada en los lotes 10-14, presentó mayor contenido de etanol (4 a 4.89% p/v). La concentración de metabolitos (ácido láctico, ácido acético y etanol) producidos fue similar entre los lotes.

**Tabla 5.** Metabolitos y valores de pH generados durante la fermentación natural de la Taberna

Muestra/ lote	Etanol (% p/v)			Ácido láctico (% p/v)			Ácido Acético (% p/v)			pH		
	Palmera I	Palmera II	Palmera III	Palmera I	palmera II	palmera III	Palmera I	palmera II	palmera III	Palmera I	palmera II	palmera III
Savia fresca*	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	7.26±0.02 <sup>a</sup>	7.25±0.02 <sup>a</sup>	7.25±0.02 <sup>a</sup>
1	nd	nd	nd	0.26±0.05 <sup>a</sup>	0.26±0.05 <sup>a</sup>	0.26±0.05 <sup>a</sup>	0.02±0.00 <sup>a</sup>	0.02±0.00 <sup>a</sup>	0.03±0.00 <sup>b</sup>	5.4±0.01 <sup>a</sup>	6.07±0.05 <sup>b</sup>	6.63±0.03 <sup>c</sup>
2	nd	nd	nd	0.32±0.01 <sup>a</sup>	0.27±0.02 <sup>b</sup>	0.27±0.01 <sup>b</sup>	nd	nd	nd	5±0.02 <sup>a</sup>	4.62±0.14 <sup>b</sup>	5.24±0.08 <sup>c</sup>
3	nd	nd	nd	0.12±0.00 <sup>a</sup>	0.12±0.00 <sup>a</sup>	0.13±0.00 <sup>a</sup>	0.01±0.00 <sup>a</sup>	0.01±0.00 <sup>a</sup>	0.02±0.00 <sup>a</sup>	4.83±0.01 <sup>a</sup>	4.36±0.03 <sup>b</sup>	4.46±0.07 <sup>c</sup>
4	0.69±0.00 <sup>a</sup>	0.35±0.03 <sup>b</sup>	0.69±0.01 <sup>a</sup>	0.29±0.00 <sup>a</sup>	0.26±0.02 <sup>b</sup>	0.29±0.00 <sup>a</sup>	0.09±0.00 <sup>a</sup>	0.08±0.00 <sup>a</sup>	0.09±0.00 <sup>a</sup>	4.7±0.00 <sup>a</sup>	4.37±0.04 <sup>b</sup>	4.42±0.01 <sup>b</sup>
5	0.24±0.01 <sup>a</sup>	0.24±0.01 <sup>a</sup>	0.24±0.01 <sup>a</sup>	0.05±0.00 <sup>a</sup>	0.05±0.00 <sup>a</sup>	0.05±0.00 <sup>a</sup>	0.09±0.00 <sup>a</sup>	0.01±0.00 <sup>a</sup>	0.01±0.00 <sup>a</sup>	4.73±0.01 <sup>a</sup>	4.34±0.03 <sup>b</sup>	4.33±0.01 <sup>b</sup>
6	0.19±0.01 <sup>a</sup>	0.19±0.01 <sup>a</sup>	0.26±0.00 <sup>b</sup>	0.18±0.02 <sup>a</sup>	0.18±0.02 <sup>a</sup>	0.22±0.01 <sup>a</sup>	0.04±0.01 <sup>a</sup>	0.03±0.01 <sup>a</sup>	0.04±0.00 <sup>a</sup>	4.8±0.02 <sup>a</sup>	4.45±0.03 <sup>b</sup>	4.68±0.07 <sup>c</sup>
7	0.27±0.00 <sup>a</sup>	0.25±0.03 <sup>a</sup>	0.25±0.01 <sup>a</sup>	0.27±0.00 <sup>a</sup>	0.23±0.00 <sup>b</sup>	0.33±0.00 <sup>c</sup>	0.04±0.00 <sup>a</sup>	0.03±0.00 <sup>b</sup>	0.02±0.00 <sup>b</sup>	4.52±0.06 <sup>a</sup>	4.57±0.06 <sup>a</sup>	4.57±0.01 <sup>a</sup>
8	0.71±0.01 <sup>a</sup>	0.66±0.00 <sup>b</sup>	0.41±0.02 <sup>c</sup>	0.27±0.00 <sup>a</sup>	0.23±0.01 <sup>b</sup>	0.27±0.00 <sup>a</sup>	0.09±0.00 <sup>a</sup>	0.11±0.00 <sup>b</sup>	0.09±0.00 <sup>a</sup>	4.38±0.02 <sup>a</sup>	4.18±0.02 <sup>b</sup>	4.48±0.01 <sup>c</sup>
9	1.14±0.01 <sup>a</sup>	1.02±0.02 <sup>a</sup>	1.5±0.18 <sup>a</sup>	0.30±0.00 <sup>a</sup>	0.29±0.01 <sup>a</sup>	0.32±0.01 <sup>a</sup>	0.11±0.00 <sup>a</sup>	0.14±0.04 <sup>a</sup>	0.16±0.01 <sup>a</sup>	4.24±0.01 <sup>a</sup>	4.25±0.00 <sup>a</sup>	4.41±0.04 <sup>b</sup>
10	4.33±0.12 <sup>a,b</sup>	4.37±0.02 <sup>b</sup>	4.06±0.09 <sup>a</sup>	0.35±0.00 <sup>a</sup>	0.29±0.01 <sup>b</sup>	0.31±0.01 <sup>b</sup>	0.11±0.03 <sup>a</sup>	0.17±0.03 <sup>a</sup>	0.11±0.01 <sup>a</sup>	4.15±0.00 <sup>a</sup>	4.14±0.09 <sup>a</sup>	4.26±0.01 <sup>b</sup>
11	4.4±0.34 <sup>a</sup>	4.8±0.09 <sup>a</sup>	4.49±0.02 <sup>a</sup>	0.28±0.01 <sup>a</sup>	0.32±0.01 <sup>b</sup>	0.28±0.00 <sup>a</sup>	0.12±0.01 <sup>a</sup>	0.22±0.02 <sup>b</sup>	0.15±0.00 <sup>a</sup>	4.07±0.01 <sup>a</sup>	4.05±0.03 <sup>a</sup>	4.5±0.01 <sup>b</sup>
12	4.57±0.02 <sup>a</sup>	4.85±0.05 <sup>b</sup>	4.58±0.02 <sup>a</sup>	0.31±0.02 <sup>a</sup>	0.34±0.02 <sup>a</sup>	0.30±0.00 <sup>a</sup>	0.19±0.01 <sup>a</sup>	0.22±0.00 <sup>b</sup>	0.21±0.00 <sup>b</sup>	4.35±0.02 <sup>a</sup>	4.07±0.03 <sup>b</sup>	4.29±0.03 <sup>c</sup>
13	5.26±0.03 <sup>a</sup>	4.84±0.03 <sup>b</sup>	3.59±0.01 <sup>c</sup>	0.31±0.03 <sup>a</sup>	0.34±0.00 <sup>a</sup>	0.31±0.01 <sup>a</sup>	0.16±0.03 <sup>a</sup>	0.12±0.01 <sup>a</sup>	0.14±0.01 <sup>a</sup>	3.96±0.01 <sup>a</sup>	4.08±0.07 <sup>b</sup>	4.17±0.01 <sup>c</sup>
14	4.89±0.15 <sup>a</sup>	4.81±0.05 <sup>a</sup>	4.64±0.05 <sup>a</sup>	0.50±0.00 <sup>a</sup>	0.47±0.00 <sup>b</sup>	0.48±0.00 <sup>c</sup>	0.29±0.00 <sup>b</sup>	0.22±0.00 <sup>a</sup>	0.22±0.00 <sup>a</sup>	4±0.04 <sup>a</sup>	4.02±0.05 <sup>a</sup>	4.11±0.01 <sup>b</sup>

Los datos son las medias de dos repeticiones de cada una de las muestras colectadas de tres palmeras ± desviación estándar. La comparación de medias se realizó entre el mismo parámetro entre palmeras; el valor de las medias seguida por letras diferentes en superíndice son estadísticamente diferentes (Fisher's LSD a  $P \leq 0.05$ ). \*La información es idéntica para las tres palmeras, porque la savia de cada palmera fue mezclada (para mayor volumen) y solo una muestra fue analizada. p/v: peso/volumen. nd: no detectado.

## 5.2. Hidrólisis de exopolisacáridos producidos en la fermentación de Taberna

Con la finalidad de demostrar la formación de polímeros de glucosa o fructosa en la Taberna, y poder explicar la disminución de la sacarosa en la savia, se realizó la hidrólisis de las muestras y la concentración de los productos generados se determinó por HPLC. Los resultados mostraron un aumento en las concentraciones de los monosacáridos (glucosa y fructosa) (Tabla 6) con respecto al valor teórico (el valor teórico se refiere a la suma de glucosa o fructosa en la muestra más la glucosa o fructosa que componen a la sacarosa). Las muestras analizadas en este experimento corresponden a los lotes en donde se observó una reducción significativa de la concentración de sacarosa en relación con su presencia en la savia fresca (Tabla 4), y un aumento de la viscosidad de la savia (no medida), considerando que estos dos factores están relacionados con la síntesis de polisacáridos y que podrían ayudar a entender el agotamiento del disacárido en las muestras. Por ejemplo, los resultados del lote 4 indican que el polímero en la savia consistió de monómeros de glucosa (valor teórico/ valor real: 64.9 mM/123.13mM), mientras que en los lotes 5 y 6 el polisacárido estuvo formado de monómeros de fructosa (31.68 mM/168.71 mM y 74.12 mM/ 139.23 mM) (Tabla 6). Las muestras de los últimos lotes (13 y 14) analizados mostraron una disminución del polisacárido (Tabla 6). De esta manera los resultados ayudan a explicar que en los lotes (4-9) donde la concentración de etanol es baja (0.6-1% p/v), una parte de la cantidad de sacarosa es empleada para la formación de polímeros de glucosa o fructosa, mientras que en la etapa donde el contenido de etanol en la savia aumenta, la formación del polímero disminuye.



**Tabla 6.** Concentración de glucosa y fructosa en muestras de Taberna hidrolizadas

Muestra /lote	Glucosa (mM)		Fructosa (mM)	
	Valor teórico <sup>a</sup>	Valor real <sup>b</sup>	Valor teórico <sup>a</sup>	Valor real <sup>b</sup>
4	64.9	123.13	169.49	140.72
5	0.11	56.45	31.82	168.71
6	36.07	30.27	74.12	139.23
13	4.4	11.7	26.28	38.03
14	4.59	13.63	29.34	39.87

<sup>a</sup>Corresponde a la suma de la concentración de glucosa/fructosa en la muestra sin hidrolizar más la concentración de glucosa/fructosa que teóricamente proviene de la sacarosa.

<sup>b</sup>Corresponde a la concentración de glucosa/fructosa después de la hidrólisis de las muestras.

### 5.3. Crecimiento microbiano durante la producción de Taberna

Los resultados de la población microbiana se reportan como medias de los datos obtenidos de las tres palmeras estudiadas. La población microbiana en las muestras de Taberna se presenta en la Tabla 7. La población más baja de levaduras ( $4.68 \times 10^3$  ufc/mL) se presentó en la savia fresca, la cual aumentó ligeramente ( $7.94 \times 10^4$  ufc/mL) en la savia fermentada del primer lote. A partir del lote 4 y hasta las muestras del lote 10, la población de levaduras se mantuvo constante (aproximadamente  $10^6$  ufc/mL) (sin diferencia estadísticamente significativa entre ellas). Sin embargo, la población disminuyó significativamente en la Taberna cosechada en los lotes 11-14. La población de bacterias ácido lácticas, ácido acéticas y mesófilicas aerobias resultó ser más alta que la población de levaduras, la savia fresca presentó una concentración celular de aproximadamente  $10^7$  ufc/mL para cada grupo bacteriano; los coliformes totales presentaron la concentración más baja ( $6.16 \times 10^5$  ufc/mL). La Taberna recolectada de los lotes 2 a 7 presentó la población más alta de BAL, BAA y bacterias mesofílicas totales (Tabla 7). En los últimos lotes evaluados, la población alcanzó valores alrededor de  $10^5$  ufc/mL. Mientras que la población de coliformes totales no se detectó a partir de las muestras del lote 11.

**Tabla 7.** Poblaciones de microorganismos en muestras de Taberna

Muestra/lote	Microorganismos (Log <sub>10</sub> ufc/mL)				
	BAL	BAA	Levaduras	MA	Coliformes totales
Savia fresca*	6.91 ± 0.00 <sup>def</sup>	7.04 ± 0.00 <sup>b</sup>	3.67 ± 0.00 <sup>ab</sup>	6.69 ± 0.00 <sup>de</sup>	5.79 ± 0.00 <sup>ab</sup>
1	7.38 ± 0.36 <sup>abcd</sup>	7.01 ± 0.13 <sup>b</sup>	4.90 ± 0.06 <sup>c</sup>	6.78 ± 0.94 <sup>cde</sup>	6.08 ± 0.92 <sup>a</sup>
2	7.82 ± 0.18 <sup>abc</sup>	7.73 ± 0.18 <sup>a</sup>	6.03 ± 0.03 <sup>d</sup>	7.25 ± 1.12 <sup>abcd</sup>	4.97 ± 0.33 <sup>bc</sup>
3	8.08 ± 0.04 <sup>a</sup>	7.84 ± 0.25 <sup>a</sup>	6.94 ± 0.05 <sup>e</sup>	7.83 ± 0.38 <sup>ab</sup>	4.48 ± 0.08 <sup>cd</sup>
4	7.87 ± 0.49 <sup>abc</sup>	7.85 ± 0.37 <sup>a</sup>	6.65 ± 0.06 <sup>de</sup>	7.72 ± 0.39 <sup>abc</sup>	5.07 ± 0.99 <sup>bc</sup>
5	8.17 ± 0.14 <sup>a</sup>	8.02 ± 0.22 <sup>a</sup>	6.26 ± 0.11 <sup>de</sup>	8.12 ± 0.11 <sup>a</sup>	4.97 ± 0.16 <sup>bc</sup>
6	8.09 ± 0.44 <sup>a</sup>	7.84 ± 0.19 <sup>a</sup>	5.93 ± 0.18 <sup>d</sup>	7.96 ± 0.25 <sup>ab</sup>	5.32 ± 0.18 <sup>abc</sup>
7	7.92 ± 0.31 <sup>ab</sup>	7.67 ± 0.45 <sup>a</sup>	5.97 ± 0.16 <sup>d</sup>	7.65 ± 0.46 <sup>abcd</sup>	5.11 ± 0.71 <sup>abc</sup>
8	7.09 ± 0.33 <sup>cde</sup>	7.04 ± 0.23 <sup>b</sup>	6.34 ± 0.07 <sup>de</sup>	6.98 ± 0.11 <sup>bcd</sup>	5.24 ± 0.35 <sup>abc</sup>
9	7.24 ± 0.20 <sup>bcd</sup>	6.78 ± 0.12 <sup>bc</sup>	5.97 ± 0.11 <sup>d</sup>	6.63 ± 0.45 <sup>de</sup>	4.74 ± 0.52 <sup>c</sup>
10	6.39 ± 0.71 <sup>efg</sup>	6.50 ± 0.02 <sup>c</sup>	5.81 ± 0.46 <sup>d</sup>	5.77 ± 0.54 <sup>ef</sup>	3.65 ± 0.14 <sup>d</sup>
11	6.19 ± 0.76 <sup>fgh</sup>	5.96 ± 0.36 <sup>d</sup>	4.36 ± 0.14 <sup>bc</sup>	5.78 ± 0.34 <sup>ef</sup>	n.d.
12	5.59 ± 0.29 <sup>h</sup>	5.42 ± 0.38 <sup>e</sup>	3.50 ± 0.22 <sup>a</sup>	5.38 ± 0.31 <sup>f</sup>	n.d.
13	5.87 ± 0.85 <sup>gh</sup>	5.12 ± 0.40 <sup>e</sup>	3.39 ± 0.08 <sup>a</sup>	5.63 ± 0.79 <sup>f</sup>	n.d.
14	5.48 ± 0.20 <sup>h</sup>	5.55 ± 0.45 <sup>de</sup>	3.17 ± 0.24 <sup>a</sup>	5.43 ± 0.65 <sup>f</sup>	n.d.

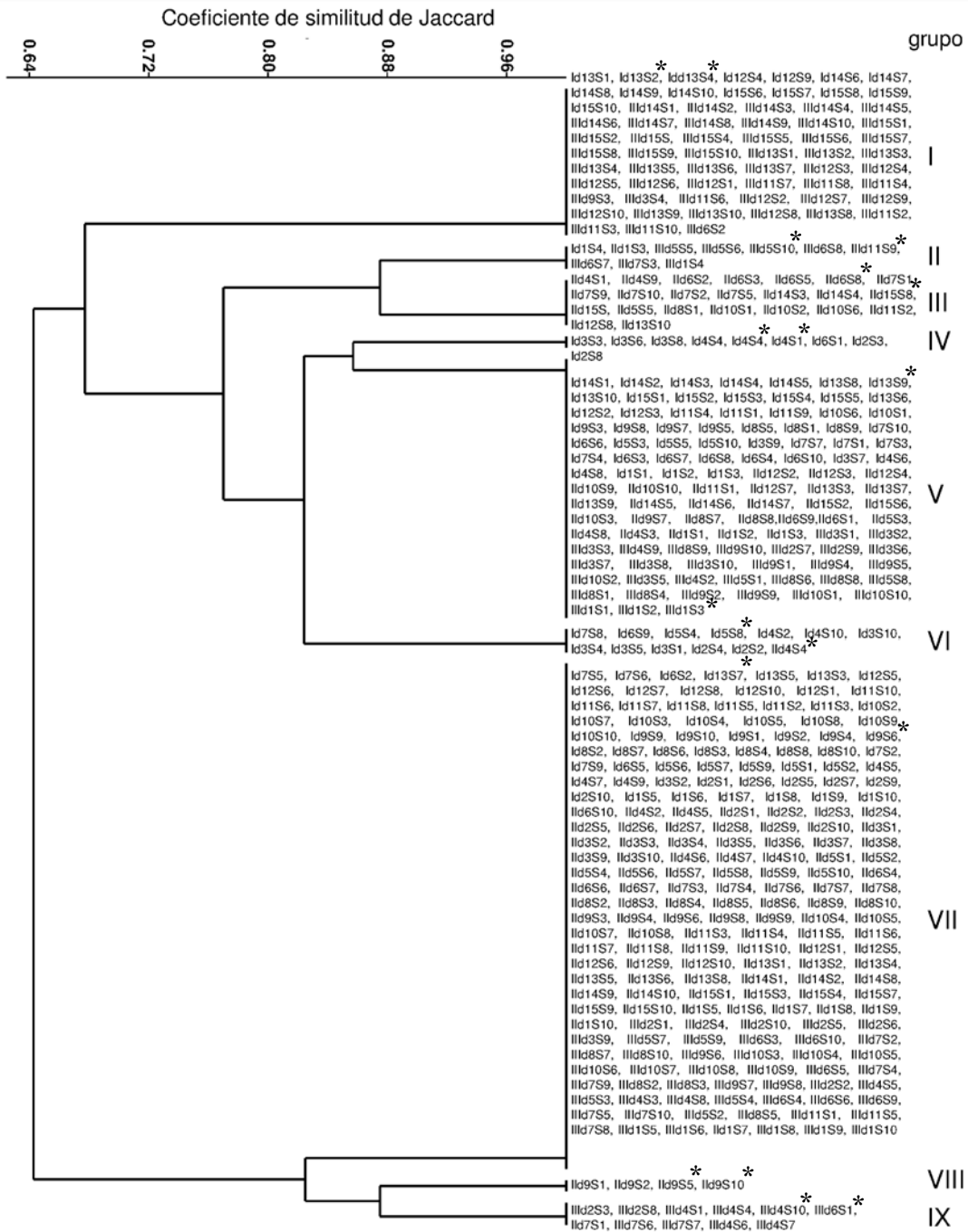
Los datos son las medias de dos repeticiones de cada una de las muestras colectadas de tres palmeras ± desviación estándar. En las columnas, los valores de las medias seguidas por letras en superíndice diferentes, presentan diferencia estadística significativa (comparación múltiple de Duncan's,  $p < 0.05$ ). BAL: bacterias ácido lácticas; BAA: bacterias ácido acéticas; MA: mesófilos aerobios; n.d.: no detectado. \*La información es idéntica para las tres palmeras, porque la savia de cada palmera fue mezclada (para tener mayor volumen) y solo una muestra fue analizada.

#### 5.4. Análisis dependiente del cultivo de la población de levaduras durante la fermentación de Taberna

##### 5.4.1. Aislamiento e identificación de las levaduras

Se aisló un total de 430 cepas de levaduras de las muestras de Taberna, las cuales fueron identificadas mediante el análisis PCR-RFLP de la región 5.8S-ITS del ADN ribosomal. Se obtuvieron amplicones de tamaños diferentes (390-850 pb). Después de la digestión de estos productos de PCR con las enzimas *Hae* III, *Hinf* I y *Hha* I y el posterior análisis de sus patrones de restricción generados (Tabla 8), las cepas se agruparon en 9 perfiles diferentes con un coeficiente de similitud del 100% (Fig. 4). Cada uno de estos perfiles de restricción fue

comparado con la información bibliográfica reportada por Esteve-Zarzoso *et al.* (1999), Granchi *et al.* (1999), Las Heras Vazquez *et al.* (2003), Osorio-Cadavid *et al.* (2008), Stringini *et al.* (2008), Pham *et al.* (2011) y Wang y Liu (2003). Las especies identificadas fueron *Saccharomyces cerevisiae* (grupo I), *Pichia kluyveri* (grupo II), *Kazachstania unispora* (grupo III), *Meyerozyma guilliermondii* (grupo IV), *Candida tropicalis* (grupo V), *Candida intermedia* (grupo VI), *Hanseniaspora guilliermondii* (grupo VII), *Kazachstania exigua* (grupo VIII) y *Pichia kudriavzevii* (*Issatchenkia orientalis* (grupo IX)) (Tabla 8). Con la finalidad de confirmar la identificación de cada uno de los grupos, dos cepas representativas de cada perfil fueron evaluadas mediante la secuenciación del dominio D1/D2 del ADN ribosomal 26S (Tabla 8), encontrando los mismos resultados con ambas técnicas.



**Fig. 4.** Análisis de Clúster de los patrones RFLP de las levaduras aisladas de las muestras de Taberna. Los números I, II y III, representan a la palmera I, palmera II, palmera III, respectivamente, la letra d representa al día de monitoreo (1-15) y la letra S representa a la cepa (1-10). \*Cepas identificadas mediante secuenciación del dominio D1/D2 del gen ribosomal 26S.

**Tabla 8.** Identificación de levaduras mediante el análisis PCR-RFLP de la región 5.8S-ITS del ADN ribosomal

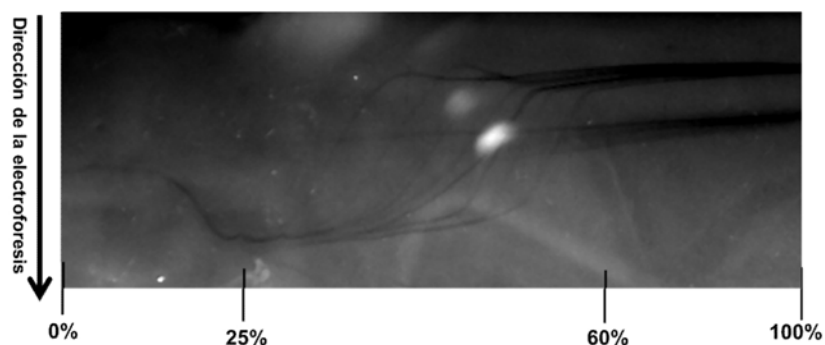
Grupos ITS-RFLP	PA <sup>a</sup> (pb)	Tamaño de los fragmentos de restricción (pb)			Longitud de las Secuencias <sup>b</sup> (pb)	Identificación de especies <sup>c</sup>	Identidad <sup>d</sup> (%)	Valor E	No. de acceso
		<i>Hae</i> III	<i>Hinf</i> I	<i>Hha</i> I					
I	850	310 + 230 + 175 + 135	360 + 360 + 130	370 + 340 + 140	559	<i>S. cerevisiae</i>	100	0.0	KF241567
II	470	365 + 90	255 + 215	170 + 100 + 60	563	<i>P. kluyveri</i>	100	0.0	KF241565
III	740	500 + 125	370 + 360	310 + 190 + 150 + 80	556	<i>K. unispora</i>	100	0.0	KF241561
IV	620	390 + 130 + 100	320 + 300	310 + 260	550	<i>M. guilliermondii</i>	100	0.0	KF241563
V	520	440 + 80	260 + 260	280 + 250	558	<i>C. tropicalis</i>	100	0.0	KF241559
VI	390	390	200 + 190	210 + 180	508	<i>C. intermedia</i>	100	0.0	KF241558
VII	750	730	340 + 220 + 190	320 + 310 + 100	550	<i>H. guilliermondii</i>	99	0.0	KF241560
VIII	730	475 + 240	345 + 245 + 140	360 + 280 + 75	556	<i>K. exigua</i>	100	0.0	KF241562
IX	535	390 + 100	225 + 160 + 150	210 + 180 + 70	598	<i>P. kudriavzevii</i>	98	0.0	KF241564

<sup>a</sup>PA es el tamaño del producto amplificado en pares de bases (pb). <sup>b</sup>Longitud de la secuencia, es el tamaño del dominio D1/D2 del ADN ribosomal 26S de las cepas amplificado con los cebadores NL1 yNL4. <sup>c</sup>Especies de levaduras identificadas por comparación de los perfiles PCR-RFLP con los patrones de las cepas descritas por Esteve-Zaroso et al. (1999), Granchi et al. (1999), Las Heras Vazquez et al. (2003), Osorio-Cadavid et al. (2008), Stringini et al. (2008), Pham et al. (2011), and Wang and Liu (2013). <sup>d</sup>Identidad, es el porcentaje de nucleótidos idénticos en la secuencia del dominio D1/D2 del ADN ribosomal 26S y la secuencia con el mejor acierto en la base de datos del GenBank. Los grupos ITS-RFLP son *Saccharomyces cerevisiae* (I), *Pichia kluyveri* (II), *Kazachstania unispora* (III), *Meyerozyma guilliermondii* (IV), *Candida tropicalis* (V), *Candida intermedia* (VI), *Hanseniaspora guilliermondii* (VII), *Kazachstania exigua* (VIII), y *Pichia kudriavzevii* (*Issatchenkia orientalis*) (IX).

## 5.5. Análisis independiente del cultivo de la población de levaduras durante la fermentación de Taberna

### 5.5.1. Optimización de las condiciones desnaturalizantes empleando DGGE perpendicular

En la Fig. 5 se observan las curvas de desnaturalización de los fragmentos amplificados del dominio D1 del gen ribosomal 26S de las especies de levaduras aisladas e identificadas previamente. El gradiente definido por el análisis del gel (DGGE) perpendicular fue de 25 a 60% de desnaturalizantes; este gradiente se empleó para resolver diferentes fragmentos de ADN en un gel DGGE paralelo.

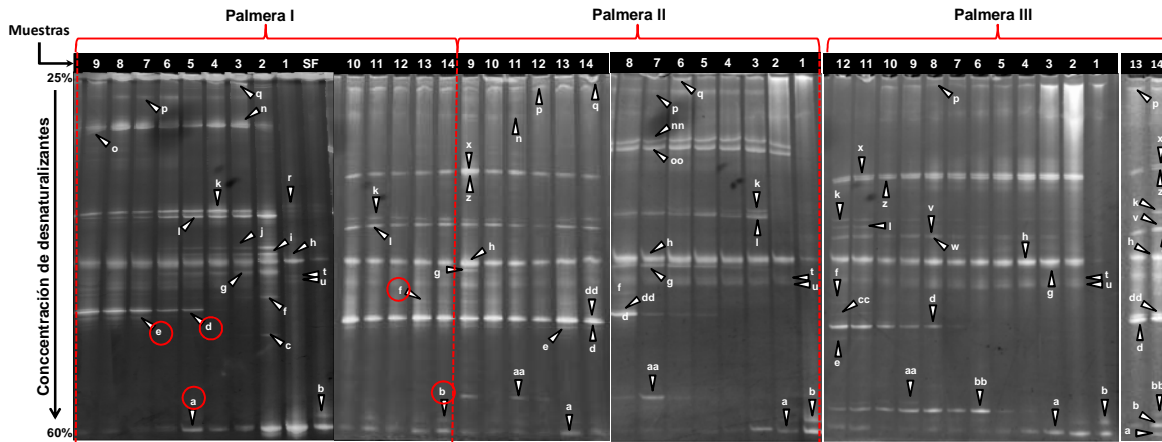


**Fig. 5.** Patrón de desnaturalización de los productos de PCR de la región D1 del gen ribosomal 26S, mediante DGGE perpendicular.

### 5.5.2. Perfiles DGGE de la comunidad de levaduras presentes en las muestras de Taberna

Los perfiles DGGE obtenidos a partir del ADN total extraído de cada muestra de Taberna se presentan en la Fig. 6. Cada línea vertical representa una muestra correspondiente a un lote de producción, y cada banda representa a una especie de levadura. Se obtuvo un total de 29 bandas con posiciones diferentes a través de los gels. Los perfiles DGGE de las muestras colectadas de las palmeras I y III presentaron 21 bandas, mientras que en la palma II se detectaron 19. Catorce bandas (a, b, d, e, f, g, h, k, l, q, t, u, x y z) fueron comunes en los perfiles de las tres palmeras, y 15 (las bandas c, l, j, o y r estuvieron presentes en el DGGE de la palma I; se encontraron bandas oo y nn en las muestras de la palma II; bandas v,

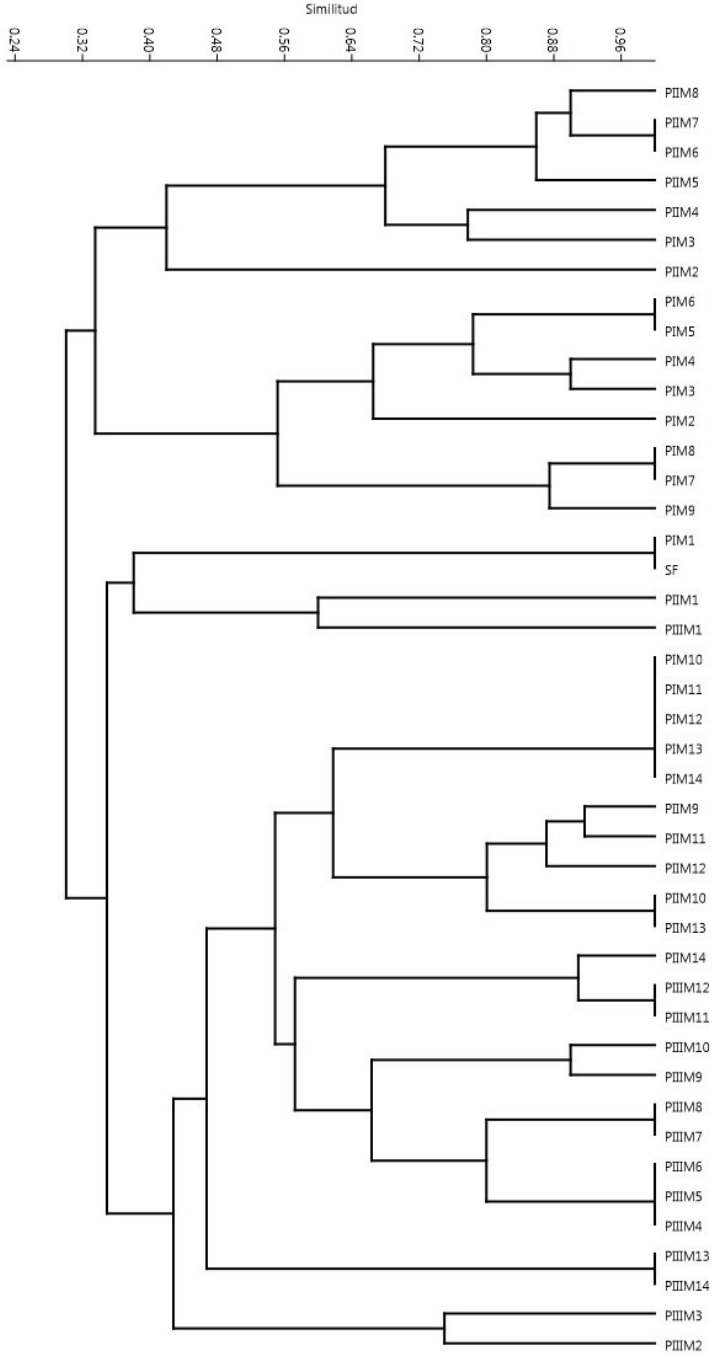
w, bb y cc en la palma III; banda n en la palma I y III; bandas p en la palma I y II; bandas aa y dd en las palmas II y III) se encontraron distribuidas entre las tres palmeras.



**Fig. 6.** Perfiles DGGE de las levaduras presentes en las muestras de Taberna de tres palmeras de coyol. Líneas 1 a 14 representan a las muestras colectadas diariamente de cada lote de producción. Línea SF, representa a la savia fresca (savia colectada después de que el productor realizará las cavidades en los tallos). Banda a: *P. kudriavzevii*; banda b: *C. akabanensis*, *M. guilliermondii* y *S. cerevisiae*; banda c: *K. exigua*; banda d: *S. cerevisiae*; banda e: *S. cerevisiae*; banda f: *K. exigua* y *P. kluyveri*; banda g: *C. tropicalis*; banda h: *H. guilliermondii*; banda i: *M. guilliermondii*; banda j: *C. akabanensis*; banda k: *S. cerevisiae*; banda l: *S. cerevisiae*; banda n: *S. cerevisiae*; banda o: *H. guilliermondii*; banda p: *H. guilliermondii*; banda q: *S. cerevisiae*; banda r: *M. guilliermondii*; banda t: *K. exigua* y *C. tropicalis*; banda u: *H. guilliermondii*; banda v: *H. guilliermondii*; banda w: *H. guilliermondii*; banda x: *C. akabanensis*, *H. guilliermondii* y *C. blattae*; banda z: *H. guilliermondii*; banda aa: *T. moniliiforme*, *M. guilliermondii* y *H. guilliermondii*; banda bb: *K. exigua*; banda cc: *H. guilliermondii* y *S. cerevisiae*; banda dd: *S. cerevisiae*; banda nn: *H. guilliermondii*; banda oo: *H. guilliermondii*, *C. blattae* y *C. intermedia*. Las letras encerradas en un círculo, señalan a las bandas evaluadas por un nuevo DGGE (ver Fig. 8).

En la Fig. 7 se presenta un dendograma que muestra la similitud entre las diferentes muestras de Taberna en base a su patrón de bandeo, sin considerar la intensidad de las bandas. Los perfiles de bandeo de las muestras correspondientes a los lotes 5, 6, 7 y 8 (PIIM5, PIIM6, PIIM7 y PIIM8) de la palmera II se agrupan con un coeficiente de similitud de 80%, al igual que las muestras de los lotes 4, 5, 6, 7 y 8 (PIIIM4, PIIIM5, PIIIM6, PIIIM7 y PIIIM8) de la

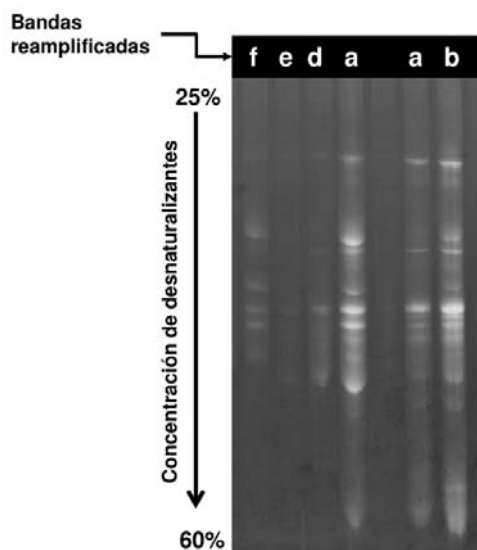
palmera III (Fig. 7). Las muestras 10, 11, 12, 13 y 14 de la palmera I forman un clúster con 100% de similitud, mientras que las muestras 9, 10, 11, 12 y 13 de la palmera II se agruparon con un coeficiente de similitud del 80%. En general, las muestras de los lotes de cada palmera fueron agrupadas en intermedias y finales en base al monitoreo.



**Fig. 7.** Análisis de clúster de los patrones DGGE del ADNr 26S de las levaduras presentes en la fermentación de la Taberna. La letra P seguida de un número romano (I, II y III) representa la palmera, la letra M acompañada de los números arábigos representa la muestra colectada de cada lote.



Para identificar las especies de levaduras presentes en cada una de las bandas de los perfiles DGGE, el ADN fue eluido, reamplificado y secuenciado. Antes de la secuenciación, los productos de PCR obtenidos se evaluaron mediante DGGE con la finalidad de confirmar la presencia de una sola banda en el gel. Los perfiles DGGE mostraron bandas adicionales, aparte de la banda esperada (Fig. 8). Por ello los nuevos patrones de bandeo fueron similares a los originales (Fig. 6). Con el objetivo de eliminar la presencia de estas bandas adicionales en los perfiles DGGE, se realizaron una serie de modificaciones a las condiciones originales de PCR. Los experimentos se basaron en las recomendaciones para disminuir las bandas artefactos, sugeridas por Janse *et al.* (2004) y Syvyk *et al.* (2008). Primero, el paso de elongación final de 72°C se extendió a 30 min, y no se observó reducción en el número de bandas. Los mismos resultados se obtuvieron cuando las muestras se amplificaron con 18 ciclos de reacción. De igual manera se observó la formación de bandas artefactos cuando el paso de elongación final a 72°C se extendió a 30 min y 20 ciclos de reacción. Finalmente, con el objetivo de incrementar la especificidad y sensibilidad en la reacción de PCR, se realizó una PCR touchdown. Sin embargo, también se observó un perfil multibanda.



**Fig. 8.** Patrones DGGE de los productos de PCR reamplificados de las bandas aisladas de los gels señalados en un círculo en la Fig. 6. Las letras a, b, d, e y f representan los perfiles DGGE del ADN en las bandas indicadas por un círculo en los gels (Fig. 6).

### 5.5.3. Secuenciación e identificación de las bandas

A partir de las bandas escindidas de los geles, fue posible identificar 19 secuencias de un total de 29. Las especies identificadas se presentan en la Tabla 9. Las bandas d, e, k, l, n, q y dd se relacionaron con *S. cerevisiae*, mientras que las h, o, p, u, w, z y nn se identificaron como *H. guilliermondii*, las bandas i y r pertenecen a la especie *M. guilliermondii* y la banda bb corresponde a *K. exigua*. Los resultados mostraron un perfil multibanda asociado con una sola especie; las secuencias de ADN tuvieron la misma asignación filogenética, aunque su patrón de migración en los geles fue diferente.

**Tabla 9.** Identidad de las bandas obtenidas de la población de levaduras en las muestras de Taberna

Banda <sup>a</sup>	Especie identificada	% de identidad <sup>b</sup>	Fuente <sup>c</sup>
C	<i>Kazachstania exigua</i>	100	HM106427.1
D	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	KM609510.1
E	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	KJ530642.1
H	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	86	KM210521.1
I	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	92	KM609507.1
J	<i>Candida akabanensis</i>	98	AB499000.1
K	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	98	KM655850.1
L	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	94	KJ530642.1
N	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	KJ530642.1
O	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	100	KM210521.1
P	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	96	GQ249098.1
Q	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	JX068683.1
R	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	100	HM771258.1
U	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	99	KM210521.1
W	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	90	KM210521.1
Z	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	94	KM210521.1
Bb	<i>Kazachstania exigua</i>	99	FJ527857.1
Dd	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	KJ530642.1
Nn	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	94	KM210521.1

<sup>a</sup>Las letras corresponden a la letra indicada en las bandas de la Fig. 6.

<sup>b</sup>Porcentaje de nucleótidos idénticos en la secuencia obtenida de las bandas DGGE y las secuencias del dominio D1 del gen ribosomal 26S encontradas en la base de datos del GenBank.

<sup>c</sup>Número de acceso de las secuencias del dominio D1 del gen ribosomal 26S del pariente más cercano encontrado mediante Blast.

Por otra parte, las secuencias de las bandas a, b, f, g, t, v, x, aa, cc y oo presentaron muchos picos ambiguos, por lo que para determinar su identidad se llevó a cabo la clonación de las bandas, y se seleccionaron cinco clonas de cada banda para su identificación. Las bandas a, b, f, g, t, v, aa y cc mostraron clonas con insertos de 350 pb e insertos con 200 pb. Este último inserto fue un fragmento no esperado (fragmento no secuenciado, que puede ser un artefacto generado durante la reacción de PCR, y su presencia podría estar asociada con las secuencias múltiples para una sola banda. Además, los resultados revelaron que una sola banda puede consistir de 2 o 3 especies, tal como se muestra en la Tabla 10. Mediante la clonación de las bandas DGGE fue posible la identificación de *P. kudriavzevii*, *P. kluyveri*, *C. tropicalis*, *C. blattae* y *T. moniliiforme*.

Las bandas a, b, h, k y r se detectaron en la primera muestra (Fig. 6, carril SF). La banda "a" corresponde a *P. kudriavzevii*, mientras que la banda "b" representó a tres especies, *M. guilliermondii*, *C. akabanensis* y *S. cerevisiae*. Estos resultados indican la comigración de diferentes fragmentos de ADN en la misma posición. La banda "h" fue identificada como *H. guilliermondii*, la banda "k" fue relacionada con *S. cerevisiae* y la banda "r" fue asociada con *M. guilliermondii*. A partir de la muestra 2, se observó un incremento en el número de bandas (Fig. 6, carril 2). Las bandas f, g, l, n, q, t y u se detectaron en las muestras de las tres palmeras. Mientras que las bandas c, i y j fueron observadas en las muestras de la palmera I, así como las bandas nn y oo en la palmera II. La banda "f" comprendió a dos especies, *K. exigua* y *P. kluyveri*, la banda "g" fue determinada como *C. tropicalis*, especie que predominó en las muestras de la palmera I y II. Las bandas n, l, k y q evidenciaron un perfil multibanda asociado con *S. cerevisiae*. Resultados similares se obtuvieron con *H. guilliermondii* (Tabla 8). *Pichia kudriavzevii* (banda a) y *S. cerevisiae* (bandas k y l) permanecieron a partir de la muestra 3 hasta la 15, de todas las palmeras.

**Tabla 10.** Identificación de las secuencias de las clonas de las bandas DGGE

Banda <sup>a</sup>	Clona <sup>b</sup>	Especie identificada	Identidad (%) <sup>c</sup>	Fuente <sup>d</sup>
a	1	<i>Pichia kudriavzevii</i> <sup>e</sup>	100	LC015645.1
b	1	<i>Candida akabanensis</i>	99	AB499000.1
	2	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	100	HM771258.1
	3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	96	AY526109.1
f	1	<i>Kazachstania exigua</i>	100	HM106427.1
	2	<i>Kazachstania exigua</i>	99	JQ585744.1
	3	<i>Pichia kluyveri</i>	99	KJ569591.1
g	1	<i>Candida tropicalis</i>	95	EF644469.1
t	1	<i>Kazachstania exigua</i>	90	JQ585744.1
	2	<i>Candida tropicalis</i>	90	KM013373.1
v	1	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	99	KF241563.1
x	1	<i>Candida akabanensis</i>	93	AB499000.1
	2	<i>Candida akabanensis</i>	90	AB499000.1
	3	<i>Candida akabanensis</i>	92	AB772160.1
	4	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	100	KM210521.1
	5	<i>Candida blattae</i>	99	DQ655694.1
aa	1	<i>Trichosporon moniliiforme</i>	99	KF826528.1
	2	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	99	KM609507.1
	3	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	99	KM210521.1
	4	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	99	KM210521.1
cc	1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100	HG425339.1
	2	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	100	KM210521.1
oo	1	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	97	KM210521.1
	2	<i>Candida blattae</i>	98	DQ655694.1
	3	<i>Candida blattae</i>	99	DQ655694.1
	4	<i>Candida blattae</i>	98	DQ655694.1
	5	<i>Candida intermedia</i>	90	KJ794663.1

<sup>a</sup>Las letras corresponden a la letra de la banda señalada en la Fig. 6.

<sup>b</sup>El número corresponde al número de clonas obtenidas con un inserto de 350 pb de cada banda.

<sup>c</sup>Porcentaje de nucleótidos idénticos en la secuencia obtenida de las bandas DGGE y las secuencias del dominio D1 del gen ribosomal 26S encontradas en la base de datos del GenBank.

<sup>d</sup>Número de acceso de las secuencias del dominio D1 del gen ribosomal 26S del pariente más cercano encontrado mediante Blast.

<sup>e</sup>*Issatchenkia orientalis* fue renombrada por *Pichia kudriavzevii* (Kurtzman *et al.*, 2008).

## 5.6. Comparación de la distribución de la población de levaduras en las muestras de Taberna a partir de los análisis PCR-RFLP y PCR-DGGE

En las Tablas 11 y 12 se muestra la distribución y la frecuencia de aislamiento de las especies de levaduras identificadas empleando los métodos dependientes (PCR-RFLP) e independientes de cultivo (PCR-DGGE). A través de la técnica PCR-DGGE, se detectó *S. cerevisiae* con una frecuencia del 100% en las muestras de las tres palmeras estudiadas. Estos resultados fueron diferentes a los encontrados con la técnica PCR-RFLP, donde *S. cerevisiae* únicamente se detectó en las muestras de las palmeras I y III con una frecuencia de 26.67 y 53.33%, respectivamente (Tabla 12). *Hanseniaspora guilliermondii* fue detectada con una frecuencia del 100% (PCR-DGGE) en las muestras de las tres palmeras, de manera similar a los resultados encontrados empleando la técnica PCR-RFLP. Mediante esta técnica se observó que *H. guilliermondii* y *C. tropicalis* resultaron ser de las especies con mayor porcentaje de aislamiento en los lotes de Taberna de la tres palmeras, similar a los resultados revelados por el análisis PCR-DGGE. El análisis independiente del cultivo mostró la presencia de *Meyerozyma guilliermondii*, *P. kudriavzevii*, *K. exigua* en las muestras de las tres palmeras, mientras que empleando el análisis dependiente del cultivo, estos microorganismos fueron identificados sólo en las muestras de una palmera (Tabla 12). Así, el análisis independiente del cultivo (PCR-DGGE) reveló una mayor diversidad de levaduras que el análisis dependiente del cultivo (PCR-RFLP). Las especies de levaduras *Candida akabanensis*, *Candida blattae* y *Trichosporon moniliforme* fueron detectados únicamente mediante la técnica PCR-DGGE. Sin embargo, esta técnica no logró la detección de *Kazachastania unispora*, especie aislada e identificada mediante PCR-RFLP.

**Tabla 11.** Número de muestras positivas y frecuencia de las especies de levaduras en las muestras de Taberna de las tres palmeras identificadas mediante PCR-DGGE

Especies	Palmera I		Palmera II		Palmera III	
	Muestras positivas	Frecuencia (%) <sup>a</sup>	Muestras positivas	Frecuencia (%) <sup>a</sup>	Muestras positivas	Frecuencia (%) <sup>a</sup>
<i>S. cerevisiae</i>	15	100	15	100	15	100
<i>H. guilliermondii</i>	15	100	15	100	15	100
<i>M. guilliermondii</i>	10	66.67	12	80	15	100
<i>C. akabanensis</i>	12	80	9	60	15	100
<i>C. tropicalis</i>	14	93.33	13	86.67	13	86.67
<i>C. blattae</i>	5	33.33	13	86.67	13	86.67
<i>C. intermedia</i>	nd	-	7	46.67	nd	-
<i>P. kudriavzevii</i>	15	100	15	100	15	100
<i>P. kluyveri</i>	8	53.33	7	46.67	3	20
<i>K. exigua</i>	14	93.33	13	86.67	13	86.67
<i>T. moniliiforme</i>	nd	-	6	40	3	20

<sup>a</sup>La frecuencia fue calculada como el número de muestras positivas para una especie dividida por el número total de muestras (15 muestras) expresada como porcentaje. nd: no detectado.

**Tabla 12.** Número de muestras positivas y frecuencia de las especies de levaduras presentes en la Taberna de tres palmeras identificadas mediante PCR-RFLP

Especies	Palmera I		Palmera II		Palmera III	
	Muestras positivas	Frecuencia (%) <sup>a</sup>	Muestras positivas	Frecuencia (%) <sup>a</sup>	Muestras positivas	Frecuencia (%) <sup>a</sup>
<i>H. guilliermondii</i>	13	86.67	15	100	11	73.33
<i>K. unispora</i>	nd	-	11	73.33	nd	-
<i>C. tropicalis</i>	14	93.33	12	80	8	53.33
<i>C. intermedia</i>	6	40	1	6.67	nd	-
<i>S. cerevisiae</i>	4	26.67	nd	-	8	53.33
<i>M. guilliermondii</i>	4	26.67	nd	-	nd	-
<i>K. exigua</i>	nd	-	1	6.67	nd	-
<i>P. kudriavzevii</i>	nd	-	nd	-	4	26.67
<i>P. kluyveri</i>	1	6.67	1	6.67	5	33.33

<sup>a</sup>La frecuencia fue calculada en base en el número total de muestras de cada palmera. nd: no detectado.

## 6. DISCUSIÓN

### 6.1. Azúcares presentes en la savia de la palma de coyol

La Taberna cosechada en los lotes 3-9 mostró una reducción significativa en la concentración de sacarosa con respecto a la concentración en la savia fresca, la cual debería reflejarse en la producción de metabolitos, principalmente etanol, pero esto no ocurrió (Tabla 4). Sin embargo, existen varios factores que justifican la disminución de este azúcar, como el crecimiento microbiano y su actividad metabólica (por ejemplo el crecimiento de BAL, producción de ácido láctico, exopolisacáridos y crecimiento de levaduras). Esta última fue indicada por la disminución del pH y el aumento en la concentración de fructosa y glucosa en los primeros lotes (Tabla 4), como consecuencia de la reacción de inversión probablemente producida por la actividad de la enzima invertasa de las levaduras (Ezeagu y Fafunso, 2003; Naknean *et al.*, 2010). Un segundo factor podría ser la formación de exopolisacáridos, sugerido por el aumento de los monosacáridos después de la hidrólisis de las muestras de Taberna (Tabla 6), lo cual justifica la disminución del disacárido. La producción de los exopolisacáridos en la Taberna probablemente se favorece por la presencia de sacarosa, azúcar que induce la síntesis de las enzimas dextran sacarasa y levansacarasa en *Leuconostoc mesenteroides* y *Z. mobilis* (Silbir *et al.*, 2014; Santos *et al.*, 2000), respectivamente, bacterias reportadas en este vino de palma (Alcántara-Hernández *et al.*, 2010; Valdés-Flores, 2014). Al inicio de la producción de Taberna (lote 4) el polisacárido formado consistió de monómeros de glucosa, probablemente debido a la presencia de *L. mesenteroides* y *L. citreum* (ambas especies de BAL se aislaron e identificaron por Valdés-Flores, 2014, quien empleo las mismas muestras que se describen en el presente trabajo). En las muestras intermedias (lotes 5 y 6) el polisacárido más abundante estuvo formado por fructosa, compuesto relacionado probablemente con la presencia de BAL y *Z. mobilis* (Alcántara-Hernández *et al.*, 2010; Valdés-Flores, 2014). Mientras que en las muestras finales (13 y 14) se evidenció la disminución de la formación del polímero por la reducción de la concentración de glucosa y fructosa, después de la



hidrólisis de las muestras (Tabla 6). Lo anterior podría explicarse por el efecto del etanol (~4.5% p/v) observado sobre el crecimiento de las BAL, tal como lo indica la reducción de su población en la Tabla 7. Por otro lado, el reactor de fermentación, es decir la canoa, es alimentada continuamente por el flujo de savia fresca de la palmera, y es probable que exista un agotamiento de los azúcares de reserva; como consecuencia de haber talado el árbol y eliminado sus hojas (el aprovechamiento de la savia de cada palmera puede durar hasta 3 meses, dependiendo del tamaño del tallo (Comunicación personal)), por lo que este no puede realizar fotosíntesis ni producir azúcares. Resultados similares fueron reportados en la producción de vino de palma de *Raphia* (Faparusi, 1981), donde la concentración inicial de azúcar disminuyó más del 50% de la concentración inicial durante los primeros 7 días del proceso de producción. En contraste, Amoah *et al.* (2007) hallaron que el contenido de azúcares en el vino de palma de Ghana permanece constante a lo largo del proceso de fermentación. Esta diferencia podría explicarse por el hecho que nuestra información corresponde a los productos finales de una fermentación por lote alimentado de 12 h, es decir a los azúcares residuales.

## **6.2. pH y producción de metabolitos en las muestras de Taberna**

El pH en las muestras de Taberna fue modificado por la producción de ácidos orgánicos, especialmente los ácidos láctico y acético determinados en este estudio (Tabla 4). Sin embargo, también podrían estar contribuyendo el ácido cítrico, málico, oxálico, tartárico, ascórbico y fumárico tal como se ha reportado en el vino de palma de Ghana (Karamoko *et al.*, 2012). Además, el CO<sub>2</sub> producido durante la fermentación también contribuye con la disminución del pH (Soto-García *et al.*, 2009), resultado del ácido carbónico que puede llegar a producir.

El pH en un ambiente determinado tiene un efecto profundo sobre el crecimiento y sobrevivencia de todos los microorganismos, de tal manera que en los alimentos, este afecta directamente a la conservación y seguridad del producto (Coton y Leguerinel, 2014), debido a que algunos microorganismos patógenos no toleran

las condiciones ácidas (Blandino *et al.*, 2003). El ácido acético forma parte de las características sensoriales de la Taberna. Sin embargo, cuando éste excede el valor de 0.6% p/v (Faparusi, 1973), el vino de palma no es aceptado por los consumidores. La concentración de este metabolito en las muestras utilizadas no superó este valor. Por otro lado, el etanol no se detectó en las primeras lotes, una posible explicación podría ser la formación de éster de acetato a partir de este alcohol, tal como sucede en el vino (Bisson y Karpel, 2010), otra justificación a estos resultados es la utilización de la sacarosa para la producción de polisacáridos de glucosa o fructosa (Tabla 6) y no para el etanol. Además, de que la población microbiana responsable de la producción de este alcohol en los primeros lotes podría ser baja, esta información es discutida posteriormente.

### **6. 3. Población microbiana en las muestras de Taberna**

La población de BAL, BAA y levaduras presentes en las muestras de Taberna, fue similar a las reportadas en el vino de palma obtenido de *Elaeis guineensis* (Karamoko *et al.*, 2012). La reducción de la población de levaduras, BAL, BAA y coliformes totales en las últimas muestras estudiadas, puede atribuirse a las condiciones selectivas en la savia fermentada; es decir, el incremento en la concentración de etanol (>4% p/v) y disminución del pH (~4) pueden afectar el crecimiento de la población no-*Saccharomyces* (Wang y Liu, 2013). Nuestros resultados contrastan con la información reportada en el vino de palma de Ghana (Amoa-Awua *et al.*, 2007), donde la población de los diferentes grupos microbianos permanece constante durante el proceso de producción. Esta discrepancia en los resultados puede deberse al hecho que durante el raspado de la canoa, la microbiota adherida a las paredes del receptáculo también se remueve, lo que influye en la cantidad de células que inicia y termina un lote de fermentación.

#### 6.4. Análisis de la población de levaduras mediante métodos dependientes e independientes de cultivo

La diversidad de levaduras y los cambios de la población involucrados en el proceso de producción de Taberna, se estudiaron mediante un enfoque múltiple, usando métodos dependientes e independientes de cultivo. Además, se determinaron varios metabolitos con la finalidad de tener una mejor descripción del proceso, y su relación con los microorganismos identificados.

El análisis PCR-DGGE permitió la identificación de las especies de levaduras, *C. blattae*, *C. akabanensis* y *T. moniliiforme* no reveladas con el método dependiente del cultivo (PCR-RFLP). La población de levaduras en la Taberna fue diferente de la población encontrada en los vinos de palma producidos de la savia de *Elaeis guineensis* en Ghana y Camerún (Amoa-Awua *et al.*, 2007; Stringini *et al.*, 2009).

La diferencia en la diversidad de especies de levaduras presentes en los diversos vinos de palma es posiblemente resultado de las condiciones ambientales diferentes, de las especies de palmeras y de las diferencias en el proceso de producción. *S. cerevisiae* y *C. tropicalis* son especies de levaduras reportadas previamente en Bandji producido en Burkina Faso, y en el vino de palma de Nigeria y Sri Lanka (Atputharajah *et al.*, 1986; Ezeronye y Okerentugba, 2000; Ouoba *et al.*, 2012). *Saccharomyces cerevisiae* se ha reportado como la especie de levadura responsable de la fermentación alcohólica y aroma de los vinos de palma (Amoa-Awua *et al.*, 2007; Stringini *et al.*, 2009).

La distribución de las levaduras entre los 14 lotes de Taberna de cada una de las palmeras fue similar pero no idéntica; es decir, de una a tres especies de levaduras fueron diferentes entre muestras. Por otra parte, la distribución de las levaduras entre palmeras fue diferente por una o cuatro especies, pero en algunos casos la población fue idéntica. El crecimiento y distribución de las especies de levaduras en la fermentación de Taberna es un proceso que depende del tipo de vectores como la fuente de inóculo, y de las condiciones en el medio de fermentación; es decir, de la savia en la canoa. La temperatura ambiental y las diferentes especies de insectos (moscas, hormigas, avispas, abejas, mosquitos, escarabajos, libélulas, entre otros) observadas en el ambiente durante la colección

de las muestras, bien podrían ser factores importantes para el crecimiento y distribución de las especies de levaduras. Nguyen *et al.* (2007) sugieren que *Drosophila* y los escarabajos pequeños son los primeros en inocular a los sustratos frescos. Además, el material empleado en el raspado de la canoa y colección de la savia también pueden contribuir a la dispersión de las levaduras entre palmeras. Asimismo, las levaduras pueden ser distribuidas a través del aire, el cual actúa como un medio de soporte o acarreador de microorganismos que pueden caer en el sustrato (Garijo *et al.*, 2008). De este modo, la baja diversidad de especies en la savia fresca puede ser atribuida a la corta exposición ambiental, considerando que esta muestra fue obtenida inmediatamente después de que la cavidad se realizó. *Saccharomyces cerevisiae*, *P. kudriavzevii* y *H. guilliermondii* fueron las especies que predominaron en la Taberna colectada de las tres palmeras (Tabla 11). Adicionalmente, otras especies de levaduras se encontraron con menos frecuencia a través de las muestras. Estos resultados revelan que la fermentación de la savia es realizada por un inóculo heterogéneo, el cual puede ser explicado por diferentes factores. Primero, durante el proceso de colección de la savia y raspado de la canoa, la microbiota adherida a las paredes es perturbada. Así la microbiota en el siguiente lote puede ser diferente a su precedente. Segundo, la población de levaduras presente en la savia y su crecimiento pueden estar relacionados con la tolerancia a las condiciones selectivas de la savia en la canoa, tal como acidez, pH, contenido de etanol, y disponibilidad de oxígeno (Stringini *et al.*, 2009), así como de nutrientes. La disponibilidad de oxígeno en la savia varía de acuerdo a la etapa de la fermentación. Las canoas se tapan con tablas de madera, pero los bordes irregulares del tallo dejan orificios que permiten el paso del aire. Por lo que se considera una fermentación abierta. La solubilidad del oxígeno en este ambiente podría ser afectado por las características reológicas de la savia y su altura en la canoa. De esta manera, se crean gradientes o nichos con concentraciones de oxígeno variables durante las 12 h de fermentación. La cantidad de oxígeno será mayor en las partes altas (superficie) de la savia que en las partes bajas (fondo). Además, conforme avanza la fermentación en un lote, la viscosidad aumenta

debido a la formación de polímeros de glucosa o fructosa, dificultando la transferencia de oxígeno.

La presencia de las especies no-*Saccharomyces* pueden contribuir a las características organolépticas de la Taberna. Por ejemplo, en la producción de vino de uvas, *H. guilliermondii* ha sido reportada como productora de alcoholes superiores, ésteres, ácidos grasos y compuestos azufrados (Moreira *et al.*, 2011). *Pichia kudriavzevii* y *C. tropicalis*, han sido reportadas como levaduras productoras de etanol a altas temperaturas (Jamai *et al.*, 2001 y Yuangsaard *et al.*, 2013). Por consiguiente, estas especies podrían estar contribuyendo a la producción de etanol en la Taberna, tomando en cuenta que la temperatura ambiental del lugar donde las muestras fueron colectadas, estuvo alrededor de 30 a 38°C.

Mediante el estudio dependiente del cultivo se encontró que la población de levaduras no-*Saccharomyces* predomina durante los primeros días del proceso de producción de Taberna, seguida por *S. cerevisiae*. En contraste con los resultados mediante el análisis PCR-DGGE, en el que *S. cerevisiae* es detectada desde el inicio de la fermentación. Sin embargo, a pesar de su presencia, la concentración de etanol en estas muestras no fue detectada, lo que sugiere que probablemente la población de esta especie fue baja en estas primeras muestras, lo que no permitió su aislamiento. El papel de *S. cerevisiae* en el proceso de fermentación alcohólica fue indicado por el contenido de etanol relativamente alto (4.25-4.78%) en las últimas muestras (10-14) comparado con el contenido de etanol (0.58-1.21%) en las primeras lotes (4-9). El método dependiente del cultivo muestra que el incremento significativo en la producción de etanol está relacionado con la aparición de *S. cerevisiae*, lo que indica que en este paso de la producción de Taberna su población es alta. Esta observación se confirmó con el aumento en el número de bandas DGGE (perfil multibanda) pertenecientes a esta levadura (Fig. 6). De esta manera, los resultados muestran que la presencia de *S. cerevisiae* está muy relacionada con la producción de etanol en la fermentación de la Taberna, y que podría ser el microorganismo que tiene mayor contribución en la síntesis de este metabolito.

Los resultados encontrados en este estudio confirman la importancia de usar un enfoque múltiple cuando se estudian comunidades microbianas, de esta manera se obtiene un panorama general más amplio y claro de la estructura de la población del grupo microbiano de interés.

En este estudio se observó un perfil multibanda asociado con una sola especie. *Hanseniaspora guilliermondii* y *S. cerevisiae* fueron las especies que presentaron mayor número de bandas a través de los geles DGGE. Por lo tanto, estas especies pueden ser las dominantes en la fermentación de Taberna. Se ha reportado que los amplicones dominantes suelen estar dispersos en los geles (Nikolausz *et al.*, 2005). Por otra parte, se ha reportado la formación de moléculas heteroduplex durante la desnaturalización y realineamiento de las secuencias en la reacción de PCR (Satokari *et al.*, 2001). Estos artefactos resultan del realineamiento de productos de cadena sencilla similares y tienen una movilidad reducida en los geles DGGE (Hong *et al.*, 2007). Nuestros resultados muestran que cuando la diversidad de levaduras aumenta a través de las muestras, el número de bandas en los geles fue más grande que el número de especies encontradas. Estos resultados pueden explicarse porque un incremento en la diversidad de ADN como templado de diversas levaduras en las muestras, incrementa la formación de moléculas heteroduplex (Thompson *et al.*, 2002). Los artefactos multibanda también han sido sugeridos por Neilson *et al.* (2003) como bandas con diferente conformación estructural estable, generados durante la reacción de PCR y estas conformaciones tienen diferente dinámica de desnaturalización en los geles DGGE. Los resultados obtenidos en el presente estudio coinciden con la información publicada por Arana-Sánchez *et al.* (2015), quienes presentan perfiles DGGE de muestras de fermentaciones de cacao, donde *Hanseniaspora* sp., *P. kluyveri* y *P. kudriavzevii* exhibieron un perfil multibanda conteniendo 6, 3 y 4 bandas, respectivamente. A pesar de estos resultados, los autores no ofrecen explicaciones sobre dichos artefactos. Aunque el polimorfismo en el número de copias del ADN ribosomal en levaduras es muy bajo, podría ayudar a explicar el perfil multibanda que presenta una especie en el

análisis DGGE, por ejemplo, *S. cerevisiae* contiene 150 copias en los cuales existe 7 polimorfismos (Ganley y Kobayashi *et al.*, 2007). Si las mutaciones ocurren en la región amplificada (dominio D1 del gen ribosomal 26S), es de esperar un perfil multibanda.

Por otro lado, en algunos casos una sola banda representó a más de una especie, lo cual indica la comigración de diferentes fragmentos de ADN en la misma posición del gel DGGE; por lo tanto hubo muchas secuencias ilegibles. Este artefacto DGGE se demostró por medio de la clonación de bandas, el cual mostró la presencia de fragmentos de ADN de 200 pb que migraron junto con las bandas (350 pb) de algunas especies de levaduras; estos fragmentos pequeños contribuyeron a obtener secuencias con picos ambiguos. De esta manera, se evidenció la posible formación de artefactos durante la reacción de PCR. Así, la presencia de varios fragmentos de ADN en la misma banda, produce un perfil multibanda cuando el ADN eluido de las bandas fue reamplificado y analizado por DGGE (Fig. 8). Aunque se realizaron una serie de modificaciones en las condiciones de PCR, no se redujo el perfil multibanda.

Los resultados sugieren que PCR-DGGE es una buena técnica para el estudio de la estructura de la comunidad, pero los diferentes artefactos tal como los perfiles multibanda y comigración de bandas encontrados en esta investigación indican que esta herramienta molecular necesita ser cuidadosamente analizada para un estudio cuantitativo, o simplemente no emplearse para la cuantificación de la diversidad como es sugerida por Neilson *et al.* (2013), debido a la posible sobre o subestimación de la diversidad microbiana. Nuestros resultados mostraron que la clonación de las bandas DGGE es una buena herramienta para el aislamiento de fragmentos de ADN, los cuales migraron a la misma posición en los geles, y su subsecuente identificación.

Un total de 7 géneros (*Saccharomyces*, *Hanseniaspora*, *Candida*, *Meyerozima*, *Kazachstania*, *Pichia* y *Trichosporon*) se identificaron en los diferentes lotes de Taberna, este número es mayor a la cantidad de géneros detectados en el vino de palma de Ghana (4 géneros detectados: *Candida*, *Pichia*, *Saccharomyces* y *Zygosaccharomyces*) y menor al número de generos presentes en la fermentación

de Bandji (vino de palma de Burkina Faso), donde se reportó *Saccharomyces*, *Arthroascus*, *Issatchenkia*, *Candida*, *Trichosporon*, *Hanseniaspora*, *Kodamaea*, *Schizosaccharomyces*, *Trigonopsis* y *Galactomyces* (Ouoba *et al.*, 2012). El número de géneros de levaduras detectados en la Taberna es similar a los reportados en la fermentación del mezcal (*Saccharomyces*, *Candida*, *Pichia*, *Zygozaccharomyces*, *Torulospora*, *Rhodotorula* y *Kluyveromyces*) (Verdugo-Valdez *et al.*, 2011). Los resultados del presente trabajo mostraron que la diversidad de levaduras en la fermentación de Taberna es similar a la diversidad presente en otros vinos de palma producidos en países diferentes, y también a otras bebidas como el mezcal producido en México. A pesar de los diversos géneros encontrados en estas bebidas, sólo predominan en la fermentación de 1 a 3 de ellos. Por ejemplo en el vino de palma de Ghana y Burkina Faso, predomina *S. cerevisiae*, mientras que en la fermentación del mezcal *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii* y *K. marxianus* son las predominantes. En el caso de la Taberna, las especies predominantes fueron *S. cerevisiae*, *P. kudriavzevii* y *H. guilliermondii*, probablemente por ser microorganismos mejor adaptados a las condiciones de estrés en la savia fermentada, como se discutió anteriormente.



## 7. CONCLUSIONES

La savia de la palmera *Acrocomia aculeata* está compuesta principalmente de sacarosa a una concentración de 11.36% (p/v), y este sustrato permite el crecimiento de bacterias y levaduras.

La concentración de los metabolitos etanol, ácido láctico, ácido acético y de los azúcares en la Taberna, depende del lote de producción y de la etapa de fermentación. En los primeros lotes de fermentación no se detectó etanol, pero sí se encontraron ácidos orgánicos, lo que origina una bebida ácida no alcohólica.

La determinación de los cambios en la composición química y los metabolitos producidos durante la fermentación de la Taberna ayudaron a entender el comportamiento de la población microbiana. El pH cercano a 4 y el contenido de etanol de 4.78% (p/v), mostraron una reducción significativa de las poblaciones de coliformes totales, BAL, BAA y levaduras.

El estudio microbiológico de las levaduras de la Taberna analizada reveló la presencia de las especies *S. cerevisiae*, *H. guilliermondii*, *P. kudriavzevii*, *C. tropicalis*, *K. exigua*, *C. akabanensis*, *C. blattae*, *C. intermedia*, *M. guilliermondii*, *P. kluyveri*, *K. unispora* y *T. moniliiforme*, siendo las tres primeras especies los microorganismos predominantes en la bebida. La distribución de las levaduras entre la Taberna de cada palmera fue heterogénea.

La combinación de los métodos dependientes del cultivo tal como el análisis RFLP de las levaduras aisladas y los métodos independientes del cultivo proporcionaron mayor información de la estructura de la población de levaduras en las muestras de Taberna.

La técnica PCR-DGGE complementada con la clonación y secuenciación de bandas determinaron la estructura y los cambios a través del tiempo de la población de levaduras. Los patrones DGGE mostraron perfiles multibanda de

algunas especies, así como comigración de bandas de ADN de especies diferentes, indicando que esta herramienta molecular fue útil para el análisis comparativo de la estructura de la comunidad entre las muestras evaluadas.

Mediante el presente estudio se determinó la población de levaduras asociadas a la fermentación de la Taberna, además se definieron las especies predominantes, así como la obtención de una colección de levaduras, lo cual abrirá las puertas a futuras investigaciones para determinar su potencial biotecnológico.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

Alcántara-Hernández, R.J., Rodríguez-Álvarez, J.A., Valenzuela-Encinas, F.A., Gutiérrez-Miceli, F.A., Castañón-González, H., Marsch, R., Ayora-Talavera, T., Dendooven, L., 2010. The bacterial community in “taberna” a traditional beverage of Southern Mexico. *Lett. Appl. Microbiol.* 51, 558-563.

Altschul, S.F., Madden, T.L., Shaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped Blastand PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402.

Amaya-Delgado, L., Herrera-Lopez, E. J., Arrizon, J., Arellano-Plaza, M., Gschaedler, A., (2013). Performance evaluation of *Pichia kluyveri*, *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* in industrial tequila fermentation. *World J. Microbiol. Biotechn.* 29, 875-881.

Amoa-Awua, W.K., 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. *J. Appl. Microbiol.* 102, 599-606.

Arana-Sánchez, A., Segura-García, L. E., Kirchmayr, M., Orozco-Ávila, I., Lugo-Cervantes, E., Gschaedler-Mathis, A., 2015. Identification of predominant yeasts associated with artisan Mexican cocoa fermentations using culture-dependent and culture-independent approaches. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 31, 359-369.

Atputharajah, J.D., Widanapathirana, S., Samarajeewa, U., 1986. Microbiology and biochemistry of natural fermentation of coconut palm sap. *Food Microbiol.* 3, 273-280.

Balick, M.J., 1990. Production of coyol wine from *Acrocomia mexicana* (Arecaceae) in Honduras. *Econ. Bot.* 44, 84-93.

Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V., 2012. The microbial ecology of grape berries. *Int. J. Food Microbiol.* 153, 243-259.

Bisson, L. F., Karpel, J. E., 2010. Genetics of yeast impacting wine quality. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 1, 139-162.

Blandino, A., Al-aseeri, M. E., Pandiella, S. S., Cantero, D., Webb, C. 2003. Cerealbased fermented foods and beverages. *Food Res. Int.* 36, 527-543.

Byun, S.O., Fang, Q., Zhou, H., Hickford, J.G.H., 2009. An effective method for silver-staining DNA in large numbers of polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 385, 174-175.

Clavijo, A., Calderón, I., Paneque, P., 2010. Diversity of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts in three red grape varieties cultured in the Serranía de Ronda (Spain) vine growing region. *Int. J. Food Microbiol.* 143, 241-245

Clemente-Jimenez, J. M., Mingorance-Cazorla, S., Martínez-Rodríguez, S., As Heras-Vazquez, F. J., Rodríguez-Vico, F., (2005). Influence of sequential yeast mixtures on wine fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 98, 301-308.

Cocolin, L., Alessandria, V., Dolci, P., Gorra, R., Rantsiou, K., 2013. Culture independent methods to assess the diversity and dynamics of microbiota during food fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 167, 29-43.

Cocolin, L., Ercolini, D., 2008. *Molecular techniques in the microbial ecology of fermented foods.* Springer, New York.

Cocolin, L., Bisson, L.F., Mills, D.A., 2000. Direct profiling of the yeasts dynamics in wine fermentations. *Fems Microbiol. Lett.* 189, 81-87.

Coton, E., Leguerinel, I., 2014. Effects of pH. Encyclopedia of Food Microbiology. 1, 577-586.

de Llanos, R., Fernández-Espinar, M.T., Querol, A., 2004. Identification of species of the genus *Candida* by analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. Antonie van Leeuwenhoek 85, 175-185.

Dhaliwal, S. S., Oberoi, H. S., Sandhu, S. k., Nanda, D. Kumar, D., Uppal, S. K., 2011. Enhanced ethanol production from sugarcane juice by galactose adaptation of a newly isolated thermotolerant strain of *Pichia kudriavzevii*. Bioresource Technol. 102, 5968-5975.

Domizio, P., Lencioni, L., Ciani, M., Di Blasi, S., Pontremolesi, C.D., Sabatelli, M., 2007. Spontaneous and inoculated yeast populations dynamics and their effect on organoleptic characters of Vinsanto wine under different process conditions. Int. J. Food Microbiol. 115:281-89.

Escalante, A., Giles-Gómez, M., Hernández, G., Córdova-Aguilar, M.S., 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. Int. J. Food Microbiol. 124, 126-134.

Ercolini, D., 2004. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. J. Microbiol. Meth. 56, 297–314.

Ercolini, D., 2014. Identification methods. Enc. Food Microbiol. 241-247.

Ercolini, D., Cocolin., 2014. Culture-independent techniques, Enc. Food Microbiol. 259-266.

Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., Querol, A., 1999. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49, 329-337.

Ezeagu, I.E., Fafunso, M.A., Ejezie, F.E., 2003. Biochemical constituents of palmwine. *Ecol. Food Nutr.* 42, 213-222.

Ezeronye, O.U., Okerentugba, P.O., 2001. Genetic and physiological variants of yeast selected from palm wine. *Mycopathologia* 152, 85-89.

Faparusi, S. I., 1981. Sugar identified in *Raphia* palm wine. *Food Chem.* 7, 81-86.  
Faparusi, S.I. (1973) Origin of initial microflora of palm wine from oil palm trees. (*Elaeis guineensis*). *J. Appl. Bacteriol.* 36, 559-565.

Fernández-Espinar, M., Esteve-Zarzoso, B., Querol, A., Barrio, E., 2000. RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacers and the 5.8S rRNA gene region of the genus *Saccharomyces*: a fast method for species identification and the differentiation of flour yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek* 78, 87–97.

Fernández-Espinar, M.T., Martorell, P., De Llanos R., Querol A., 2006. Molecular Methods to identify and characterize yeasts in foods and beverages. In A. Querol and G.H. Fleet (Eds.), *Yeast in foods and beverages* (chapter 3) Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.

Ferreira-Duarte, W., Cunha-Amorim, J., Freitas-Schwan, R., 2013. The effects of co-culturing non-*Saccharomyces* yeasts with *S. cerevisiae* on the sugar cane spirit (cachaça) fermentation process. *Antonie Van Leewenhoek.* 103, 175-194.

Fortin, N., Beaumier, D., Lee, K., Greer, C.W., 2004. Soil washing improves the recovery of total community DNA from polluted and high organic content sediments. *J. Microbiol. Meth.* 56, 181-191.

Ganley, A. R. D., Kobayashi, T., 2007. Highly efficient concerted evolution in the ribosomal DNA repeats: total rDNA repeat variation revealed by whole-genome shotgun sequence data. *Genome Res.* 17, 184-197.

Garijo, P., Santamaria, P., López, R., Sanz, S., Olarte, C., Gutiérrez, A.R., 2008. The occurrence of fungi, yeasts and bacteria in the air of a Spanish winery during vintage. *Int. J. Food Microbiol.* 125, 141-145.

Garofalo, C., Osimani, A., Milanovic, V., Aquilanti, L., De Filippis, F., Stellato, G., Di Mauro, S., Turchetti, B., Buzzini, P., Ercolini, D., Clementini, F., 2015. Bacteria and yeast microbiota in milk kefir grains from different Italian regions. *Food Microbiol.* 49, 123-133.

Giraffa, G., y Carminati, D., (2008) Molecular techniques in food fermentation: principles and applications. In L. Cocolin, y D. Ercolini (Eds.), *Molecular techniques in the microbial ecology of fermented foods* (pp. 1-30). Springer.

González-Robles, I.W., Estarrón-Espinosa, M., Díaz-Montaño, D.M., 2015. Fermentative capabilities and volatile compounds produced by *Kloeckera/Hanseniaspora* and *Saccharomyces* yeast strains in pure and mixed cultures durin *Agave tequilana* juice fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek.* 108, 525-536.

Granchi, L., Bosco, M., Messini, A., Vincenzini, M., 1999. Rapid detection and quantification of yeasts species during spontaneous wine fermentation by PCR RFLP analysis of the rDNA ITS region. *J. Appl. Microbiol.* 87, 949–956.

Greppi, A., Rantsiou, K., Padonou, W., Hounhouigan, J., Jespersen, L., Jakobsen, M., Cocolin, L., 2013. Determination of yeast diversity in ogi, mawè, gowé and tchoukoutou by using culture-dependent and –independent methods. *Int. J. Food Microbiol.* 165, 84-88.

Haque, M.A., Seo, W.T., Hwang, C.E., Lee, H. Y., Ahn, M. J., Cho, K.M., 2015. Culture-independent analysis of yeast diversity in Korean traditional fermented soybean foods (doenjang and kanjang) based on 26S rRNA sequence. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 58, 377, 385.

Head, I.M., Saunders, J.R., Pickup, R.W., 1998. Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. Microb. Ecol. 35, 1-21.

Hong, H., Pruden, A., Reardon, K.F., 2007. Comparison of CE-SSCP and DGGE for monitoring a complex microbial community remediating mine drainage. J. Microbiol. Meth. 69, 52-64.

Jamai, L., Sendide, K., Ettayebi, K., Errachidi, F., Hamdouni-Alami, O., TahriJouti, M.A., McDermott, T., Ettayebi, M., 2001. Physiological difference during ethanol fermentation between calcium alginate-immobilized *Candida tropicalis* and *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiol. Lett. 204, 375-379.

Janse, I., Bok, J., Zwart, G., 2004. A simple remedy against artifactual double bands in denaturing gradient gel electrophoresis. J. Microbiol. Meth. 57, 279-281.

James, S.A., Collins, M. D., Roberts, I. N., 1996. Use of an rRNA internal transcribed spacer region to distinguish phylogenetically closely related species of the genera *Zygosaccharomyces* and *Torulasporea*. Int. J. Syst. Bacteriol. 46,189-194.

Jany, J.L., Barbier, G., Culture-independent methods for identifying microbial communities in cheese. Food Microbiol. 25, 839-848.



Jepersen, L., 2003. Occurrence and taxonomic characteristic of strains of *Saccharomyces cerevisiae* predominant in African indigenous fermented foods and beverages. *FEMS Yeast Res.* 3, 191-200.

Jeyaram, K., Mohendro, W., Capece, A., Romano, P., 2008. Molecular identification of yeast species associated with 'Hamei' a traditional starter used for rice wine production in Manipur, India. *Int. J. Food Microbiol.* 124, 115-125.

Kadere, T., Miyamoto, T., Oniang'o, R.K., Kutina, P.M., Njoroge, S.M., 2008. Isolation and identification of the genera *Acetobacter* and *Gluconobacter* in coconut toddy (mnazi). *Afr. J. Biotechnol.* 7, 2963-2971.

Karamoko, D., Djeni, N. T., N'guessan, K. F., Bouatenin, K. M. J., & Dje, K. M., 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.

Kodama, S., Nakanishi, H., Thalagala, T. A. T. P., Isono, N., Hisamatsu, M., 2013. A wild and tolerant yeast suitable for ethanol fermentation from lignocellulose. *J. Biosci. Bioeng.* 5, 557-561.

Kurtzman, C.P., Robnett, C.J., Basehoar-Powers, E., 2008. Phylogenetic relationships among species of *Pichia*, *Issatchenkia* and *Williopsis* determined from multigene sequence analysis, and the proposal of *Barnettozyma* gen. nov., *Lindnera* gen. nov. and *Wickerhamomyces* gen. nov. *FEMS Yeast Res.* 8, 939-954.

Kurtzman, C.P., Robnett, C.J., 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 73, 331-371.

Lambrechts, M.G., Pretorius, I.S., 2000. Yeast and its importance to wine aroma. A review. S. Afr. J. Enol. Vitic. 21, 97-129.

Las Heras-Vazquez, F.J., Mingorance-Cazorla, L., Clemente-Jimenez, J.M., Rodriguez-Vico, F., 2003. Identification of Yeasts species from orange fruit and juice by RFLP and sequence analysis of the 5.8S rRNA gene and the two internal transcribed spacers. FEMS Yeast Res. 3, 3-9.

Lv, x., Huang, X., zhang, W., Rao, P. F., Ni, L., 2013. Yeast diversity of traditional alcohol fermentation starters for Hong Qu glutinous rice wine brewing, revealed by culture-dependent and culture-independent methods. Food Control. 34, 183-190.

Moreira, N., Pina, C., Mendes, F., Couto, J.A., Hogg, T., Vasconcelos, I., 2011. Volatile compounds contribution of *Hanseniaspora guilliermondii* and *Hanseniaspora uvarum* during red wine vinifications. Food Control. 22, 662-667.

Moreira, N., Mendes, F., Guedes de Pinho, P., Hogg, T., Vasconcelos, I., 2008. Heavy sulphur compounds, higher alcohols and esters production profile of *Hanseniaspora uvarum* and *Hanseniaspora guilliermondii* grown as pure and mixed cultures in grape must. Int. J. Food Microbiol. 124, 231-238.

Mu, Z., Yang, X., Yuan, H., 2012. Detection and identification of wild yeast in Koumiss. Food Microbiol. 31, 301-308.

Naknean, P., Meenune, M., Roudaut, G., 2010. Characterization of palm sap harvested in Songkhla province, Southern Thailand. Int. Food Res. J. 17, 977-986.

Nam, Y.D., Yi, S.H., Lim, S.I., 2012. Bacterial diversity of cheonggukjang, a traditional Korean fermented food, analyzed by barcoded pyrosequencing. Food Control. 28, 135-142.

Neilson, J.W., Jordan, F.L., Maier, M.R., 2013. Analysis of artifacts suggests DGGE should not be used for quantitative diversity analysis. *J. Microbiol. Meth.* 92, 256-263.

Nikolausz, M., Sipos, R., Révész, S., Székely, A., Márialigeti, K., 2005. Observation of bias associated with re-amplification of DNA isolated from denaturing gradient gels. *FEMS Microbiol. Lett.* 244, 385-390.

Nguyen, N.H., Suh, S-O., Blackwell, M., 2007. Five novel *Candida* species in insect-associated yeast clades isolated from *Neuroptera* and others insects. *Mycologia.* 99, 842-858.

Oguntoyinbo, F.A., 2011. Culture-independent analysis for determination of yeast diversity during solid substrate fermentation of grated cassava for gari production. *World J. Microb. Biot.* 27, 2461-2465.

Okafor, N., 1978. Microbiology and biochemistry of oil-palm wine. *Adv. Appl. Microbiol.* 24, 237-256.

Osorio-Cadavid, E., Chaves-López, C., Tofalo, R., Paparella, A., Suzzi, G., 2008. Detection and identification of wild yeasts in Champús, a fermented Colombian maize beverage. *Food Microbiol.* 25, 771-777.

Ouoba, L., Kando, C., Parkouda, C., Sawadogo-Lingani, H., Diawara, B., Sutherland, J.P., 2012. The microbiology of Bandji, palm wine of *Borassus akeassii* from Burkina Faso: identification and genotypic diversity of yeasts, lactic acid and acetic acid bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 113, 1428–1441.

Páez-Lerma, J. B., Arias-García, A., Rutiaga-Quiñones, O. M., Barrio, E., Soto-Cruz, N. O., 2013. Yeasts isolation from the alcoholic fermentation of *Agave duranguensis* during mezcal production. *Food Biotechnology*, 27: 342-356.

Pavel, A. B., Vasile, C. L., 2012. PyElph- a software tool for gel images analysis and phylogenetics. BMC Bioinformatics. 13, 9-15.

Pham, T., Wimalasena, T., Box, W.G., Koivuranta, K., Storgards, E., Smart, K.A., Gibson, B.R., 2011. Evaluation of ITS PCR and RFLP for differentiation and identification of brewing yeast and brewery 'Wild' yeast contaminants. J. Inst. Brew. 117, 556–568.

Ramos, C.L., de Sousa, E.S., Ribeiro, J., Almeida, T.M.M., Santos, C.C., Abegg, M.A., Schwan, R.F., 2015. Microbiological and chemical characteristic of tarubá, an indigenous beverage produced from solid cassava fermentation. Food Microbiol. 49, 182-188.

Ramos-Hernández, S., Morales-Iglesias, H., 2010. Escenarios climáticos para el estado de Chiapas. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México.

Rappe, M.S., Giovannini, S.J., 2003. The uncultured microbial majority. Annu. Rev. Microbiol. 57, 369-394.

Sambou, B., Goudiaby, A., Ervik, F., Diallo, D., Camara, C., 2002. Palm wine harvesting by the Bassari threatens *Borassus aethiopum* populations in northwestern Guinea. Biodivers. Conserv. 11, 1149-1161.

Santos, M., Teixeira, J., Rodrigues, A., 2000. Production of dextransucrose, dextran and fructose from sucrose using *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512. Biochem. Eng. J. 4, 177-188.

Satokari, R.M., Vaughan, E.E., Akkermans, A.D.L., Saarela, M., De Vos W.M., 2001. Bifidobacterial diversity in human feces detected by genus-specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. Appl. Environ. Microbiol. 67, 504-513.

Segura-García, L. E., Taillandier, P., Brandam, C., Gschaedler, A., 2015. Fermentative capacity of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* in agave juice and semi-synthetic medium. *Food Sci. Technol.* 60, 284-291.

Serrano-Altamirano, V., Díaz-Padilla, G., López-Luna, A., Cano-García, M. A., Báez-González, A. D., Garrido-Ramírez, E. R., 2006. Estadísticas climatológicas del estado de Chiapas. INIFAP-SAGARPA. Pp. 45.

Shamala, T.R., Sreekantiah, K.R., 1988. Microbiological and biochemical studies on traditional Indian palm wine fermentation. *Food Microbiol.* 5, 157-162.

Silbir, S., Dagbagli, S., Yegin, S., Baysal, T., Goksungur, Y., 2014. Levan production by *Zymomonas mobilis* in batch and continuous fermentation systems. *Carbohydr. Polym.* 99, 454-461.

Solieri, L., Landi, S., De Vero, L., Giudici, P., 2006. Molecular assessment of indigenous yeast population from traditional balsamic vinegar. *J. Appl. Microbiol.* 101, 63-71.

Soto-García, E., Rutiaga-Quiñones, M, López-Miranda, J., Montoya-Ayón, L., Soto-Cruz, O., 2009. Effect of fermentation temperatura and must processing on process productivity and product quality in mescal fermentation. *Food Control.* 20, 307-309.

Stringini, M., Comitini, F., Taccari, M., Ciani, M., 2009. Yeast diversity during tapping and fermentation of palm wine from Cameroon. *Food Microbiol.* 26, 415-420.

Steensels, J., Verstrepen, K.J., 2014. Taming wild yeast: potential of conventional and nonconventional yeast in industrial fermentations. *Annu. Rev. Microbiol.* 68, 61-80.

Stringini, M., Comitini, F., Taccari, M., Ciani, M., 2008. Yeast diversity in crop-growing environments in Cameroon. *Int. J. Food Microbiol.* 127, 184–189.

Swiegers, J. H., Bartowsky, E. J., Henschke, P.A., Pretorius, I. S., (2005). Yeast and bacterial modulation of aroma and flavor. *Aus. J. Grape Wine Res.* 11, 139-173.

Syvyk, A., Nalian, A., Hume, M., Martynova-vanKley, A., 2008. A positive control for detecting heteroduplexes in DGGE for microbial community fingerprinting. *Tex. J. Sci.* 60, 33–44.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011 MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731-2739.

Thompson, J.R., Marcelino, L.A., Polz, M.F., 2002. Heteroduplexes in mixed-template amplifications: formation, consequence and elimination by 'reconditioning PCR'. *Nucleic Acids Res.* 30, 2083-2088.

Uzochukwu, S.V.A., Balogh, E., Tucknott, O.G., Lewis, M.J., Ngoddy, P.O., 1999. Role of palm wine yeast and bacteria in palm wine aroma. *J. Food Sc. Tech.* 36, 301-304.

Valdés-Flores, A.L., 2014. Identificación de bacterias ácido lácticas presentes durante la fermentación natural de la Taberna. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM.

Van der Kraan, G.M., Buijzen, F., Kuijvenhoven, C.A.T., y Muyzer, G., (2011) Application of PCR-DGGE: case study on an oilfield core sample. In C. Whit by, T.L. Skovhus (Eds.), Applied Microbiology and Molecular Biology in Oilfield Systems (pp. 33-43). Springer Science+Business Media B.V.

Verdugo-Valdez, A., Segura-Garcia, L., Kirchmayr, M., Ramirez-Rodriguez, P., González-Esquinca, A., Coria, R., Gschaedler Mathis, A., 2011. Yeast communities associated with artisanal mezcal fermentations from *Agave Salmiana*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 100, 497-506.

Walker, G. M., (2009). *Yeast*. Elsevier Inc. Pp. 478-491.

Wang, C., Liu, Y., 2013. Dynamic study of yeast species and *Saccharomyces cerevisiae* strains during the spontaneous fermentations of Muscat blanc in Jingyang, China. *Food Microbiol.* 33, 172–177.

Wang, H.Y., Zhang, X.J., Zhao, L.P., Xu, Y., 2008. Analysis and comparison of the bacterial community in fermented grains during the fermentation for two different styles of Chinese liquor. *J. Ind. Microbiol. Biot.* 35, 603-609.

Yuangsaard, N., Yongmanitchai, W., Yamada, M., Limtong, S., 2013. Selection and characterization of a newly isolated thermotolerant *Pichia kudriavzevii* strain for ethanol production at high temperature from cassava starch hydrolysate. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 103, 577-588.

## **9. Anexo.**

### **Artículos publicados**





# 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



Jorge A. Santiago-Urbina<sup>a</sup>, Alma G. Verdugo-Valdez<sup>b</sup>, Francisco Ruiz-Terán<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad Universitaria, Coyoacán 04510, Mexico D. F., Mexico

<sup>b</sup>Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas (UNICACH), Colonia Lajas Maciel, Tuxtla Gutiérrez, 1150 CHIS, Mexico

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 30 October 2012

Received in revised form

30 January 2013

Accepted 4 February 2013

### Keywords:

Taberna

Microbial composition

Organic acids

*Acrocomia aculeata*

## ABSTRACT

The aim of this study was to determine the physicochemical and microbiological changes that occur during “taberna” production. “Taberna” is a traditional alcoholic drink produced by natural fermentation of the sap of “coyol” palm. Samples of the fermentation from three palm trees were collected for fifteen days of tapping and these were chemically and microbiologically analysed. The main microbiota recovered in the samples were yeasts, lactic acid bacteria (LAB) and acetic acid bacteria (AAB), aerobic mesophilic bacteria (AMB) and total coliforms were also found. The initial amount of yeasts was about  $3.67 \log_{10}$  CFU/mL, whereas the initial bacterial population was approximately  $7 \log_{10}$  CFU/mL. The total counts of microorganism (yeast, LAB, AAB, AMB and total coliforms bacteria) rose in subsequent samples until the ethanol and lactic acid concentrations increased at 4.25 and 0.32% w/v, respectively, from these samples the microbial population decreased, even the total coliforms bacteria population was not detected. High-Performance Liquid Chromatographic (HPLC) was used to determine sugars, ethanol, and organic acids. Sucrose was the main sugar in the “coyol” palm sap (11.36% w/v), whereas glucose and fructose were found in low concentrations. In general, the sugar content during tapping decreased and the organic acids and ethanol content increased. The maximum ethanol concentration was 4.78% w/v and lactic acid reached 0.48% w/v in the final sample (sample 15). The pH values of the sap in the first samples were nearly neutral (7.25), however during the fermentation this value dropped due to the production of organic acids.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

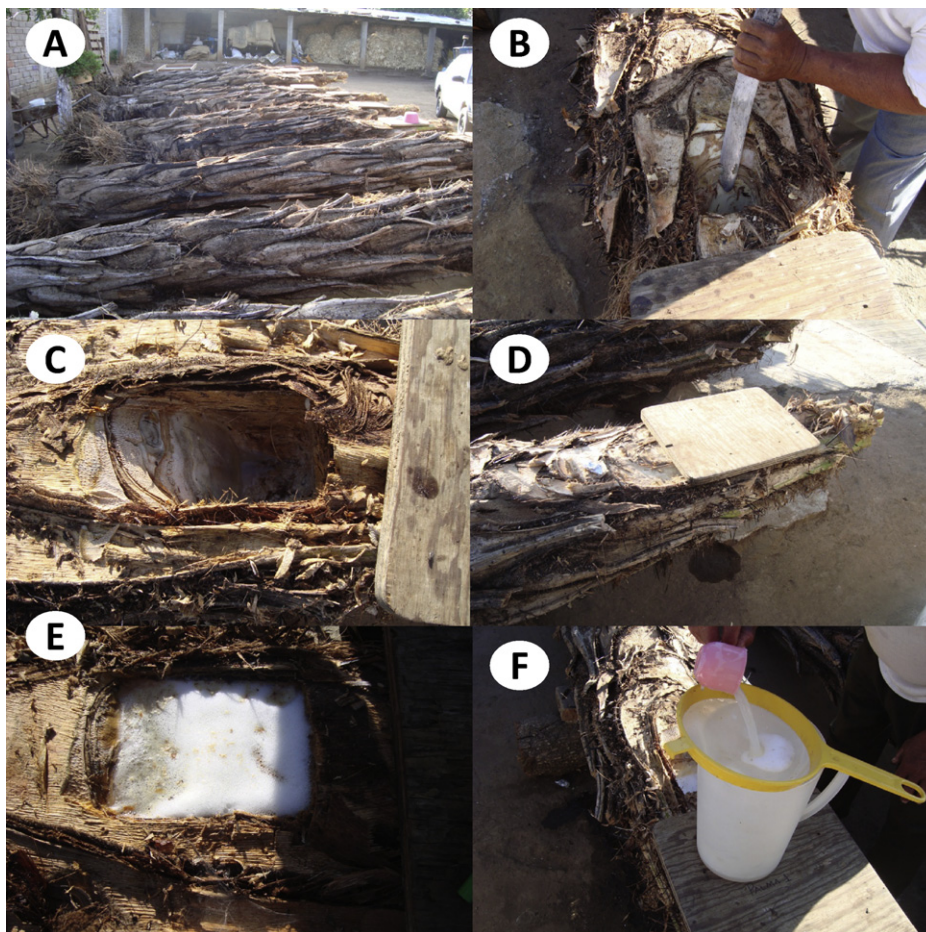
## 1. Introduction

“Taberna” is an alcoholic traditional drink, produced and consumed in small villages in the South of Mexico and other areas in Central America (Balick, 1990). This drink is whitish, effervescent, sweet, and is produced by the natural fermentation of the sap obtained from a palm tree which is known in the region as “coyol” palm (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.) (Alcántara-Hernández et al., 2010).

The sap is obtained from palm trees of 10–14 years old, these are felled, the leaves are removed, and the stems are placed horizontally (Fig. 1A) to enable the maximum flow of sap. On the apical part of the stem a rectangular cut is made forming a receptacle, which is

called “canoe” where the sap is continuously accumulated (Fig. 1C and E). The “canoe” is made carefully with a large machete (Fig. 1B) in the morning, the tapper strip away layer after layer of sheath base until the heart or “palmito” is completely found; in this step the “canoe” has approximately 5–7 cm<sup>2</sup> size long. After that, the “canoe” is cover with wood pieces and allowed to repose for 12 h. Then, in the afternoon the sap (“taberna”) is collected and again the “canoe” is cover and allowed to repose for 12 h, later in the following morning the tapper collect the sap, thereafter, the “canoe” is scraped (Fig. 1B) 1 cm per day to increase the size long until 10 × 15 cm, is cut to keep the “palmito” vessels flowing freely. The scraping is made carefully preventing not to cut too far below the “palmito”, as this will limit the flow of sap (Balick, 1990; Serrano-Macias personal communication). The “taberna” can be consumed immediately or store for later sale (Serrano-Macias personal communication). The traditional procedure for “taberna” production is shown in Fig. 2. The manufacture of this beverage is

\* Corresponding author. Tel./fax: +52 555 56225311.  
E-mail address: [panchote@unam.mx](mailto:panchote@unam.mx) (F. Ruiz-Terán).



**Fig. 1.** Process of tapping from “coyol” palm tree: stems in horizontally position (A), making the “canoe” (B), “canoe” (C), “canoe” covered with wood pieces, sap accumulated in the “canoe” (E), sap collection (F).

similar to the one reported for production of palm wine (Amoa-Awua, Sampson, & Tano-Debrah, 2007; Karamoko, Djeni, N'guessan, Bouatenin, & Dje, 2012; Stringini, Comitini, Taccari, & Ciani, 2009). The production of “taberna” is carried out under non-aseptic conditions, for this reason, the microbiota involved in the fermentation is the one present in the environmental media, this means that the inoculation of the sap may occur by the tools used when the “canoe” is made, by the natural microbiota present in the trunk or by the insects which are constantly attracted thanks to the sweetness of the sap (Karamoko et al., 2012).

There are several problems associated with different aspects of the indigenous food fermentation processes, including lack of good manufacturing procedure or hygiene code, the poor control over parameters such as pH, temperature, humidity, etc, that may affect the good quality of the product. Serrano-Macias (personal communication) mentions that small changes, for instance, in the velocity of the wind, may affect the fermentation making it sluggish.

The chemical composition of the palm sap, source and amount of the microbial inoculum in the spontaneous fermentation of “taberna”, make the study of the biochemical and microbiological changes during the fermentation of this beverage interesting. However, until now, there are a limited number of investigations about the natural fermentation of this product. Alcántara-Hernández et al. (2010) reported in an *in vitro* study different bacteria species such as *Zymomonas mobilis*, *Fructobacillus* spp., *Pantoea agglomerans* among others *gammaproteobacteria*, *Acetobacter pasteurianus*, and certain *lactic acid bacteria* as *Lactobacillus*

*nagelii*, *Lactobacillus sucicola* and *Lactobacillus* sp. According to the authors, *Z. mobilis* and *Lactobacillus* play an important role in the production of “taberna”. Furthermore, microbial activity in the palm sap produces many different chemical compounds, such as organic acids, alcohols and volatile constituents (Karamoko et al., 2012; Lasekan, Buettner, & Christlbauer, 2007; Naknean, Meenune, & Roudaut, 2010). Organic acids play an important role in the taste and aroma of fermented food products and its evaluation can be included as parameter of quality control (Shukla et al., 2010).

Consumers prefer to drink the “taberna” taken directly from the “canoe” which generally is effervescent, sweet and sour; and the microorganisms are alive. If the collected “taberna” is not consumed within 24 h, it begins to develop a vinegary taste, which is unacceptable for the consumers (Serrano-Macias personal communication).

The aim of this study was to determine the biochemical and microbiological changes of the indigenous fermented beverage called “taberna”. This work was conducted *in vivo* during fifteen days of tapping of the “coyol” palm tree.

## 2. Material and methods

### 2.1. Taberna samples

The samples were obtained directly from the “canoe” from three “coyol” palms during the 15 days of tapping in the community Benito Juárez (Villaflores) in the State of Chiapas, in March 2012

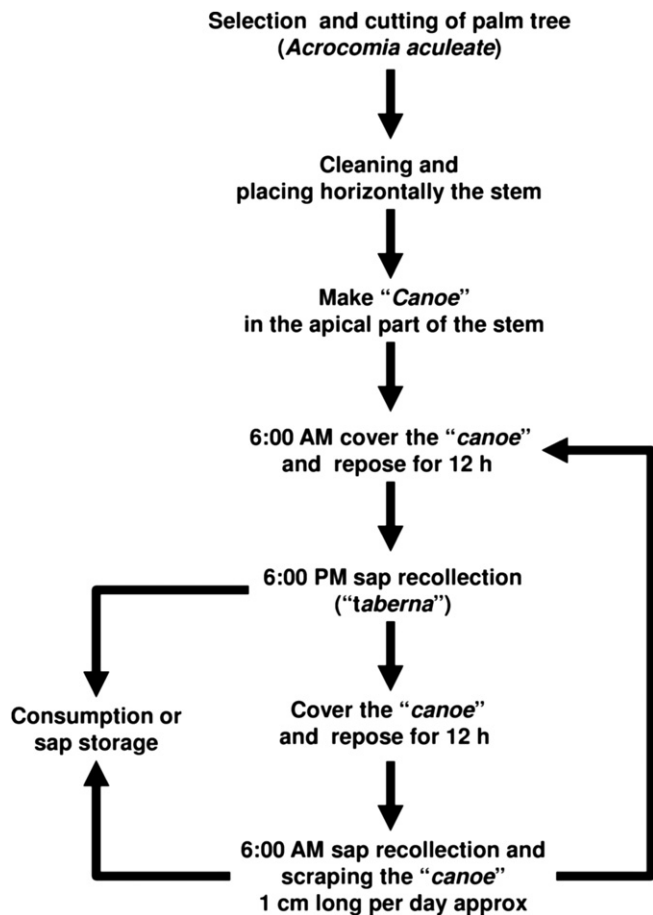


Fig. 2. Flow diagram of the "taberna" production.

where the ambient temperature varies from 30 to 38 °C. The samples were collected in triplicates from each tree into pre-sterilised 50 mL Falcon tubes in the morning (6:00 AM), before of the "canoe" scrapping was performed (Fig. 2). The collection of the sap ("taberna") was done twice a day, the sap collected in the afternoon (6:00 PM) by the tapper is either consumed or stored for later sale, while the sap collected in the morning (6:00 AM) was used to our study. The samples were transported to the laboratory in the Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas (UNICACH), in ice boxes (4 °C).

## 2.2. Enumeration of microorganisms

The samples for the count of microorganism were processed after 3 h from the time when the samples were taken and maintained in ice.

The Falcon tubes containing the taberna samples were gently shaken by hand and tenfold serial dilutions were prepared with sterile peptone (Bioxon, Becton, Dickinson company, New Jersey, USA) solution (0.1% w/v), afterwards spread-plated for microbiological examination were carried out in duplicates (Osorio-Cadavid, Chaves-López, Tofalo, Paparella, & Suzzi, 2008), in different culture media. Plate Count Agar (PCA, Oxoid LTD, Basingstoke, Hampshire, England) was used as a general medium for mesophilic bacteria population incubated at 30 °C for 5 days. The enumeration of total coliforms bacteria was carried out using plates of Violet Red Bile Lactose agar (VRBL, Oxoid LTD, Basingstoke, Hampshire, England) which were incubated for 48 h at 30 °C (Karamoko et al., 2012). Lactic acid bacteria were enumerated on Man, Rogosa and Sharpe

agar (MRS, Difco™ Le pont de Claix, France) containing cycloheximide 0.005% w/v (Sigma–Aldrich, Saint Louis, MO, USA) to inhibit the growth of the yeast (Stringini et al., 2009) and incubated under anaerobic conditions at 30 °C for 3 days. Acetic acid bacteria were enumerated on GEY agar (2% w/v D-glucose, 1% w/v yeast extract, 2% w/v CaCO<sub>3</sub>, 5% v/v ethanol and 2% w/v agar) supplemented with cycloheximide 0.005% w/v (Sigma–Aldrich, Saint Louis, MO, USA) (Stringini et al., 2009). Wallerstein Laboratories nutrient agar (WL, Difco™ 242510, Le pont de Claix, France) supplemented with chloramphenicol 0.01% w/v (Sigma–Aldrich, Saint Louis, MO, USA) was used for enumeration of yeasts, the plates were incubated at 30 °C for 3–5 days (Cocolin, Bisson, & Mills, 2000; Verdugo-Valdez et al., 2011). After the incubation period, the Colony Forming Units (CFUs) were enumerated.

## 2.3. Organic acids, carbohydrates and ethanol determination

Samples were first defrosted and then centrifuged at 10,000 rpm for 10 min and supernatants were filtered through a 0.45 µm Millipore membrane filter (EMD Millipore, Billerica, MA, USA). Carbohydrates (sucrose, glucose and fructose), organic acids (lactic and acetic acid) and ethanol analysis were performed with a Waters liquid chromatography system (Waters corporation, Milford, MA, USA), equipped with a refractive index detector (Waters 2414, Milford, MA, USA). An ion-exclusion aminex HPX-87H column (300 × 7.8 mm) (BIO-RAD, USA) was used (Escalante et al., 2008). Sulphuric acid (0.004 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) was used as the mobile phase at a flow rate of 0.6 mL/min. Individual components were identified by comparing their retention times with certified standards, and concentrations were determined according to an external calibration methodology. All the samples from each palm tree were analysed in duplicate.

The pH was determined using a pH meter (pH-meter AB15, Accumet, Cole- Palmer, Chicago) and all samples were analysed in triplicates.

## 2.4. Statistical analysis

"Taberna" samples from each "coyol" palm (three) were analysed in duplicate and mean values ± standard deviations are reported. The Duncan's multiple comparison procedure using Statgraphics Centurion XV software program (Statpoint Technologies Inc. USA.) was performed to evaluate the statistical significance (level  $P \leq 0.05$ ) of differences between the "Taberna" samples and to compare the means among them.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Chemical characteristics of the "taberna" during the fermentation process

The process of tapping of "taberna" from "coyol" palm tree can be considered as fed-batch fermentation since every 12 h the sap in the "canoe" is collected (drained) and then, the sap flow starts again to begin a new batch of "taberna" fermentation. Therefore, in this study each sample collected (1–15) corresponds to a batch of 12 h of fermentation, this is the sap accumulated from 6:00 PM to 6:00 AM.

The sugar composition of the "taberna" samples is shown in Table 1. The main sugar found in the first sample was sucrose (11.36% w/v), fructose was also detected although at low concentrations (0.27% w/v). This sample was collected after that the "canoe" was carved out. Therefore, sucrose represents the main sugar in the sap of the "coyol" palm tree. Similar result was reported for palm sap of *Borassus flabellifer* (Naknean et al., 2010). As shown

**Table 1**  
Physicochemical changes of the “*Taberna*” samples during the tapping of “*coyol*” palm tree.

Taberna samples	Parameters						
	pH	Sucrose (% w/v)	Glucose (% w/v)	Fructose (% w/v)	Ethanol (% w/v)	Lactic acid (% w/v)	Acetic acid (% w/v)
1	7.25 ± 0.00 <sup>a</sup>	11.36 ± 0.00 <sup>a</sup>	n.d.	0.27 ± 0.00 <sup>a</sup>	n.d.	n.d.	n.d.
2	6.03 ± 0.62 <sup>b</sup>	8.21 ± 0.32 <sup>b</sup>	n.d.	0.30 ± 0.02 <sup>a</sup>	n.d.	0.26 ± 0.00 <sup>de</sup>	0.02 ± 0.00 <sup>a</sup>
3	4.95 ± 0.31 <sup>c</sup>	7.66 ± 1.13 <sup>b</sup>	n.d.	0.52 ± 0.07 <sup>a</sup>	n.d.	0.28 ± 0.03 <sup>defg</sup>	n.d.
4	4.55 ± 0.25 <sup>cde</sup>	5.72 ± 0.07 <sup>c</sup>	0.23 ± 0.00 <sup>a</sup>	1.28 ± 0.05 <sup>cd</sup>	n.d.	0.12 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.02 ± 0.00 <sup>a</sup>
5	4.49 ± 0.17 <sup>def</sup>	3.05 ± 0.12 <sup>d</sup>	n.d.	1.87 ± 0.46 <sup>de</sup>	0.58 ± 0.19 <sup>a</sup>	0.28 ± 0.02 <sup>defg</sup>	0.09 ± 0.00 <sup>b</sup>
6	4.47 ± 0.23 <sup>defg</sup>	0.62 ± 0.00 <sup>ef</sup>	0.07 ± 0.00 <sup>a</sup>	1.21 ± 0.00 <sup>bc</sup>	0.24 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.05 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.01 ± 0.00 <sup>a</sup>
7	4.64 ± 0.18 <sup>cd</sup>	1.33 ± 0.58 <sup>e</sup>	0.22 ± 0.12 <sup>a</sup>	2.61 ± 0.73 <sup>f</sup>	0.21 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.19 ± 0.02 <sup>c</sup>	0.04 ± 0.00 <sup>a</sup>
8	4.55 ± 0.03 <sup>cde</sup>	2.63 ± 0.95 <sup>d</sup>	0.71 ± 0.04 <sup>b</sup>	2.35 ± 0.59 <sup>ef</sup>	0.25 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.27 ± 0.05 <sup>def</sup>	0.03 ± 0.00 <sup>a</sup>
9	4.34 ± 0.15 <sup>defg</sup>	2.54 ± 1.30 <sup>d</sup>	2.15 ± 0.22 <sup>c</sup>	3.30 ± 0.41 <sup>g</sup>	0.59 ± 0.16 <sup>a</sup>	0.25 ± 0.02 <sup>d</sup>	0.09 ± 0.01 <sup>bc</sup>
10	4.30 ± 0.09 <sup>defg</sup>	0.69 ± 0.35 <sup>ef</sup>	2.01 ± 0.55 <sup>c</sup>	3.54 ± 0.48 <sup>g</sup>	1.21 ± 0.25 <sup>b</sup>	0.30 ± 0.01 <sup>efg</sup>	0.14 ± 0.02 <sup>d</sup>
11	4.18 ± 0.06 <sup>efg</sup>	0.43 ± 0.18 <sup>ef</sup>	0.12 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.91 ± 0.22 <sup>abc</sup>	4.25 ± 0.16 <sup>c</sup>	0.32 ± 0.03 <sup>fg</sup>	0.13 ± 0.04 <sup>cd</sup>
12	4.21 ± 0.25 <sup>defg</sup>	0.44 ± 0.18 <sup>ef</sup>	0.18 ± 0.10 <sup>a</sup>	0.75 ± 0.28 <sup>abc</sup>	4.56 ± 0.21 <sup>c</sup>	0.29 ± 0.02 <sup>defg</sup>	0.16 ± 0.04 <sup>d</sup>
13	4.24 ± 0.15 <sup>defg</sup>	0.22 ± 0.19 <sup>f</sup>	0.05 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.58 ± 0.20 <sup>ab</sup>	4.67 ± 0.16 <sup>c</sup>	0.32 ± 0.02 <sup>fg</sup>	0.20 ± 0.01 <sup>e</sup>
14	4.07 ± 0.11 <sup>fg</sup>	0.45 ± 0.19 <sup>ef</sup>	0.18 ± 0.09 <sup>a</sup>	0.72 ± 0.32 <sup>abc</sup>	4.56 ± 0.86 <sup>c</sup>	0.32 ± 0.02 <sup>g</sup>	0.14 ± 0.02 <sup>d</sup>
15	4.04 ± 0.05 <sup>g</sup>	0.46 ± 0.15 <sup>ef</sup>	0.20 ± 0.15 <sup>a</sup>	0.84 ± 0.31 <sup>abc</sup>	4.78 ± 0.13 <sup>c</sup>	0.48 ± 0.01 <sup>h</sup>	0.24 ± 0.04 <sup>f</sup>

The data are means of two repetitions for each sample taken at different day ± standard deviation. Samples were collected in three different “*coyol*” palms. In a column, means values followed by different superscript letters are statistically different (Duncan’s multiple comparison procedure at  $P \leq 0.05$ ). w/s: weight/volume. n.d.: not detected.

in Table 1, the sucrose concentration in the “*taberna*” samples decreased, these results might be due to the inversion reaction caused by invertase activity and acid condition in the medium (Ezeagu & Fafunso, 2003; Naknean et al., 2010) as a result of the microbial metabolic activity. This enzymatic activity is evidenced as the fructose and glucose concentrations increased in the first 10 samples (Table 1). Similar results were reported during the tapping period of a *Raphia* palm tree (Faparusi, 1981), where the sucrose concentration drops to less than 50% of the initial amounts, within the first seven days. Glucose was found until the fourth sample and remains at low levels in concentrations varying from 0.23 to 2.15% w/v (Table 1), which may be due the microorganisms readily ferment glucose (Zaman, Lippman, Zhao, & Broach, 2008). On the other hand, the fructose concentrations were found throughout the samples from 0.27 to 3.54% w/v.

In the “*taberna*” samples the sugar amount varies because the palm tree is constantly producing sap and the microorganisms are consuming them. On the other hand, the dropping of sucrose concentration in each sample should be reflected in the production of metabolites mainly ethanol, however it didn’t occur (Table 1). In addition, this reduction in sugars observed in the early samples can be mainly caused by the depletion of sugar reserve in the palm tree; this sugar exhaustion is probably due to the fact that the trees are taken out of the field with roots, and the leaves are cut off, hence the palm tree doesn’t realize photosynthesis and does not produce sugars; so it starts to die.

At the beginning of tapping the pH, of the sap, was almost neutral, 7.25 (Table 1); as reported in the palm wine by Stringini et al. (2009) and Amoa-Awua et al. (2007). This value indicates the freshness of palm sap. The initial pH value decreased from the second sample down to pH 4, this remained constant until the fifteenth sample when we stopped sampling (Table 1). Similar pH values were also found in the palm wine fermentation (Amoa-Awua et al., 2007; Karamoko et al., 2012). These changes on pH were due to the production of organic acids mainly lactic acid as shown in Table 1, this acidic conditions ensure the microbiological safety of the product because some pathogens do not survive at this pH (Blandino, Al-aseeri, Pandiella, Cantero, & Webb, 2003). After the first sample, the lactic acid value reached 0.26% w/v and this amount varied between 0.26 and 0.48% w/v during the tapping of “*coyol*” palm. This variation could be to the fact that every time that the samples were taken, the “*canoe*” was totally drained and scraped, and all the stem residues were removed. The organic acids produced declined the pH values of the sap indicating the initial

fermentation step of palm sap. The acetic acid concentration also varied from 0.01 to 0.24% w/v (Table 1). According to Faparusi (1973), the palm wine can be acceptable by the consumers when the acetic acid concentration is lower than 0.6% w/v. The amount of this organic acid in the samples collected of *taberna* were lower than the reported amount for palm wine; therefore, consumers accept the beverage and it is one of the main characteristics of the *taberna* flavour.

At the beginning of the fermentation ethanol was not detected but, from fifth until eleventh sample it increased from 0.58 to 4.25% w/v (Table 1), however, from eleventh to fifteenth sample the ethanol concentration is constantly (there are no statistically significant differences between them). These values were similar to those reported by Amoa-Awua et al. (2007) in the palm wine where the maximum amount of ethanol established was 6% w/v. Ethanol concentration in “*taberna*” varies throughout the samples, probably due to the increase of yeast population responsible of the ethanol fermentation.

### 3.2. Microbial characteristics of “*taberna*”

The microbiological analysis from the “*taberna*” samples collected during 15 days of tapping of the “*coyol*” palm tree is presented in Table 2. The population of yeast, LAB, AAB, total coliforms and mesophilic bacteria increased slightly during the first days of tapping. Yeast initial counts were 3.67 log<sub>10</sub> CFU/mL whereas lactic acid, acetic acid and total mesophilic bacteria reached counts of approximately 7 log<sub>10</sub> CFU/mL. These counts are similar to those reported by Karamoko et al. (2012) in palm wine. The obtained count of total coliforms was 5.79 log<sub>10</sub> UFC/mL. LAB, AAB and yeasts are reported to be the most common and important groups of microorganisms in the palm sap fermentation (Amoa-Awua et al., 2007; Karamoko et al., 2012; Stringini et al., 2009), they are responsible of the lactic acid, acetic acid and ethanol production, respectively. Table 2 shows that the yeast population increased during the first four days of tapping (sample 1–4) and yeast total counts remained in approximately 6 log<sub>10</sub> CFU/mL from samples 5 to 11 (there are no statistically significant differences between them). After this, in subsequent samples yeast population decreased until 3 log<sub>10</sub> CFU/mL, probably because this particular environment is highly selective regarding pH and ethanol conditions, mainly for non-*Saccharomyces* yeast population (Wang & Liu, 2013). On the other hand, lactic acid, acetic acid and total mesophilic bacteria populations increased during the first three days of

**Table 2**  
Mean values of the populations of various micro-organisms in “*Taberna*” samples during the tapping of “*coyol*” palm tree.

Taberna samples	Microorganisms (Log <sub>10</sub> CFU/mL)				
	LAB	AAB	Yeasts	AM	Total coliforms
1	6.91 ± 0.00 <sup>def</sup>	7.04 ± 0.00 <sup>b</sup>	3.67 ± 0.00 <sup>ab</sup>	6.69 ± 0.00 <sup>de</sup>	5.79 ± 0.00 <sup>ab</sup>
2	7.38 ± 0.36 <sup>abcd</sup>	7.01 ± 0.13 <sup>b</sup>	4.90 ± 0.06 <sup>c</sup>	6.78 ± 0.94 <sup>cde</sup>	6.08 ± 0.92 <sup>a</sup>
3	7.82 ± 0.18 <sup>abc</sup>	7.73 ± 0.18 <sup>a</sup>	6.03 ± 0.03 <sup>d</sup>	7.25 ± 1.12 <sup>abcd</sup>	4.97 ± 0.33 <sup>bc</sup>
4	8.08 ± 0.04 <sup>a</sup>	7.84 ± 0.25 <sup>a</sup>	6.94 ± 0.05 <sup>e</sup>	7.83 ± 0.38 <sup>ab</sup>	4.48 ± 0.08 <sup>cd</sup>
5	7.87 ± 0.49 <sup>abc</sup>	7.85 ± 0.37 <sup>a</sup>	6.65 ± 0.06 <sup>de</sup>	7.72 ± 0.39 <sup>abc</sup>	5.07 ± 0.99 <sup>bc</sup>
6	8.17 ± 0.14 <sup>a</sup>	8.02 ± 0.22 <sup>a</sup>	6.26 ± 0.11 <sup>de</sup>	8.12 ± 0.11 <sup>a</sup>	4.97 ± 0.16 <sup>bc</sup>
7	8.09 ± 0.44 <sup>a</sup>	7.84 ± 0.19 <sup>a</sup>	5.93 ± 0.18 <sup>d</sup>	7.96 ± 0.25 <sup>ab</sup>	5.32 ± 0.18 <sup>abc</sup>
8	7.92 ± 0.31 <sup>ab</sup>	7.67 ± 0.45 <sup>a</sup>	5.97 ± 0.16 <sup>d</sup>	7.65 ± 0.46 <sup>abcd</sup>	5.11 ± 0.71 <sup>abc</sup>
9	7.09 ± 0.33 <sup>cde</sup>	7.04 ± 0.23 <sup>b</sup>	6.34 ± 0.07 <sup>de</sup>	6.98 ± 0.11 <sup>bcd</sup>	5.24 ± 0.35 <sup>abc</sup>
10	7.24 ± 0.20 <sup>bcd</sup>	6.78 ± 0.12 <sup>bc</sup>	5.97 ± 0.11 <sup>d</sup>	6.63 ± 0.45 <sup>de</sup>	4.74 ± 0.52 <sup>c</sup>
11	6.39 ± 0.71 <sup>efg</sup>	6.50 ± 0.02 <sup>c</sup>	5.81 ± 0.46 <sup>d</sup>	5.77 ± 0.54 <sup>ef</sup>	3.65 ± 0.14 <sup>d</sup>
12	6.19 ± 0.76 <sup>fgh</sup>	5.96 ± 0.36 <sup>d</sup>	4.36 ± 0.14 <sup>bc</sup>	5.78 ± 0.34 <sup>ef</sup>	n.d.
13	5.59 ± 0.29 <sup>h</sup>	5.42 ± 0.38 <sup>e</sup>	3.50 ± 0.22 <sup>a</sup>	5.38 ± 0.31 <sup>f</sup>	n.d.
14	5.87 ± 0.85 <sup>gh</sup>	5.12 ± 0.40 <sup>e</sup>	3.39 ± 0.08 <sup>a</sup>	5.63 ± 0.79 <sup>f</sup>	n.d.
15	5.48 ± 0.20 <sup>h</sup>	5.55 ± 0.45 <sup>de</sup>	3.17 ± 0.24 <sup>a</sup>	5.43 ± 0.65 <sup>f</sup>	n.d.

The data are means of two repetitions ± standard deviation in three different “*coyol*” palms. In a column, means values followed by different superscript letters are statistically different (Duncan’s multiple comparison procedure at  $P \leq 0.05$ ). LAB: lactic acid bacteria; AAB: acetic acid bacteria; AM: aerobic mesophiles. n.d.: not detected.

tapping (samples 1–3) reaching a total count of about 8 log<sub>10</sub> CFU/mL, these populations start to decrease after ninth sample reaching 5.5 log<sub>10</sub> CFU/mL by the end of sampling (sample 15). The results here obtained do not coincide with those reported by Amoa-Awua et al. (2007) mainly because they found that the population of these bacteria remain constant during the fermentation process of the palm wine, they also found that the sugar concentration remained constant. The difference between our results could be explained by the fact that the total amount of fermented sap accumulated in the “*canoe*” was removed each time when the sample was taken, thus, data represents residual sugars, metabolites and final microorganisms counts from each sample analysed corresponding to one batch of 12 h. The reduction on the quantity of the microbial population in our results was probably caused by the reductions on the amount of sugar present in the sap; this reduction observed was presumably because palm tree begins to die after almost 20 days without any supply of nutrients. In addition to the selective conditions regarding to pH and ethanol concentration in the fermented sap only favouring the growth of the fermenting microorganisms (Stringini et al., 2009). The total coliforms population was about 5.6 log<sub>10</sub> UFC/mL at the beginning of tapping (first sample), this population was decreasing and disappeared by the sample twelve (Table 2). These results could be explained by the changes on the ethanol concentration and pH, which must certainly influence the growth of the microorganism.

#### 4. Conclusions

Alcoholic, lactic acid and acetic acid fermentation occurred during tapping of “*coyol*” palm sap. The identification of the compounds produced during the fermentation processes facilitated the understanding of population dynamics. The microbial changes occurred during fermentation have an effect on the physicochemical composition of “*taberna*”.

#### Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge Mr. Serrano-Macias for providing us with “*taberna*”, Zavala-Nacul for providing language help, and the “Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología” (CONACYT) by grant support for Santiago-Urbina.

#### References

- Alcántara-Hernández, R. J., Rodríguez-Álvarez, J. A., Valenzuela-Encinas, F. A., Gutiérrez-Miceli, F. A., Castañón-González, H., Marsch, R., et al. (2010). The bacterial community in “*taberna*” a traditional beverage of Southern Mexico. *Letters in Applied Microbiology*, 51, 558–563.
- Amoa-Awua, W. K., 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.
- Balick, M. J. (1990). Production of coyol wine from *Acrocomia mexicana* (Arecaceae) in Honduras. *Economic Botany*, 44, 84–93.
- Blandino, A., Al-aseeri, M. E., Pandiella, S. S., Cantero, D., & Webb, C. (2003). Cereal-based fermented foods and beverages. *Food Research International*, 36, 527–543.
- Cocolin, L., Bisson, L. F., & Mills, D. A. (2000). Direct profiling of the yeasts dynamics in wine fermentations. *Fems Microbiology Letters*, 189, 81–87.
- Escalante, A., Giles-Gómez, M., Hernández, G., Córdova-Aguilar, M. S., López-Munguía, A., Gosset, G., et al. (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.
- Ezeagu, I. E., & Fafunso, M. A. (2003). Biochemical constituents of palm wine. *Ecology of Food and Nutrition*, 42, 213–222.
- Faparusi, S. I. (1973). Origin of initial microflora of palm wine from oil palm trees (*Elaeis guineensis*). *Journal of Applied Bacteriology*, 36, 559–565.
- Faparusi, S. I. (1981). Sugar identified in *Raphia* palm wine. *Food Chemistry*, 7, 81–86.
- Karamoko, D., Djani, N. T., N’guessan, K. F., Bouatenin, K. M. J., & Dje, K. M. (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.
- Lasekan, O., Buettner, A., & Christlbauer, M. (2007). Investigation of important odorants of palm wine (*Elaeis guineensis*). *Food Chemistry*, 105, 15–23.
- Naknean, P., Meeunee, M., & Roudaut, G. (2010). Characterization of palm sap harvested in Songkhla province, Southern Thailand. *International Food Research Journal*, 17, 977–986.
- Osorio-Cadavid, E., Chaves-López, C., Tofalo, R., Paparella, A., & Suzzi, G. (2008). Detection and identification of wild yeast in champús, a fermented Colombian maize beverage. *Food Microbiology*, 25, 771–777.
- Shukla, S., Choi, T. B., Park, H.-K., Kim, M., Lee, I. K., & Kim, J. K. (2010). Determination of non-volatile and volatile organic acids in Korean traditional fermented soybean paste (Doenjang). *Food and Chemical Toxicology*, 48, 2005–2010.
- Stringini, M., Comitini, F., Taccari, M., & Ciani, M. (2009). Yeast diversity during tapping and fermentation of palm wine from Cameroon. *Food Microbiology*, 26, 415–420.
- Verdugo-Valdez, A., Segura-García, L., Kirchmayr, M., Ramirez-Rodríguez, P., González-Esquinca, A., Coria, R., et al. (2011). Yeast communities associated with artisanal mezcal fermentations from Agave Salmiana. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 100, 497–506.
- Wang, C., & Liu, Y. (2013). Dynamic study of yeast species and *Saccharomyces cerevisiae* strains during spontaneous fermentations of muscat blanc in Jingyang, China. *Food Microbiology*, 33, 172–177.
- Zaman, S., Lippman, S., Zhao, X., & Broach, J. (2008). How *Saccharomyces* responds to nutrients. *Annual Review of Genetics*, 42, 27–81.

## MiniReview

# Microbiology and biochemistry of traditional palm wine produced around the world

Santiago-Urbina, J. A. and \*Ruíz-Terán, F.

*Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad Universitaria, Coyoacán, 04510, México, D. F. México*

### Article history

Received: 28 September 2013

Received in revised form:

26 February 2014

Accepted: 27 February 2014

### Abstract

Palm wine is an alcoholic drink obtained by the natural fermentation of the sap of various types of palm trees; this beverage is produced and consumed in several tropical regions of the world. It plays an important role in traditional practices as an alcoholic beverage, so it is important to determine the physicochemical characteristics and microbiological aspects of its fermentation. During the tapping process of the palm wine production, lactic-alcoholic-acetic fermentation is conducted by the lactic acid bacteria (LAB), yeast and acetic acid bacteria (AAB), respectively. *Saccharomyces cerevisiae* is the main microorganism that has been identified as the responsible of the alcoholic fermentation and odorants production. On the other hand, *Lactobacillus plantarum* and *Leuconostoc mesenteroides* have been reported as the predominant LAB. While, *Gluconobacter* and *Acetobacter* genera are the predominant AAB. The palm wine composition depends of the stage of tapping period in which it is consumed. Thus, ethanol concentration varies in the range of 1 to 6%, lactic acid concentration varies in the range of 0.1 to 0.5%, and acetic acid percentage varies between 0.02 and 0.4%. The principal components responsible for the odorants of the palm wine are higher alcohols, esters, acids, aldehydes and ketones.

© All Rights Reserved

### Keywords

Palm wine

Palm sap

Tapping

Microbial composition

Microbial metabolites

## Introduction

Palm wine is the collective name for a group of alcoholic beverages produced by the natural fermentation of the sap obtained from various tropical plants of the *Palmae* family (Okafor, 1978), such as those listed in the Table 1. Palm wine is an alcoholic beverage that is produced and consumed in different regions of the world, according to the country of origin; palm wine is called by different names such as this shown in the Table 1. The sap of the palm trees, which is originally sweet (Atputharajah *et al.*, 1986; Amoa-Awua *et al.*, 2007; Naknean *et al.*, 2010; Santiago-Urbina *et al.*, 2013) serves as a rich substrate for the growth of various types of microorganisms. The sap undergoes spontaneous fermentation, which promotes the proliferation of yeasts and bacteria for the conversion of the sweet substrate into several metabolites mainly ethanol, lactic acid and acetic acid (Amoa-Awua *et al.*, 2007; Stringini *et al.*, 2009; Ouoba *et al.*, 2012; Santiago-Urbina *et al.*, 2013). Palm sap fermentation has been reported to be an alcoholic, lactic and acetic fermentation (Okafor, 1978; Atputharajah *et al.*, 1986; Amoa-Awua *et al.*, 2007; Stringini *et al.*, 2009; Ouoba *et al.*, 2012; Santiago-Urbina *et al.*, 2013), therefore, yeasts, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria are considered to play the most important role in the palm wine production.

The palm sap is obtained through the process known as tapping, which involves a series of operations to stimulate the flow of sap (Atputharajah *et al.*, 1986), such as the perforation of the trunk, insertion of a tube in the hole and collection of the sap in a container (gourd, clay pot, plastic container, glass bottle or calabash) (Ouoba *et al.*, 2012). There are diverse ways of tapping palm trees; they depend on the locality; but in general, two methods are practiced: in the first method the sap is obtained from a live standing tree, such as the Bandji and Toddy production (Figure 1), this process implicates climbing very tall palm trees, and perforate the trunk in the top of the tree for Bandji production (Ouoba *et al.*, 2012), or cutting into the end of spadix from the tender inflorescence of the palm tree (inflorescence tapping) for Toddy production (Okafor, 1978; Atputharajah *et al.*, 1986; Mbuagbaw and Noorduyn, 2012). In the second method the tree is felled or cut down before tapping (stem tapping), such as palm wine from Ghana and Taberna production (Figure 2). The cessation of the flow of palm sap varies according to the palm tree species and from tree to tree; for instance the shorter duration of tapping could be 2 weeks and the longest 8 weeks (Balick, 1990; Amoa-Awua *et al.*, 2007; Santiago-Urbina *et al.*, 2013). Palm wine is collected twice a day, normally in the morning and the evening, it can be either immediately consumed or stored for later sale (Amoa-Awua *et al.*, 2007; Naknean *et al.*,

\*Corresponding author.

Email: [panchote@unam.mx](mailto:panchote@unam.mx)

Tel/Fax: +555 56225311

Table 1. Palm wine names according to the country of origin

Palm tree	Traditional name	Country	References
<i>Borassus akeassii</i>	Bandji	Burkina Faso	Ouoba <i>et al.</i> , 2012
<i>Acrocomia aculeata</i>	Taberna	Mexico	Santiago-Urbina <i>et al.</i> , 2013
<i>Cocos nucifera</i>	Mnazi	Kenya	Kadere <i>et al.</i> , 2008
<i>Cocos nucifera</i>	Toddy	Sri Lanka	Atputharajah <i>et al.</i> , 1986
<i>Cocos nucifera</i>	Tuba	Philippines	Atputharajah <i>et al.</i> , 1986
<i>Cocos nucifera</i>	Tuak	Indonesia	Atputharajah <i>et al.</i> , 1986
<i>Elaeis guineensis</i>	Mimbo	Cameron	Jepersen, 2003
<i>Raphia hookeri</i>	Emu	Nigeria	Jepersen, 2003
<i>Elaeis guineensis</i>	Palm wine	Ghana	Amoa-Awua <i>et al.</i> , 2007
<i>Elaeis guineensis</i>	Palm wine	Cameron	Stringini <i>et al.</i> , 2009
<i>Borassus flabellifer</i>	Palmyrah toddy	Sri Lanka	Theivendirarajah and Chrystopher, 1987
<i>Phoenix sylvestris</i>	Toddy	India	Shamala and Sreekantiah, 1988
<i>Borassus aethiopian</i>	Palm wine	Republic of Guinea	Sambou <i>et al.</i> , 2002
<i>Nypa fruticans</i>	Toddy	Malaysia	Päivöke, 1985; Nur Aimi <i>et al.</i> , 2013

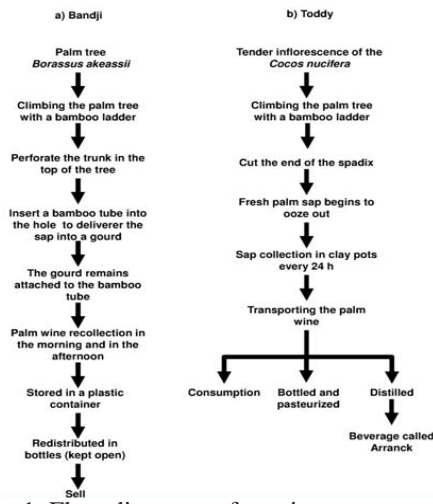


Figure 1. Flow diagrams of tapping process of live standing palm tree for Bandji (a) and Toddy (b) production

2010; Karamoko *et al.*, 2012; Santiago-Urbina *et al.*, 2013). Palm wine from Ghana is distilled for gin production called Akpeteshie (Amoa-Awua *et al.*, 2007); similarly, Toddy is also distilled to produce the spirit known as Arrack (Atputharajah *et al.*, 1986). Tapping process from a live standing palm tree such as Bandji production from *Borassus akeassii*, has been reported that it is not significantly different of wine production from others types of palm trees where sap is collected from a live upright tree, as the palm wine from *Elaeis guineensis* produced in Ghana (Amoa-Awua *et al.*, 2007).

This drink has a significant role in several nutritional, medical, religious and social uses such as traditional wedding ceremonies, traditional religious ceremonies or festivals, prayers and it is good for malaria (Olasupo and Obayori, 2003; Chandrasekhar *et al.*, 2012). The aim of this review is to describe the biochemical and microbiological aspects of the traditional palm wine produced in some regions of Africa, Asia and America.

### Biochemical constituents of palm wine

The main characteristics of palm wine are whitish color, effervescent, sweet and acid taste. Palm wine is produced by natural lactic-alcoholic-acetic fermentation of the sugary sap of palm tree (Okafor, 1978; Atputharajah *et al.*, 1986; Amoa-

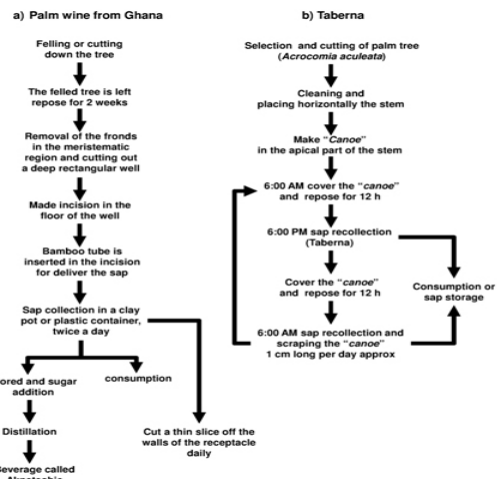


Figure 2. Flow diagrams of tapping process of felled palm tree for the palm wine from Ghana (a) and Taberna (b) production

Awua *et al.*, 2007; Stringini *et al.*, 2009; Ouoba *et al.*, 2012; Santiago-Urbina *et al.*, 2013), it consist of an initial lactic acid fermentation, a middle alcoholic fermentation and a final acetic fermentation (Atputharajah *et al.*, 1986; Amoa-Awua *et al.*, 2007). At each stage the microbial activity helping the activity of the microorganism in the next stage (Atputharajah *et al.*, 1986), i.e. members of the consortium communicative one another with trading metabolites. As a result each individual cell in the mixture responds to the presence of others in the consortium (Smid and Lacroix, 2013). An increase in the total acidity and decrease in the pH by the production of organic acids, probably enhance the growth and invertase activity of the yeasts (Atputharajah *et al.*, 1986; Naknean *et al.*, 2010), and the ethanol produced by the yeasts serves as a substrate for the acetic acid production by the acetic acid bacteria (Atputharajah *et al.*, 1986; Amoa-Awua *et al.*, 2007).

The palm sap is transparent, with a sugar content in a range of 10-18% w/v approximately (Atputharajah *et al.*, 1986; Eze and Uzoечи, 1988, Amoa-Awua *et al.*, 2007; Naknean *et al.*, 2010; Santiago-Urbina *et al.*, 2013), which is mainly sucrose (Eze and Uzoечи, 1988; Amoa-Awua *et al.*, 2007; Obahiagbon and Oviasogie, 2007; Ben Thabet *et al.*, 2009; Naknean *et al.*, 2010; Santiago-Urbina *et al.*, 2013), for example, Ben Thabet *et al.* (2009) reported that the proportion of the sugars of the sap of *Phoenix dactylifera* consist of 95.27% of sucrose, 2.51% glucose and 1.61% fructose (dry matter basis). Palm sap has a pH near neutral, approximately 7 to 7.4; this value indicates the freshness of palm sap (Ezeagu *et al.*, 2003; Amoa-Awua *et al.*, 2007; Karamoko *et al.*, 2012; Santiago-Urbina *et al.*, 2013). During the tapping, palm sap changes the consistency and the color from transparent to whitish (Naknean *et al.*, 2010), due

to the lactic acid bacteria produce a gum probably dextrans (Alcántara-Hernández *et al.*, 2010; Naknean *et al.*, 2010). In addition a heavy suspension of yeast and bacteria also gives a milky-white appearance (Lasekan *et al.*, 2007). The composition of the palm wine depends of the state of the fermentation at which the wine is consumed.

#### *Sugars identified and their concentrations in palm wine*

In the first days of tapping the palm wine is very sugary and does not contain substantial concentration of alcohol (Ezeagu *et al.*, 2003; Amoa-Awua *et al.*, 2007; Karamoko *et al.*, 2012; Santiago-Urbina *et al.*, 2013). In *Raphia* palm wine, sucrose, maltose, glucose and fructose sugars were present in the first day of tapping (Faparusi and Bassir, 1972; Faparusi, 1981); while xylose and cellobiose were detected on the middle tapping period; and galacturonic acid, arabinose and rhamnose sugars appeared irregularly for a few days (Faparusi, 1981). The palm wine of *Borassus flabellifer* contains about to 9.29 to 17.44% of sucrose, glucose content between 0.50 and 1.85%, and fructose in a range of 0.50 and 1.81% (Naknean *et al.*, 2010) in the first samples of tapping. On the other hand, in palm wine of *Elaeis guineensis* was found that the total sugars in the samples dropped from initial concentrations of about 14% to about 11% by the fourth day of tapping, and subsequently between 12% and 8%, this variation was observed during the 35 days of tapping period (Amoa-Awua *et al.*, 2007). This sugar concentration is maintained by the continual oozing of the sweet sap (Amoa-Awua *et al.*, 2007). Meanwhile Karamoko *et al.* (2012) reported an initial concentration of total sugars of about 50% w/v, this sugar concentration decreased through the tapping process about 21% for the first week; then, 7.9%, 6.4% and 5.4% for the second, third and fourth week, respectively, in the palm wine of *Elaeis guineensis*. The decrease in sugar content is a clear indication that a large portion of the sugars is fermented especially during the early stages of tapping. On the other hand, during the 15 days of tapping of *Acrocomia aculeata* was found an initial concentration of sucrose in the palm wine of 11.36%, this concentration dropped through-out the tapping process to 0.22%, as a result of the microbial metabolic activity (Santiago-Urbina *et al.*, 2013). In addition, this reduction in sugars can be also caused by the depletion of sugar reserve in the palm tree due to the fact that the trees are felled, and the leaves are cut off, hence the palm does not realize photosynthesis and does not produces sugar (Santiago-Urbina *et al.*, 2013). The variation in the sugar composition through

the tapping process can be explained by different factors, such as different palm tree species, time of collection of the palm wine samples, different ways of make the tapping process.

#### *pH and organic acids concentration in palm wine*

Normally, natural palm sap shows approximately a neutral pH; however, in the first days of the tapping process, this value decreases between 5 and 4 and subsequently between 4 and 3 (Eze and Uzoechi, 1988; Ezeagu *et al.*, 2003; Amoa-Awua *et al.*, 2007; Karamoko *et al.*, 2012; Santiago-Urbina *et al.*, 2013). These changes on pH are due to the organic acids production as a result of the microbial metabolic activity. Lactic acid produced by the lactic acid bacteria has been reported as the main responsible for the acidic condition in palm wine (Atputharajah *et al.*, 1986; Amoa-Awua *et al.*, 2007; Stringini *et al.*, 2009; Ouoba *et al.*, 2012; Santiago-Urbina *et al.*, 2013). e.g. in the palm wine of *Elaeis guineensis* the percentage of lactic acid after the first few days of tapping was between 0.1 and 0.3% (Amoa-Awua *et al.*, 2007), similarly in the palm wine of *Acrocomia aculeata*, the lactic acid concentration varied in the range of 0.26 to 0.48%, through the tapping process (Santiago-Urbina *et al.*, 2013). This lactic acid concentration decreased the pH in the medium in an approximately 24 h and after that the pH is stabilized at 4 and 3 (Eze and Uzoechi, 1988; Amoa-Awua *et al.*, 2007; Santiago-Urbina *et al.*, 2013). The second organic acid produced in the palm wine is the acetic acid, with a concentration of about 0.02 to 0.4% (Amoa-Awua *et al.*, 2007; Ouoba *et al.*, 2012; Santiago-Urbina *et al.*, 2013). According to Faparusi (1973), this acetic acid concentration in the palm wine are acceptable by the consumers but, when the concentration exceeds 0.6% the beverage becomes unacceptable. Thus, the acetic acid is considered as part of the aroma of palm wine (Amoa-Awua *et al.*, 2007). Moreover, in palm wine of *Elaeis guineensis* from Ivory Coast in addition to lactic (0.015-0.079%) and acetic (0.01-0.077%) acids, others organic acids have been reported such as oxalic (0.01-0.04%), citric (0.005-0.04%), tartaric (0.031-0.04%), malic (0.05-0.1%), ascorbic (0.005-0.024%) and fumaric (0.001-0.003%) acids (Karamoko *et al.*, 2012). Lactic and acetic acids are produced throughout the tapping process by the lactic and acetic acid bacteria, respectively, however the tartaric and malic acids are considered as native to the exudates (Karamoko *et al.*, 2012).

#### *Ethanol concentrations in palm wine*

The concentration of ethanol in palm wine



during the tapping depends of several factors such as the presence of microorganisms responsible for the alcoholic fermentation, composition of sap, species of palm tree, environmental conditions e.g. temperature and velocity of the wind (Santiago-Urbina *et al.*, 2013), type of tapping, flow rate of the sap, and the time in which the palm wine samples are taken, and time between collection and analysis of the samples. Thus, in palm wine of *Elaeis guineensis*, the ethanol concentration fluctuates, the palm wine collected between the day contains less alcohol (1.4% and 2.82%) than the palm wine which has been accumulated overnight (3.24% and 4.75% and even over 6% in few cases) (Amoa-Awua *et al.*, 2007), it is probably due to the microbiota that has colonized the walls of the receptacle is removed during tapping in the morning, when the tapper cuts a thin slice off the walls of the receptacle or canoe, which reduces the microbial load (Amoa-Awua *et al.*, 2007; Santiago-Urbina *et al.*, 2013) therefore reducing the ethanol production. On the other hand, the palm wine which is stored has higher levels of ethanol than palm wine recollected directly from the tree. e.g. Amoa-Awua *et al.* (2007) reported alcohol content about 8.16% in 24 h. Moreover, in Taberna, Alcántara Hernández *et al.* (2010) reported a percentage of ethanol about 10.80% in 60 h of storage (*in vitro* fermentation); this concentration is higher than 4.78% ethanol content reported in an *in vivo* fermentation of Taberna (Santiago-Urbina *et al.*, 2013). The variation aforementioned in the ethanol content is due to that in an *in vivo* fermentation there is a constant dilution of the metabolites produced as the flow of sap is accumulated in the receptacle or canoe, this process is considered as fed-batch fermentation (Santiago-Urbina *et al.*, 2013).

The ethanol production is attributed to several microorganisms, such as *Saccharomyces cerevisiae* (Amoa-Awua *et al.*, 2007; Stringini *et al.*, 2009; Ouoba *et al.*, 2012) and *Saccharomyces chevalieri* (Atputharajah *et al.*, 1986). In addition, *Zymomonas mobilis* also have been reported as responsible in the ethanol production (Obire, 2005; Alcántara-Hernández *et al.*, 2010).

#### *Minerals and trace elements present in the palm wine*

Macro and micro mineral elements content have been reported in the palm wine. Where, Magnesium and Phosphorus were the most abundant minerals, in concentrations of 32.0 and 59.75 mg/L, respectively, in palm wine from *Elaeis guineensis* (Ezeagu *et al.*, 2003). Cadmium, Plumb and Cobalt were detected in low levels  $\leq 0.1$  ppm. Copper, Manganese, Zinc, and

Calcium have also been reported in concentrations of 3.78, 2.63, 1.26, 1.95 and 0.48 mg/L, respectively (Ezeagu *et al.*, 2003). While, in palm wine from *Phoenix dactylifera* in addition to P and Mg (41.49 and 330 mg/100 g of dry matter basis, respectively) the Potassium is also reported (522.92 mg/100 g of dry matter basis), and it is the most abundant element. Others mineral elements, in decreasing order are Ca, Na, Fe, Cu, and Zn (Ben Thabet *et al.*, 2009).

#### *Odorants of palm wine*

During the fermentation of palm wine, various organic acids and alcohols are produced thanks to microbial metabolic activity, and do not correspond to metabolites of the palm tree because the major components are not present in the fresh palm sap; all the metabolites play an important role in palm wine characteristic aroma. For instance, in the palm wine of *Elaeis guineensis* has been identified 73 compounds. There are 23 esters, 11 carbonyls, 14 alcohols and phenols, 10 acids, 5 sulphur compounds, 3 terpenes, 2 hydrocarbons, 2 acetals, 2 nitrogen compounds and 1 lactone. The higher alcohols and esters (more than 70% of total volatiles), as well as acids, aldehydes and ketones are the major groups of compounds found, and they are considered the main volatile components responsible for the palm wine aroma (Uzochukwu *et al.*, 1997). Similarly, Lasekan *et al.* (2007) reported that the volatile profile is largely dominated by alcoholic substances such as ethanol, 2-3-methylbutanol and 2-phenylethanol, as well as acetic acid. In addition, methyl butanoate, acetoin, diethylsuccinate, ethyl lactate have also been reported, and several acids such as isobutanoic acid, 2-methyl butanoic acid, 3-methylpentanoic acid, phenylacetic acid and pentanoic acid. The most potent odorants in palm wine are earthy-smelling: 3-isobutyl-2-metoxypyrazine, buttery-smelling acetoin, fruity ethylhexanoate, 3-methylbutylacetate and popcorn-smelling 2-acetyl-1-pyrroline. Furthermore, Nur Aimi *et al.* (2013) identified the volatile compounds responsible for the aroma in fermented nipa sap (*Nypa fruticans*), which consists of alcohols such as ethanol, 1-propanol, 2-methylpropanol, 2-methylbutanol; acetoin, acetic acid, diacetyl, and esters such as ethyl acetate and ethyl lactate.

#### *Microbial communities in palm wine*

The palm sap of the palm tree is a rich medium capable of supporting the growth of several types of microorganisms like high numbers of aerobic mesophilic bacteria, coliforms bacteria, lactic acid bacteria, acetic acid bacteria and yeasts (Amoa-Awua *et al.*, 2007; Karamoko *et al.*, 2012; Santiago-Urbina

Table 2. Microorganisms identified in several types of palm wine

Microorganisms	Bandji <sup>1</sup>	Taberna <sup>2</sup>	Palm wine	Palm wine	Palm wine	Toddy <sup>6</sup>	Toddy <sup>7</sup>
			from Cameroon <sup>3</sup>	from Ghana <sup>4</sup>	from Nigeria <sup>5</sup>		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	x		x	x	x		x
<i>Saccharomyces ludwigii</i>			x			x	
<i>Saccharomyces bayanus</i>					x		
<i>Saccharomyces uvarum</i>					x		
<i>Saccharomyces bailii</i>						x	
<i>Saccharomyces chevalieri</i>						x	
<i>Candida tropicalis</i>	x				x	x	
<i>Candida pararugosa</i>	x						
<i>Candida quercitrusa</i>	x						
<i>Candida parapsilopsis</i>			x			x	
<i>Candida fermentati</i>			x				
<i>Candida krusei</i>				x			
<i>Candida utilis</i>					x		
<i>Candida guilliermondii</i>						x	
<i>Candida valida</i>						x	
<i>Pichia etchellsii</i>						x	
<i>Pichia farinosa</i>						x	
<i>Pichia membranaefaciens</i>						x	
<i>Pichia ohmeri</i>						x	
<i>Pichia guilliermondii</i>						x	
<i>Pichia fermentans</i>			x				
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>			x				
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	x				x	x	x
<i>Issatchenkia orientalis</i>	x						
<i>Arthroascus fermentans</i>	x						
<i>Trichosporon asahii</i>	x						
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	x		x				
<i>Kodamaea ohmeri</i>	x						
<i>Trichosporonasteroides</i>	x						
<i>Trigonopsis variabilis</i>	x						
<i>Galactomyces geotrichum</i>	x						
<i>Kloeckera apiculata</i>				x			
<i>Kloeckera javanica</i>						x	
<i>Rhodotorula glutinis</i>						x	
<i>Kluyveromyces lactis</i>					x		
<i>Lactobacillus plantarum</i>	x			x			
<i>Lactobacillus fermentum</i>	x						
<i>Lactobacillus paracasei</i>	x						
<i>Lactobacillus nagelii</i>	x	x					
<i>Lactobacillus succicola</i>		x					
<i>Lactobacillus sp</i>		x				x	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	x			x			
<i>Leuconostoc dextranum</i>							x
<i>Leuconostoc sp</i>						x	
<i>Fructobacillus durionis</i>	x	x					
<i>Fructobacillus fructosus</i>		x					
<i>Streptococcus mitis</i>	x						
<i>Acetobacter indonesiensis</i>	x						
<i>Acetobacter tropicalis</i>	x						
<i>Acetobacter estunensis</i>	x						
<i>Acetobacter ghanensis</i>	x						
<i>Acetobacter acetii</i>	x					x	x
<i>Acetobacter lovaniensis</i>	x						
<i>Acetobacter orientalis</i>	x						
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	x	x					
<i>Acetobacter cerevisiae</i>	x						
<i>Acetobacter rancens</i>							x
<i>Acetobacter suboxydans</i>							x
<i>Acetobacter sp</i>				x			
<i>Gluconobacter oxydans</i>	x						
<i>Gluconobacter saccharivorans</i>	x						
<i>Gluconobacter sp</i>				x			
<i>Zymomonas mobilis</i>		x					

1: Ouoba *et al.*, 2012; 2: Alcántara-Hernández *et al.*, 2010; 3: Stringini *et al.*, 2009; 4: Amoa-Awua *et al.*, 2007; 5: Ezeronye and Ekerentugba, 2001; 6: Atputharajah *et al.*, 1986; 7: Shamala and Sreekantiah, 1988. x: Identified microorganisms

*et al.*, 2013). Yeast populations have been reported in the palm wine in concentrations of about 10<sup>4</sup> to 10<sup>7</sup> cfu/mL, while, LAB ranging between 10<sup>7</sup> and 10<sup>9</sup> CFU/mL, AAB from concentrations of 10<sup>5</sup> to about 10<sup>8</sup> cfu/mL, total aerobic mesophiles ranging between 10<sup>6</sup> and 10<sup>9</sup> cfu/mL, and total coliforms have been reported in a range of 10<sup>3</sup> to 10<sup>7</sup> cfu/mL (Atputharajah *et al.*, 1986; Amoa-Awua *et al.*, 2007; Stringini *et al.*, 2009; Karamoko *et al.*, 2012; Ouoba *et al.*, 2012; Santiago-Urbina *et al.*, 2013).

The yeasts, LAB and AAB which have been identified in the different palm wine are presented in the Table 2. *Saccharomyces cerevisiae* is the dominant yeast species responsible for the fermentation of palm wine tapped from *Elaeis guineensis* in Ghana and

Cameroon, as well as Bandji in Burkina Faso (Amoa-Awua *et al.*, 2007; Stringini *et al.*, 2009; Ouoba *et al.*, 2012). On the other hand, *Saccharomyces chevalieri* has been reported the yeast specie predominant in the Toddy from Sri Lanka (Atputharajah *et al.*, 1986). *S. cerevisiae* predominance in the palm wine production is attributed by the selective medium regarding pH, ethanol content, and anaerobic conditions, which favors the fermenting yeasts (Stringini *et al.*, 2009). The major total volatiles and alcohols are produced by *S. cerevisiae* and *S. chevalieri* (Uzochukwu *et al.*, 1999). e.g. the higher alcohols in fermented nipa (*Nypa fruticans*) sap is by cause of the metabolism of *S. cerevisiae* through two metabolic pathways; amino acids such as isoleucine and leucine, and glycolysis (NurAimi *et al.*, 2013). Moreover, *Zymomonas mobilis* is also considered as the microorganism responsible for the palm wine fermentation and has been reported in Taberna, considering that this microorganism has ability to grow in acidic condition (pH about to 3.53) and tolerate high ethanol concentration (10.33% v/v) (Alcántara-Hernández *et al.*, 2010), similar results are reported in palm wine obtained by “inflorescence tapping” from *Elaeis guineensis* in Nigeria (Obire, 2005).

Other identified yeasts during the tapping process probably play a determinant role in the fermentation. e.g. in wine fermentation is reported that the apiculate yeasts such as *Hanseniaspora guilliermondii* and *Hanseniaspora uvarum* have the capacity to influence, in a positive way, the aromatic profile of wines. *H. guilliermondii* has been reported to produce high levels of 2-phenylethyl acetate and 1-propanol (Moreira *et al.*, 2011).

Thus also, the predominant LAB reported in palm wine fermentation are *Lactobacillus plantarum* and *Leuconostoc mesenteroides* (Amoa-Awua *et al.*, 2007). These microorganisms are responsible for the sour taste of palm wine and are responsible for the pH decrease during the tapping through the organic acids production (Amoa-Awua *et al.*, 2007; Ouoba *et al.*, 2012). These bacteria also control the growth of undesirable microorganism such as enterobacteria by acid and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production (Amoa-Awua *et al.*, 2007; Alcántara-Hernández *et al.*, 2010; Naknean *et al.*, 2010; Santiago-Urbina *et al.*, 2013). e.g. Santiago-Urbina *et al.* (2013) reported that the total coliforms population in Taberna decreased during the tapping period with the increased of lactic acid production. Similar results are reported in Bandji where the predominant genus is *Lactobacillus* representing 86.67% of the LAB total isolates followed by the genera *Leuconostoc* (10%). Hence, *Lactobacillus plantarum* is the dominant species represented

46.67% of the total isolates (Ouoba *et al.*, 2012). In addition, other species are described and are listed in the Table 2. Furthermore, in Taberna has been reported that *Lactobacillus nagelii* and *Lactobacillus succicola* are present in the fermentation process (Alcántara-Hernández *et al.*, 2010). Additionally, the acetic acid bacteria of the genera *Acetobacter* and *Gluconobacter* have been identified in palm wine (Amoa-Awua *et al.*, 2007; Kadere *et al.*, 2008), such as *Acetobacter pasteurianus* in Taberna (Alcántara-Hernández *et al.*, 2010), *Acetobacter indonesiensis* in Bandji, and other species listed in the Table 2. The role of AAB during the palm wine fermentation is related with the acetic acid production, which comprises part of the aroma volatiles. However, AAB can be considered as spoilage microorganisms, when the palm wine becomes unacceptable to consumers. In addition, like LAB, AAB also can contribute to the acidification and inhibition of undesirable microorganism (Ouoba *et al.*, 2012).

#### *Methods employed for identification of microorganisms in palm wine*

Many microorganisms can be present during the palm wine production; however, they cannot be detecting because a good identification technique is not apply, and there are only a limited number of advanced identification studies. The microbial population identification in palm wine has been performed by the application of traditional methods and some molecular techniques.

Amoa-Awua *et al.* (2007) made a tentative identification of yeasts, LAB and AAB. They employed culture dependent methods, where the yeasts isolated were evaluated by determining their pattern of fermentation and assimilation of several sugars and also the usage of various carbohydrates in ID 32 C galleries. The LAB and AAB were examined by Gram staining, catalase test, gas production, and growth in different selective culture medium. LAB were also identified by determining their pattern of carbohydrate fermentation in API 50 CHL galleries. Similarly, Kadere *et al.* (2008) identified the AAB present in Mnazi, they used Gram staining, catalase test, biochemical and physiological test. On the other hand, LAB was phenotypically characterized by Gram staining, catalase test, microscopic morphology, and carbohydrate fermentation pattern using API 50CH (Ziadi *et al.*, 2011). Thus, the yeasts identification in palm wine has been also carried out using standard morphological and physiological tests. These tests include morphology, surface characteristic, and presence of pseudohyphae, ascospore formation and vegetative reproduction; as well as, fermentative

test of several sugars (Nwachukwu *et al.*, 2006). These identification methods are commonly called traditional methods, and their disadvantage is that only easily culturable microorganism can be detected, and members of microbial communities that need elective enrichment are not identified (Stringini *et al.*, 2009). Moreover, this phenotypic identification is time consuming and there is possible inaccuracy in the results (Martín-Platero *et al.*, 2009). However, others techniques applied to isolated microorganisms have been employed in the studies of the palm wine microbiology, those are based on polymerase chain reaction (PCR) amplification and analysis of restriction of the complex Internal Transcribed Spacer (ITS) regions (non-coding and variable) and the 5.8S rRNA gene (coding and conserved) useful in measuring close fungus phylogenetic relationships (Kurtzman, 1992; Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999; Arroyo López *et al.*, 2006). e.g. Stringini *et al.* (2009) identified yeasts population present during the tapping of palm wine from Cameroon using the RFLP (restriction fragment length polymorphism) analysis of the 5.8S rRNA gene and the two internal transcribed spacers (5.8S-ITS). The DNA is extracted of the isolated yeasts, then, through the PCR the 5.8S-ITS region is amplified, using the primers ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'; and ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'. After that, the PCR products are digested using restriction endonucleases such as *Cfol*, *HaeIII* and *Hinfl*. For the microorganism identification, the restriction patterns are compared with previously published studies, such as in Esteve-zarsoso *et al.*, 1999; Sabate *et al.*, 2002; de Llanos Frutos *et al.*, 2004; Arrollo López *et al.*, 2006). Ouoba *et al.* (2012) made identification and genotypic diversity of the yeasts, LAB and AAB isolated from Bandji. The isolated microorganism were grouped by amplification of the 5.8S-ITS region and 16S-23S rDNA ITS region for yeast and bacteria, respectively. The yeasts, first grouped by phenotypic characteristic were analyzed using ITS-PCR, 11 groups representing different species were founded. For yeasts identification, sequencing of the D1/D2-region of the 26S rRNA was performed, using the NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') and NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') primers for the amplification. Correspondingly, the bacteria (LAB and AAB) were grouped phenotypically and then, clustered by mean of ITS-PCR. For bacteria identification, sequencing of a 940 bp portion of conserved region of the 16S rRNA gene was amplified using the pA (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and pE (CCGTCAATTCCTTTGAGTTT-3') primers. In addition, the *gyrB* gen that encodes the subunit

B protein of DNA gyrase, an enzyme important in DNA replication was sequencing. In the other hand yeasts and bacteria were further differentiated by repetitive sequence-based PCR (rep-PCR) using the primer GTG5 (5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3'). Rep-PCR allowed a clear differentiation of some yeast species, which using ITS-PCR, it was not possible to differentiate. Some LAB were not clearly differentiate by 16S RNA gene sequencing but, *gyrB* sequencing allowed a clearly distinction (Ouoba *et al.*, 2012). Although these molecular PCR methods have improved the identification of the culturable microorganisms, there are still problems associated with selective cultivation and isolation of microorganisms from natural samples. Considering the lack of knowledge of the real conditions under which most microorganisms are growing in the natural habitat and the difficult to develop media for cultivation that accurate resembles these conditions, the culture-independent techniques have been used (Ercolini, 2004). Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) is perhaps the most commonly used among the culture-independent fingerprinting techniques (Ercolini, 2004). The PCR-DGGE is usually employed to assess the structure of microbial communities in environmental samples without cultivation, and to determine the community dynamics in response to environmental variations (Ercolini, 2004). DGGE is an electrophoretic method capable of detecting differences between DNA fragments of the same size but with different sequences (Ercolini, 2004). e.g. Stringini *et al.* (2009) in addition to PCR-RFLP analysis of isolated yeasts, they also evaluated the yeasts population in palm wine by means of PCR-DGGE analysis, they used a polyphasic approach, i.e. both culture-dependent and culture-independent strategies. Total DNA was extracted from each samples of palm wine and approximately 250 nucleotides of the 5'-end region of the 26S rRNA gene were amplified by PCR using the primers NL1 with GC clamp, 5'CGCCC GCCGCGCGGGCGGGCGGGGCGGGGGCCA TATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3', and reverse primer LS2, 5'-ATTCCCAAACAACCTCGACTC-3', the addition of a GC clamp to one of the primers insures that the fragments of DNA will remain partially double-strand and that the region screened in is the lowest melting domain (Myers *et al.*, 1985; Sheffield *et al.*, 1989). The PCR products were analyzed in 8% polyacrylamide gels containing a 20-50% urea-formamide gradient. After the DGGE analysis, selected bands were excised and sequenced. Thereafter, molecular identification and phylogenetic analysis were performed. This culture-independent

method (DGGE) achieves the detection of additional species, which were not detected using culture based methods (Stringini *et al.*, 2009). On the other hand, another culture-independent method used in the identification of microorganism in palm wine is the clone library of the 16S rDNA, this technique was employed by Alcántara-Hernández *et al.* (2010) for identification of bacterial community in taberna. The library was constructed from metagenomic DNA extracted from samples collected during the in vitro fermentation of Taberna. Approximately 1500 bp were amplified from 16S rDNA via PCR using the 46F (5'-GCCTAACACATGCAAGTC-3') and 1540R (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3') bacterial specific primers. PCR products were cloned directly into a vector using the TOPO TA cloning kit, and restriction analysis with *EcoRI* was performed to detect the insertion. Then the 16S rDNA was sequenced and molecular identification and phylogenetic analysis were carried out (Alcántara-Hernández *et al.*, 2010).

## Conclusions and perspectives

The chemical composition of the palm sap is very similar among different species of palm trees. Sucrose is the main sugar presents in the sap and is the substrate in the natural fermentation conducted by lactic acid bacteria, yeasts and acetic acid bacteria. The palm wine involves three types of fermentations: lactic, alcoholic and acetic, making this traditional beverage an interesting environment where microorganism or genes with potential biotechnological applications can be isolated. Palm wine contains ethanol, lactic acid, acetic acid, as well as higher alcohols, esters, aldehydes and ketones. The composition of palm wine depends of several factors such as the source of the sap and the length of the fermentation. Microorganism identification in this beverage has been performed using traditional techniques of identification which involves isolation of the microorganism, and some molecular techniques that do not need microorganism culture such as PCR-DGGE. Therefore the structure of the microbial community probably is not completely identified. The microbiology and the biochemistry of palm wine must be fully understood. e.g. determine changes in the structure and the metabolic activity of the microbial community. Microbial community metabolism can be evaluated by monitoring the relative expression of messenger RNA (mRNAs). Ratio of microorganism in the fermentation during tapping of palm tree can be performed by quantitative monitoring of microorganisms using real-time PCR technology. Other important point is, knowing the

origin of the microorganism and microbial vectors. On the other hand, many authors have reported that yeasts are the responsible for the ethanol production mainly *S. cerevisiae*, however, others authors have attributed this to *Zymomonas mobilis*, therefore is necessary that this bacteria is studied.

### Acknowledgements

The authors thank Hasibi Zavala-Nacul and Marcos Ortiz-Caro for critical discussion of the manuscript, and the “Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología” (CONACYT) by grant support for Santiago-Urbina.

### References

- Alcántara-Hernández, R. J., Rodríguez-Álvarez, J. A., Valenzuela-Encinas, F. A., Gutiérrez-Miceli, F. A., Castañón-González, H., Marsch, R., Ayora-Talavera, T. and Dendooven, L. 2010. The bacterial community in “taberna” a traditional beverage of Southern Mexico. *Letters in Applied Microbiology* 51(5): 558-563.
- Amoa-Awua, W. K., Sampson, E. and 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 (2): 599–606.
- Arroyo-López, F. N., Durán-Quintana, M. C., Ruíz-Barba, J. L., Querol, A. and Garrido-Fernández, A. 2006. Use of molecular methods for the identification of yeast associated with table olives. *Food Microbiology* 23 (8): 791-796.
- Atputharajah, J. D., Widanapathirana, S. and Samarajeewa, U. 1986. Microbiology and biochemistry of natural fermentation of coconut palm sap. *Food Microbiology* 3 (4): 273-280.
- Balick, M.J. 1990. Production of coyol wine from *Acrocomia mexicana* (arecaceae) in Honduras. *Economic botany* 44 (1): 84-93.
- Ben Thabet, I., Besbes, S., Attia, H., Deroanne, C., Francis, F., Drira, N. and Blecker, C. 2009. Physicochemical characteristics of date sap “Lagmi” from deglet nour palm (*Phoenix dactylifera* L.). *International Journal of Food Properties* 12 (3): 659-670.
- Chandrasekhar, H., Sreevani, S., Seshapani, P. and Pramodhakumari, J. 2012. A review on palm wine. *International Journal of Research in Biological Science* 2 (1): 33-38.
- de Llanos Frutos, R., Fernández-Espinar, M. T. and Querol, A. 2004. Identification of species of the genus *Candida* by analysis of the 5.8S rRNA gene and two ribosomal internal transcribed spacers. *Antonie Van Leeuwenhoek* 85 (3): 175-185.
- Ercolini, D. 2004. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *Journal of Microbiological Methods* 56 (3): 297-314.
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F. and Querol, A. 1999. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49 (1): 329-337.
- Ezeagu, I. E., Fafunso, M. A. and Ejezie, F. E. 2003. Biochemical constituents of palmwine. *Ecology of Food and Nutrition* 42 (3): 213-222.
- Eze, M. O. and Uzoechi, O. 1988. Sugars of the unfermented sap and the wine from the oil palm, *Elaeis guineensis*, tree. *Plant Foods for Human Nutrition* 38 (2): 121-126.
- Ezeronye, O. U. and Okerentugba, P. O. 2001. Genetic and physiological variants of yeast selected from palm wine. *Mycopathologia* 152 (2): 85-89.
- Faparusi, S. I. 1981. Sugar identified in Raphia palm wine. *Food Chemistry* 7 (2): 81-86.
- Faparusi, S. I. and Bassir, O. 1972. Factors affecting the quality of palm wine. 1. Period of tapping a palm tree. *West African journal of Biological and Applied Chemistry* 15: 17-23.
- Jepersen, L. 2003. Occurrence and taxonomic characteristic of strains of *Saccharomyces cerevisiae* predominant in African indigenous fermented foods and beverages. *FEMS Yeast Research* 3 (2): 191-200.
- Kadere, T., Miyamoto, T., Oniang'o, R. K., Kutina, P. M. and Njoroge, S. M. 2008. Isolation and identification of the genera *Acetobacter* and *Gluconobacter* in coconut toddy (mnazi). *African Journal of Biotechnology* 7 (16): 2963-2971.
- Karamoko, D., Djeni, N. T., N'guessan, K. F., Bouatenin, K. M. J. and Dje, K. M. 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 (2): 504-511.
- Kurtzman, C. P. 1992. rRNA sequence comparisons for assessing phylogenetic relationships among yeasts. *International Journal of Systematic Bacteriology* 42 (1): 1-6.
- Lasekan, O., Buettner, A. and Christlbauer, M. 2007. Investigation of important odorants of palm wine (*Elaeis guineensis*). *Food Chemistry* 105 (1): 15-23.
- Martín-Platero, A. M., Maqueda, M., Valdivia, E., Purswani, J. and Martínez-Bueno, M. 2009. Polyphasic study of microbial communities of two Spanish farmhouse goats' milk cheeses from Sierra de Aracena. *Food Microbiology* 26 (3): 294-304.
- Mbuagbaw, L. and Noorduy, S. G. 2012. The palm wine trade: occupational and health hazards. *International Journal of Occupational and Environmental Medicine* 3 (4): 157-164.
- Moreira, N., Pina, C., Mendes, F., Couto, J. A., Hogg, T. and Vasconcelos, I. 2011. Volatile compounds contribution of *Hanseniaspora guilliermondii* and *Hanseniaspora uvarum* during red wine vinifications. *Food Control* 22 (5): 662-667.
- Myers, R. M., Fisher, S. G., Lerman, L. S. and Maniatis, T. 1985. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nuclei Acids*

- Research 13 (9): 3131-3145.
- Naknean, P., Meenune, M. and Roudaut, G. 2010. Characterization of palm sap harvested in Songkhla province, Southern Thailand. *International Food Research Journal* 17 (4): 977-986.
- Nur Aimi, R., Abu Bakar, F. and Dzulkifly, M. H. 2013. Determination of volatile compounds in fresh and fermented Nipa sap (*Nypa fructicans*) using static headspace gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). *International Food Research Journal* 20 (1): 369-376.
- Nwachukwu, I. N., Ibekwe, V. I., Nwabueze, R. N. and Anyanwu, B. N. 2006. Characterization of palm wine yeast isolates for industrial utilization. *African Journal of Biotechnology* 5 (19): 1725-1728.
- Obahiagbon, F. I. and Oviasogie, P. 2007. Changes in the physico-chemical characteristics of processed and stored *Raphia hookeri* palm sap (shelf life studies). *American Journal of Food Technology* 2 (4): 323-326.
- Obire, O. 2005. Activity of *Zymomonas* species in palm-sap obtained from three areas in Edo State, Nigeria. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management* 9 (1): 25-30.
- Okafor, N. 1978. Microbiology and biochemistry of oil-palm wine. *Advances in Applied Microbiology* 24: 237-256.
- Olasupo, N. A. and Obayori, O. S. 2003. Utilization of palm wine (*Elaeis guineensis*) for the improved production of Nigerian indigenous alcoholic drink-Ogogoro. *Journal of Food Processing Preservation* 27 (5): 365-372.
- Ouoba, L., Kando, C., Parkouda, C., Sawadogo-Lingani, H., Diawara, B. and Sutherland, J. P. 2012. The microbiology of Bandji, palm wine of *Borassus akeassii* from Burkina Faso: identification and genotypic diversity of yeasts, lactic acid and acetic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology* 113 (6): 1428-144.
- Päivökä, E. A. 1985. Tapping practices and yields of the nipa palm (*Nypa fructicans*) in Papua New Guinea. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 13 (1): 59-72.
- Sabate, J., Cano, J., Esteve-Zarzoso, B. and Guillamón, J. M. 2002. Isolation and identification of yeasts associated with vineyard and winery by RFLP analysis of ribosomal genes and mitochondrial DNA. *Microbiological research* 157 (4): 267-274.
- Sambou, B., Goudiaby, A., Ervik, F., Diallo, D. and Camara, C. 2002. Palm wine harvesting by the Bassari threatens *Borassus aethiopum* populations in north-western Guinea. *Biodiversity and Conservation* 11 (7): 1149-1161.
- Santiago-Urbina, J. A., Verdugo-Valdez, A. G. and Ruíz-Terán, F. 2013. Physicochemical and microbiological changes during tapping of palm sap to produce an alcoholic beverage called "Taberna", which is produced in the south east of Mexico. *Food Control* 33 (1): 58-62.
- Shamala, T. R. and Sreekantiah, K. R. 1988. Microbiological and biochemical studies on traditional Indian palm wine fermentation. *Food Microbiology* 5 (3): 157-162.
- Sheffield, V. C., Beck, J. S., Stone, E. M. and Myers, R. M. 1989. Attachment of a 40 bp G+C rich sequence (G-C clamp) to genomic DNA fragments by polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86 (1): 232-236.
- Smid, E.J. and Lacroix, C. 2013. Microbe-microbe interactions in mixed culture food fermentations. *Current Opinion in Biotechnology* 24 (2): 148-154.
- Stringini, M., Comitini, F., Taccari, M. and Ciani, M. 2009. Yeast diversity during tapping and fermentation of palm wine from Cameroon. *Food Microbiology* 26 (4): 415-420.
- Theivendirarajah, K. and Chrystopher, R. K. 1987. Microflora and microbial activity in palmirah (*Borassus flabellifer*) palm wine in Sri Lanka. *MIRCEN Journal* 3 (1): 23-31.
- Uzochukwu, S. V. A., Balogh, E., Tucknott, O., Lewis, M. J., and Ngoddy, P. O. 1997. Volatiles of palm wine using solvent extracts. *Journal of Food Quality* 20 (6): 483-494.
- Uzochukwu, S. V. A., Balogh, E., Tucknott, O. G., Lewis, M. J. and Ngoddy, P. O. 1999. Role of palm wine yeast and bacteria in palm wine aroma. *Journal of Food Science and Technology* 36 (4): 301-304.
- Ziadi, M., M'hir, S., Kbaier, N., Hamdi, M. and Ferchichi, A. 2011. Microbiological analysis and screening of lactic acid bacteria from Tunisian date palm sap. *African Journal of Microbiological Research* 5 (19): 2929-2935.

# Yeast species associated with spontaneous fermentation of *taberna*, a traditional palm wine from the southeast of Mexico

Jorge Alejandro Santiago-Urbina ·  
José Armando Arias-García · Francisco Ruiz-Terán

Received: 28 November 2013 / Accepted: 28 February 2014 / Published online: 20 March 2014  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg and the University of Milan 2014

**Abstract** The aim of this study was to isolate and identify the yeasts present in *taberna*, a traditional palm wine from Mexico, which is produced by natural fermentation of the palm sap obtained from *Acrocomia aculeata*. A total of 450 yeast isolates were obtained from 45 *taberna* samples collected over 15 days of tapping at the end of fed-batch fermentation (12 hours of feeding and fermentation of the sap in the *canoe*) from three coyol palm trees. The yeast isolates were identified using restriction pattern analysis of the internal transcribed spacer region 5.8S-ITS and by sequence analysis of the D1/D2 divergent domain of the 26S rRNA gene. Nine different yeast species were identified in the *taberna* samples tested, namely, *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniopsis guilliermondii*, *Candida tropicalis*, *Candida intermedia*, *Kazachstania unispora*, *Kazachstania exigua*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Pichia kudriavzevii* (*Issatchenkia orientalis*) and *Pichia kluyveri*. The non-*Saccharomyces* yeasts *H. guilliermondii* and *C. tropicalis* were detected in samples from all three palm trees, while *S. cerevisiae* was detected in samples from only two of the palm trees. The frequency and distribution of the yeast species were different in the samples of each palm tree, which indicated that the inoculum in the palm sap may be deposited randomly by different vectors. This study is the first to characterize the yeast population associated with the palm wine named *taberna*.

**Keywords** *Taberna* · Palm wine · *Acrocomia aculeata* · Yeast · PCR-RFLP · D1/D2 domain

## Introduction

*Taberna* is a palm wine produced by the natural fermentation of the sap obtained by tapping the coyol palm tree (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.). This palm wine is consumed as a refreshing sour and alcoholic beverage in the southeast of Mexico and Central America (Balick 1990; Alcántara-Hernández et al. 2010). The process of *taberna* production has been reported previously by Santiago-Urbina et al (2013). The palm sap undergoes a natural fermentation in which the inoculum may come from the tools, the natural microbiota present in the trunk, and/or the insects that are constantly attracted to the sweetness of the sap (Karamoko et al. 2012; Santiago-Urbina et al. 2013). *Taberna* production is carried out via a fed-batch fermentation process, wherein every 12 hours the sap in the *canoe* is collected (drained) and then the new sap flow is used to begin a new batch of fermentation (Santiago-Urbina et al. 2013). The *taberna* product is collected twice a day, in the morning and in the afternoon. After the morning collection of the sap, the producer scrapes the *canoe*, cutting a thin slice of the walls to expose a fresh layer of the palm tissue; this process physically removes the microbiota that colonized the walls of the *canoe*, thus reducing the microbial load for the next batch. The unfermented sap contains mainly sucrose, about 11.36 % (w/v), and has a pH of 7.25 (Santiago-Urbina et al. 2013). In contrast, the fermented sap contains from 0.21 to 4.78 % (w/v) ethanol, 0.05 to 0.48 % (w/v) lactic acid, 0.01 to 0.24 % (w/v) acetic acid, and has pH values from 6 to 4. The composition of the sap depends on the stage of fermentation at which the *taberna* is consumed. *Taberna* has similar physicochemical and microbiological characteristics as other palm wines such as Bandji, Lagmi,

J. A. Santiago-Urbina · F. Ruiz-Terán (✉)  
Laboratorio 321, Departamento de Alimentos y Biotecnología,  
Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México,  
Ciudad Universitaria, Coyoacán, 04510 México, D. F., México  
e-mail: panchote@unam.mx

J. A. Arias-García  
Laboratorio de Biotecnología, Centro universitario de ciencias  
biológicas y agropecuarias, Universidad de Guadalajara, A.P.139-1  
Zapopan Jalisco, 45101 Guadalajara, México

Toddy, Tuak, Mimbo, and Mnazi (Atputharajah et al. 1986; Jepersen 2003; Kadere et al. 2008; Ben Thabet et al. 2009; Ouoba et al. 2012). During tapping of *Acrocomia aculeata*, the sap develops alcoholic, lactic, and acetic acid fermentations similar to those in the palm wine from *Elaeis guineensis* (Amoa-Awua et al. 2007; Stringini et al. 2009) and Toddy from *Cocos nucifera* (Atputharajah et al. 1986). Therefore, yeasts, and lactic and acetic acid bacteria have been found in *taberna* in concentrations of about  $10^3$  and  $10^7$  colony forming units (CFU)/mL for yeast, and  $10^7$  to  $10^8$  CFU/mL for lactic and acetic acid bacteria (Santiago-Urbina et al. 2013). A previous study of the microbial community in *taberna*, which was focused on the identification of the bacteria, showed that *Zymomonas mobilis*, *Fructobacillus durionis*, *Fructobacillus fructosus*, *Pantoea agglomerans*, and other Gammaproteobacteria, lactic acid bacteria such as *Lactobacillus nagelli*, *Lactobacillus sucicola*, *Lactobacillus* sp., and acetic acid bacteria such as *Acetobacter pasteurianus* were present at some stages of the in vitro fermentation of *taberna* (Alcántara-Hernández et al. 2010). However, until now, no studies have reported the identification of yeasts from *taberna*. Yeast species such as *Saccharomyces cerevisiae* are important for alcoholic fermentation, and they have been found in the palm wine of *E. guineensis* in Ghana and Cameroon, as well in Bandji from Burkina Faso (Amoa-Awua et al. 2007; Stringini et al. 2009; Ouoba et al. 2012). The major total volatiles and alcohols are produced by *S. cerevisiae* and *Saccharomyces chevalieri* (Uzochukwu et al. 1999; Nur Aimi et al. 2013). However, other yeast species are also capable of influencing, in a positive way, the aromatic profile of palm wines.

Variations in the chemical composition of *taberna* through the tapping process, the source and microbial inoculum in the natural fermentation, as well as the environmental conditions such as the temperature in the place where *taberna* is produced, which ranges from 35 to 38 °C (Serrano-Macias, pers. comm.), make this traditional beverage an interesting source of microorganisms with potential biotechnological applications. Until now, most studies have focused on the bacterial content of *taberna*, and no studies on the yeast population have been reported so far. Hence, the aim of the present study was to identify the yeast population in samples collected during *Taberna* production from 15 fed-batches during 15 days of tapping.

## Materials and methods

### Samples

In March 2012, a total of 45 *taberna* samples were obtained during 15 days of tapping from three coyol palms in Benito Juárez in the state of Chiapas, México, where the ambient

temperature varies from 30 to 38 °C. Each day during tapping, approximately 50 mL of palm sap was collected directly from the *canoe* at the end of the fed-batch fermentation. The samples were collected into pre-sterilized 50-mL Falcon tubes in the morning (6:00 am), before the *canoe* scraping was performed. The samples were transported in an ice box (4 °C) to the laboratory at the Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas (UNICACH) within 2 h of their collection. The palm trees were identified as I, II, and III. The samples were collected in triplicate from each palm tree.

### Chemical and statistical analyses

The sugar (sucrose, glucose, and fructose) and ethanol concentrations in the *taberna* samples from each coyol palm (three) were determined using a liquid chromatography system (Waters Corporation, Milford, MA, USA) following the methodology described by Santiago-Urbina et al (2013). The pH was determined using an Accumet AB15 pH meter (Cole-Palmer, IL, USA). All the samples from each palm tree were analyzed in duplicate. Data obtained were subjected to an analysis of variance (ANOVA) using the Fisher's least significant difference (LSD) test to determine significant differences between each palm tree sample ( $P \leq 0.05$ ). The analysis was performed using Statgraphics Centurion XV software (Statpoint Technologies Inc., Warrenton, VA, USA).

### Yeast isolation

The samples were processed 3 h after their collection. The Falcon tubes containing the *taberna* samples were shaken gently by hand and ten-fold serial dilutions were prepared in 0.1 % (w/v) of sterile peptone water (Bioxon, Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA). Next, 0.1 mL of the dilutions were spread-plated in duplicate on plates of Wallerstein Laboratories nutrient agar (WL, Difco™, Le Pont-de-Claix, France), supplemented with 0.01 % w/v chloramphenicol (Sigma-Aldrich, MO, USA). The plates were incubated at 30 °C for 3–5 days (Cocolin et al. 2000; Verdugo Valdez et al. 2011). After the incubation period, the colony-forming units (CFU) were counted. Then, 10 colonies from each sample were picked up from the countable plates on the basis of different color and colony morphology. Selected colonies were sub-cultured on YEPD agar plates (yeast extract 10 g/L; peptone 20 g/L; dextrose 20 g/L; agar 20 g/L) by streaking. The purified isolates were suspended in YEPD broth containing 30 % (v/v) glycerol and stored at -20 °C until identification.

### DNA isolation

A total of 450 isolated yeasts from *taberna* samples were analyzed. Yeasts were grown in 5 mL of YEPD broth at



30 °C with shaking at 200 rpm for 18 h. Approximately 1.5 mL of culture was centrifuged at 20,000 x g for 5 min at 4 °C three times (for more biomass recovery). The pellet was used for DNA extraction using a modified method reported by Cocolin et al. (2000). The cells were resuspended in 200 µL of breaking buffer (2 % triton X-100, 1 % SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA pH 8), 0.3 g of glass beads (diameter 0.42–0.6 mm), and 200 µL of buffered phenol, chloroform, and isoamyl alcohol (25:24:1, v/v) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) were added to the mixture. After vortexing for 1 min and centrifuging at 20,000 x g for 10 min, 200 µL of TE buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 7.6) were added. The mixture was centrifuged at 20,000 x g at 4 °C for 10 min. The upper phase was pipetted into a 1.5-mL Eppendorf tube. The DNA was precipitated with 1 mL of ice-cold 96 % ethanol and maintained in a freezer at -20 °C for 20 min, then centrifuged at 20,000 x g at 4 °C for 10 min. The pellet was washed with ice-cold 70 % ethanol, and dried overnight. The DNA pellet was resuspended in 100 µL of sterile deionized water for 1.5 h at room temperature and stored at -20 °C until use.

#### Yeast molecular identification

The 5.8S-ITS (internal transcribed spacer region) rDNA of the isolated yeasts was amplified by polymerase chain reaction (PCR) assay with the forward primer ITS1 (5'-TCCGTAGG TGAACCTGCGG-3') and reverse primer ITS4 (5'-TCCTCC GCTTATTGATATGC-3'). PCRs were performed in a 50-µL reaction volume containing: 1x PCR buffer, 2.25 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 µM dNTP mix, 0.5 µM each of forward and reverse primers, 1.25 U of Taq DNA polymerase (Invitrogen, CA, USA), and 2 µL of DNA solution. The amplification was performed with a PIKO 24 thermal cycler (Thermo Scientific, Vantaa, Finland) under the PCR conditions described by Esteve-Zarzoso et al (1999). The PCR products were separated by applying 10 µL of each amplicon with 1.5 µL of 6x loading buffer (Invitrogen) to a 1.5 % (w/v) agarose (Invitrogen) gel containing 0.7 µg/mL of ethidium bromide (Bio-Rad, CA, USA). The approximate sizes of the amplicons were determined using a standard molecular weight marker (100-bp DNA ladder; Invitrogen). The gel was run in 0.5 x TBE buffer (44.5 mM Tris (Sigma-Aldrich, MO, USA), 44.5 mM boric acid (Sigma-Aldrich), 1 mM Na<sub>2</sub>-EDTA (Sigma-Aldrich)) for 90 min at 100 V and photographed under transilluminated ultraviolet (UV) light. Band sizes were estimated by comparison against the DNA ladders using Kodak Molecular Imaging Software version 5.0 (Carestream Health, Inc, Rochester, NY, USA).

For restriction reactions of the amplified DNA (5.8S-ITS rDNA), 11.5 µL of the PCR products were digested without further purification, in 15 µL reaction volume (1.5 µL of 10 x

buffer, 0.2 µL of restriction enzyme (2 U) and 1.8 µL sterile deionized water). The restriction enzymes used for all amplified DNA from the yeast isolates were *Hae*III, *Hinf*I, and *Hha*I (Invitrogen). The digestion reaction was incubated for 3.8 h at 37 °C. Restriction fragments were separated by gel electrophoresis (Bio-rad) on a 2 % (w/v) agarose (Invitrogen) gel containing 0.7 µg/mL of ethidium bromide (Bio-Rad), in 0.5x TBE buffer. The gel was run in 0.5 x TBE for 90 min at 90 V and photographed under transilluminated UV light. The fragment sizes were estimated by comparison against the standard DNA markers (100-bp DNA Ladder, Invitrogen) using Kodak Molecular Imaging Software, version 5.0 (Carestream Health, Inc). The restriction patterns were compared with previously published studies by Esteve-Zarzoso et al. (1999), Granchi et al. (1999), Las Heras-Vazquez et al. (2003), Osorio-Cadavid et al. (2008), Stringini et al. (2008), Pham et al. (2011), and Wang and Liu (2013).

Isolates were grouped based on their restriction fragment length polymorphism (RFLP) patterns after identification of unique common restriction profiles using unweighted pair group average (UPGMA) cluster analysis based on the Jaccard similarity index using the PAST software, version 2.17c (Jeyaram et al. 2008).

#### Sequence analysis of the 26S rDNA D1/D2 domain

Sequencing of the D1/D2 divergent domain of the large subunit (26S) rDNA was performed on representative strains of each created group by PCR-RFLP. The NL1 (5'-GCATATCA ATAAGCGGAGGAAAAG-3') and NL4 (5'-GGTCCGTG TTTCAAGACGG-3') primers (Kurtzman and Robnett 1998) were used to amplify the D1/D2 domain. The reactions were performed in a PIKO 24 thermal cycler (Thermo Scientific) under the following conditions: initial denaturation at 95 °C for 5 min; 35 cycles of denaturing at 94 °C for 1 min, annealing at 55.5 °C for 2 min, and extension at 72 °C for 2 min; and a final extension at 72 °C for 10 min. The amplified fragments were then sequenced by Laragen Sequencing and Genotyping (Culver, CA, USA). The sequences were edited using Mega 5.1 (Tamura et al. 2011) and compared with the sequences in the GenBank database at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide> using the basic local alignment search tool (BLAST).

#### Nucleotide sequence accession number

The D1/D2 26S rRNA sequences have been deposited in GenBank under accession numbers KF241558, KF241559, KF241560, KF241561, KF241562, KF241563, KF241564, KF241565, and KF241567.

## Frequency percentage analysis

To study the species distribution in our samples, the method proposed by Solieri et al. (2006) was used. This method evaluates the number of times each species is detected in a sample, without considering the number of strains that belong to the species. In this way, the number of positive samples for each species and the corresponding frequency, defined as the number of positive samples for a species divided by the total number of samples expressed as a percentage, was estimated.

## Results

### Chemical composition and yeast counts of the *taberna* samples

The physicochemical characteristics of *taberna* are listed in Table 1. The initial total sugar content (sucrose, glucose, and fructose) of fresh palm wine was  $11.63 \pm 0.54$  % (w/v) in the samples from all three palm trees (I, II, and III), and this concentration decreased similarly over time in all the samples. However, from day 11 onwards the lowest sugar concentrations were found in the samples from coyol palm III (Table 1). The initial pH values in the first samples from the three palms were almost neutral ( $7.26 \pm 0.02$ ), and then decreased to values of approximately 4 in all samples. On the other hand, in the samples taken on the first 4 days, no ethanol content was detected (Table 1), then, from sample 5 onwards, the ethanol content was found to range from approximately 0.6 to 4.8 % (w/v). The yeast count was  $3.67 \log_{10}$  CFU/mL in the first samples from all three palms, and then increased to approximately  $7 \log_{10}$  CFU/mL in the samples taken on day 4. After that, the yeast count remained close to  $6 \log_{10}$  CFU/mL until day 11 (Table 1), when a 2.32, 2.96, and 2.8 log reduction was observed in the samples from palm trees I, II, and III, respectively (Table 1).

### Isolation and identification of yeast isolates

To identify the dominant yeasts present during *taberna* production, a total of 450 yeasts were isolated from *taberna* samples obtained from three different coyol palm trees over the 15-day tapping process. Different ITS-PCR product sizes (390–850 bp long) were detected in the isolates. When the PCR products were digested with *Hae*III, *Hin*I, and *Hha*I restriction enzymes and then analyzed, nine different restriction patterns were obtained (Fig. 1 and Table 2). The nine pattern groups were identified directly after comparing their restriction fragment profiles with the data from Esteve-Zarzoso et al. (1999), Granchi et al. (1999), Las Heras-Vazquez et al. (2003), Osorio-Cadavid et al. (2008), Stringini

et al. (2008), Pham et al. (2011), and Wang and Liu (2013) as: *Saccharomyces cerevisiae* (I), *Pichia kluyveri* (II), *Kazachstania unispora* (III), *Meyerozyma guilliermondii* (IV), *Candida tropicalis* (V), *Candida intermedia* (VI), *Hanseniaspora guilliermondii* (VII), *Kazachstania exigua* (VIII), and *Pichia kudriavzevii* (*Issatchenkia orientalis*) (IX) (Table 2).

To confirm the identity of each of the groups, strains representing each profile were identified by sequencing of the D1/D2 domain of their 26S rDNA. The sizes of the sequences that were obtained ranged from 508–598 bp (Table 2). When the D1/D2 sequences were compared with the sequences in GenBank, they were found to share sequence homologies of 98–100 % with known sequences (Table 2). The D1/D2 domain of each representative strain of groups I, II, III, IV, V, VI, and VIII shared 100 % identity with sequences from *S. cerevisiae*, *P. kluyveri*, *K. unispora*, *M. guilliermondii*, *C. tropicalis*, *C. intermedia* and *K. exigua*, respectively. The group VII strain shared 99 % identity with *H. guilliermondii*, while the group IX strain shared 98 % identity with *P. kudriavzevii* (*I. orientalis*). All the isolates identified by the sequences of the D1/D2 domain of the 26S rDNA genes coincided with the results obtained by the RFLP analysis (Table 2).

### Frequency percentage analysis

The frequency of positive samples of different species identified for each palm tree is shown in Table 3. *Candida tropicalis* strains (93.33 %) were the most common species in the *taberna* samples from palm tree I, followed by *H. guilliermondii* (86.67 %) and *C. intermedia* (40 %). Other yeast species detected in the samples were *M. guilliermondii*, *S. cerevisiae*, and *P. kluyveri*. In the samples from palm tree II, *H. guilliermondii* (100 %) was the dominant species, followed by *C. tropicalis* (80 %), and *K. unispora* (73.33 %). Low percentages of *C. intermedia*, *P. kluyveri*, and *K. exigua* were detected, and these strains could be considered as sporadic strain in the fermentation process. In the samples from palm tree III, *H. guilliermondii* (73.33 %) was the dominant species, followed by *S. cerevisiae* (53.33 %) and *C. tropicalis* (53.33 %). The most common and abundant yeast species in the *taberna* samples from the three palm trees were *C. tropicalis* and *H. guilliermondii*. *S. cerevisiae* was found in samples from palm trees I and III. *K. unispora* was detected only in the samples from palm tree II, while *P. kudriavzevii* was detected only in the samples from palm tree III.

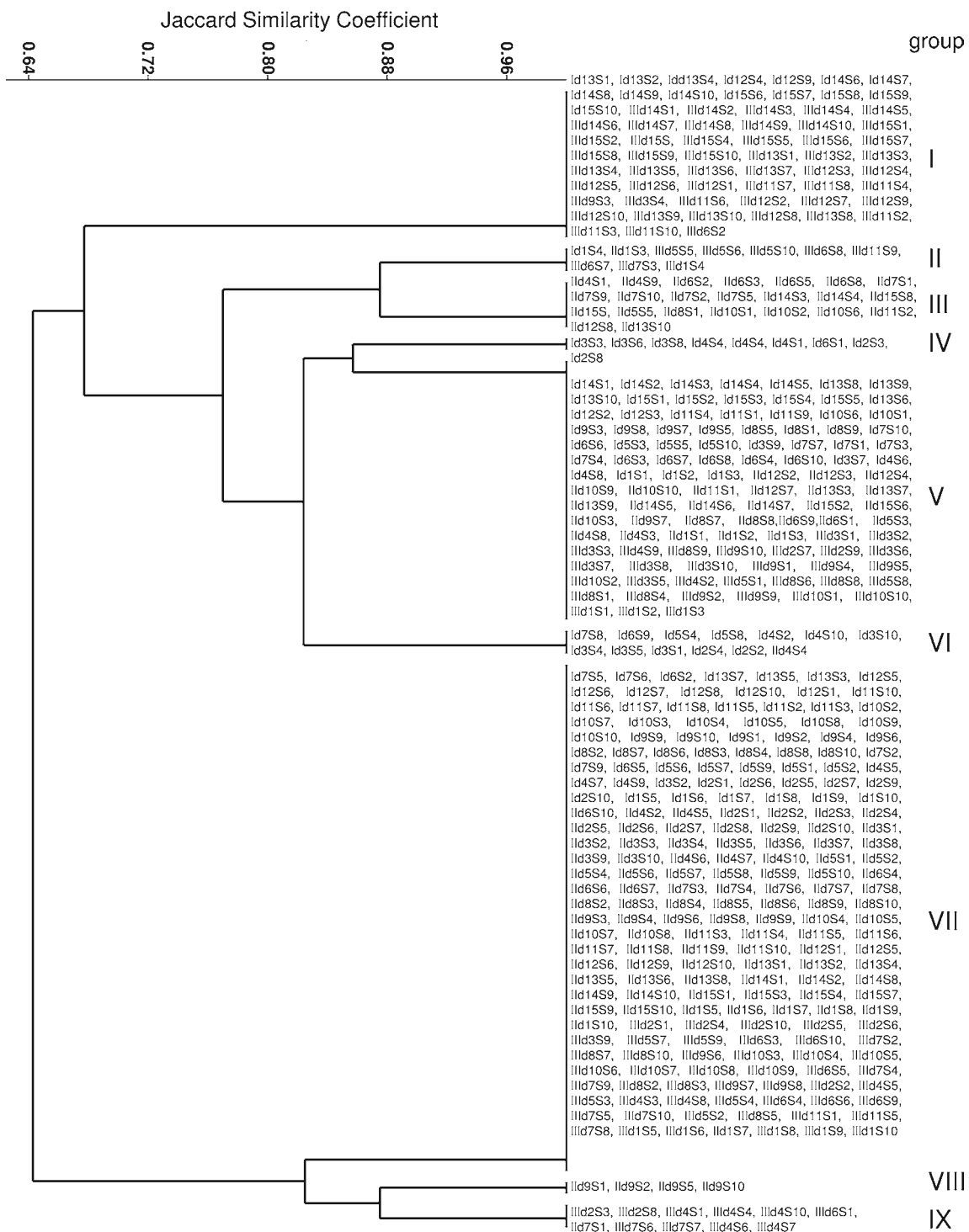
### Yeast distribution in the *taberna* samples

The distributions of the different yeast species in the samples of *taberna* taken from each palm tree are shown in the Fig. 2. The data for the first sample for all three palm trees are

**Table 1** Physicochemical analysis and yeast count of the *taberna* samples obtained from three coyol palms during the 15-day tapping process

Taberna samples	Palm tree I				Palm tree II				Palm tree III			
	Total sugar <sup>a</sup> (% w/v)	pH	Ethanol (% w/v)	Yeast count <sup>b</sup>	Total sugar <sup>a</sup> (% w/v)	pH	Ethanol (% w/v)	Yeast count <sup>b</sup>	Total sugar <sup>a</sup> (% w/v)	pH	Ethanol (% w/v)	Yeast count <sup>b</sup>
1 <sup>c</sup>	11.63±0.54*	7.26±0.02*	nd	3.67±0.03*	11.63±0.54*	7.25±0.02*	nd	3.67±0.03*	11.63±0.54*	7.25±0.02*	nd	3.67±0.04*
2	8.34±0.33*	5.40±0.01*	nd	4.81±0.02*	8.37±0.31*	6.07±0.05**	nd	4.99±0.01**	8.86±0.40*	6.63±0.03***	nd	4.94±0.03**
3	9.45±0.18*	5±0.02*	nd	5.98±0.04*	7.82±0.01**	4.62±0.14**	nd	6.08±0.01**	7.80±0.00**	5.24±0.08***	nd	6.05±0.11***
4	7.31±0.02*	4.83±0.01*	nd	6.86±0.03*	7.31±0.01*	4.36±0.03**	nd	7.02±0.06**	7.11±0.31*	4.46±0.07***	nd	6.98±0.03**
5	5.30±0.00*	4.7±0.00*	0.69±0.00*	6.56±0.02*	4.49±0.24**	4.37±0.04**	0.35±0.03**	6.74±0.03**	5.27±0.00*	4.42±0.01**	0.69±0.01*	6.65±0.03***
6	1.91±0.05*	4.73±0.01*	0.24±0.01*	6.10±0.04*	1.91±0.05*	4.34±0.03**	0.24±0.01*	6.43±0.04**	1.90±0.05*	4.33±0.01**	0.24±0.01*	6.34±0.18*
7	3.44±0.30*	4.80±0.02*	0.19±0.01*	6.19±0.04*	3.28±0.03*	4.45±0.03**	0.19±0.01*	5.67±0.05**	5.79±0.03**	4.68±0.07***	0.26±0.00**	5.80±0.04***
8	5.87±0.17*	4.52±0.06*	0.27±0.00*	6.19±0.01*	4.73±0.11**	4.57±0.06*	0.25±0.03*	5.75±0.07**	6.51±0.09***	4.57±0.01*	0.25±0.01*	5.86±0.06***
9	7.17±0.03*	4.38±0.02*	0.71±0.01 <sup>a</sup> *	6.23±0.02*	8.17±0.20**	4.18±0.02**	0.66±0.00**	6.45±0.03**	8.64±0.08***	4.48±0.01***	0.41±0.02***	6.39±0.07**
10	5.31±0.01*	4.24±0.01*	1.14±0.01*	5.81±0.02*	7.71±0.16**	4.25±0.00*	1.02±0.02*	6.14±0.03**	5.61±0.03*	4.41±0.04**	1.50±0.18*	6.06±0.10**
11	1.91±0.03*	4.15±0.00*	4.33±0.12 <sup>a</sup> **	5.15±0.02*	1.42±0.06**	4.14±0.09*	4.37±0.02**	6.47±0.03**	1.16±0.01***	4.26±0.01**	4.06±0.09*	6.14±0.04***
12	1.90±0.04*	4.07±0.01*	4.40±0.34*	4.15±0.08*	1.39±0.01**	4.05±0.03*	4.80±0.09*	4.57±0.09**	0.84±0.00***	4.5±0.01**	4.49±0.02*	4.47±0.05**
13	0.61±0.04*	4.35±0.02*	4.57±0.02*	3.19±0.02*	1.23±0.02**	4.07±0.03**	4.85±0.05**	3.82±0.01**	0.73±0.01***	4.29±0.03***	4.58±0.02*	3.66±0.04***
14	1.81±0.15*	3.96±0.01*	5.26±0.03*	3.28±0.02*	1.35±0.09**	4.08±0.07**	4.84±0.03**	3.50±0.07*	0.70±0.01***	4.17±0.01***	3.59±0.01***	3.44±0.31*
15	1.80±0.06*	4.00±0.04*	4.89±0.15*	2.83±0.13*	1.81±0.13*	4.02±0.05*	4.81±0.05*	3.51±0.06**	0.88±0.03***	4.11±0.01***	4.64±0.05*	3.34±0.11***

The data are the mean of two repetitions for each sample taken on different days±standard deviation. The comparison of means was made between the same parameter among palm trees; mean values followed by different number of superscript asterisks are statistically different (Fisher's LSD at  $P\leq 0.05$ ). <sup>a</sup> Total sugar indicates the combined sucrose, glucose, and fructose content of a sample. <sup>b</sup> Yeast count is given as Log<sub>10</sub> colony forming units (CFU)/mL. <sup>c</sup> The data for sample 1 is identical for all three palm trees, because the sap from each palm tree was mixed (for more volume) and only the one mixed sample was analyzed. w/v: weight/volume; nd: none detected



**Fig. 1** Cluster analysis of the RFLP patterns of the yeasts isolated from *taberna* samples. The numbers I, II, and III represent to the palm tree I, palm tree II, and palm tree III, respectively, the letter d represents the day (1 to 15), and the letter S represents the strain (1 to 10)

identical because, at this point, the sap from each palm tree was mixed (for more volume) and only the one mixed sample was analyzed. For palm tree I, non-*Saccharomyces* yeasts were predominant in samples 1–11 (Fig. 2a), in which the most abundant species were *C. tropicalis* and *H. guilliermondii*. However, from samples 12–15,

*S. cerevisiae* was also identified, and in samples 14 and 15 the yeast population was composed of 50 % *C. tropicalis* and 50 % *S. cerevisiae*.

Non-*Saccharomyces* yeasts were detected in all the samples from palm tree II (Fig. 2b); *H. guilliermondii* was the most abundant yeast species, followed by *K. unispora* and

**Table 2** Identification of yeast isolates by 5.8S-ITS PCR product size with three restriction endonucleases and sequencing of the D1/D2 domain of the 26S rDNA of representative strains

ITS-RFLP group	AP <sup>a</sup> (bp)	Restriction fragment length (bp)			Sequence length <sup>b</sup> (bp)	Species identification <sup>c</sup>	Identity <sup>d</sup> (%)	Accession no.
		<i>Hae</i> III	<i>Hin</i> I	<i>Hha</i> I				
I	850	310+230+175+135	360+360+130	370+340+140	559	<i>S. cerevisiae</i>	100	KF241567
II	470	365+90	255+215	170+100+60	563	<i>P. kluyveri</i>	100	KF241565
III	740	500+125	370+360	310+190+150+80	556	<i>K. unispora</i>	100	KF241561
IV	620	390+130+100	320+300	310+260	550	<i>M. guilliermondii</i>	100	KF241563
V	520	440+80	260+260	280+250	558	<i>C. tropicalis</i>	100	KF241559
VI	390	390	200+190	210+180	508	<i>C.intermedia</i>	100	KF241558
VII	750	730	340+220+190	320+310+100	550	<i>H. guilliermondii</i>	99	KF241560
VIII	730	475+240	345+245+140	360+280+75	556	<i>K. exigua</i>	100	KF241562
IX	535	390+100	225+160+150	210+180+70	598	<i>P. kudriavzevii</i>	98	KF241564

<sup>a</sup> AP is the 5.8S-ITS amplified product size in base pairs (bp). <sup>b</sup> Sequence length is the size of the D1/D2 domains of the 26S rDNA of the strains amplified with universal primers NL1 and NL4. <sup>c</sup> Yeast species were identified by comparing the 5.8S-ITS PCR product size pattern obtained for each group with the pattern of the strains described by Esteve-Zarzoso et al. (1999), Granchi et al. (1999), Las Heras-Vazquez et al. (2003), Osorio-Cadavid et al. (2008), Stringini et al. (2008), Pham et al. (2011), and Wang and Liu (2013). <sup>d</sup> Identity is the percentage of identical nucleotides in the sequence of the D1/D2 domains of 26S rDNA and the sequence with the best hit in the GenBank database. The ITS-RFLP groups are *Saccharomyces cerevisiae* (I), *Pichia kluyveri* (II), *Kazachstania unispora* (III), *Meyerozyma guilliermondii* (IV), *Candida tropicalis* (V), *Candida intermedia* (VI), *Hanseniaspora guilliermondii* (VII), *Kazachstania exigua* (VIII), and *Pichia kudriavzevii* (*Issatchenkia orientalis*) (IX).

*C. tropicalis*. In samples 2 and 3, the yeast population was 100 % *H. guilliermondii*. From sample 4 onwards, *K. unispora* and *C. tropicalis* were also present. The yeast species identified in samples from palm tree II were different from the species found in palm tree I. *Kazachstania unispora* and *K. exigua*, which were not found in samples from palm tree I, were identified in samples from palm tree II. Furthermore, *S. cerevisiae* was not identified in the samples from palm tree II, although it was found in the samples from palm trees I and III.

In the palm tree III samples (Fig. 2c), non-*Saccharomyces* yeasts predominated in samples 1–10, in which *H. guilliermondii* and *C. tropicalis* were the most abundant. However, from samples 11–15, *S. cerevisiae* predominated. In samples 12–15, the yeast population was 100 % *S. cerevisiae*.

Thus, in palm tree III, in the first 10 days of tapping, non-*Saccharomyces* species predominated, and after 11 days, *S. cerevisiae* dominated in the fermenting samples. These results are similar to those reported previously in winemaking from grapes (Zott et al. 2008).

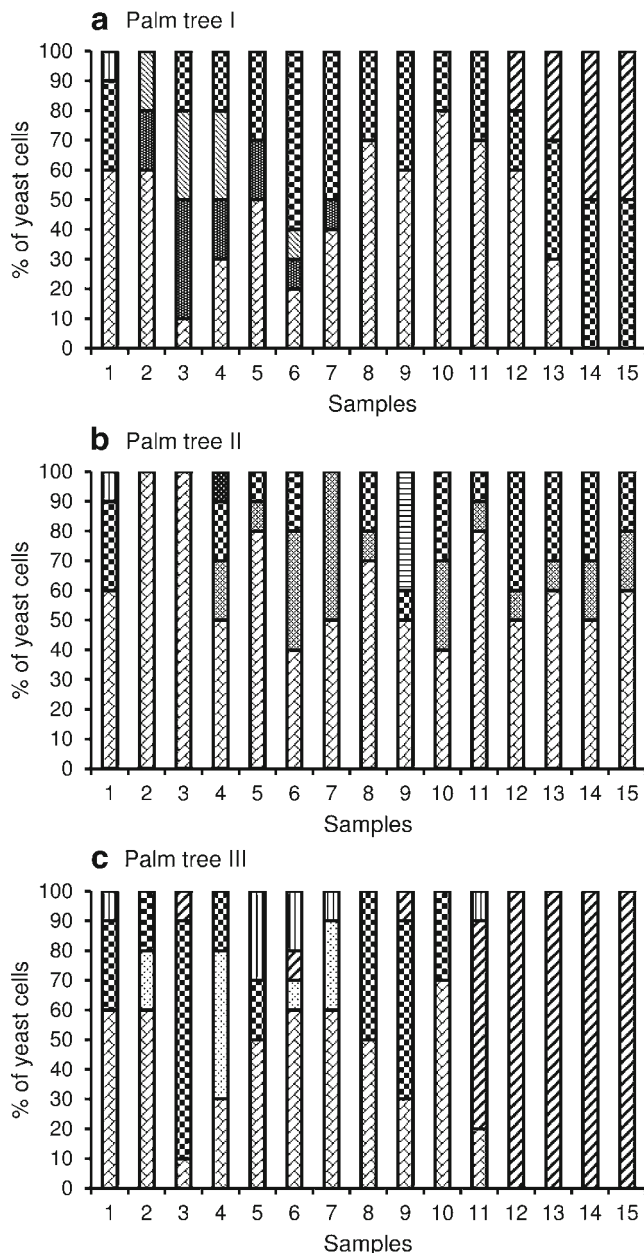
## Discussion

The results from the present study revealed that the composition of the yeast species in the samples varied among the different palm trees. Also, the yeast population in *taberna* was different from the yeast population in palm wines produced from *Elaeis guineensis* in Ghana and Cameroon (Amoa-Awua et al. 2007; Stringini et al. 2009). Different

**Table 3** Number of positive samples and frequency of yeasts species present in *taberna* from three palm trees

Species	Palm tree I		Palm tree II		Palm tree III	
	Positive sample	Frequency (%) <sup>a</sup>	Positive sample	Frequency (%) <sup>a</sup>	Positive sample	Frequency (%) <sup>a</sup>
<i>H. guilliermondii</i>	13	86.67	15	100	11	73.33
<i>K. unispora</i>	nd	-	11	73.33	nd	-
<i>C. tropicalis</i>	14	93.33	12	80	8	53.33
<i>C. intermedia</i>	6	40	1	6.67	nd	-
<i>S. cerevisiae</i>	4	26.67	nd	-	8	53.33
<i>M. guilliermondii</i>	4	26.67	nd	-	nd	-
<i>K. exigua</i>	nd	-	1	6.67	nd	-
<i>P. kudriavzevii</i>	nd	-	nd	-	4	26.67
<i>P. kluyveri</i>	1	6.67	1	6.67	5	33.33

<sup>a</sup> Frequency was calculated based on the total number of samples from the tree. nd: none detected.



**Fig. 2** Distribution of the yeast populations in the *taberna* samples from three palm trees. Samples were collected over the 15-day tapping process. Each sample was collected to the end of the fed-batch fermentation, approximately 12 h. The yeast cells are identified as: *Saccharomyces cerevisiae* (//), *Candida tropicalis* (■), *Hanseniaspora guilliermondii* (\), *Kazachstania unispورا* (⊗), *Kazachstania exigua* (≡), *Pichia kudriavzevii* (⊥), *Pichia kluyveri* (□), *Meyerozyma guilliermondii* (//•), and *Candida intermedia* (\\•)

environmental conditions, different palm trees species, and differences in the production process (tapping) are likely causes of the observed variations in the yeast populations in palm wines from different countries. *Saccharomyces cerevisiae* and *C. tropicalis* have been reported in other palm wines such as those produced in Burkina Faso (Bandji,

Nigeria (palm wine), and Sri Lanka (Toddy) (Atputharajah et al. 1986; Ezeronye and Okerentugba 2000; Ouoba et al. 2012). *Saccharomyces cerevisiae* has been described as being the yeast species responsible of the fermentation and aroma of palm wine (Amoa-Awua et al. 2007; Stringini et al. 2009). However, in the present study the non-*Saccharomyces* yeasts were found to predominate during the early days of *taberna* production, followed by *S. cerevisiae*. This finding suggests that both groups of yeast contribute to ethanol production. Indeed, the observed succession of yeast species in *taberna* production is similar to that reported previously for wine fermentation, where non-*Saccharomyces* yeasts dominated the early stages of the spontaneous fermentation process and showed lower fermentative activity than *S. cerevisiae* (Bauer and Pretorius 2000).

In our analysis, *S. cerevisiae* and *C. tropicalis* dominated the fermentation of *taberna* in the later samples analyzed from palm trees I and III (Fig. 2), and this low diversity of species was reflected in the low yeast counts in these samples (Table 1). The results indicate the importance of these yeast species in the fermentation of palm sap. The predominant role of *S. cerevisiae* in the alcoholic fermentation process was also indicated by the relatively high ethanol content (4.06–4.89 % (w/v) for palm wines I and III) in the later samples (11–15) compared with the ethanol content (0.69–1.5 % (w/v) for palm wines I and III) in samples 5–10 (Table 1). However, in the samples from palm tree II, *S. cerevisiae* was not detected; therefore, the non-*Saccharomyces* yeasts, such as *C. tropicalis*, that were detected in the samples probably also play an important role in the alcoholic fermentation process. *Candida tropicalis* has been reported to have the ability to produce ethanol at high temperatures (Jamai et al. 2001) similar to those recorded in the areas where *taberna* is produced. Thus, the high environmental temperature may explain the dominance of the non-*Saccharomyces* yeasts in *taberna* production because, for instance, the local environmental conditions influence the composition of the microorganism community (Gonzalez et al. 2012). The yeast count was similar among the three palms, and their values decreased in the later samples where the ethanol content was high, pH values and sugar content were low (Table 1); the data indicates that, most likely, the microorganisms were inhibited by these conditions. The survival of microorganisms and their subsequent growth are related closely to the sum of various physical, chemical, and biotic factors such as temperature, humidity, presence of nutrients (such as the high level of sugars in the early samples of palm wine; Table 1), pH, which varied from 7 to 4 in the samples, and the presence of microorganisms that can inhibit the growth of other microorganisms. It has been reported that non-*Saccharomyces* yeasts can affect both the kinetics of growth and the metabolism of *S. cerevisiae* (Lema et al. 1996). These yeasts are capable of anaerobic and aerobic growth and can persist during fermentation, competing with

*S. cerevisiae* for nutrients (Romano et al. 2003). Importantly, the presence of *H. guilliermondii*, *K. unispora*, *K. exigua*, *M. guilliermondii*, *P. kudriavzevii*, *P. kluyveri*, and *C. intermedia* in palm wine has not been described previously. Consequently, differences in species diversity in *taberna* compared with the species diversity in other palm wines could contribute to the particular characteristics of *taberna*. The presence of non-*Saccharomyces* yeasts during fermentation has been associated with increased wine quality and complexity because these yeasts can have a significant effect on the higher levels of alcohols, esters, and fatty acids (Moreira et al. 2011; Zott et al. 2011). *Pichia kudriavzevii* has been shown to have a desirable profile for the higher alcohol levels and low acetaldehyde production during wine fermentation (Clemente-Jiménez et al. 2004). *Hanseniaspora guilliermondii*, an apiculate yeast, has been reported to produce higher alcohols such as 1-propanol, aliphatic higher alcohol, and 2-phenylethanol, as well as significant levels of esters such as 2-phenylethyl acetate and ethyl acetate, and high amounts of acetic acid (Moreira et al. 2011). On the other hand, *Zymomonas mobilis* has also been reported in *taberna* where it was considered to be responsible for the production of ethanol (Alcántara-Hernández et al. 2010). Although in the present study only the yeast populations were analyzed, bacteria could also be one of the ethanol producers in our palm wine samples.

The composition and frequency of yeast species differed among the *taberna* samples from the three coyol palm trees examined, which indicated that the fermentation of *taberna* is a heterogeneous process that depends on the types of vectors as the inoculum source, seasonal variations between days (Serrano-Macias personal communication), and the microbiota present. The yeast species in the palm sap are inoculated randomly by vectors such as insects (flies, ants, wasps, bees, dragonflies, mosquitoes, beetles, and others (Serrano-Macias, pers. comm.)), the material employed in scraping the *canoe* and in sap collection, the air and dust, and the microbiota present in the palm tree. The air acts as a support medium or carrier of microorganisms until they fall and are deposited on the substrate (Garijo et al. 2008). Therefore, the yeast species that were detected in the *taberna* samples were those deposited by any of the possible vectors and were those that could tolerate the conditions in the fermented palm sap, such as pH (which was almost neutral in the first sample and then, from the third day of tapping, had values between 4 and 5; Table 1), the presence of ethanol (0.24–4.89 % (w/v) approximately), the concentration of organic acids, oxygen availability, and temperature (Stringini et al. 2009). The yeast species that were common to all the samples probably were inoculated at the beginning of the tapping process, and were able to tolerate the conditions in the palm sap. They must have remained on the walls of the *canoe* in spite of the scraping, so that the species served as inoculum for the new fed-batch. Although

*S. cerevisiae* was not detected in the samples from palm tree II, the ethanol concentrations in the samples from this tree were similar to the ethanol concentrations in the samples from palm trees I and III (Table 1). These results suggested that *C. tropicalis* and *S. cerevisiae* were probably the ethanol producers in *taberna* production. The results also confirm that inoculation in the palm sap was random; therefore, the yeast population in the samples from the different palm trees can be different.

## Conclusions

The information obtained in the present study revealed the diversity of yeast species in the *taberna* fermentation process. Many yeast species, namely *H. guilliermondii*, *K. unispora*, *K. exigua*, *M. guilliermondii*, *P. kudriavzevii*, and *P. kluyveri*, have not been reported previously in palm wine prepared from other palm trees and may be specific to the sap from *Acrocomia aculeata*, thereby contributing to the typicality of *taberna*. The non-*Saccharomyces* yeasts *H. guilliermondii* and *C. tropicalis* were the most common species in the *taberna* samples, and other yeast species were different in the samples from the three palm trees analyzed. Further studies are necessary to obtain better knowledge about the participation of these yeast species in *taberna* fermentation and to investigate their contribution to the production and final quality of this palm wine.

**Acknowledgments** The authors thank Serrano-Macias for providing the *taberna* samples, and Hasibi Zavala-Nacul and Marcos Ortiz-Caro for critical discussion of the manuscript. The work was funded partially by a grant from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) to J.A. Santiago Urbina.

## References

- Alcántara-Hernández RJ, Rodríguez-Álvarez JA, Valenzuela-Encinas FA, Gutiérrez-Miceli FA, Castañón-González H, Marsch R, Ayora-Talavera T, Dendooven L (2010) The bacterial community in “*taberna*” a traditional beverage of Southern Mexico. *Lett Appl Microbiol* 51:558–563
- Amoa-Awua WK, 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. *J Appl Microbiol* 102:599–606
- Atputharajah JD, Widanapathirana S, Samarajeewa U (1986) Microbiology and biochemistry of natural fermentation of coconut palm sap. *Food Microbiol* 3:273–280
- Balick MJ (1990) Production of coyol wine from *Acrocomia mexicana* (arecaceae) in Honduras. *Econ Bot* 44:84–93
- Bauer FF, Pretorius IS (2000) Yeast stress response and fermentation efficiency: how to survive the making of wine. A review. *S Afr J Enol Vitic* 21:27–51
- Ben Thabet I, Besbes S, Attia H, Deroanne C, Francis F, Drira N, Blecker C (2009) Physicochemical characteristics of date sap “Lagmi” from

- deglet nour palm (*Phoenix dactylifera* L.). Int J Food Prop 12:659–670
- Clemente-Jiménez JM, Mingorance-Cazorla L, Martínez-Rodríguez S, Las Heras-Vázquez FJ, Rodríguez-Vico F (2004) Molecular characterization and oenological properties of wine yeasts isolated during spontaneous fermentation of six varieties of grape must. Food Microbiol 21:149–155
- Cocolin L, Bisson LF, Mills DA (2000) Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. FEMS Microbiol Lett 189:81–87
- Esteve-Zarzoso B, Belloch C, Uruburu F, Querol A (1999) Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. Int J Syst Bacteriol 49:329–337
- Ezeronye OU, Okerentugba PO (2000) Genetic and physiological variants of yeast selected from palm wine. Mycopathologia 152:85–89
- Garijo P, Santamaria P, López R, Sanz S, Olarte C, Gutiérrez AR (2008) The occurrence of fungi, yeasts and bacteria in the air of a Spanish winery during vintage. Int J Food Microbiol 125:141–145
- Gonzalez A, King A, Robeson MS, Song S, Shade A, Metcalf JL, Knight R (2012) Characterizing microbial communities through space and time. Curr Opin Biotech 23:431–436
- Granchi L, Bosco M, Messini A, Vincenzini M (1999) Rapid detection and quantification of yeasts species during spontaneous wine fermentation by PCR-RFLP analysis of the rDNA ITS region. J Appl Microbiol 87:949–956
- Jamai L, Sendide K, Ettayebi K, Errachidi F, Hamdouni-Alami O, Tahri-Jouti MA, McDermott T, Ettayebi M (2001) Physiological difference during ethanol fermentation between calcium alginate-immobilized *Candida tropicalis* and *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiol Lett 204:375–379
- Jepersen L (2003) Occurrence and taxonomic characteristic of strains of *Saccharomyces cerevisiae* predominant in African indigenous fermented foods and beverages. FEMS Yeast Res 3:191–200
- Jeyaram K, Mohendro W, Capece A, Romano P (2008) Molecular identification of yeast species associated with ‘Hamei’ a traditional starter used for rice wine production in Manipur, India. Int J Food Microbiol 124:115–125
- Kadere T, Miyamoto T, Oniang’o RK, Kutina PM, Njoroge SM (2008) Isolation and identification of the genera *Acetobacter* and *Gluconobacter* in coconut toddy (mnazi). Afr J Biotechnol 7:2963–2971
- Karamoko D, Djeni NT, N’guessan KF, Bouatenin KMJ, Dje KM (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
- Kurtzman CP, Robnett CJ (1998) Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. Antonie Van Leeuwenhoek 73:331–371
- Las Heras-Vázquez FJ, Mingorance-Cazorla L, Clemente-Jimenez JM, Rodríguez-Vico F (2003) Identification of Yeasts species from orange fruit and juice by RFLP and sequence analysis of the 5.8S rRNA gene and the two internal transcribed spacers. FEMS Yeast Res 3:3–9
- Lema C, Garcia-Jares C, Orriols I, Angulo L (1996) Contribution of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* populations to the production of some components of Albarino wine aroma. Am J Enol Vitic 47:206–216
- Moreira N, Pina C, Mendes F, Couto JA, Hogg T, Vasconcelos I (2011) Volatile compounds contribution of *Hanseniaspora guilliermondii* and *Hanseniaspora uvarum* during red wine vinifications. Food Control 22:662–667
- Nur Aimi R, Abu Bakar F, Dzulkifly MH (2013) Determination of volatile compounds in fresh and fermented Nipa sap (*Nypa fruticans*) using static headspace gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Int Food Res J 20:369–376
- Osorio-Cadavid E, Chaves-López C, Tofalo R, Paparella A, Suzzi G (2008) Detection and identification of wild yeasts in Champús, a fermented Colombian maize beverage. Food Microbiol 25:771–777
- Ouoba L, Kando C, Parkouda C, Sawadogo-Lingani H, Diawara B, Sutherland JP (2012) The microbiology of Bandji, palm wine of *Borassus akeassii* from Burkina Faso: identification and genotypic diversity of yeasts, lactic acid and acetic acid bacteria. J Appl Microbiol 113:1428–1441
- Pham T, Wimalasena T, Box WG, Koivuranta K, Storgards E, Smart KA, Gibson BR (2011) Evaluation of ITS PCR and RFLP for differentiation and identification of brewing yeast and brewery ‘Wild’ yeast contaminants. J Inst Brew 117:556–568
- Romano P, Fiore C, Paraggio M, Caruso M, Capece A (2003) Function of yeast species and strains in wine flavour. Int J Food Microbiol 86:169–180
- Santiago-Urbina JA, Verdugo-Valdez AG, 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
- Solieri L, Landi S, De Vero L, Giudici P (2006) Molecular assessment of indigenous yeast population from traditional balsamic vinegar. J Appl Microbiol 101:63–71
- Stringini M, Comitini F, Taccari M, Ciani M (2008) Yeast diversity in crop-growing environments in Cameroon. Int J Food Microbiol 127:184–189
- Stringini M, Comitini F, Taccari M, Ciani M (2009) Yeast diversity during tapping and fermentation of palm wine from Cameroon. Food Microbiol 26:415–420
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol Biol Evol 28:2731–2739
- Uzochukwu SVA, Balogh E, Tucknott OG, Lewis MJ, Ngoddy PO (1999) Role of palm wine yeast and bacteria in palm wine aroma. J Food Sci Technol 36:301–304
- Verdugo Valdez A, Segura-García L, Kirchmayr M, Ramirez Rodriguez P, González Esquinca A, Coria R, Gschaedler Mathis A (2011) Yeast communities associated with artisanal mezcal fermentations from *Agave salmiana*. Antonie Van Leeuwenhoek 100:497–506
- Wang C, Liu Y (2013) Dynamic study of yeast species and *Saccharomyces cerevisiae* strains during the spontaneous fermentations of Muscat blanc in Jingyang, China. Food Microbiol 33:172–177
- Zott K, Miot-Sertier C, Claisse O, Lonvaud-Funel A, Masneuf-Pomarede I (2008) Dynamics and diversity on non-*Saccharomyces* yeasts during the early stages in winemaking. Int J Food Microbiol 125:197–203
- Zott K, Thibon C, Bely M, Lonvaud-Funel A, Dubourdieu D, Masneuf-Pomarede I (2011) The grape must non-*Saccharomyces* microbial community: impact on volatile thiol release. Int J Food Microbiol 152:210–215