



INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ

REPORTE DE RESIDENCIA PROFESIONAL

NOMBRE DEL PROYECTO:
**Evaluación de la dinámica microbiana durante la
fermentación de la “taberna”, una bebida autóctona de
Chiapas**

PRESENTA:
MENDOZA AVENDAÑO CLAUDIA

ASESOR:
M.C. LUCIA MARÍA CRISTINA VENTURA CANSECO

REVISORES:
DRA. TERESA AYORA TALAVERA
DR. MIGUEL ABUD ARCHILA

TUXTLA GUTIÉRREZ, CHIAPAS; 09 DE DICIEMBRE DEL 2011

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	4
2. JUSTIFICACIÓN.....	5
3. OBJETIVOS.....	5
3.1 Objetivo general.....	5
3.2 Objetivos Específicos	5
4. CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA EN LA QUE PARTICIPÓ	6
5. PROBLEMAS A RESOLVER	6
6. ALCANCES Y LIMITACIONES	6
7. FUNDAMENTO TEÓRICO	7
7.1. Vino de palma	7
7.2. La taberna.....	8
7.2.1. Proceso de obtención de la taberna	9
7.2.2. Propiedades atribuidas a la taberna	11
7.2.3. Estudios previos de la taberna	11
7.3. Bacterias ácido acéticas.....	12
7.3.1. Características generales de las bacterias ácido acéticas	12
7.3.2. Fuentes obtención de bacterias ácido acéticas	13
7.3.3. Taxonomía de bacterias ácido acéticas.....	15
7.3.4. Necesidades nutricionales	18
7.3.5. Oxidación del acetato, del lactato y de los ácidos orgánicos.....	18
7.3.6. Oxidación de etanol	19
7.3.7. Métodos de aislamiento e identificación de bacterias ácido acéticas	22
7.3.7.1. Cultivo.....	22
7.3.7.2. Técnicas moleculares.....	23

8.	PROCEDIMIENTO Y DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS	24
8.1.	Recolecta de taberna “in vivo”	24
8.2.	Conservación de muestras de taberna	25
8.3.	Caracterización fisicoquímica de la taberna	25
8.3.1.	Cuantificación de azúcares residuales	25
8.3.3.	Determinación de pH	25
8.3.4.	Determinación de densidad	26
8.3.5.	Determinación de °Brix	26
8.4.	Cinética de crecimiento de los microorganismos en la taberna	26
8.5.	Identificación y aislamiento de bacterias ácido acéticas	27
8.5.1.	Identificación por pruebas de catalasa	28
8.5.2.	Identificación por tinción de Gram	28
8.5.3.	Oxidación de etanol	28
8.5.4.	Oxidación de acetato y lactato	29
8.5.5.	Producción de ácido acético	29
8.5.6.	Conservación de cepas	29
9.	RESULTADOS	30
9.1.	Caracterización fisicoquímica de la taberna	30
9.2.	Cinética de crecimiento de los microorganismos en la taberna	32
9.3.	Identificación y aislamiento de bacterias ácido acéticas en la taberna	34
9.3.1.	Características morfológicas de las BAA aisladas de la taberna	34
9.3.2.	Pruebas bioquímicas realizadas a las bacterias ácido acéticas aisladas de la taberna	37
10.	CONCLUSIÓN	42
11.	RECOMENDACIONES	43

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS Y VIRTUALES.....	44
ANEXOS.....	50

1. INTRODUCCIÓN

En México, la “taberna” es una tradicional bebida alcohólica producida por fermentación natural de la savia de la palma de coyol *Acrocomia aculeata*. Es una bebida dulce, efervescente, producida y consumida en la región sur de México, similar al “vino de palma” de África (Rodríguez-Álvarez *et al.* 2010)

El vino de palma es principalmente producido por fermentación natural de la savia de plantas tropicales de la familia Palmae, tales como la palma aceitera (*Elaeis guineensis*) (Inwachukwu *et al.* 2006 citado por Stringini *et al.* 2009).

La presencia de diferentes microorganismos, especialmente las bacterias y las levaduras responsables de la fermentación de vino de palma ha sido reportado por Bassir (1962), Faparusi (1966) y Okafor (1977) (citado por Obire, 2005).

Se ha reportado la presencia de las levaduras que coexisten con otros microorganismos como son las bacterias ácido lácticas y ácido acéticas en diferentes alimentos y bebidas fermentados indígenas (Stringini *et al.* 2009).

De ahí que se puede suponer que algunos de los beneficios que aporta la taberna pueden deberse tanto a sus componentes nutricionales, como a la flora microbiana presente.

Estos microorganismos se encuentran presentes en los ingredientes (sustrato), utensilios empleados y en el medio ambiente; éstos, se van presentando y adaptando, de acuerdo a las características del sustrato y el ajuste que éste va adquiriendo a lo largo del proceso de fermentación. La mayoría de los alimentos fermentados tradicionalmente son elaborados mediante un sustrato que se va fermentando de manera natural o por la adición de cultivos iniciadores (Tamang, 1998).

Tradicionalmente, el enfoque estándar para la identificación de microorganismos se ha basado en el análisis fenotípico. Las cepas aisladas son examinadas por varios parámetros morfológicos, bioquímicos y propiedades fisiológicas que son sistemáticamente comparados con descripciones estándares para identificar al género y las especies. En general, es necesario llevar a cabo unas 100 pruebas individuales para obtener una identificación razonablemente confiable (Kurtzman y Fell 1988, Barnett *et al.* 2000 citado por Beh *et al.* 2006).

Los métodos moleculares basados en análisis de ADN se están utilizando para identificar rápidamente a nivel de género y especies de levaduras. La carga de trabajo es mínima y, generalmente, se pueden obtener datos confiables en 1 o 2 días. Varios enfoques son utilizados. La prueba más definitiva y universal

determina la secuencia de bases en segmentos de ADN ribosomal. Otras pruebas se basan en la determinación del polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) de los segmentos del ADN ribosomal, la hibridación con sondas específicas de ácidos nucleicos, y la reacción en cadena de polimerasa (PCR) con iniciadores específicos para la especie (Beh *et al.* 2006)

2. JUSTIFICACIÓN

La taberna es una bebida fermentada, obtenida de la savia que se extrae del centro del tronco de la palma de coyol (*A. aculeata*) es consumida en gran parte de la población de las regiones de la Sierra Madre de Chiapas. Es muy apreciada por su sabor, porque no ocasiona la pérdida de lucidez e incluso se le atribuyen propiedades medicinales para la cura de enfermedades gastrointestinales como úlceras y gastritis, anorexia e infecciones renales.

La presencia de diferentes microorganismos, especialmente las levaduras y bacterias Gram positivas y negativas responsables de la fermentación de esta bebida, han sido reportadas en un primer estudio mediante técnicas tradicionales, un segundo estudio confirmó la presencia de los géneros *Zymomonas*, *Lactobacillus* y *Acetobacter*, a lo largo de la fermentación.

Hasta el momento no existen reportes que nos indiquen la composición de esta bebida fermentada, ni mucho menos la dinámica microbiana lo largo de la fermentación de esta bebida.

Por todo lo anterior el objetivo de este proyecto es conocer los diversos grupos de microorganismo presentes y su dinámica durante la fermentación de la savia así como identificar a las bacterias ácido acéticas (BAA) que intervienen en la fermentación de la taberna.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Evaluar la dinámica poblacional de la taberna.

3.2 Objetivos Específicos

Evaluar el crecimiento de levaduras, bacterias ácido acéticas, lácticas, *Zymomonas* y mesofílicas durante el proceso de fermentación *in vivo* de la “taberna”

Analizar fisicoquímicamente a la taberna durante la fermentación *in vivo*.

Aislar e identificar las bacterias ácido acéticas mediante la amplificación de la región 16S-23S ADNr y digestión con enzimas de restricción.

4. CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA EN LA QUE PARTICIPÓ

El proyecto se llevó a cabo en el laboratorio de investigación del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, ubicado en Carretera Panamericana km. 1080

El laboratorio de Investigación cuenta con material de cristal, balanzas analíticas y granatarias, cámaras de incubación, microscopios, autoclaves, reactivos, etc. Es un área donde los estudiantes de la Maestría en Ciencias de Ingeniería bioquímica y alumnos de la Licenciatura en Ingeniería Bioquímica realizan trabajos de investigación.

5. PROBLEMAS A RESOLVER

Una de los principales problemas que se tuvo en este proyecto fue en la toma de muestra, debido a que la palma de donde se extraía la taberna se encontraba en el municipio de Villaflores, Chiapas, lo cual hacía difícil su traslado.

También se tuvo dificultades en la disponibilidad de algunos materiales y reactivos, lo cual repercutió en la realización de algunas actividades.

6. ALCANCES Y LIMITACIONES

El proyecto permitió conocer la dinámica de los diferentes microorganismos durante el proceso de fermentación de la taberna, así también conocer algunas de sus características fisicoquímicas. Se logró aislar 34 colonias de bacterias acéticas provenientes de los primeros 5 días de fermentación.

Debido al tiempo y la falta de algunos materiales y reactivos, no fue posible realizar la identificación de las bacterias ácido acéticas mediante la amplificación de la región 16S-23S ADNr y digestión con enzimas de restricción.

7. FUNDAMENTO TEÓRICO

7.1. Vino de palma

El vino de palma es una bebida alcohólica obtenida de la savia fermentada de plantas tropicales de la familia Palmae (Stringini et al. 2009). Es una bebida alcohólica que se produce y se consume en cantidades muy grandes en África occidental, y es conocido según la región como “mimbo” en Camerún, “nsfufo” en Ghana, “emu” en Nigeria (Jespersen, 2003 citado por Stringini et al. 2009).

En varios países de África, la savia del árbol de palma se extrae y se deja la fermentación espontánea, que permite la proliferación de especies de levaduras para convertir el sustrato dulce en una bebida alcohólica (Amoa-Awua et al., 2007). Las especies de taberna y el método para obtener la savia varían de acuerdo con el lugar de elaboración (Okafor, 1975).

La savia de palma se obtiene de las inflorescencias masculinas inmaduras (sangrado de inflorescencia) o del tronco (sangrado del tronco). Sin embargo, en Camerún y Ghana, el proceso de sangrado de la savia implica primero la tala o el corte de los árboles, dejándolo por un período de alrededor de 2 semanas para que la savia se concentre (Stringini et al., 2009), enseguida se eliminan las hojas de la región meristemática y se le realiza una incisión rectangular de aproximadamente 7.5 cm, en el núcleo vegetativo del árbol (Amoa-Awua et al., 2007), en donde drena la savia para ser recolectada. Se hace una incisión en el fondo del pozo a través del cual se inserta un tubo de bambú para recuperar la savia en un recipiente, que puede ser una olla de barro o un recipiente de plástico (Okraaku-Offeri 1968, Hartley 1984 citado por AmoA-Awua et al., 2007).

Si el vino de palma no se consume en pocos días, comenzará a desarrollar un gusto avinagrado, lo cual es inaceptable para los consumidores (Stringini et al., 2009).

El jugo fresco de la palma es dulce, claro e incoloro que contiene de 10 a 12% de azúcares, principalmente sacarosa (Okafor, 1975).

La presencia de varios microorganismos, en especial las bacterias y levaduras responsables de la fermentación del vino de palma ha sido reportada por Bassir (1962), Faparusi (1966) y Okafor (1977). Durante la fermentación, los azúcares en el vino de palma son metabolizadas a alcohol y ácidos orgánicos, como resultado la savia pierde su dulzura (Okafor, 1975). El vino de palma puede ser sometido a una segunda fermentación, si se le adiciona azúcar al producto, alargando su fermentación por 4 a 7 días más (Amoa-Awua et al., 2007).

Dentro de las primeras 24 horas de fermentación, el contenido de azúcares totales en el vino de palma es alrededor de 14-11%, el pH inicial es reducido de 7.4-6.8 a 4.5-4.0 y el contenido de alcohol tiene un rango de 1.4-2.8%, después del cuarto día los azúcares totales se mantienen entre 8-12%, el pH se mantiene entre 3.5-4%. En muestras en las que la savia fue acumulada toda la noche los niveles de alcohol son mucho más altos 3.24-6%. El porcentaje de ácido láctico después de los primeros días se mantiene entre 0.1-0.3% mientras que el ácido acético después de los primeros 6 días es del 0.2-0.4% (Amoa-Awua et al., 2007).

7.2. La taberna

La taberna es una bebida fermentada, obtenida de la savia de la palma *Acrocomia aculeata*, producida en el Sureste de México mejor conocida como palma de coyol (Figura 1). Su nombre deriva del náhuatl “coyolli”, que significa “cascabel” y antiguamente se le conocía como “cuauhcoyolli” o sea árbol de cascabeles, ya que al agitar el fruto seco, éste produce un sonido semejante (Cabrera-Cachón, 1991).

Existe la posibilidad de que la palabra “taberna”, proceda, en este caso particular de lo siguiente: “ocmanazoyatl”, significa: “palma de la que se hace vino” (ocmana-zoyatl: octli, vino; mana, hacer; zoyatl, palma), de ahí derivó la palabra “ocnamacoyan”, que quiere decir “donde se vende vino” y su equivalente en castellano pasó a ser “taberna” (Corzo, 1978).



Figura 1. (A) *Acrocomia aculeata* o palma de coyol. (B) Taberna o vino de coyol.

El gran inconveniente para la obtención de esta bebida es el hecho de que se tiene que derribar a la palma, generalmente antes de la floración. Esta situación aunada a la dificultad que presentan sus semillas para germinar y su lento crecimiento, ha traído como consecuencia la reducción en el número de individuos de sus poblaciones.

7.2.1. Proceso de obtención de la taberna

Durante los meses calurosos de Febrero a Mayo, la población local elige cuidadosamente las palmas maduras (antes de la floración y que hayan tenido frutos al menos una vez), que no tenga tallos delgados, para ser cortadas y llevadas a una huerta donde serán dejados en reposo en posición horizontal (Figura 2), esto con la finalidad de permitir el drenado de la savia hacia una cavidad realizada cerca del extremo apical, conocida como “canoa” (Balick 1990, Cruz-Molina C., 2010; Zuart-Macías et al. 1999), donde se irá acumulando la savia de la palma (Figura 3).



Figura 2. Tallos de la palma de coyol preparados para la elaboración de la taberna.

La taberna se obtiene mediante el siguiente proceso: de manera muy cuidadosa con un machete largo, el tabernero, despoja capa tras capa de la parte apical de la palma, hasta hacer evidente la presencia del palmito (Balick, 1990). Un corte rectangular de unos 15 cm de largo x 10 cm de ancho se convierte en la canoa de drenado, el cual es tapado con una lámina gruesa de plástico, cartones o las propias vainas de la palma; si la cavidad no es cubierta, moscas, mosquitos y abejas principalmente, lo invadirán debido a su dulce contenido (Cruz-Molina C., 2010). Durante los primeros días este líquido es un aguamiel dulce que se

fermenta rápidamente. Es necesario vaciar todos los días esta cavidad para que la savia continúe drenando, la savia se recoge dos veces al día, de la mayoría de palmas (Cruz-Molina., 2010); sin embargo, el flujo de la savia, recién cortadas las palmas, es tan elevado que se puede coleccionar tres veces al día durante los primeros días de cosecha. Esta taberna recuperada se deposita en recipientes para que la fermentación continúe por 5 ó 6 días antes de adicionarle azúcar y evitar la producción de ácido acético. Según Balick (1990), cada árbol tiene una vida productiva de aproximadamente 25 días, obteniéndose un promedio de 2 a 5 litros de taberna por día; esto, si el propietario raspa el corazón de la corteza o palmito diariamente, es decir, que corte una capa final de la corteza para remover la parte expuesta de la cavidad, haciendo que se genere una abertura nueva. Sin embargo es necesario tener mucho cuidado al momento de realizar los cortes con el fin de evitar cualquier tipo de contaminación.



Figura 3. Canoa de drenaje de la savia.

La savia de la palma se extrae de la cavidad con una cuchara con mango largo o un carrizo (Cruz-Molina., 2010); y se deja que continúe la fermentación espontánea en recipientes de plástico grandes, de aproximadamente 50 L de capacidad, para luego colocarlos en recipientes de 1 y $\frac{1}{2}$ litros para su venta (Cruz-Molina., 2010).

Después de cinco días de fermentación en los botes de plástico, tiempo máximo que guardan los productores el vino de coyol para su consumo, se le adiciona azúcar para evitar lo que ellos conocen como descomposición, que no es más que la simple conversión del etanol en ácido acético.

7.2.2. Propiedades atribuidas a la taberna

La taberna, aparte de ser una bebida reconocida por los chiapanecos, debido a su sabor tan exquisito, se le ha reconocido por tener propiedades medicinales, pues se emplea para: desinflamar, cicatrizar úlceras, tratamientos de vesícula, próstata y como laxante (*vox populi*). No obstante, hasta el momento se desconocen los agentes microbiológicos o bioquímicos, que le confieren estas características.

Estas propiedades “curativas” de la taberna son similares a las atribuidas a otras bebidas fermentadas como la tuba, el tepache, el pozol y el pulque, principalmente a los beneficios relacionados con el sistema digestivo.

7.2.3. Estudios previos de la taberna

La mayoría de las bebidas fermentadas, hasta hoy en día, son tradicionales y se producen en forma regional; generalmente no se sabe de ellos fuera de su lugar de origen. Desde tiempos inmemorables, forman parte de la dieta y del acervo cultural de muchos grupos étnicos de diversas partes del mundo (Herrera, 2003)

Hasta la fecha, de los más de 200 alimentos y bebidas fermentadas que hay en el país, únicamente se han estudiado 12, donde el grado de avance de la investigación de cada uno de ellos es variable. Puede considerarse que los conocimientos microbiológicos y químicos son aún incipientes, con excepción del pozol, el tesgüino, tejuino, atole agrio, tepache, tibicos y pulque, en donde se establecen que existe un tipo de fermentación láctica, acética y alcohólica. Así mismo, se ha logrado aislar e identificar los microorganismos claves que participan en su transformación (Herrera, 2003).

En el caso de la taberna, se realizó el aislamiento de microorganismos a las 28 h de la fermentación empleando análisis morfológico y bioquímico, aislándose 15 cepas con características propias de BAL (cocos y bacilos), 18 cepas Gram negativas y 16 cepas de levaduras con características que sugieren la presencia de *Saccharomyces cerevisiae*, *Brettanomyces*, *Torulopsissu* y *Schizosacharomyces* (Rodríguez-Álvarez, 2008).

Un segundo estudio de la taberna en 2010, utilizando el 16S rADN para el análisis molecular al consorcio bacteriano durante la cinética de fermentación de la bebida se determinó la presencia de los géneros *Zymomonas*, *Lactobacillus* y *Acetobacter*, además de la presencia del género de las Enterobacterias (Rodríguez-Álvarez et al., 2010).

7.3. Bacterias ácido acéticas

7.3.1. Características generales de las bacterias ácido acéticas

Se trata de bacterias Gram-negativas (Gram-positivas en cultivos viejos), aerobias estrictas y de morfología variable; generalmente las células son bacilares en pareja y a veces forman cortas cadenas. Su tamaño varía entre 0.4 a 1 μm de ancho y de 0.8 a 4.5 μm de largo. Son catalasa positiva y oxidasa negativa. El pH óptimo para su crecimiento es 5-6.5 pero pueden crecer en pH más bajos entre 3-4. Hay especies inmóviles, mientras que otras son móviles presentando flagelos polares o peritricos (Sengun y Karabiyikli, 2010).

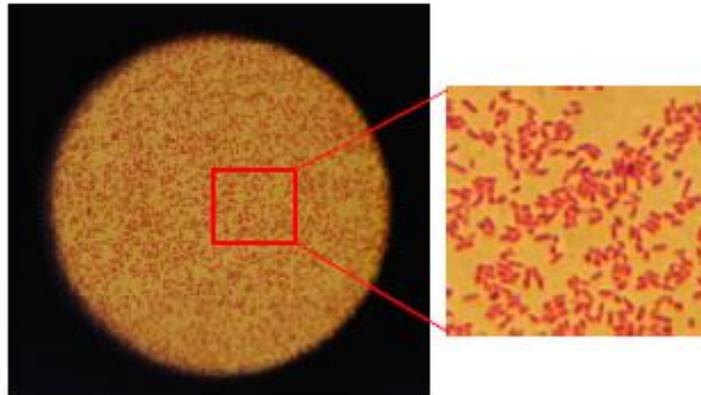


Figura 9.- Bacterias ácido acéticas encontradas en vinagre de Arándanos (*Vaccinium corymbosum*).

Este grupo de microorganismos necesita del oxígeno como aceptor final de electrones, por lo que tienen un metabolismo aerobio obligado. Además de la fermentación acética, pueden formarse ácido glucurónico de la glucosa, sorbosa del sorbitol, dihidroxiacetona de la glicerina y 5-cetogluconato de la glucosa. Las bacterias ácido acéticas oxidan muchos alcoholes y ácidos orgánicos como el pirúvico y el láctico; algunas de ellas producen celulosa (caso único en las bacterias). *Gluconobacter* es siempre catalasa positivo, pero dentro del género *Acetobacter* la prueba de la catalasa puede dar una reacción débil o incluso nula (*A. peroxydans*). La característica metabólica que define al grupo es la capacidad de utilizar una gran diversidad de sustratos y la incapacidad de oxidarlos completamente. A pesar de tratarse de microorganismos aerobios, acumulan en el medio que crecen una gran cantidad de catabolitos diferentes (Parés y Juárez, 2002).

7.3.2. Fuentes obtención de bacterias ácido acéticas

Las bacterias ácido acéticas se encuentran dispersas en la naturaleza y un gran número de cepas han sido aisladas de gran variedad de fuentes, se han encontrado en flores, frutas, vino de uva, sidra, cerveza, vinagre, virutas de madera de generadores de vinagre y acetificadores, entre otros . Como se puede ver en la tabla 1, las BAA pertenecientes al género *Acetobacter* han sido aisladas con mayor frecuencia que las cepas del género *Gluconobacter*, mientras que los géneros *Acidomonas*, *Kozakia*, *Swaminathania*, *Saccharibacter*, *Neoasia*, *Granulibacter*, *Tanticharoenia* y las cepas de *Ameyamaea* son raramente encontradas en las fuentes de aislamiento comunes (Sengun y Karabiyikli, 2010).

Tabla 1. Fuentes de aislamiento de bacterias ácido acéticas.

Fuente	Especie	Referencia
Café arábigo (<i>Coffea arabica</i>)	<i>Ga. Diazotrophicus</i>	Jimenez-Salgado et al. (1997), Madhaiyana et al. (2004)
Plantas de café	<i>Ga. azotocaptans</i> , <i>Ga. johannae</i>	Fuentes-Ramírez et al. (2001)
Cacao fermentado	<i>A. pasteurianus</i> ,	Ardhana y Flett (2003)
Habas	<i>A. syzygii</i> <i>A. lovaniensis</i> <i>A. tropicales</i> <i>A. malorum</i> <i>G. oxydans</i> <i>A. aceti</i> <i>A. pasteurianus</i> <i>A. lovaniensis</i>	Carr et al. (1979) De Vuyst et al. (1979) Lagunes-Gálvez et al. (2007) Nielsen et al. (2007) Schwan y Wheals (2004)
Frutas tropicales (Coco, mango, guayaba, zapote, etc.)	<i>A. orleanensis</i> <i>A. lovaniensis</i> <i>A. syzygii</i> <i>A. indonesiensis</i> <i>A. cibinongensis</i> <i>A. tropicalis</i> <i>A. orientalis</i> <i>G. oxydans</i> <i>G. frateurii</i> <i>Ga. hansenii</i> <i>F. aurantia</i>	Lisdiyanti et al. (2003)
Manzana podrida	<i>A. malorum</i>	Cleenwerck et al. (2002)
Raíces del maíz	<i>G. azotocaptans</i>	Menhaz, Weselowski y Lazarovits (2006)
Cereza (<i>Prunus</i> sp)	<i>G. cerinus</i>	Yamasa y Akita (1984)
Fresa	<i>G. frateurii</i>	Manson y Claus (1989)
Uva	<i>G. oxydans</i> <i>A. aceti</i>	Joyeux et al. (1997) Gonzales (2005)
Flores (ixora, lantana, etc)	<i>Ga. liquefaciens</i> <i>A. orleanensis</i> <i>A. indonesiensis</i> <i>A. syzygii</i> <i>A. orientalis</i> <i>G. oxydans</i> <i>G. frateurii</i> <i>As. siamensis</i> <i>As. indonesiensis</i> <i>F. aurantia</i>	Yamada et al. (1997) Lisdiyanti et al.(2003) Yukphan et al. (2009)
Flores del jengibre rojo	<i>Am. chiangmaiensis</i>	
Polen	<i>Sa. florícola</i>	Jojima et al. (2004)
Cerveza	<i>A. cerevisiae</i> <i>A. pasteurianus</i> <i>G. oxydans</i>	Cleenwerck et al. (2002) Skerman, McGowan y Sneath (1980)
Raíces de la caña de azúcar	<i>Ga. diazotrophicus</i>	Yamada et al.(1997)
Cochinilla de la caña de azúcar	<i>Ga. sacchari</i>	Franke et al. (1999)
Palma de azúcar morena, ragi	<i>K. baliensis</i>	Lisdiyanti et al. (2003)
Arroz de tierra húmeda	<i>G. diazotrophicus</i> <i>A. peroxydans</i>	Muthukumarasamy et al. (2005)
Arroz salvaje	<i>Sw. salitolerans</i>	Loganatha y Nair (2004)

Abreviatura: A.: *Acetobacter*, G.:*Gluconobacter*, Ga.: *Gluconacetobacter*, K.: *Kozakia*, As.: *Asaia*, Am.: *Amejamaea*, Sa.: *Sachharibacter*, Sw.: *Swaminathania*, F.:*Frateuria*

Tabla citada por Sengun y Karabiyikli (2011).

7.3.3. Taxonomía de bacterias ácido acéticas

La clasificación de las bacterias acéticas ha variado enormemente en los últimos tiempos. En la actualidad, bajo este nombre se conoce un grupo de bacterias pertenecientes a los géneros *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Gluconacetobacter*, *Acidomonas*, *Asai*, *Kozakia*, *Swaminathania*, *Neoasia*, *Granulibacter*, *Saccharibacter*, *Tanticharoenia* y *Ameyamaea* (Yamada y Yukphan, 2008). Sin embargo esta clasificación está en constante revisión. La tabla 2 muestra la clasificación actual de BAA.

Los criterios bioquímicos y fisiológicos que se utilizan para la identificación a nivel de género en las BA son su capacidad para oxidar D,L-Lactato a CO₂ y H₂O, el grado de oxidación de etanol, la capacidad para formar pigmentos solubles en agua, la capacidad de oxidar glicerol, la de producir ácido 5-cetoglucónico a partir de glucosa, y la propiedad de crecer en medios que contengan etanol y lactato

como única fuente de carbono. (Drysdale y Fleer, 1988 citado por Blasco 2009). El género *Acidomonas* se caracteriza por su capacidad para crecer en metanol. El género *Asaia* por su incapacidad para crecer en un medio con una concentración superior al 0.35% de ácido acético.

Así, las especies de los géneros *Acetobacter* y *Gluconacetobacter* oxidan etanol a ácido acético, pero también pueden oxidar completamente este ácido a CO₂ y H₂O. Las especies de *Gluconobacter* se caracterizan por su incapacidad para oxidar el ácido acético hasta CO₂ y H₂O y por oxidar parcialmente el etanol a ácido acético (González, 2005). Existe un método sencillo que permite diferenciar rápidamente los géneros *Acetobacter* y *Gluconobacter*. Para ello, se preparan tubos inclinados con medio CARR y se inocula en estría. A medida que el crecimiento alrededor de la estría se hace visible, pueden producirse cambios en el color del medio, inicialmente verde. *Gluconobacter* provoca el cambio a amarillo. *Acetobacter* vira inicialmente el medio a amarillo, para volver más tarde al color verde inicial (Parés y Juárez, 2002).

Además de por estas características metabólicas los géneros *Acetobacter* y *Gluconacetobacter*, pueden diferenciarse de los otros en base al tipo de ubiquinona que presentan, así *Acetobacter* presenta la ubiquinona Q9 y *Gluconobacter* la ubiquinona Q10 (Trček y Teuber, 2002 citado por Blasco 2009).

Tabla 2. Especies de los doce géneros de bacterias ácido acéticas.

Genero	Especie	Genero	Especie
<i>Acetobacter</i>	<i>A. aceti</i>	<i>Gluconacetobacter</i>	<i>Ga. azotocaptans</i>
	<i>A. cerevisiae</i>		<i>Ga. diazotrophicus</i>
	<i>A. cibirongensis</i>		<i>Ga. entanii</i>
	<i>A. estunensis</i>		<i>Ga. europaeus</i>
	<i>A. indonesiensis</i>		<i>Ga. hansenii</i>
	<i>A. lovaniensis</i>		<i>Ga. intermedius</i>
	<i>A. malorum</i>		<i>Ga. johanna</i>
	<i>A. nitrogenifigens</i>		<i>Ga. liquefaciens</i>
	<i>A. oeni</i>		<i>Ga. nataicola</i>
	<i>A. orientalis</i>		<i>Ga. oboediens</i>
	<i>A. orleanensis</i>		<i>Ga. rhaeticus</i>
	<i>A. pasteurianus</i>		<i>Ga. sacchari</i>
	<i>A. peroxydans</i>		<i>Ga. saccharivorans</i>
	<i>A. pomorum</i>		<i>Ga. swingsii</i>
	<i>A. syzygii</i>		<i>Ga. Xylinus</i>
<i>Acidomonas</i>	<i>Ac. methanolica</i>	<i>Granulibacter</i>	<i>Gr. Bethesdensis</i>
<i>Asaia</i>	<i>As. bogorensis</i>	<i>Gluconobacter</i>	<i>G. albidus</i>
	<i>As. krungthrpensis</i>		<i>G. cerinus</i>
	<i>As. lannensis</i>		<i>G. frateurii</i>
	<i>As. siamensis</i>		<i>G. japonicus</i>
	<i>As. spathodeae</i>		<i>G. kondonii</i>
			<i>G. oxydans</i>
			<i>G. roseus</i>
			<i>G. sphaericus</i>
			<i>G. thailandicus</i>
			<i>G. wancherniae</i>
<i>Ameyamaea</i>	<i>Am. Chiangmaiensis</i>	<i>Saccharibacter</i>	<i>S. florícola</i>
<i>Neoasaia</i>	<i>N. Chiangmaiensis</i>	<i>Swaminathania</i>	<i>Sw. Salitolerans</i>
<i>Kozakia</i>	<i>K. baliensis</i>	<i>Tanticharoenia</i>	<i>T. sakaeratensis</i>

Tabla adaptada de Yamada y Yukphan (2008) con la combinación de datos de Sengun y Karabiyikli (2011).

En general, las BAA pertenecientes al género *Acetobacter* han sido encontradas con mayor frecuencia que las pertenecientes a *Gluconobacter* (Camu et al. 2007). Las principales diferencias entre esto dos géneros fueron citológicas y fisiológicas. Aunque las pruebas que figuran en la Tabla 3 se utilizan para diferenciar los géneros de BAA, las pruebas fenotípicas por sí solas no son muy confiables y no son muy recomendadas (Cleenwerck y de Vos, 2008). Como podemos ver en la tabla, las BAA son un grupo heterogéneo, que comprende tanto organismos con flagelación peritrica y polar. En los primeros años, el patrón de flagelación se utilizaba en la clasificación de las BAA. Las especies de BAA con flagelación polar se pueden clasificar en el género de *Gluconobacter*, mientras que las especies que presentan flagelación peritrica pertenecen al género *Acetobacter* (Leifson, 1954).

Las BAA tiene dos enzimas, que desempeñan un papel importante en el proceso de oxidación: alcohol deshidrogenasa y aldehído deshidrogenasa. La actividad de la alcohol deshidrogenasa de *Acetobacter* es más estable a altas concentraciones de ácido acético que la del *Gluconobacter*, lo que explica por qué *Acetobacter* produce más ácido acético (Matsushita, Toyama y Adachi, 1994).

Tabla 3. Características diferenciales de los doce géneros de las bacterias del ácido acético

Característica	A	Ac	As	Ga	G	K	S	Sa	N	Gr	T	Am
Flagelación	pe/n	n	pe/n	pe/n	po/n	n	pe	n	n	n	n	po
Oxidación de etanol a ácido acético	+	+	-w ^a	+	+	+	+	v	+	v	+	+
Oxidación de ácido acético a CO ₂ y H ₂ O	+	+	+	+ ^b	-	w	w	-	-	w	-	+
Oxidación de lactato a CO ₂ y H ₂ O	+	w	+	+/-	-	w	w	w	-	+	-	w
Crecimiento en 0.35% de ácido acético contenido en el medio	+	+	-	+	+	+	+	-	+	Nd	+	+
Crecimiento en metanol	-w ^c	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	w
Crecimiento en D-manitol	+/-	w	+/-	+/-	+	+						
Crecimiento en presencia de 30% de D-glucosa	-	-	+	+/-	-/+	-	Nd	+	+	Nd	+	-
Producción de celulosa	-	-	-	+/-	-	-	Nd	-	Nd	Nd		
Producción de levan-como sustancia mucosa de la sacarosa	-/+	-	-	-/+	-	-	Nd	-	-	Nd	-	-
Fijación de nitrógeno molecular	-	-	-	-/+	-	-						
Cetogénesis (dihidroxiacetona) a partir del glicerol	+/-	w	-w	+/-	+	+	+	-	w	-	+	w
<i>Producción de ácido a partir de:</i>												
D-Manitol	-/+	-	+/-	+/-	+	-	-	+	w	-	-	-
Glicerol	-/+	-	+	+	+	+	+	-	+	v	+	w
Rafinosa	-	Nd		-	-	+	Nd	-	+	Nd		
Tipo de ácido graso celular	C _{18:1}											
Tipo de ubiquinona	Q-9	Q-10	Q-10	Q-10	Q-10	Q-10	Q-10	Q-10	Q-10	Q-10	Q-10	Q-10
Composición de bases del ADN (mol % G+C)	52-60	63-66	59-61	55-66	55-63	56-57	57-60	52-53	63.1	59	66.0	65.6

Abreviaturas: A, *Acetobacter*; Ac, *Acidomonas*; As, *Asaia*; Ga, *Gluconacetobacter*; G, *Gluconobacter*; K, *Kozakia*; S, *Swaminathania*; N, *Neoasaia*; Gr, *Granulibacter*; T, *Tanticharoenia*; Am, *Ameyamaea*; pe, peritrico; po, polar; n, ninguno; +, 90% o más de las cepas positivas; w, reacción positiva débil; -, 90% o más de las cepas negativas; V, variable; Nd, No determinado.

^a *Asaia* no produce ácido acético a partir de etanol, con la excepción de una cepa productora de ácido débil (Yamada *et al.* 2000).

^b La sobreoxidación de acetato a CO₂ y H₂O depende de la concentración de acetato en el medio.

^c *A. pomorum* asimila metanol débilmente (Skollek *et al.* 1998).

Tabla citada por Sengun y Karabiyikli (2010).

7.3.4. Necesidades nutricionales

Las necesidades nutricionales de las bacterias acéticas dependen mucho de la fuente de carbono. La mayoría de las cepas son auxótrofas para algunas vitaminas, sobre todo el ácido paraminobenzoico, la niacina, la tiamina y el ácido pantoténico. (Gossele et al.1981).

Pueden utilizar el amoníaco como fuente de nitrógeno, Álvarez y Martines-Drets (1955) aislaron en el suelo *Acetobacter diazotrophicus* que es capaz de fijar nitrógeno atmosférico.

Las bacterias que realizan la fermentación acética de los vinagres de alcohol son capaces de desarrollarse en un medio mineral con dos fuentes de carbono, la glucosa y el etanol; pero con los substratos utilizados en la industria, las necesidades nutricionales son más complejas y para su crecimiento necesita la adición de extractos de levaduras (Divies, 1970).

En condiciones industriales, el crecimiento a partir de glucosa es bastante más ventajoso que el obtenido con el etanol. Durante el ciclo de crecimiento, el rendimiento de la transformación varía de 0.5 a 0.15 g de células formadas por gramo de glucosa mientras que en el caso del etanol el rendimiento es pequeño: varía de 0.048 a 0-0068 g de células formadas por gramo de etanol utilizado.

En el vino, la sidra y la cerveza se asegura un buen crecimiento de bacterias a veces con la adición de fosfato amónico cuando el amoniaco está en cantidad insuficiente.

7.3.5. Oxidación del acetato, del lactato y de los ácidos orgánicos

Las bacterias del género *Gluconobacter* no pueden oxidar el acetato ya que no tiene ciclo tricarboxílico funcional (Williams y Rainbow, 1964; Maragoudakis y Strasmann, 1967). Son deficientes en α -cetoglutarato deshidrogenasa y succinato deshidrogenasa (Greenfieds y Claus, 1972). De todos modos es posible el empleo anabólico del acetato. Las bacterias del género *Acetobacter* tienen además enzimas del ciclo tricarboxílico y por tanto pueden oxidar el acetato. Algunas especies de *Acetobacter* tiene todas las enzimas del ciclo glioxílico; por tanto, pueden utilizar el etanol como única fuente de carbono en medio Hoyer (1898).

Las bacterias del género *Acetobacter* oxidan el etanol en ácido acético y a continuación oxidan el acetato cuando el etanol ha desaparecido del medio de cultivo. El etanol inhibe y limita a las enzimas de oxidación del acetato. El acidó

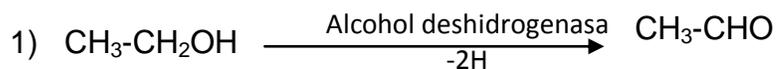
acético inhibe su propia oxidación en concentraciones superiores a 8° Ac (1° Ac= 1 gramo de ácido sulfúrico por 100 ml de solución) a pH=3. Son capaces de degradar el lactato con formación de CO₂; los dos isómeros son oxidados del mismo modo pero a diferente velocidad (de Ley y Schellen, 1984; Dupuy y Maugent, 1963). El producto intermedio es el ácido pirúvico.

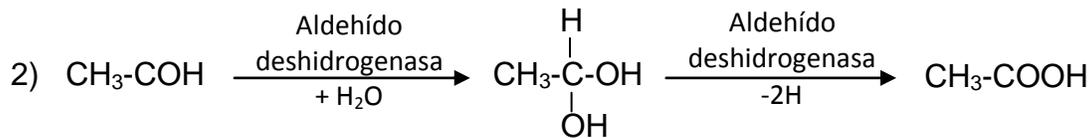
A pH ácido, 3.8, el piruvato es descarboxilado en acetaldehído, el cual es oxidado en ácido acético que se acumula. A pH 6 se oxida una parte del acetato formado y se asimila una parte del sustrato. No obstante, sobre todo a pH 3.8 la cantidad de CO₂ desprendida no corresponde exactamente a la cantidad de ácido acético formado, lo cual indica que podrían estar involucrados otros procesos. Realmente el piruvato puede estar transformando parcialmente en acetoína por *A. rancens* (de Ley, 1984). Dependiendo de las condiciones del medio y de aireación, la oxidación del lactato por *A. rancens* da lugar a la formación de agua, CO₂, ácido acético, acetaldehído y acetoína. Un pH ácido favorece la producción de etanol. Yamada et al (1995) han podido aislar y clonar el gen de la α -acetolactato descarboxilasa de *A. acetii* spp. *xilinum*. Lo han utilizado para transformar una levadura y de este modo hacerla útil para descarboxilar el α - acetolactato.

Las especies del género *Acetobacter* utilizan el conjunto de ácidos orgánicos del ciclo tricarboxílico: málico, succínico, fumárico y cítrico, lo cual no ocurre en el caso de las bacterias del género *Gluconobacter*.

7.3.6. Oxidación de etanol

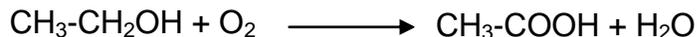
Según, Llaguno y Polo (1991); Lu et al. (1999) y Tesfaye et al.(2002), la producción de ácido acético resulta de una oxidación de etanol por las bacterias acéticas, esto involucra una reacción en dos pasos; en la primera etapa se oxida etanol a acetaldehído y en la segunda el acetaldehído a ácido acético, esta oxidación es catalizada por enzimas que se encuentran en la membrana celular, específicamente en la superficie externa de la membrana citoplasmática, en contacto con el medio de cultivo donde el ácido acético se acumula rápidamente. Estas son alcohol deshidrogenasa y aldehído deshidrogenasa, además existen otros dos importantes componentes que actúan en la oxidación de etanol estos son Citocromo C y terminal oxidasa.





Hidrato de aldehído

La reacción global de la fermentación acética



es una oxidación sin producción de CO_2 , por lo que aparentemente correspondería a una asimilación de oxígeno por una reacción mono-oxigenásica.

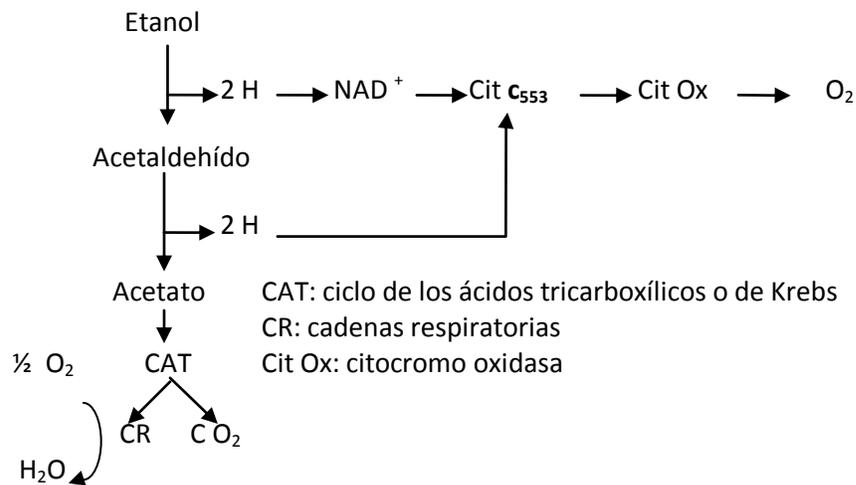
En realidad se trata de dos reacciones deshidrogenásicas en las cuales los 4 H van a formar 2 H_2O con O_2 por una cadena respiratoria que comprende la citocromo oxidasa. Una de las dos moléculas de agua es requerida para la oxidación de acetaldehído (Parés & Juárez, 2002).

Las especies del género *Gluconobacter* no tienen ciclo del ácido cítrico funcional y acumulan acetato. Las del género *Acetobacter* sólo acumulan acetato mientras hay alcohol en el medio, pero luego pueden oxidar el acetato hasta CO_2 . La capacidad para oxidar el acetato no es uniforme en todos los miembros del género *Acetobacter*. Así, *A. peroxydans* oxida el acetato muy lentamente. Si se trabaja con extractos crudos de esta bacteria, al añadir etanol como sustrato se obtiene acetato junto a intermediarios del ciclo de Krebs, lo que sugiere que existe la capacidad de oxidar el acetato transfiriendo los electrones hasta la cadena respiratoria, que no es funcional en el extracto crudo.

En tales extractos se ha podido poner en evidencia la existencia de una alcohol deshidrogenasa NAD^+ dependiente muy parecida a la de los organismos superiores. En cambio, la oxidación del acetaldehído se lleva a cabo por una citocromo C_{553} reductasa sin la intervención de NAD^+ .

En los miembros del género *Gluconobacter*, tanto la oxidación del etanol como la del acetaldehído están ligadas directamente a la citocromo C_{553} reductasa y tiene un pH óptimo entre 5.7 y 6.2. En la subespecie *suboxydans* de *G. oxydans* el pH óptimo se halla entre 3.7 y 4.7, como en la mayoría de los miembros del género

Acetobacter. Esto sugiere que en las bacterias ácido acéticas el transporte de hidrógeno desde el etanol y el acetaldehído puede depender de enzimas diferentes. En términos generales la oxidación del etanol en *Gluconobacter* y *Acetobacter* puede representarse como se indica en la figura 4. En *Acetobacter*, la alcohol deshidrogenasa moviliza todo el NAD⁺ mientras hay alcohol disponible. El ciclo de Krebs se paraliza al no disponer de NAD⁺ (Parés & Juárez, 2002).



Acetobacter

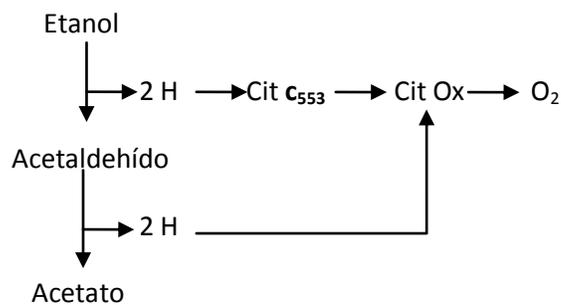


Figura 4. Oxidación del etanol en *Acetobacter* y *Gluconobacter*. Nótese que *Gluconobacter* no requiere participación del NAD⁺.

7.3.7. Métodos de aislamiento e identificación de bacterias ácido acéticas

7.3.7.1. Cultivo

Uno de los mayores obstáculos en la gestión de bacterias ácido acéticas es su cultivo y el mantenimiento de un cultivo puro, especialmente en cepas aisladas de fuentes que contienen un alto nivel de ácido acético (Raspon y Goranovic, 2008).

Aunque hay muchos medios de cultivo desarrollados para el aislamiento y/o identificación de bacterias ácido acéticas, ellos consisten principalmente en los mismos ingredientes con proporciones variables (Tabla 4), lo cual causa diferentes reacciones en el cultivo en placa. En medios que contienen carbonato de calcio, como el medio GYC, después de incubación (2 ó 3 días), las colonias que forman las bacterias acéticas pueden reconocerse porque clarifican el medio a su alrededor (disolución de la dispersión de CaCO_3) formando un halo.

El medio ambiente de donde provienen las BAA también es importante para la selección del medio de aislamiento, ya que hay medios que pueden ser más eficiente en una cepa que en otra, por ejemplo el medio RAE permite el crecimiento de BAA capaces de producir ácido acético en concentraciones de hasta un 10% a 15% (Raspor & Goranovič, 2008). A menudo es necesario añadir antibióticos para prevenir el crecimiento de otros microorganismos como levaduras (pimaricin, cicloheximida) y bacterias ácido lácticas (nisina, penicilina).

Las condiciones incubación que principalmente se utiliza para el crecimiento de BAA es 25- 30°C por 2-5 días (Seearunruangchai et al. Citado por Sengun, 2011).

En fuentes de obtención donde la muestra se encuentra líquida, como el vino, con alto contenido de alcohol y la baja disponibilidad de oxígeno, los microorganismos probablemente necesitan un medio que les permita recuperarse antes de que puedan crecer en medio solido con otra fuente de carbono (Sengun y Karabiyikli, 2010).

Las BAA pueden ser conservadas en agar inclinado a 4°C y liofilizadas, pero la tasa de supervivencia resulta mejor en el almacenamiento con glicerol a -80°C (Du Toit & Pretorius, 2002). Debido a que una gran proporción de la población microbiana puede estar viable pero no cultivable, los métodos de cultivo convencionales, tienen el límite de aislar sólo a las especies o colonias que sean fácilmente cultivables, aunque menos abundante (De Vero et. Al.,2006; Millet and Lovaund-Funel, 2000). De la práctica industrial, se sabe desde hace mucho tiempo que las propiedades de una nueva cepa aislada de BAA pueden cambiar del primer momento de su cultivo en placas Petri. Las cepas cultivadas dependiendo

el número de generaciones, pueden mostrar diferentes características fenotípicas, especialmente en cuanto a la adaptación a determinadas concentraciones de ácido acético se refiere.

Tabla 4. Diferentes medios de cultivo usados para el aislamiento y/o identificación de bacterias ácido acéticas

Medio	Porcentaje	Medio	Porcentaje
YPM (Gullo & Giudici, 2008)		AE (Yamada <i>et al.</i>, 1999)	
Extracto de levadura	0.5%	Glucosa	0.5%
Peptona	0.3%	Extracto de levadura	0.3%
Manitol	2.5%	Peptona	0.4%
Agar	1.2%	Agar	0.9 %
		Etanol absoluto	0.3 % (v/v)
		Ácido acético	0.3 % (v/v)
GYC (Ruiz, 2000)		AE- reforzado (Zahoor <i>et al.</i>, 2006)	
Glucosa	5%	Glucosa	4%
Extracto de levadura	1%	Extracto de levadura	1%
CaCO ₃	0.5%	Peptona	2%
Agar	2%	Na ₂ HPO ₄ •H ₂ O	0.338%
		Ácido cítrico	0.15%
GY (Yamada & Yukphan, 2008)		Etanol	2 % (v/v)
Glucosa	2 %	Ácido acético	1% (v/v)
Extracto de levadura	1 %		
Agar	2 %		

Tabla citada por Sengun y Karabiyikli (2010).

7.3.7.2. Técnicas moleculares

La taxonomía microbiológica clásica ha utilizado tradicionalmente las características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas para diferenciar entre especies. La identificación fenotípica de las BAA, especialmente en nivel de especie, es difícil (Columpios, 1992). Una de las razones principales en la alta frecuencia de mutaciones espontáneas. La identificación por métodos basados en características fenotípicas no sólo es inexacto, sino que también consume mucho tiempo. Por lo tanto nuevas técnicas han sido desarrolladas utilizando técnicas moleculares para superar las desventajas del cultivo e identificación de BAA (Gonzales, Hierro, Poblet, Mas, & Guillamon, 2006).

La mayor parte de los métodos moleculares de identificación utilizan el análisis de los ácidos nucleicos con diferentes aproximaciones. Se han identificado especies de BA utilizando la hibridación ADN/rADN (De Ley & Schell, 1963; Gillis y De Ley,

1980). También se ha usado la técnica RAPD'S para discriminar las distintas especies de BA en el vino (Bartowsky et al., 2003; Trček et al., 1997). En ocasiones se utiliza la secuenciación del gen ribosomal 16S ADN para diferenciar entre especies (Sievers et al., 1994; Sievers et al., 1996; Schuller et al., 2000). Una técnica de identificación que se basa en las diferencias en la secuencia de este gen pero que es de más sencilla realización e interpretación es la denominada 16S-ARDRA; consiste en la amplificación del gen ribosomal 16S y en la posterior digestión del amplificado (González et al., 2005; Poblet et al., Ruiz et al., Trček y Raspor, 1999). A veces la identidad de secuencia entre especies es tan alta que estas técnicas impiden la correcta separación de algunas especies. En estos casos se puede recurrir al análisis de las secuencias intergénicas 16S-23S (ISR o ITS), que exhiben un mayor grado de variación que las secuencias de los genes ribosomales 16S y 23S.

8. PROCEDIMIENTO Y DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS

8.1. Recolecta de taberna “*in vivo*”

La taberna se colectó durante los meses de Marzo-Abril del 2011, en el poblado Colonia Benito Juárez, del municipio de Villaflores, Chiapas, México. Sus coordenadas geográficas son 16° 25'33 .94"N, 93° 19'16, 152"W, a una altitud de 646 msnm.

Las palmas de *Acrocomia aculeata* fueron preparadas de acuerdo al proceso artesanal por un productor de taberna en la misma localidad de Benito Juárez.

La toma de las muestras de taberna se realizó todas las mañanas (6 a.m.-7 a.m.) durante 15 días. Se tomaron muestras de savia de 4 palmas de coyol, el proceso inició en el momento en que se realizó la incisión a la palma (tiempo cero) una vez que la savia se acumuló en la zona de la incisión se tomó la muestra de aproximadamente 1000 mL, en recipientes térmicos lavados con agua estéril. Inmediatamente las muestra se transportaron al laboratorio de investigación en el Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez (el tiempo del traslado fue aproximadamente 3 horas), una vez ahí, en condiciones asépticas se tomaron dos muestras de 50 ml, de las cuales una se utilizó para realizar los análisis microbiológicos por triplicado y la otra para su conservación. El resto de la muestra sirvió para realizar los análisis fisicoquímicos por triplicado. El monitoreo se realizó de la misma forma cada 24 horas, durante 15 días.

8.2. Conservación de muestras de taberna

En condiciones asépticas la muestra que contenía 50 ml de taberna se distribuyó de la siguiente manera, 5 muestras en eppendorfs estériles con 0.7 ml de taberna y 0.3 ml de glicerol estéril, 5 muestras en eppendorfs estériles con 1 ml taberna y dos muestras con 20 ml de taberna en recipientes plásticos estériles. Todas las muestras se conservaron hasta su uso a -20°C . Este procedimiento se realizó de la misma forma para cada monitoreo de la taberna.

8.3. Caracterización fisicoquímica de la taberna

8.3.1. Cuantificación de azúcares residuales

Después de centrifugar las muestras de taberna, el sobrenadante obtenido se empleó para cuantificar azúcares residuales totales (Dubois et al.1965) y reductores (Miller, 1959) los análisis se realizaron por triplicado.

8.3.2. Cuantificación de acidez total

Se pesó 5 gramos de Na_2CO_3 y se colocó en un vaso de precipitado con 20 mL de agua destilada previamente calentada y se le adicionará 2 gotas de fenolftaleína al 1%, obteniéndose una sustancia rosa-purpura. Enseguida se tituló con la muestra de taberna, hasta la desaparición de la coloración rosa-purpura, es decir, hasta obtener una solución traslucida (Método estequiométrico según NMX-AA-036-SCFI-2001).



$$\text{Acidez muestra} = (m \text{ Na}_2\text{CO}_3 / \text{PE} * \text{V muestra}) (\text{PE Ácido})$$

Donde:

$m \text{ Na}_2\text{CO}_3$ = masa de Na_2CO_3

PE = peso equivalente de Na_2CO_3 (g/eq) según la ecuación (I)

V muestra = Volumen de la muestra

PE ácido = Peso equivalente del ácido sulfúrico (49 g/eq)

8.3.3. Determinación de pH

Se utilizó un potenciómetro multiparámetros, OAKLON pH 510 series.

Ya que se esperaba que la muestra tuviera pH ácido. Para la calibración del equipo se enjuagó el electrodo y se sumergió en Sol. Tampón pH 7.0, seguida la

Sol. Tampón pH 4. La determinación del pH de las muestras se realizó por triplicado, enjuagando el electrodo entre las mediciones.

8.3.4. Determinación de densidad

Se empleó el picnómetro para medir la densidad de cada muestra. La densidad se determinó por medio de la ecuación (II). El picnómetro es un pequeño frasco de vidrio de volumen exacto y conocido (V_p). Se pesa vacío (w_p), luego se llena completamente (incluido el capilar) con la muestra de taberna a analizar y finalmente se pesa (w_{p1}). Con estos datos se puede calcular la densidad del líquido.

$$\text{Densidad de la muestra} = \frac{w_{p1} - w_p}{V_p} \quad (\text{Ecuación II})$$

8.3.5. Determinación de °Brix

Se empleó un refractómetro digital marca ATAGO, modelo Pocket PAL-3 con corrección por temperatura. El procedimiento se realizó de la siguiente manera, se limpió la superficie del prisma y se colocó aproximadamente 0.3 ml de la muestra dentro de la superficie del prisma y al presionar el botón START apareció el valor de °Brix así como también la temperatura de la muestra. La determinación se realizó por triplicado, entre cada medición se removió la muestra con un pañuelo limpio y se usó agua para remover cualquier residuo de la muestra, secando cualquier exceso de agua con un pañuelo seco.

8.4. Cinética de crecimiento de los microorganismos en la taberna

Para realizar la cinética de microorganismos durante la fermentación del vino de coyol “*in vivo*”, las muestras se tomaron cada 24 h a partir del tiempo cero (el cual corresponde al momento cuando la savia es tomada de la canoa o incisión de los tallos de esta palma).

A partir del tiempo cero las muestras fueron sometidas a diluciones en serie e inoculadas por triplicado mediante la técnica de vaciado en placa e incubadas de la siguiente manera: medio MRS en condiciones anaerobias a 37°C por 48 horas, para evaluar la presencia de BAL (Stringini M. *et al.* 2009 y Amoa-A.W.K. *et al.* 2006); medio TSA en condiciones aerobias a 30°C por 48 horas, para bacterias mesofílicas, medio YM en condiciones aerobias a 30°C por 48 h, para levaduras (Amoa-A.W.K. *et al.* 2006), medio CARR en condiciones aerobias a 30°C por 48

horas, para bacterias acéticas (Stringini M *et al.* 2009 y Amoa-A.W.K. *et al.* 2006), medio WL e condiciones aerobias a 30°C por 48 horas, para *Zymomonas* (Stringini M *et al.* 2009 y Obire O. 2005) y medio Mc Conkey en condiciones aerobias a 30°C por 48 h, para enterobacterias. La cuantificación de colonias se realizó en un contador de colonias JSB de 3 dígitos. Todas las siembras se realizaron por triplicado.

En el anexo I se presenta una descripción y composición de cada uno de los medios utilizados para la cinética de microorganismos de la taberna.

8.5. Identificación y aislamiento de bacterias ácido acéticas

Una vez realizada la cinética de crecimiento, las bacterias acéticas fueron aisladas de las muestras de taberna conservadas en glicerol a -20°C.

El proceso de aislamiento consistió en tomar 1 mL de las muestras y sembrarla en 20 mL de medio líquido (Glucosa- 1%, etanol-0.5 %, extracto de levadura-0.8 % y ácido acético-0.3%), para dejar incubar a 30°C, 120 rpm por 3-7 días (Lisdiyanti *et al.* 2003). Posteriormente se realizaron una serie de diluciones, cada una de las cuales fue sembrada por vaciado en placa (por duplicado) sobre un medio selectivo de crecimiento y aislamiento (GYC) e incubadas a 30°C por 3 a 5 días (Ruiz *et al.*, 2000).

Las colonias se identificaron de acuerdo a su morfología colonial: tamaño, forma, color, bordes, elevación, superficie, aspecto y presencia del halo translucido característico de las BAA en medio GYC. Se seleccionaron las colonias representativas y se procedió a aislarlas por la técnica de estría cruzada, hasta obtener colonias puras después de varias resiembras en medio GYC.

En el Anexo 2 presenta una descripción y composición de cada uno de los medios utilizados para el aislamiento de las bacterias acéticas.

A las colonias preliminarmente identificadas como bacterias acéticas se realizaron test bioquímicos de catalasa, tinción de Gram y se desarrollaron test fisiológicos de oxidación de etanol, oxidación de lactato y oxidación de acetato (Kadere *at al.*, 2008).

8.5.1. Identificación por pruebas de catalasa

Método del portaobjetos

Con el asa de siembra se tomó una muestra del centro de una colonia pura con 24 a 48 horas de haberse resembrado y se colocó sobre un portaobjetos limpio. Se adicionó con gotero una gota de H₂O₂ al 30% sobre el microorganismo sin mezclarlo con el cultivo. La formación inmediata de burbujas es un resultado positivo. Si se invierte el orden del método (extender la colonia sobre el agua oxigenada) puede producirse falsos positivos (Parés y Juárez, 2002).

8.5.2. Identificación por tinción de Gram

Se colocó el portaobjetos ya con el frotis de cada colonia aislada, sobre un puente de vidrio. Se cubrió completamente el portaobjetos con colorante violeta de genciana y se dejó actuar durante 1 minuto. Se escurrió el colorante y se adicionó la solución Gram-Yodo y se dejó actuar durante 1 minuto. Se lavó la muestra con solución alcohol-acetona, hasta que dejó de observarse a simple vista el color azul-violeta. Se aplicó la safranina y se dejó actuar durante 1 minuto. Se lavó con agua hasta eliminar el exceso de colorante. Finalmente, se dejó secar el portaobjetos y se observaron las preparaciones al microscopio (Parés y Juárez, 2002).

8.5.3. Oxidación de etanol

Identificación a nivel de género. La sobre oxidación del etanol es suficiente para diferenciar entre *Acetobacter* y *Gluconobacter*. *Acetobacter* oxida el etanol a ácido acético, que a su vez vuelve a ser oxidado a CO₂ y H₂O, mientras que *Gluconobacter* no lleva a cabo esta doble oxidación. El medio utilizado para verificar esta prueba es el medio de Carr citado por De Ley *et al.* (1984).

El medio CARR se distribuyó en tubos de ensayo; después de esterilizar el medio y antes de que solidifique se añadió etanol. Se permitió la solidificación de los tubos en posición inclinada y cada colonia aislada se inoculó en estría. Para posteriormente incubar a 28 °C por 10 a 15 días (Kadere *at al.*, 2008).

A medida que el crecimiento alrededor de la estría se hace notorio, pueden producirse cambios en el color del medio, inicialmente verde. *Gluconobacter* provoca el cambio del medio a amarillo. *Acetobacter* vira inicialmente el medio a amarillo, para volver más tarde al color verde inicial (Parés y Juárez, 2002).

8.5.4. Oxidación de acetato y lactato

Se utilizaron los medios descritos por Kadere, Miyamoto *et. al.* 2008. Los medios utilizados se pueden ver en el Anexo 2. Se dejó incubar a 28°C por 4-7 días.

Las bacterias del género *Gluconobacter* no pueden oxidar el acetato ya que no desarrollan el ciclo tricarboxílico mientras que las bacterias del género *Acetobacter* tienen enzimas del ciclo tricarboxílico y por tanto pueden oxidar el acetato. Los dos géneros son capaces de crecer en lactato (Sengun y Karabiyikli, 2010).

8.5.5. Producción de ácido acético

Para la preparación del inóculo se procedió a tomar las colonias crecidas en medio GYC y respectivamente se pasaron a medio líquido (Glucosa- 1%, etanol-0.5 %, extracto de levadura-0.8 % y ácido acético-0.3%). Se extrajo el 10% de medio y se inoculó en 150 ml del medio descrito por Lisdiyanti *et al.* (2003), agregando 4% de etanol. A partir de este momento se monitoreó la cinética de crecimiento de las bacterias ácido acéticas aisladas de la taberna, efectuando la medición de la absorbancia a 550 nm, la estimación de ácido acético con NaOH 0.5 N y la medición del pH. Las mediciones se efectuaron cada 24 horas durante 120 horas.

Estimación de ácido acético:

Se extrajo 5 ml del medio y se mezcló con agua destilada y se agregó 2-3 gotas de fenolftaleína como indicador y se tituló con NaOH 0.5 N.

Cantidad de ácido acético producido por cada 100 ml = (Vol. NaOH) (0.03)(20)

8.5.6. Conservación de cepas

Para la conservación de cepas puras, las colonias crecidas en medio GYC se inocularon en caldo enriquecido para BAA (Glucosa- 1%, etanol-0.5 %, extracto de levadura-0.8 % y ácido acético-0.3%) por 3-5 días. se tomaron 3 muestras en eppendorf estériles, con 0.7 ml de la muestra y 0.3 ml de glicerol estéril, las muestras se conservaron hasta su uso a -20°C.

9. RESULTADOS

9.1. Caracterización fisicoquímica de la taberna

El proceso de fermentación de la taberna es poco conocido, no se sabe bien cuanto tiempo dura, que tipos de metabolitos se producen y que cambios fisicoquímicos ocurren a lo largo de este proceso.

Los productos obtenidos durante los primeros días de fermentación tuvieron elevadas concentraciones de azúcares, en la figura 5 se observan las concentraciones de azúcares reductores y totales, así como los °Brix durante la cinética de fermentación. Se observa que al inicio de la fermentación el contenido de azúcares totales es de 109.29 g/L y disminuye aproximadamente 93% durante las primeras 40 horas; después del cuarto día y durante el resto de la fermentación se mantiene a concentraciones de 12 g/L a 16 g/L.

Esto se puede atribuir a que al principio de la fermentación es cuando la concentración de microorganismos es menor y conforme los microorganismos aumentan se puede ver que disminuye el contenido de azúcares totales, esto debido a que dichos compuestos son utilizados por los microorganismos como fuente de carbono y energía durante el proceso fermentativo produciendo etanol, ácido láctico y ácido acético.

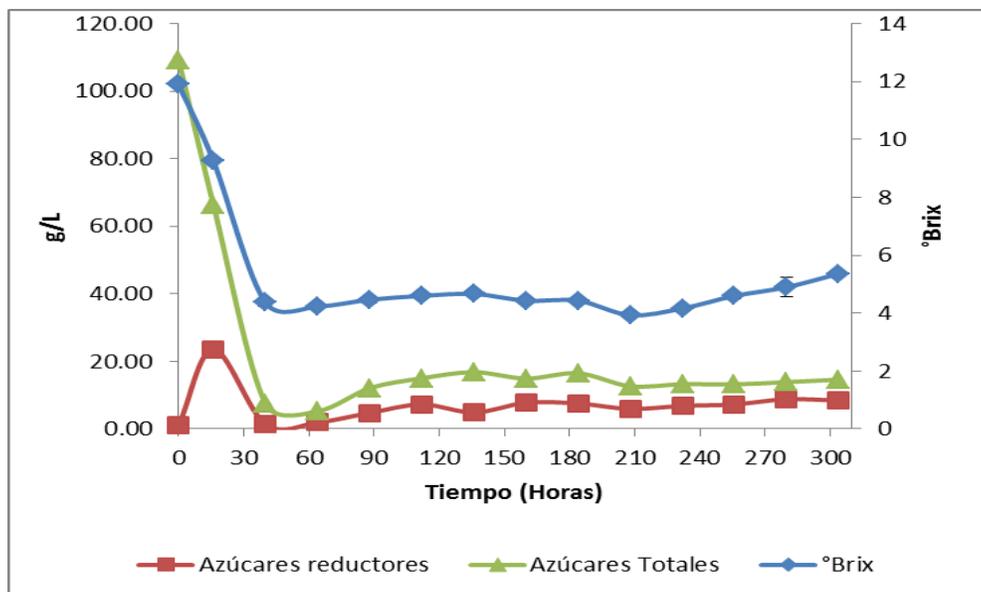


Figura 5. Concentración de azúcares reductores, azúcares totales y °Brix durante la fermentación de la taberna.

En lo que se refiere a los °Brix y azúcares reductores al inicio de la fermentación se encontraba a 11.9° y 1.02 g/L respectivamente, durante las primeras 40 horas los °Brix disminuyen aproximadamente 62% y durante el resto de la fermentación se mantiene de 4-5 °Brix. En el caso de los azúcares reductores después de las 88 horas se mantienen a concentraciones de 4-8 g/L.

En la figura 6 podemos observar que el pH de la taberna disminuye de 7.52 a 4.05 en las primeras horas, manteniéndose a valores de 4.1-3.5 durante el resto de la fermentación; este pH es similar a la reportada para por Ainoa-Awua en el 2007, en el vino de palma de África.

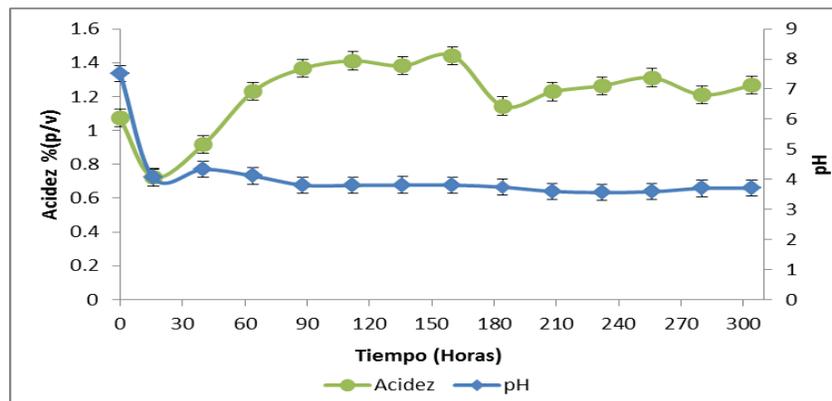


Figura 6. % Acidez y pH durante la fermentación de la taberna.

También podemos observar que cuando el porcentaje de acidez comienza a aumentar el pH disminuye. El porcentaje de acidez y la densidad, casi en toda la fermentación permanecen constantes, entre un valor de 1.2%-1.4% y 1.001 g/ml-1.004 g/ml respectivamente. En la Figura 7 se presentan los valores de las densidades durante la cinética de fermentación de la taberna.

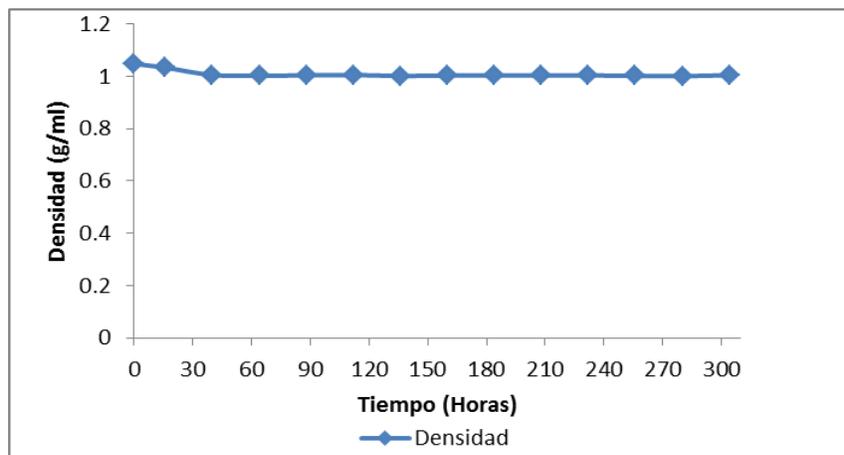


Figura 7. Densidad durante la fermentación de la taberna.

9.2. Cinética de crecimiento de los microorganismos en la taberna

Con respecto a la población microbiana, un drástico incremento se observa en las primeras 16 horas, el número de levaduras aumentó de 5.6×10^5 UFC/ml a 6.3×10^7 UFC/ml; en las bacterias ácido lácticas de 1.04×10^6 UFC/ml a 5.8×10^8 ; en las bacterias ácido acéticas de 2.0×10^5 UFC/ml a 1.4×10^8 UFC/ml; en las bacterias mesófilicas 2.78×10^5 a 1.18×10^8 UFC/ml; Zymomonas de 2.06×10^5 UFC/ml a 1.49×10^8 UFC/ml; y en el caso de las enterobacterias el incremento fue menor, de 1.88×10^4 UFC/ml a 2.7×10^4 UFC/ml. En las figuras 8 y 9 se puede apreciar la cinética de crecimiento de los diferentes grupos de microorganismos durante la fermentación de la taberna.

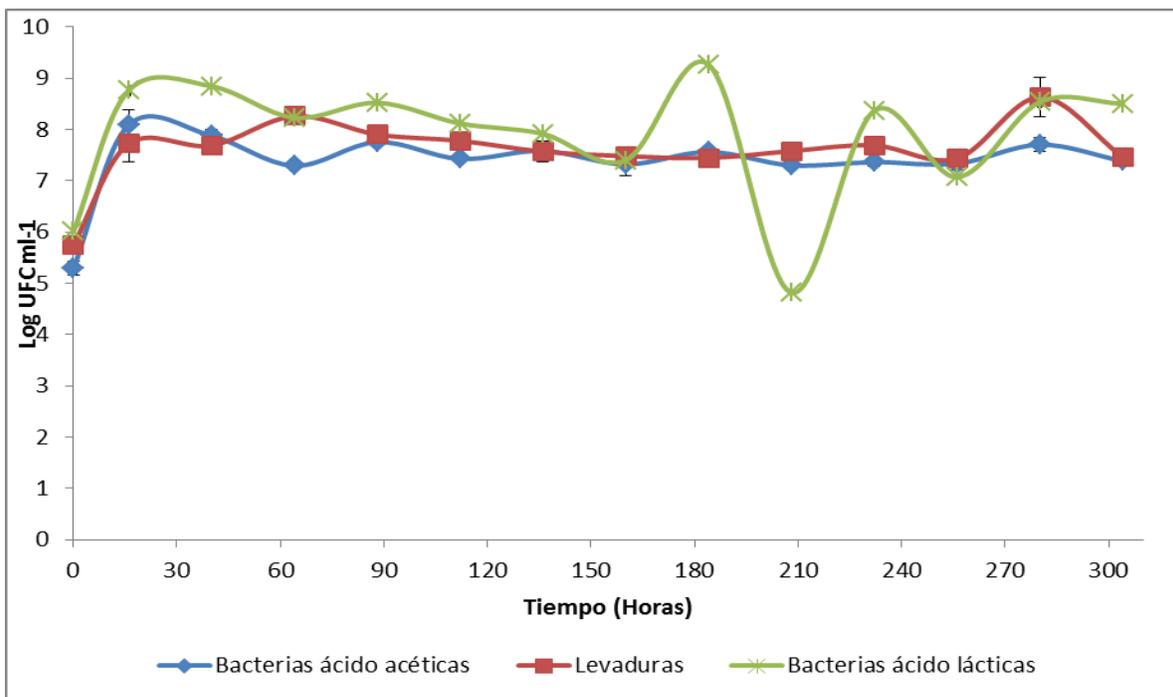


Figura 8. Cinética de crecimiento de bacterias ácido acéticas, bacterias ácido lácticas y levaduras durante la fermentación de la taberna.

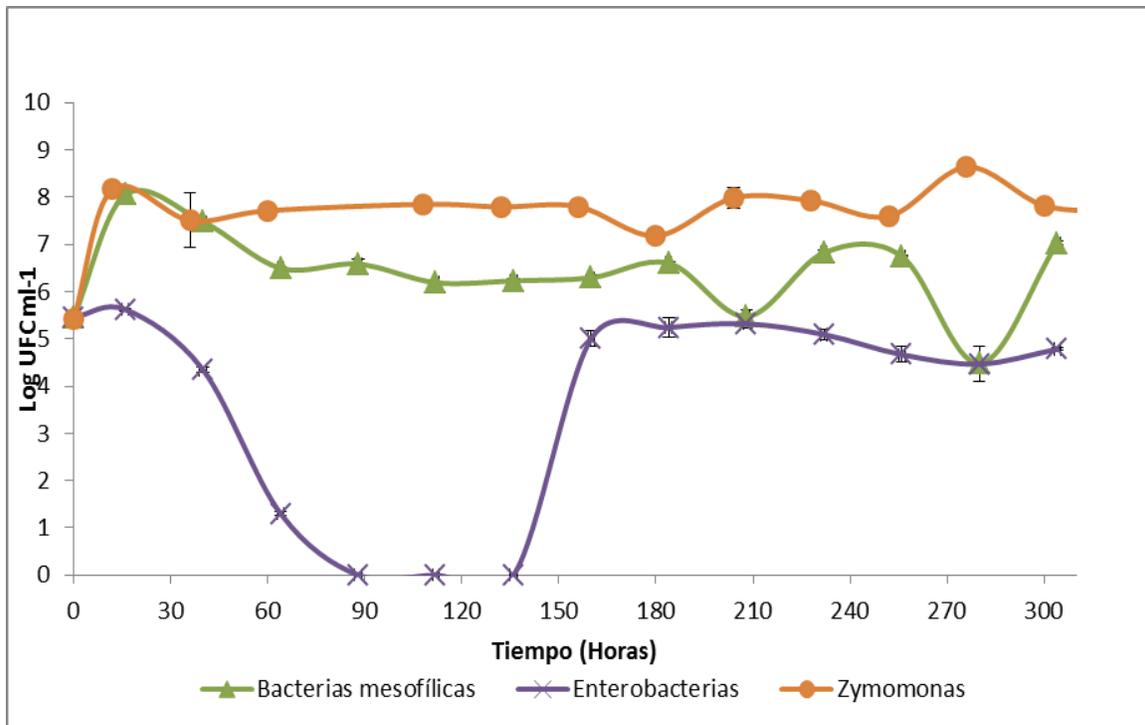


Figura 9. Cinética de crecimiento de bacterias mesofílicas, Enterobacterias y Zymomonas durante la fermentación de la taberna.

Después del incremento inicial, las levaduras se mantienen a concentraciones de 10^7 UFC/ml, las bacterias ácido acéticas alcanzan concentraciones de 10^7 UFC/ml. En el caso de las enterobacterias, después del incremento inicial se puede observar un descenso gradual en el número de microorganismos, incluso en la hora 88 de la fermentación no hay presencia de este grupo de bacterias, sin embargo en la hora 160 de la fermentación vuelven a aparecer y se mantienen a concentraciones similares a las del inicio de la misma durante toda la fermentación. La concentración tan variable de este grupo de bacterias se puede atribuir a la higiene y cuidados que se tiene en los instrumentos utilizados para raspar la palma y al momento de manipular la muestra, ya que la palma de donde se extrae la taberna se encuentra en el suelo, al aire libre, dejándola expuesta a gran cantidad de microorganismos.

Es necesario conocer la concentración de alcohol, ácido acético, ácido láctico para explicar cómo influyen y si son responsables del comportamiento de los diferentes microorganismos a lo largo del proceso de fermentación de la taberna.

9.3. Identificación y aislamiento de bacterias ácido acéticas en la taberna

La identificación de microorganismos se puede llevar a cabo atendiendo a cuatro criterios diferentes: morfológicos, bioquímicos, inmunológicos o genéticos. En este trabajo solo se abordaron dos aspectos, el morfológico y el bioquímico.

Después de una serie de resiembras, se escogieron colonias con morfología diferente; se lograron aislar 34 colonias de los primeros días de la fermentación de la taberna, que correspondían a bacterias crecidas en medio GYC, después de 3-4 días las colonias clarificaron el medio a su alrededor lo que sugiere que las colonias corresponden a BAA(Figura 10).

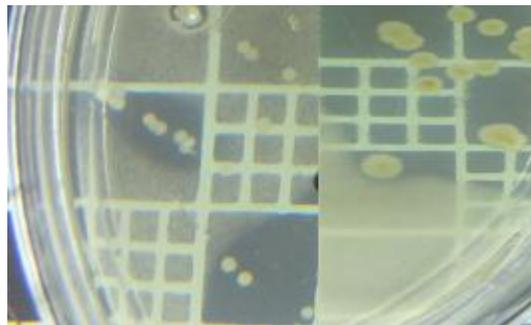


Figura 10. BAA en medio GYC. Obsérvese el halo característico alrededor de la zona de crecimiento.

En el primer día no se pudo aislar a ninguna BAA, probablemente se deba a que el almacenamiento de las muestras en glicerol no fue el adecuado. Se considera que el daño a las células es menor cuando se realiza una congelación rápida, por eso es conveniente conservarlas a -80°C , pero solo se contaba con un congelador a -20°C .

9.3.1. Características morfológicas de las BAA aisladas de la taberna

De las 34 colonias aisladas de la taberna se lograron formar 12 grupos de acuerdo a las diferentes características morfológicas.

En las Tablas 5, 6, 7, 8 y 9 se muestran los resultados de las características macroscópicas de los aislamientos obtenidos de BAA presentes en la taberna.

Tabla 5. Características macroscópicas y microscópicas de BAA aisladas del 2° día de fermentación de la taberna.

Colonia	Características macroscópicas	Características microscópicas	Grupo
TBAA-ITTG-02-01 TBAA-ITTG-02-08	Colonias con borde beige y centro amarillo, circulares, borde entero, crateriforme, húmedas, brillantes.	Forma: bacilos cortos Agrupación: Pares	A
TBAA-ITTG-02-02 TBAA-ITTG-02-05	Colonias con borde color beige y centro amarillo, circulares, borde entero, convexa, cremosas, borde opaco y centro brillante.	Forma: bacilos Agrupación: Pares	B
TBAA-ITTG-02-03	Colonias con borde claro y centro café, circulares, borde entero, convexa plana, cremosas, brillantes.	Forma: bacilos cortos Agrupación pares	C
TBAA-ITTG-02-04 TBAA-ITTG-02-06	Colonias con borde beige y centro amarillo, circulares, borde entero, convexa plana, húmedas, cremosas.	Forma: bacilos cortos Agrupación: pares	H
TBAA-ITTG-02-07	Colonias muy pequeñas, borde beige y centro amarillo, circulares, borde entero, convexas, cremosas, brillantes.	Forma: bacilos Agrupación cadenas	D

Tabla 6. Características macroscópicas y microscópicas de BAA aisladas del 3° día de fermentación de la taberna.

Colonia	Características macroscópicas	Características microscópicas	Grupo
TBAA-ITTG-03-02 TBAA-ITTG-03-05	Colonias borde beige y centro amarillo, circulares, borde entero, crateriforme, húmedas, brillantes.	Forma: bacilos cortos Agrupación: Pares	A
TBAA-ITTG-03-03	Colonias borde beige y punto café en el centro, circulares, borde ondulado, convexa plana, borde seco y centro húmedo, borde mate y centro brillante.	Forma: bacilos cortos Agrupación: pares	I
TBAA-ITTG-03-04 TBAA-ITTG-03-07A	Colonias con borde color beige y centro amarillo, circulares, borde entero, convexa, cremosas, borde opaco y centro brillante.	Forma: bacilos Agrupación: Pares	B
TBAA-ITTG-03-06	Colonias beige, circulares, borde entero, convexa plana, cremosas, brillantes.	Forma: bacilos cortos Agrupación: pares	F
TBAA-ITTG-03-07B	Colonias con borde traslucido, centro beige y punto amarillo en el centro, circular, borde entero, convexa plana, cremosas, brillante.	Forma: bacilos cortos Agrupación: Pares	E

Tabla 7. Características macroscópicas y microscópicas de BAA aisladas del 4° día de fermentación de la taberna.

Colonia	Características macroscópicas	Características microscópicas	Grupo
TBAA-ITTG-04-01	Colonias beige, circulares, borde entero, convexa plana, cremosas, brillantes.	Forma: bacilos cortos Agrupación: pares	F
TBAA-ITTG-04-02 TBAA-ITTG-04-05	Colonias con borde color beige y centro amarillo, circulares, borde entero, convexa, cremosas, borde opaco y centro brillante.	Forma: bacilos Agrupación: pares	B
TBAA-ITTG-04-03	Colonias beige, circulares, borde entero, crateriformes, secas y mates.	Forma: bacilos Agrupación: pares	J
TBAA-ITTG-04-04	Colonias con borde beige y centro amarillo, circulares, borde entero, crateriforme, húmedas, brillantes.	Forma: bacilos cortos Agrupación: pares	A
TBAA-ITTG-04-06	Colonias con borde beige y centro café, circulares, borde ondulado, convexas, secas y mates.	Forma: bacilos Agrupación: pares	G

Tabla 8. Características macroscópicas y microscópicas de BAA aisladas del 5° día de fermentación de la taberna.

Colonia	Características macroscópicas	Características microscópicas	Grupo
TBAA-ITTG-05-01 TBAA-ITTG-05-05	Colonias con borde color beige y centro amarillo, circulares, borde entero, convexa, cremosas, borde opaco y centro brillante.	Forma: bacilos Agrupación: Pares	B
TBAA-ITTG-05-04	Colonias con borde beige y punto café en el centro, circular, borde entero, convexa, húmedas, brillosas.	Forma: bacilos cortos Agrupación: pares	K
TBAA-ITTG-05-06	Colonias con borde claro y centro café, circulares, borde entero, convexa plana, cremosas, brillantes.	Forma: bacilos cortos Agrupación pares	C
TBAA-ITTG-05-07	Colonias con borde beige y centro amarillo, circulares, borde entero, crateriforme, húmedas, brillantes.	Forma: bacilos cortos Agrupación: pares	A

Tabla 9. Características macroscópicas y microscópicas de BAA aisladas del 6° día de fermentación de la taberna.

Colonia	Características macroscópicas	Características microscópicas	Grupo
TBAA-ITTG-06-01 TBAA-ITTG-06-02	Colonias muy pequeñas, borde beige y centro amarillo, circulares, borde entero, convexas, cremosas, brillantes.	Forma: bacilos Agrupación cadenas	D
TBAA-ITTG-06-03 TBAA-ITTG-06-04	Colonias con borde traslucido, centro beige y punto amarillo en el centro, circular, borde entero, convexa plana, cremosas, brillante.	Forma: bacilos cortos Agrupación: Pares	E
TBAA-ITTG-06-05	Colonias con borde beige y centro café, circular, borde entero, crateriforme, borde cremoso y centro seco.	Forma: bacilos cortos Agrupación: pares	L
TBAA-ITTG-06-06 TBAA-ITTG-06-07	Colonias con borde beige y centro café, circulares, bordes ondulados, convexas, secas y mates.	Forma: bacilos Agrupación: pares	G
TBAA-ITTG-06-08	Colonias con borde claro y centro café, circulares, borde entero, convexa plana, cremosas, brillantes.	Forma: bacilos cortos Agrupación pares	C

Nota: Mismas letras en las tablas indican colonias con características similares.

9.3.2. Pruebas bioquímicas realizadas a las bacterias ácido acéticas aisladas de la taberna

A las colonias preliminarmente identificadas como bacterias acéticas se realizaron test bioquímicos de catalasa y tinción Gram para comprobar que son BAA. Y se desarrollaron test fisiológicos de oxidación de etanol, oxidación de lactato y oxidación de acetato (Kadere *at al.*, 2008). En la tabla 10 se muestran los resultados de las pruebas.

Se puede observar que en las pruebas realizadas todas las colonias resultaron catalasa positiva; Gram-negativas, solo las colonias pertenecientes al grupo A, G y la colonia TBAA-ITTG-03-04 no tienen un buen crecimiento en acetato y que solo las colonias del grupo D no tienen un buen crecimiento en lactato. Todas las colonias tienen la capacidad oxidar el etanol a CO₂ y H₂O.

Las BAA son Gram negativos y además contienen la enzima catalasa que descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. Los resultados de la tinción de Gram y la prueba de catalasa nos indican que las colonias aisladas de la taberna son bacterias ácido acéticas, la reacción positiva en la prueba de catalasa tuvo lugar cuando ocurrió el desprendimiento de burbujas al agregar el H_2O_2 .

La prueba de oxidación de etanol sugiere que todas las colonias de BAA aisladas de la taberna pertenecen al género *Acetobacter*. La reacción positiva tuvo lugar cuando el indicador (verde de bromocresol) cambio dos veces de color, el primer viraje (de verde a amarillo) se produce cuando el medio es ácido; el segundo viraje (amarillo a verde) tiene lugar cuando desaparece la acidez del medio. La figura 11 muestra el resultado positivo de la prueba. Las bacterias del género *Acetobacter* son capaces de sobre oxidar el etanol a ácido acético, el que a su vez vuelve a ser oxidado a CO_2 y H_2O , mientras que *Gluconobacter* no realiza esta doble oxidación, por lo anterior se utiliza la prueba de oxidación de etanol para diferenciar a los géneros *Acetobacter* y *Gluconobacter*.

Otra prueba que nos confirma que las BAA aisladas de la taberna pertenecen al género *Acetobacter* es la prueba de crecimiento en acetato. Las bacterias del género *Gluconobacter* no pueden oxidar el acetato ya que no desarrollan el ciclo tricarboxílico mientras que las bacterias del género *Acetobacter* tienen enzimas del ciclo tricarboxílico y por tanto pueden oxidar el acetato. Como se menciono anteriormente todas las BAA aisladas tiene la capacidad de crecer en acetato, aunque en algunos casos el crecimiento es débil.

La prueba de crecimiento en lactato en todas las colonias aisladas resultó positiva ya que las BAA contienen la enzima lactato deshidrogenasa y pueden degradar el lactato con formación de CO_2 , obteniéndose como producto intermediario el piruvato. Luego el piruvato es descarboxilado en acetaldehído, el cual es oxidado en ácido acético que se acumula.

Tabla 9. Características de las BAA aisladas durante la fermentación de la taberna

Grupo	Colonia	Tinción de Gram	Catalasa	Oxidación de etanol a CO ₂ y H ₂ O	Crecimiento en acetato	Crecimiento en lactato
A	TBAA-ITTG-02-01	-	+	+	d	+
	TBAA-ITTG-02-08					
	TBAA-ITTG-03-02					
	TBAA-ITTG-03-05					
	TBAA-ITTG-04-04					
TBAA-ITTG-05-07						
B	TBAA-ITTG-02-02	-	+	+	+	+
	TBAA-ITTG-02-05					
	TBAA-ITTG-03-04	-	+	+	d	+
	TBAA-ITTG-03-07A	-	+	+	+	+
	TBAA-ITTG-04-02					
	TBAA-ITTG-04-05					
TBAA-ITTG-05-01						
TBAA-ITTG-05-05						
C	TBAA-ITTG-02-03	-	+	+	+	+
	TBAA-ITTG-05-06					
	TBAA-ITTG-06-08					
D	TBAA-ITTG-02-07	-	+	+	+	d
	TBAA-ITTG-06-01					
	TBAA-ITTG-06-02					
E	TBAA-ITTG-03-07B	-	+	+	+	+
	TBAA-ITTG-06-03					
	TBAA-ITTG-06-04					
F	TBAA-ITTG-03-06	-	+	+	+	+
	TBAA-ITTG-04-01					
G	TBAA-ITTG-04-06	-	+	+	d	+
	TBAA-ITTG-06-06					
	TBAA-ITTG-06-07					
H	TBAA-ITTG-02-04	-	+	+	+	+
	TBAA-ITTG-02-06					
I	TBAA-ITTG-03-03	-	+	+	+	+
J	TBAA-ITTG-04-03	-	+	+	+	+
K	TBAA-ITTG-05-04	-	+	+	+	+
L	TBAA-ITTG-06-05	-	+	+	+	+

+ = Resultado positivo, - = Resultado negativo, d= Crecimiento débil

Después de agrupar a las BAA se seleccionó una colonia de los grupos más representativos para hacer pruebas de producción de ácido acético. En la tablas

12,13 y 14 se muestran los resultados de las pruebas. Como se puede observar en la cinética de las BAA aisladas de la taberna, las colonias TBAA-ITTG-05-01, TBAA-ITTG-04-06 y TBAA-ITTG-05-06 tienen un patrón de crecimiento muy similar y alcanzan el mayor crecimiento, las colonias TBAA-ITTG-02-08, y TBAA-ITTG-03-06 también crecen de manera similar. Mientras que las otras colonias tiene un patrón de crecimiento diferente.

En lo que se refiere al comportamiento del pH durante la cinética de crecimiento, el comportamiento es muy similar para todas las colonias, el pH pasa de 4.9-4.20 a 3.5-3.3 al final de la fermentación.

El comportamiento en la producción de ácido acético en la fermentación es muy similar para las colonias TBAA-05-01. TBAA-ITTG-02-07, TBAA-ITTG-05-06, TBAA-ITTG-04-06 Y TBAA-ITTG-02-08, además estas 5 colonias producen las concentraciones más altas de ácido acético 2.67%-2.4%. Las colonias que produjeron menos ácido acético fueron las colonias TBAA-ITTG-03-06 Y TBAA-ITTG-03-07b con valores de 1.41% y 1.02% respectivamente.

Hay que notar que la producción de ácido acético es proporcional a la biomasa, ya que 3 las colonias en que la biomasa es mayor el % de acidez es también es mayor y en el caso de la colonia TBAA-ITTG-03-07b que fue la que menor crecimiento presento, el % de acidez solo fue de 1.02%. Pero en el caso de las colonias TBAA-ITTG-02-08 y TBAA-ITTG-02-07 a pesar de ser de las 5 colonias que producen más altas concentraciones de ácido acético, la biomasa es casi la mitad de la alcanzada por las otras colonias con mayor producción de ácido acético.

A pesar de que todas las colonias tiene diferentes características macroscópicas y microscópicas se puede observan en la cinética de producción de ácido acético que algunas de las colonias comparten patrones similares de crecimiento y/o cantidad de ácido acético producido en la fermentación.

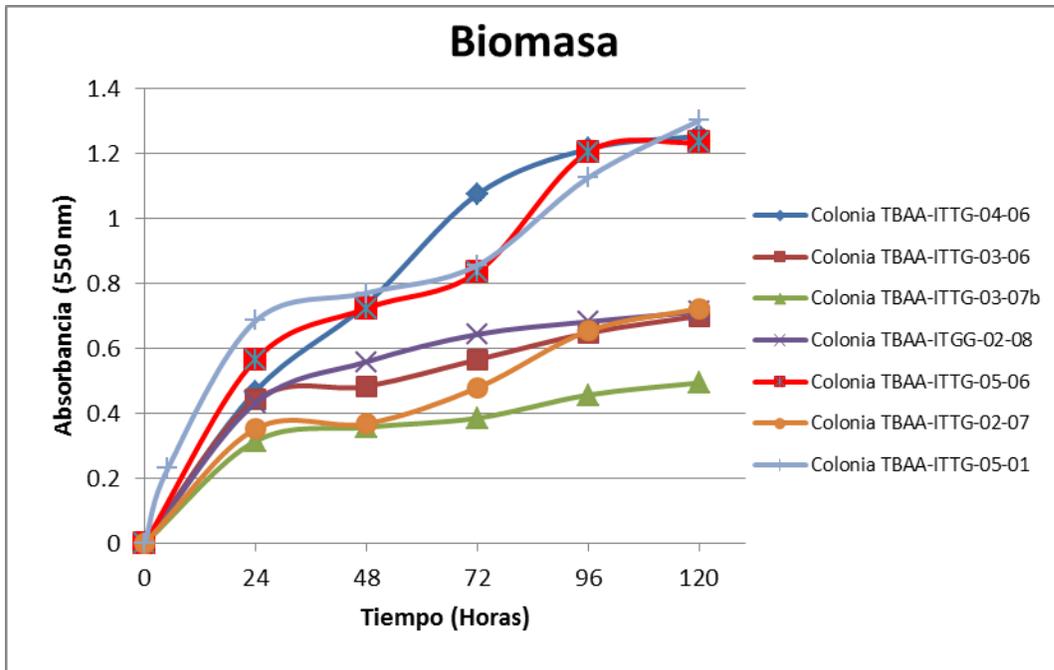


Figura 12. Cinética de crecimiento de BAA aisladas de la taberna.

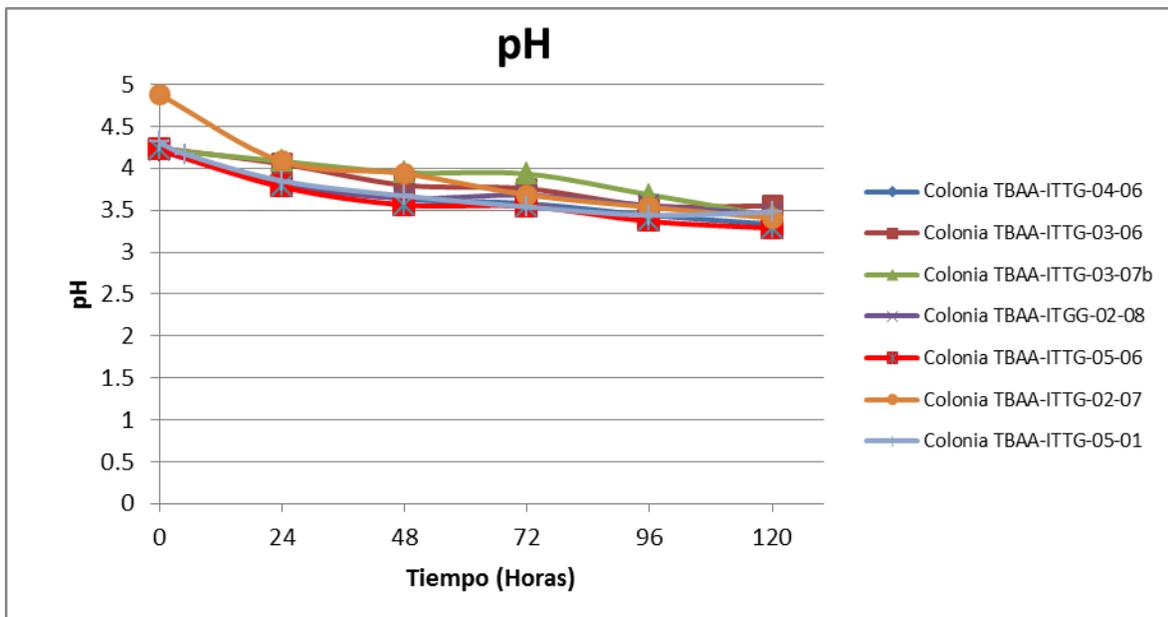


Figura 13. pH durante la cinética de crecimiento de BAA aisladas de la taberna.

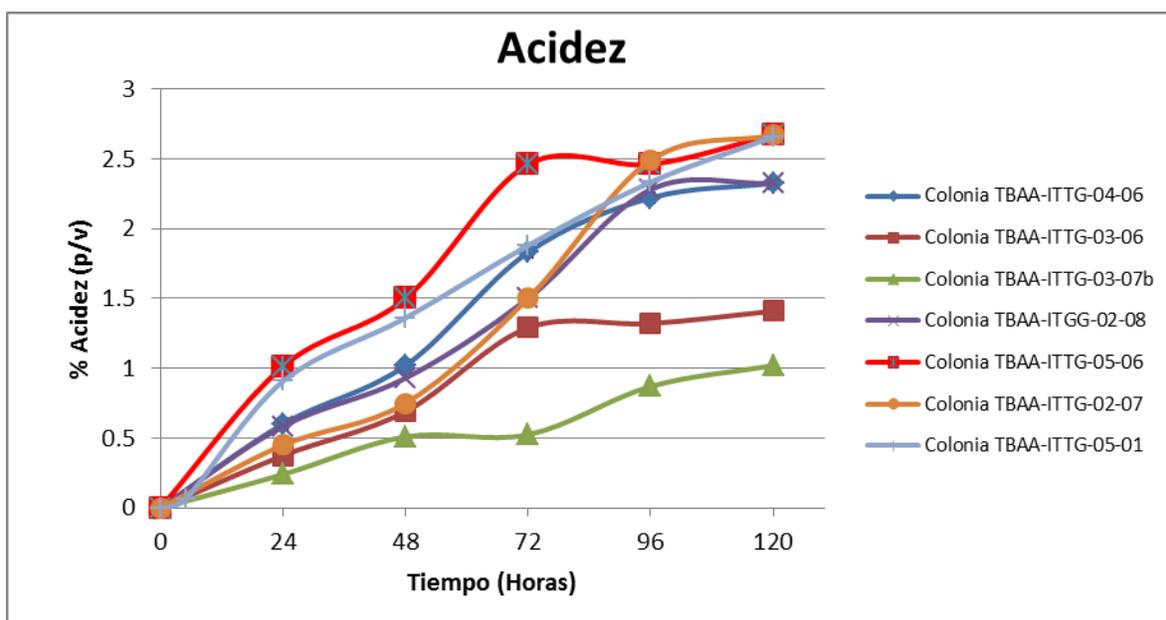


Figura 14. Acidez durante la cinética de crecimiento de BAA aisladas de la taberna.

10.CONCLUSIÓN

El vino de palma es un medio capaz de permitir el crecimiento de varios tipos de microorganismos. Un alto número de bacterias mesofílicas, bacterias ácido acéticas, ácido lácticas, levaduras, enterobacterias y *Zymomonas* fueron encontrados durante el proceso de fermentación de la taberna.

Aunque no se pudo aislar BAA del primer día de fermentación, por los resultados de la cinética, podemos saber que este grupo de bacterias se encuentra presente desde el comienzo de la fermentación.

De los primero cinco días de fermentación, se lograron aislar 34 colonias de BAA. Las pruebas bioquímicas, morfológicas, tinción de Gram y catalasa permitieron clasificar a las bacterias ácido acéticas en 12 grupos. La prueba de oxidación de etanol y crecimiento en acetato nos sugiere que todas las colonias aisladas pertenecen al género *Acetobacter*.

Es importante mencionar que a pesar que todas las colonias provienen de la misma fuente algunas se comportan de manera diferente y aunque algunas colonias comparten características similares, no todas producen las mismas cantidades de ácido acético.

11.RECOMENDACIONES

Aunque las pruebas realizadas permitieron aislar e identificar a las bacterias ácido acéticas, es necesario realizar más pruebas ya sean bioquímicas o moleculares, para conocer el género y especie de las bacterias aisladas.

Ya que en el primer día de fermentación no se pudo aislar a ninguna BAA, sería conveniente que en futuros experimentos las muestras se procesaran de inmediato, para evitar que las células sufran daño por congelación,

También se recomienda realizar una caracterización más completa de la taberna, para así conocer sus diferentes componentes, lo que permitirá realizar un medio similar a esta bebida y nos permita un mejor crecimiento de las BAA, ya que tal vez algunas de las bacterias presentes en la taberna no pueden crecer en los medios propuestos, ya sea por la falta de algún compuesto o por otros factores.

Sería conveniente estudiar con mayor detalle la capacidad para producir ácido acético de las colonias de BAA aisladas, para así determinar cual de ellas tiene mayor productividad y compararla con otras cepas de uso industrial, para ver si las BAA aisladas de la taberna tienen capacidad de ser utilizadas industrialmente para la producción de ácido acético.

12.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS Y VIRTUALES

Álvarez, B., Martínez-Drets, G. (1995). Metabolic characterization of *Acetobacter diazotrophicus*. Can. J. Microbiol. 41: 918-924.

Amoa-Awua, W.K., Sampson, E., Tano-Debrah, K. (2006). Growth of yeasts, lactic and acetic bacteria in palm wine during tapping and fermentation from felled oil palm (*Elaeis guineensis*) in Ghana. J. Appl. Microbiol. 102: 599–606.

Balick, M. J. (1990). "Ethnobotany and the Identification of Therapeutic Agents from the Rainforest". In D. J. Chadwick and J. Marsh, eds., Bioactive Compounds from Plants, pp. 22-39. Ciba Foundation Symposium 154. Chichester: Wiley.

Bassir, O. (1968). Some Nigerian wines. West Afr J Biol Appl Chem 10: 42–45.

Beh, A.L., Fleet, G.H., Prakitchaiwattana, C., Heard, G.M. (2006). Evaluation of molecular methods for the analyses of yeasts in foods and beverages. In Advances in Food Mycology. Edited by Hocking AD, Pitt JT, Samson RA, Thrane U. Springer; 2006: 69-106.

Blasco, L., (2003). Aplicación de las técnicas Fhis, PCR específica y 16s-ARDRA al estudio de la población bacteriana asociada al proceso de vinificación. Universidad de Valencia. Facultad de Ciencias Biologicas. Tesis Doctoral, Valencia, España.

Cabrera-Chacón, T. (1991). Plantas de Chiapas: sus usos, valores e importancia. El Coyol. No.6, YASHTE del IHN. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. p. 1-4.

Camu, N., De Winter, T., Verbrugghe, K., Cleenwerck, I., Vandamme, P., Takrama, J. S., et al. (2007). Dynamics and biodiversity of populations of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria involved in spontaneous heap fermentation of cocoa beans in Ghana. Applied and Environmental Microbiology, 73: 1809-1824.

Cleenwerck, I., & de Vos, P. (2008). Polyphasic taxonomy of acetic acid bacteria: an overview of the currently applied methodology. International Journal of Food Microbiology, 125: 2-14.

Corzo, E.C. (1978). Palabras de Origen Indígena en el Español de Chiapas. Costa ACIC Editores S.A. México D.F. pp. 60-61.

Cruz-Molina S (2010). Productor de taberna en la Colonia Benito Juárez del Municipio de Villaflores.

De Ley, J., Gills, M., and Swings, J. 1984. Acetobacteriaceae. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 9th ed., 267–278. Krieg, N. R., and Holt, J. G., eds. Williams & Wilkins, London.

De Vero, L., & Giudici, P. (2008). Genus-specific profile of acetic acid bacteria by 16S rDNA PCR-DGGE. International Journal of Food Microbiology, 125: 96-101.

Divies, C. (1970). Cinétique de la fermentation acétique réalisée par *Acetobacter xylinum*. Rev Ferment Indust Alim, 25: 105-110.

Drysdale, G. S., & Fleet, G. H. (1988). Acetic acid bacteria in winemaking: a review. American Journal of Enology and Viticulture, 39: 143-154.

Du Toit, W. J., Pretorius, I. S., & Lonvaud-Funel, A. (2005). The effect of sulphur dioxide and oxygen on the viability and culturability of a strain of *Acetobacter pasteurianus* and a strain of *Brettanomyces bruxellensis* isolated from wine. Journal of Applied Microbiology, 98: 862-871.

Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. Analytical chemistry. 28(3): 350-356.

Faparusi, S.I. (1973). Origin of initial microflora of palm wine from oil palm trees. (*Eaeis guineensis*). J Appl Bacteriol 36: 559–565.

Gonzales, A. (2005). Application of molecular techniques for identification of acetic acid bacteria. Tesis Doctoral, Universidad Rovira I Virgili, Tarragona, España.

Gossele, F., Van den Mooter, M., Verdonck, L., Swings, J. (1981). The nitrogen requirements of *Gluconobacter*, *Acetobacter* and *Frauteria*. *Antonie van Leeuwenhoek. J. Microbiol*, 47: 289-296.

Greenfield, S., Clauss, G. (1972). Non functional tricarboxylic acid cycle and the mechanism of the glutamate biosynthesis in *Acetobacter suboxydans*. *J. Bacteriol*, 112: 1295-1301.

Gullo, M., & Giudici, P. (2008). Acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar: Phenotypic traits relevant for starter cultures selection. *International Journal of Food Microbiology*, 125: 46-53.

Herrera, P. (2003). Pocos estudiados, los fermentados indígenas. Ciclo de conferencias "Mi vida en la ciencia". *Gaceta UNAM*. p. 9-13.

Jespersen, L. (2003). Occurrence and taxonomic characteristics of strains of *Saccharomyces cerevisiae* predominant in African indigenous fermented foods and beverages. *FEMS Yeast Res.* 3: 191–200.

Kadere T., Miyamoto T., Oniang R., Kutima P., Njoroge S. (2008). Isolation and identification of the genera *Acetobacter* and *Gluconobacter* in coconut toddy (mnazi). *African Journal of Biotechnology*. 7: 2963-2971.

Leifson, E. (1954). The flagellation and taxonomy of species of *Acetobacter*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 20: 102-110.

Lisdiyanti, P., Katsura, K., Potacharoen, W., Navarro, R. R., Yamada, Y., Uchimura, T., et al. (2003). Diversity of acetic acid bacteria in Indonesia, Thailand, and the Philippines. *Microbial Culture Collection*, 19: 91-98.

Lisdiyanti, P., Katsura, K., Potacharoen, W., Navarro, R. R., Yamada, Y., Uchimura, T., et al. (2003). Diversity of acetic acid bacteria Isolated from South-east Asian Sources. *Microbial Culture Collection*.

Llaguno C. y Polo C. (1991). El vinagre de vino. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Madrid. España. p, 238 .

Lu, S., Lee, F., y Chen, H. (1999). A thermotolerant and high acetic acid producing bacterium *Acetobacter* sp. I14-2. *J. of Applied Microbiology*, 86:55-62.

Maragoudakis, M., Strassman, M. (1967). Biosynthesis of isopropylmalic and citric acids in *Acetobacter suboxydans*. *J. Bacteriol*, 94: 512-516.

Matsushita, K., Toyama, H., & Adachi, O. (1994). Respiration chains and bioenergetics of acetic acid bacteria. *Advances in Microbial Physiology*, 36: 247-301.

Miller, G. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31: 426-428.

Millet, V., & Lonvaud-Funel, A. (2000). The viable but non-culturable state of wine micro-organisms during storage. *Letters in Applied Microbiology*, 30: 136-141.

Obire, O. (2005). Activity of Zymomonasspecies in palm sap obtained from three areas in Edo state, Nigeria. *J. Appl. Sci. Environ. Manage.* 9: 25-30.

Okafor, N. (1975). Microbiology of Nigerian Palm Wine with Particular Reference to Bacteria. *J. Appl. Bact.* 38: 81-88.

Okraaku-Offei, G. (1968). Palm wine, microbiology and chemical changes during fermentation. BSc. Dissertation, University of Ghana.

Parés R. y Juárez A. (2002) *Bioquímica de los microorganismos*. 1ª Reimpresión Ed Reverté. S.A. Barcelona-España, p. 54 – 60.

Raspor, P., & Goranovic, D. (2008). Biotechnological applications of acetic acid bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology*, 28: 101-124.

Rodríguez-Álvarez, J.A. (2008). La taberna como Probiótico. Tesis Profesional para la licenciatura de Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México.

Rodríguez-Álvarez, J.A., Alcántara-Hernández R.J., Valenzuela-Encinas C., 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. *J. Appl. Microbiol.*, 1-6.

Ruiz, A., Poblet, M., Mas, A., & Guillamon, J. M. (2000). Identification of acetic acid bacteria by RFLP of PCR-amplified 16S rDNA and 16S-23S rDNA intergenic spacer. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50: 1981-1987.

Seearunruangchai, A., Tanasupawat, S., Keeratipibul, S., Thawai, C., Itoh, T., & Yamada, Y. (2004). Identification of acetic acid bacteria isolated from fruits collected in Thailand. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 50: 47-53.

Sengun I., Karabiyikli S. (2011). Importance of acetic acid bacteria in food industry. *FOOD CONTROL* 22: 647-656

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.

Tamang, J.P. (1998). Role of Microorganisms in Traditional Fermented Foods. *IndianFoodIndustry*. 17(3): 162-166.

Tesfaye, W., Morales, M., Troncoso, A. y García, M. (2002). Wine Vinegar: technology, authenticity and quality evaluation. *Trends in Food Science & technology*. 13:12-21.

Trček, J. y Teuber, M. (2002). Genetic and restriction analysis of the 16S-23S rDNA internal transcribed spacer regions of the acetic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*. 208: 69-75.

Williams, P., Rainbow, C. (1964). Enzymes of the tricarboxylic acid cycle in acetic acid bacteria. *J. Gen Microbiol*, 35: 237-247.

Yamada, Y., & Yukphan, P. (2008). Genera and species in acetic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 125: 15-24.

Yamada, Y., Hoshino, K., & Ishikawa, T. (1998). *Gluconacetobacter* nom. corrig. (*Gluconoacetobacter* [sic]). Validation of publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB. List no. 64. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48: 327-328.

Yamada, Y., Hosono, R., Lisdyanti, P., Widyastuti, Y., Saono, S., Uchimura, T., et al. (1999). Identification of acetic acid bacteria isolated from Indonesian sources, especially of isolates classified in the genus *Gluconobacter*. *Journal of General and Applied Microbiology*, 45: 23-28.

Yamanaka, S., Watanabe, K., Kitamura, N., Iguchi, M., Mitsunashi, S., Nishi, Y., and Uryu, M. (1989). The structure and mechanical properties of sheets prepared from bacterial cellulose. *J. Mater. Sci.* 24: 3141–3145.

Zahoor, T., Siddique, F., & Farooq, U. (2006). Isolation and characterization of vinegar culture (*Acetobacter aceti*) from indigenous sources. *British Food Journal*, 108: 429-439.

Zuart-Macías, J., Ponce, P., Santiago, G., Quiroga, R. (1999). Coyol Palm (*Acrocomia mexicana*), a phylogenetic resource from Chiapas, México. II International Symposium on Ornamental Palms & other Monocots from the Tropics. *ISHS Acta Horticulturae* 486.

ANEXOS

Anexo 1

Medio estándar de crecimiento de bacterias ácido lácticas

Ingrediente	Cantidad g/L
Caldo MRS (Lab. Difco)	55
Agar (Lab. Dibico)	20
*Cicloheximida (Lab. Sigma)	0.05
Esterilizar, sembrar e incubar en condiciones anaerobias a 37°C por 48 horas	

*(Stringini M *et al.* 2009)

Medio de crecimiento de levaduras

Ingrediente	Cantidad g/L
Extracto de malta (Lab. Dibico)	3
Extracto de levadura (Lab. Dibico)	3
Peptona de caseína (Lab. DB Bioxon)	5
Dextrosa (Lab. J.T. Baker)	10
Agar (Lab. Dibico)	20
Oxitetraciclina	0.05
Esterilizar, sembrar e incubar 30°C por 48 horas	

*(Stringini M *et al.* 2009)

Medio de crecimiento para bacterias ácido acéticas

Ingrediente	Cantidad g/L
Extracto de Levadura (Lab. Dibico)	30
Etanol	20
Verde de bromocresol (Lab. Hycel)	0.05
Agar (Lab. Dibico)	20
Cicloheximida (Lab. Sigma)	0.05
Penicilina	0.01
Ajustar el pH a 5.5-6.0, esterilizar y añadir el etanol para posteriormente sembrar e incubar 30°C por 48 horas	

(Stringini M *et al.* 2009 y Amoa-A.W.K. *et al.* 2006)

Medio de crecimiento para *Zymomonas*.

Ingrediente	Cantidad g/L
Extracto de Levadura (Lab. Dibico)	4
Peptona de caseína (Lab. DB Bioxon)	5
Dextrosa (Lab. J.T. Baker)	50
Fosfato monopotásico	0.55
Cloruro de potasio	0.425
Cloruro de calcio	0.125
Sulfato de magnesio	0.125
Cloruro férrico	0.0025
Sulfato de manganeso	0.0025
Verde de bromocresol (Lab. Hycel)	0.022
Cicloheximida (Lab. Sigma)	0.05
Penicilina	0.01
Esterilizar, sembrar e incubar 30°C por 48 horas	

(Stringini M *et al.* 2009 y Orbie O. 2005)

Anexo 2

Medios de cultivo utilizados en la identificación y aislamiento de BAA.

Composición del medio de enriquecimiento para BAA.

Ingrediente	Cantidad g/L
Glucosa	10
Etanol	5 ml/L
Peptona	15
Extracto de levadura	8
Ácido acético	3 ml/L
Cicloheximida	0.05
Penicilina	0.01
Ajustar el pH del medio 3.5 con HCl, esterilizar a 121°C durante 15 minutos, el sembrar e incubar 30°C y 120 rpm durante 3-7 días.	

(Lisdiyanti *et al.*, 2003)

Medio estándar de crecimiento de bacterias acéticas (GYC).

Ingrediente	Cantidad g/L
Glucosa	50
Extracto de levadura	10
CaCO ₃	5
Agar	20
Cicloheximida	0.05
Penicilina	0.01
Ajustar el pH del medio a 4.5 con HCl, esterilizar a 121°C durante 15 minutos, el sembrar e incubar 30°C durante 2-4 días.	

(Ruiz *et al.*, 2000)

Medio CARR para el crecimiento sobre etanol.

Ingrediente	Cantidad %
Extracto de levadura (Lab. Difco)	3
Etanol	2
Agar	2
Verde de bromocresol	0.0022

Ajustar el pH del medio a 5.5-6.0 con HCl, distribuir en tubos de ensayo. Después de esterilizar el medio y antes de que solidifique, se añade a cada tubo el etanol, se permite la solidificación de los tubos en posición inclinada y se inocular en estría, incubándose a 28°C

(Kadere *et al.*, 2008)

Medio para oxidación de lactato.

Ingrediente	Cantidad %
Extracto de levadura (Lab. Difco)	3
Lactato de calcio	2
Agar	2
Distribuir en tubos de ensayo, esterilizar, se permite la solidificación de los tubos en posición inclinada y se inocular en estría, incubándose a 28°C	

(Kadere *et al.*, 2008)

Medio para oxidación de acetato.

Ingrediente	Cantidad %
Extracto de levadura (Lab. Difco)	3
Acetato de sodio	2
Agar	2
Distribuir en tubos de ensayo, esterilizar, se permite la solidificación de los tubos en posición inclinada y se inocular en estría, incubándose a 28°C	

(Kadere *et al.*, 2008)