

---

## TRABAJO PROFESIONAL

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TÍTULO DE

## INGENIERO BIOQUÍMICO

QUE PRESENTA

**IVÁN ALBERTO MANDUJANO RAMOS**

CON EL TEMA:

**“EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE  
*Lactobacillus sp.* DURANTE EL PROCESO  
DE FERMENTACIÓN DE LA TABERNA”**

MEDIANTE

**OPCIÓN I  
TESIS PROFESIONAL**

TUXTLA GUTIÉRREZ, CHIAPAS

SEPTIEMBRE 2015

SEP

SECRETARÍA DE  
EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO  
Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez

"2015, Año del Generalísimo José María Morelos Y Pavón"

DIRECCIÓN  
SUBDIRECCIÓN ACADÉMICA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
Tuxtla Gutiérrez, Chiapas 13 de agosto del 2015

OFICIO NUM. DEP-CT-638-2015

**C. IVÁN ALBERTO MANDUJANO RAMOS**  
PASANTE DE LA CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA  
EGRESADO DEL INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ.  
P R E S E N T E.


Habiendo recibido la comunicación de su trabajo profesional por parte de los CC. DR. VICTOR MANUEL RUIZ VALDIVIEZO, M.C. LUCIA MARÍA CRISTINA VENTURA CANSECO, Q.B.P. AURA FLORES PÉREZ Y DR. FEDERICO ANTONIO GUTIERREZ MICELI, en el sentido que se encuentra satisfactorio el contenido del mismo como prueba escrita, **AUTORIZO** a Usted a que se proceda a la impresión del mencionado Trabajo denominado:

**" AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LACTOBACILLUS SP. DURANTE EL PROCESO DE FERMENTACIÓN DE LA TABERNA "**

Registrado mediante la opción:  
**I (TESIS PROFESIONAL)**

**ATENTAMENTE**  
**"CIENCIA Y TECNOLOGÍA CON SENTIDO HUMANO"**

Vo. Bo.

  
ING. JUAN JOSÉ ARREOLA ORDAZ  
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE LA DIVISION DE  
ESTUDIOS PROFESIONALES

  
M. en C. JOSÉ LUIS MÉNDEZ NAVARRO  
DIRECTOR

C.c.p.- Departamento de Servicios Escolares  
C.c.p.- Expediente  
I'JLMN/I'JJA0/I'eeam



Secretaría de Educ. Pública  
Instituto Tecnológico  
de Tuxtla Gutiérrez,  
Div. de Est. Profesionales



Carretera Panamericana Km. 1080, C.P. 29050, Apartado Postal 599  
Tuxtla Gutiérrez, Chiapas; Tels. (961) 61 54285, 61 50461  
[www.ittg.edu.mx](http://www.ittg.edu.mx)



## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad; muchos de mis logros se los debo a ustedes entre los que se incluye este. Me formaron con reglas y libertades, pero al final de cuentas, me motivaron constantemente para alcanzar mis anhelos.

A mis hermanos, aunque en la mayoría de las veces parecía que estuviéramos en una batalla, hay momentos en los que la guerra cesa y nos unimos para apoyarnos y lograr nuestros objetivos. Gracias por todo su apoyo y por todos los momentos bonitos que hemos pasado.

A mis amigos por estar en los momentos buenos y malos de mi vida, los considero mis hermanos, jamás olvidaré los momentos que pasamos juntos, a pesar de los distintos rumbos que nuestras vidas están tomando, siempre los tendré presentes.

A todos mis profesores que participaron en mi formación académica, especialmente al Dr. Víctor Ruiz por haberme tenido paciencia en este proyecto y a la Dra. Teresa Ayora, mi mentora, la profesora que me inspiró para tomar este camino.

Al Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez por haberme brindado la oportunidad de estudiar esta ingeniería que, con cada momento duro y difícil vino una gran recompensa, conocimiento.

## Contenido

LISTA DE TABLAS.....	6
LISTA DE FIGURAS .....	6
INTRODUCCIÓN .....	7
ANTECEDENTES .....	9
1 Vino de palma .....	9
2 Taberna.....	11
Métodos moleculares para la identificación de microorganismos .....	14
Estudios moleculares para la identificación de bacterias y levaduras.....	16
Importancia del género <i>Lactobacillus</i> en la producción de bebidas fermentativas .....	18
JUSTIFICACIÓN .....	20
OBJETIVOS .....	21
Objetivo general.....	21
Objetivos específicos .....	21
METODOLOGÍA.....	22
Obtención de las muestras de taberna .....	22
Aislamiento de cepas en medios selectivos.....	22
Re-aislamiento de las bacterias que presentaron crecimiento en el medio selectivo .....	23
Pruebas bioquímicas y evaluación de la fermentación de carbohidratos glucosa, fructosa, sacarosa, lactosa, y maltosa. ....	24
Extracción de ADN genómico .....	25
Amplificación del gen 16 s rARN.....	28
Secuenciación y análisis bioinformático.....	29
RESULTADOS Y DISCUSIONES .....	30
1. Aislamiento de bacterias ácido lácticas a partir de la taberna .....	30
2. Re-aislamiento de las bacterias.....	32

Pruebas bioquímicas y fermentación de azúcares.....	34
3. Extracción de ADN .....	38
4. Producto de PCR del gen 16S rARN.....	39
5.1 Criterio para la selección de las cepas para secuenciación.....	40
5.2 Análisis de las secuencias y asignación taxonómica .....	41
CONCLUSIONES.....	43
BIBLIOGRAFIA .....	45

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1	Tabla 1 Crecimiento microbiano observado en cada tubo.	29
Tabla 2.	Resultado de pruebas bioquímicas.	32
Tabla 3.	Fermentación de azúcares.	34

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Condiciones de la reacción de PCR.	26
Figura 2.	Cinética del crecimiento de las poblaciones de bacterias ácido lácticas.	28
Figura 3.	Acidificación de medio WL por las cepas aisladas del proceso de fermentación.	31
Figura 4.	Electroforesis de extracciones de ADN en gel de agarosa 1%.	35
Figura 5.	Producto de PCR en gel de agarosa 0,8%.	36

## INTRODUCCIÓN

La variedad de bebidas alcohólicas que se producen en comunidades rurales es muy amplia, en algunos casos estas bebidas se remontan a cientos de años, son parte de una tradición, de las costumbres de comunidades y pueblos.

En el sureste de México se encuentra la planta *Acrocomia aculeata*, que en Chiapas se conoce con el nombre de 'coyol' palabra de origen náhuatl, derivado de 'coyolli', que significa cascabel (Martinez, 1976). Esta planta es una palma de abundantes espinas, su importancia radica en la amplia diversidad de usos por parte de la población regional, por ejemplo, se aprovechan sus flores, frutos, yemas y tallo; este último es utilizado para la obtención artesanal de la taberna (Cruz, 2009), la cual es una bebida alcohólica fermentada de exquisito sabor, que se obtiene de la savia. La taberna es producida y consumida principalmente en las regiones rurales del estado de Chiapas, donde su consumo está ampliamente difundido. Alcántara-Hernández (2010) reportó la presencia de ciertas bacterias ácido lácticas tales como *Lactobacillus nagelii*, *Lactobacillus sucicola* and *Lactobacillus sp.* destacando el rol que tiene *Lactobacillus sp.* en la fermentación alcohólica de la taberna.

En 2013 Santiago-Urbina en su estudio sobre la taberna reportó cambios en la población bacteriana durante la obtención de la savia de palma para la producción de esta bebida fermentada utilizando técnicas de microbiología convencionales

midiendo únicamente UFC/ml. Sin embargo, no hay un estudio de biología molecular que permita la identificación de las bacterias presentes en el proceso de fermentación y producción de taberna. Por lo tanto, el objetivo de este estudio es evaluar la presencia de una bacteria ácido láctica mediante la amplificación del gen 16S rARN dado que tiene numerosas áreas de aplicación, debido a su contribución al sabor, olor, textura, valor nutricional y a sus propiedades probióticas y a su tolerancia a altas concentraciones de etanol.



## ANTECEDENTES

La humanidad emplea la fermentación alcohólica desde tiempos inmemoriales para la obtención de bebidas alcohólicas como la cerveza, el vino y el champán que son obtenidas a través de levaduras. En muchas áreas tropicales de América, África y Asia, hay bebidas alcohólicas que son muy populares, que consisten en savias de plantas que llevan un proceso de fermentación mixta, conteniendo levaduras y bacterias, varias de ellas del género *Lactobacillus* (Xiao-Ran et al., 2013).

### 1 Vino de palma

El vino de palma se obtiene de la savia fermentada de varias especies de plantas tropicales de la familia *Palmae*, algunas de ellas son el *ogogoro* de Nigeria, el *tuba* de Filipinas, el *kalu* de la India, el pulque de México (Scoustra et al., 2013), la palma aceitera (*Elaeis guineensis*), la palma de coco (*Cocos nucifera*), palmera datilera (*Phoenix dactylifera*), la palma de nipa (Fruticans de *Nypa*), palma kithul (*Caryo taurens*) y palma rafia (*Raphia hookeri*) (Stringini et al., 2009), su uso es ampliamente difundido pues más de 10 millones de personas en el mundo consumen alguno de ellos (Balick, 1990).

La savia se obtiene de las inflorescencias masculinas inmaduras (sangrado de inflorescencia) o del tronco (sangrado del tronco). 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 2 semanas para que la savia se concentre (Stringini

et al., 2009), posteriormente se eliminan las hojas de la región meristemática y se le realiza una incisión rectangular de 7 a 10 cm, en el núcleo vegetativo del árbol (Amoa-Awua et al., 2007), de 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 (Amoa-Awua et al., 2007).

La savia fresca de la palma es dulce, claro, incoloro y contiene entre 10-12% de azúcares, principalmente sacarosa (Svanberg et al., 2012).

Sí, el vino de palma no se consume en pocos días, desarrollará un gusto avinagrado, que para algunos consumidores es preferido y para otros es inaceptable (Stringini et al., 2009).

La presencia de diferentes microorganismos, especialmente las bacterias y las levaduras responsables de la fermentación del vino de palma han sido estudiadas. La especie encontrada con mayor frecuencia es *Saccharomyces cerevisiae*. Es común que *S. cerevisiae* coexista con otros microorganismos como bacterias ácido lácticas y bacterias ácido acéticas. En 2012 Ouba, logró el aislamiento de *Lactobacillus* de un árbol de palma del oeste de África durante el proceso de fermentación de su savia y con una gran presencia debido a su capacidad para fermentar sacarosa, fructosa y glucosa; principales azúcares de la savia de la palma (Kasra-Kermanshahi & Peymanfar, 2012). *Lactobacillus* sp. tiene la capacidad de tolerar condiciones ácidas y concentraciones altas de alcohol, puede llegar a crecer a valores de pH 4-7 y a concentraciones de alcohol de 2.5-15%

(Lucena & Dos-Santos, 2010). En algunos casos los azúcares presentes en la savia de palma son metabolizados a alcohol y ácidos orgánicos, perdiendo la dulzura de la savia (Svanberg et al., 2012). Además de su habilidad fermentativa *Lactobacillus sp.* son conocidas como inofensivas para el consumo humano, algunos de los productos de fermentación se consideran útiles para mejorar el funcionamiento del sistema circulatorio, el sistema nervioso y el sistema renal (Danova & Petrov, 2005)}. Consecuentemente la presencia de *Lactobacillus sp.* en el vino de palma puede ser benéfico para la salud del hombre.

## **2 Taberna**

La taberna es un líquido ligeramente viscoso, dulce y efervescente. Se produce durante los meses de febrero y marzo, la población local elige cuidadosamente las palmas adultas, aquellas que tengan entre 4 y 7 años de edad (Rodríguez-Álvarez, 2011).

### **2.1 Definición**

La palabra taberna probablemente tuvo su origen en el vocablo náhuatl “ocmanazoyatl”, “palma que hace vino”, se derivó a “ocnamacoyan”, “donde se vende vino” y su equivalente castellano pasó a ser taberna (Corzo, 1978).

## 2.2 Procesos de obtención

La palma se derriba antes de que comience la etapa de floración y se le eliminan todas las hojas, cerca del extremo apical se realiza la apertura de una cavidad, conocida entre los lugareños como “canao” donde se acumulará la savia, la cual será cubierta con cartones o plásticos para evitar la invasión de insectos que son atraídos por su dulce contenido (Rodríguez-Álvarez, 2011). 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, según el testimonio de algunas personas, una palmera puede producir de 2 a 6 litros de taberna por día; para llevar a cabo este rendimiento, el propietario debe raspar el “corazón” de la corteza diariamente, generando un abertura nueva. Durante este proceso es necesario tener especial cuidado para evitar cualquier tipo de contaminación. Bajo estas condiciones una palmera puede producir entre 90-180 litros de taberna en los 25-30 días que mantiene la producción (Zuart-Macías et al., 1999).

La savia de la palma se extrae de la cavidad con una cuchara de mango largo o un carrizo largo (Rodríguez-Álvarez, 2011), y se deja que continúe la fermentación espontánea en recipientes plásticos por 5-6 días antes de adicionarle azúcar y evitar la conversión de etanol en ácido acético. A 30 litros de jugo se le agregan 4.5 kg de azúcar por día. Se le puede agregar azúcar para lograr una segunda fermentación por 4-7 días más (Amoa-Awua et al., 2007).

### 2.3 Zonas de producción en México y Chiapas.

La zona sureste de México es donde se produce la taberna, siendo en los estados de Chiapas y Oaxaca donde se produce de manera importante. En el estado de Chiapas se lleva a cabo una mayor producción en la zona frailesca siendo en los municipios de Villaflores, y Villacorzo donde se produce la mayor parte, así como en Chicomuselo (Serrano-Macías, comunicación personal).

### 2.4 Propiedades medicinales

La taberna es muy apreciada por su exquisito sabor y las propiedades medicinales en enfermedades musculares y respiratorias (Zuart-Macias et al., 1999). La taberna se ha utilizado como auxiliar en el tratamiento a algunos trastornos tales como problemas gastrointestinales, anorexia e infecciones renales debido a la presencia de pro bióticos (Alegria, 2012) y sus altos valores nutricionales (Steinkraus, 2002).

## **Métodos moleculares para la identificación de microorganismos**

### **El gen 16S rARN**

Entre los tres genes de rADN, el 16S rADN es el más estudiado en filogenia y taxonomía bacteriana (Rodicio y Mendoza, 2004). El estudio de la diversidad bacteriana empleando al gen 16S rADN, ha permitido obtener información sobre la composición y estructura de comunidades bacterianas y a su vez ha conllevado al diseño de marcadores con fines de diagnóstico e identificación tanto de bacterias cultivables como no cultivables (Rodríguez-Álvarez, 2011).

El rARN 16S, es un polirribonucleótido de aproximadamente 1500 nucleótidos codificado por el gen *rrn*, también denominado ADN ribosomal 16S (rADN 16S), a partir de cuya secuencia se puede obtener información filogenética y taxonómica. Dado que el rARN 16S, proviene de las subunidades pequeñas de los ribosomas, existe un acrónimo que lo refiere, conocido como rARN SSU (del inglés, *small subunit*) (Rodicio y Mendoza, 2004). Los rARN SSU se encuentran altamente conservados, presentando regiones comunes a todos los organismos pero contienen además variaciones que se encuentran en zonas específicas, esta molécula tiene un papel importante en el ribosoma para la síntesis de proteína (Barrera-Chavez, 2010). El análisis de la secuencia de los rARN 16S de distintos grupos filogenéticos reveló un hecho adicional de gran importancia práctica: la presencia de una o más secuencias características que se denominan oligonucleótidos firma (Rodicio y Mendoza, 2004). Se trata de secuencias específicas cortas que aparecen en la mayoría de los miembros de un determinado grupo filogenético y nunca están presentes en otros grupos, incluidos

los más próximos. Debido a esta razón, los oligonucleótidos firma pueden ser utilizados para ubicar cada bacteria dentro de su grupo (Rodicio y Mendoza, 2004).

El número de copias del operón ribosómico por genomas bacteriano varía considerablemente, de 1 a 15, siendo relativamente constante a nivel especie, género e incluso familia (Rodicio y Mendoza, 2004).

Este marcador molecular presenta varias ventajas: a) está presente en todos los organismos y tiene la misma función en todos ellos; b) debido a restricciones estructurales, diferentes regiones de la molécula presentan distinto grado de variabilidad en su secuencia, lo que permite realizar comparaciones con diferente nivel de resolución; c) su transmisión es principalmente vertical, ya que se considera que no está sujeto a transferencia génica horizontal entre microorganismos; d) la longitud de su secuencia tiene un tamaño adecuado (1500 nucleótidos) para proporcionar suficiente información, con un bajo costo; además logra minimizar las fluctuaciones estadísticas y e) el análisis de la secuencia nos permite realizar reconstrucciones filogenéticas de los microorganismos (Rodicio y Mendoza, 2004).

El rADN es una molécula muy antigua, con carácter universal, constante y una limitada función, la cual, se estableció en una temprana fase de evolución, y no es afectada por cambios en el medio ambiente de los organismos (Rodicio y Mendoza, 2004). Los cambios ocurren de manera suficientemente lenta, que ayudan a aportar información acerca de todos los procariontes; los rARN SSU

contienen suficiente variabilidad para diferenciar no solo organismos más alejados, sino también los próximos (Rodicio y Mendoza, 2004).

El empleo de la molécula del rADN 16S, es eficiente, dependiendo del grupo de microorganismos que se deseen evaluar; ya que se pueden emplear desde iniciadores muy generales (para el estudio de comunidades bacterianas); hasta muy específicos, para la identificación de un determinado grupo de bacterias (Díaz-Ruiz y Wachter-Rodarte, 2003). Es imprescindible que los iniciadores tengan una alta especificidad, pues nos proporciona inferencias filogenéticas, la cual nos facilita el alineamiento de secuencias (Rosello-Mora y Amann, 2001).

### **Estudios moleculares para la identificación de bacterias y levaduras**

Hay estudios de las comunidades microbianas presentes en diversas bebidas fermentadas en tales como el pulque, el pozol y bebidas a partir de soya en las cuales se han logrado identificar bacterias, a través de técnicas de biología molecular, que presentan un gran potencial, como Sánchez-González (2011) quien a partir de las aguas resultantes del procesamiento del maíz, aisló e identificó nuevas cepa de *Bacillus flexus* que es alcalifílica facultativa, que tiene las propiedades físicas para producir moléculas de gran valor para la elaboración de productos agroindustriales; así también Escalante (2008) logró estudiar la comunidad bacteriana del pulque a través de las técnicas dependiente del cultivo y de las no dependientes.



Una de las bacterias más importantes es *Lactobacillus* sp. que es un microorganismo en forma de bacilos largos y extendidos, aunque con frecuencia pueden observarse bacilos cortos o coco-bacilos coryneformes (Samaniego-Fernandez, 2000). Son normalmente no motiles, las especies motiles presentan flagelación peritrica, son Gram positivas con rara producción de pigmentos, aunque unas pocas especies los producen de color amarillo, naranja, rojo o pardo. No producen nitritos a partir de nitratos. Son microaerófilas hacia la anaerobiosis. No esporulan, algunas cepas presentan cuerpos bipolares que probablemente contengan polifosfato. Los grandes bacilos homofermentativos presentan gránulos internos. La pared celular es típicamente Gram positiva y contiene peptidoglicanos (mureínas) de varios quimiotipos, de ahí que el peptidoglicano del tipo Lisina-D-Asparagina sea el más ampliamente distribuido. Esta pared contiene polisacáridos unidos al peptidoglicano mediante enlaces fosfodiéster, las colonias de *Lactobacillus* en medios sólidos son pequeñas (2 mm), convexas, suaves, con márgenes enteros, opacas y generalmente sin pigmentos, en ocasiones presentan coloración amarillenta y rojiza. Normalmente no producen nitratos, indol y sulfhídrico. Las cepas del género *Lactobacillus* son catalasas negativas, pero algunas cepas producen la enzima pseudocatalasa que descompone el peróxido de hidrógeno. Son citocromo negativos, por la ausencia de porfirinas (Samaniego-Fernandez, 2000).

La clasificación taxonómica es (NCBI, 2014):

Reino: *Bacteria*

Phylum: Firmicutes

Clase: *Bacilli*

Orden: Lactobacillales

Familia: Lactobacillaceae

Género: *Lactobacillus*

### **Importancia del género *Lactobacillus* en la producción de bebidas fermentativas**

Los microorganismos han sido utilizados en forma empírica en la producción de alimentos durante miles de años, los más claros ejemplos se aprecia en productos lácticos y alcohólicos (Chukeatirote, 2003). Algunos de estos alimentos aportan características, en base a la presencia de determinados microorganismos. En los últimos años se ha mostrado un interés específico sobre estos, debido a que su utilización puede mejorar la salud y prevenir enfermedades (Reid, 2001).

El interés de los consumidores por alimentos funcionales ha aumentado, alimentos que demuestren poseer un efecto beneficioso sobre por lo menos alguna función en el organismo, más allá de los efectos nutricionales habituales. (Rodríguez-González, 2009)

Las Bacterias Ácido Lácticas (BAL) son unos de los microorganismos fundamentales en la biotecnología alimenticia (Vaughan, 2013). Por ejemplo, el pulque es una bebida tradicional no destilada, producida por la fermentación de la savia conocida como aguamiel, que es extraída de diversas especies de maguey, esta bebida es producida y altamente consumida en el centro de México. Estudios realizados para caracterizar la diversidad microbiana de las muestras d pulque han

demostrado la presencia de varias Bacterias Ácido Lácticas (BAL) entre ellas *Lactobacillus* sp. (Escalante, 2008).

La presencia de *Lactobacillus* sp. está confirmada en bebidas fermentadas de manera empírica, tal es el caso de caxiri, bebida alcohólica producida a partir de papas por los indígenas Juruna en Brasil (Auler-Doamaral, 2012), así también en los productos fermentados de Zambia, mabisi, chibwantu y munkoyo (Schoustra, 2013) y en Taiwán se reportó la presencia de *Lactobacillus* sp. en una bebida alcohólica obtenida de arroz y que es típica de unas tribus indígenas de ese país (Shiou-Huei, 2013).

## JUSTIFICACIÓN

La taberna es una bebida fermentada obtenida de la palma de “coyol” (*Acrocomia aculeata*). Esta bebida es considerada una alternativa al tratamiento de algunos trastornos, tales como problemas gastrointestinales, anorexia e infecciones renales debido a la presencia de aminoácidos, proteínas, vitaminas, azúcares y probióticos. A su vez tiene altos valores nutricionales y es fuente de microorganismos tales como levaduras, bacterias ácido lácticas, bacterias ácido-acéticas. Sin embargo, la presencia y función de los microorganismos en el proceso de la fermentación de la taberna no es bien conocida. Por lo tanto, es necesario aislar e identificar los microorganismos que están presentes en el proceso de fermentación de esta bebida mediante el uso de herramientas de microbiología convencional y biología molecular, debido a que la taberna puede ser una fuente de microorganismos con alto potencial biotecnológico para la producción de etanol y probióticos.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

Evaluar la presencia de *Lactobacillus* sp. durante el proceso de fermentación de la taberna mediante la combinación de técnicas de microbiología, como tinción de Gram, pruebas de oxidasa, catalasa, manitol, movilidad y de reducción de nitratos y técnicas moleculares.

### Objetivos específicos

Aislar cepas en diferentes medios selectivos, tales como medio Bandarú y medio WL (Wallerstein Laboratory) para *Lactobacillus* sp. durante los días 1 al 14 del proceso de fermentación.

Evaluar la capacidad de fermentación de las cepas aisladas mediante el crecimiento en medios individuales de glucosa, fructosa, sacarosa, maltosa y lactosa.

Identificar la presencia de *Lactobacillus* sp. mediante las pruebas bioquímicas de oxidasa, catalasa, manitol, movilidad y reducción de nitratos.

Identificar las cepas bacterianas presentes en el proceso de fermentación de la taberna mediante la extracción de ADN, amplificación por PCR y secuenciación del gen 16S rARN.

## METODOLOGÍA

### **Obtención de las muestras de taberna**

Las muestras fueron proporcionadas por el Laboratorio de Biología Molecular de la División de Estudios de Posgrado e Investigación del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, que se obtuvieron directamente del lugar de producción de la taberna, en el poblado Colonia Benito Juárez, del municipio de Villaflores, Chiapas, México. Sus coordenadas geográficas son 16° 23'33.9"4N, 93° 19'16, 152"W, a una altitud de 46 msnm. Las muestras se tomaron de 4 palmas jóvenes (8 años de edad), de manera aséptica, en un bote de plástico limpio con un volumen aproximado de 2 litros e inmediatamente se transportaron a temperatura ambiente al laboratorio en el Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, con muestreos realizados cada 24 horas durante 14 días. Las muestras estuvieron almacenadas con glicerol a un 20% a una temperatura de -4°C durante 3 meses.

### **Aislamiento de cepas en medios selectivos**

Para determinar la presencia de la bacteria *Lactobacillus* sp. en la taberna se utilizó un medio de cultivo selectivo con una composición de: extracto de malta 0.3%, extracto de levadura 0.3%, glucosa 2.0%, peptona 0.5% y cicloheximida 0.002%. Se transfirieron 9 ml de medio de cultivo a tubos de ensaye y se inocularon respectivamente con 1 ml de taberna proveniente de cada tiempo de monitoreo. Después, se incubó a una temperatura de 30 °C durante 24 horas. Finalmente, se evaluó el crecimiento en cada tubo de acuerdo a la turbidez.

## **Re-aislamiento de las bacterias que presentaron crecimiento en el medio selectivo**

Las muestras que presentaron crecimiento en el medio anterior fueron re-aisladas en cajas Petri que contienen medio de cultivo llamado agar WL, con una composición de extracto de levadura del 0.4%, peptona de caseína 0.5%, glucosa 5%, fosfato de potasio 0.055%, sulfato de magnesio 0.015%, cloruro de calcio 0.0125%, cloruro de potasio 0.0425%, cloruro de hierro (III) 0.00025%, verde de bromocresol 0.0022% y agar al 1.7% (Manual Difco & BBL ) (Hurtado M. , 2011). La inoculación se realizó mediante la técnica de estría cruzada. Las placas se incubaron a 30°C durante 48 horas. A todas las muestras que crecieron se les evaluó la acidificación causada por las bacterias mediante la detección del viraje de color del indicador de pH verde de bromocresol presente en el medio, que torna del color azul a amarillo al decrecer el pH.

Para la conservación de las cepas aisladas que provocaron viraje, se inocularon en el medio propuesto por Bandarú (2005), se incubaron por 3 días a 30°C y se tomó una alícuota de 700  $\mu$ L y se le adicionó glicerol 300 $\mu$ L (70:30) para ser finalmente conservado a -20 °C (Rodríguez-Álvarez, 2011).

## **Pruebas bioquímicas y evaluación de la fermentación de carbohidratos glucosa, fructosa, sacarosa, lactosa, y maltosa.**

Las colonias que demostraron acidificación del medio se transfirieron a cajas de Petri con medio propuesto por Bandarú (2005), que tiene una composición de glucosa 10%, extracto de levadura 1%, 0.1%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.1%  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ , 0.1%  $\text{MgSO}_4$  que además incluyó 3 % de etanol y 0.002% de cicloheximida. Se incubaron a una temperatura de 30°C durante 48 horas y 125 rpm, condiciones similares usadas por Alegría (2012), en la evaluación de la dinámica poblacional de la taberna.

Una vez que las cepas crecieron se les realizó una caracterización fenotípica y bioquímica, las pruebas que se llevaron a cabo fueron: tinción de Gram, catalasa, manitol, movilidad, reducción de nitratos, oxidasa, de acuerdo a las técnicas descritas en el Manual Básico de Microbiología (2009). Así también se determinó la habilidad del microorganismo de fermentar diferentes azúcares como son: glucosa, fructosa, sacarosa, lactosa, y maltosa, utilizando un medio compuesto del azúcar a determinar al 1%, extracto de levadura 0.5%, pH 6.8 el cual fue ajustado con ácido clorhídrico (HCl) 0.1 N, del cual se transfirieron 9 ml a tubos de ensayo y fueron inoculados con 1 ml de las cepas crecidas en medio líquido, después se incubaron a 30°C durante 48 horas y se evaluó el crecimiento de las cepas de acuerdo a su turbidez de manera visual.



## **Extracción de ADN genómico**

Las cepas que demostraron un resultado positivo en la acidificación del medio selectivo WL y resultados similares a *Lactobacillus* en las pruebas bioquímicas, fueron inoculadas en medio líquido en tubos de ensaye, conteniendo un volumen total de 6 ml reportado por Bandarú (2005), que tiene una composición de glucosa 10%, extracto de levadura 1%, 0.1%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.1%  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ , 0.1%  $\text{MgSO}_4$  incubadas a 36°C por 120 h a 125 rpm para asegurar la presencia de biomasa.

## Preparación de la muestra

1. Se tomaron 6 ml de cultivo del microorganismo (crecido en medio líquido durante 5 días en agitación a 125 rpm) se tomó 1.5 ml y se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos.
2. El sobrenadante se descartó y se agregó 1.5 ml del cultivo microbiano medio inoculado, el paso 1 se repite hasta obtener el 'pellet' de los 6 ml.

## Extracción de ADN

El ADN fue extraído de las cepas aisladas de acuerdo a las indicaciones del fabricante del kit '*Zymo Research ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™*' tal como fue reportado por Salvador-Figueroa *et al.* 2015. Brevemente, cada uno de los pasos se mencionan a continuación:

1. El '*pellet*' obtenido se resuspendió en 200  $\mu$ l de agua destilada estéril PiSA® y fueron transferidos a un tubo de lisis '*ZR BasgningBead®*'. Se agregó 750  $\mu$ l de la solución de lisis al tubo.
2. Se usó un vortex a máxima potencia durante 8 minutos.
3. El tubo de lisis '*ZR BasgningBead®*' fue centrifugado a 10,000 rpm durante un minuto.
4. Después, 400  $\mu$ l del sobrenadante se transfirieron a un tubo '*Zymo-Spin® IV Spin Filter*' (tapa naranja) dentro de un tubo recolector y se centrifugó a 7,000 rpm durante un minuto.
5. Se agregó 1,200  $\mu$ l del buffer de unión de ADN al filtrado en el tubo colector del paso 4.

6. Se transfirió 800  $\mu$ l de la mezcla del paso 5 a una columna '*IIC Zymo-Spin®*' en un tubo recolector y se centrifugó a 10,000 rpm durante un minuto.
7. El fluido del tubo colector se descartó y se repitió el paso 6.
8. Se agregó 250  $\mu$ l del buffer de pre-lavado de ADN a la columna '*IIC Zymo-Spin®*' en un nuevo tubo recolector y se centrifugó a 10,000 rpm durante un minuto
9. Se agregó 500  $\mu$ l del buffer de lavado de ADN a la columna '*IIC Zymo-Spin®*' y se centrifugó a 10,000 rpm durante un minuto.
10. Se transfirió la columna '*IIC Zymo-Spin®*' a un tubo limpio para centrifugar de 1.5 ml y se agregó 100  $\mu$ l del buffer de elución de ADN directamente a la matriz de la columna. Se centrifugó a 10,000 rpm durante 30 s para diluir el ADN.

Los productos obtenidos a través de la extracción de ADN fueron analizados mediante electroforesis con un gel de agarosa al 1%, cargando en un pozo 2  $\mu$ l del marcador molecular de tamaño y en los demás pozos 3  $\mu$ l de cada muestra, y se usó un voltaje de 90V durante 30 minutos, seguido de un revelado con Bromuro de etidio.

## Amplificación del gen 16 s rARN

Las reacciones de amplificación se desarrollaron en un volumen total de 25  $\mu$ l: 2.5  $\mu$ l de buffer de carga, 1.5  $\mu$ l de  $MgCl_2$  (25 mM), 1.25 de los oligonucleótidos 27F y 1492R, 0.5  $\mu$ l de dNTP's (60 mM), 1  $\mu$ l del ADN extraído, 0.125  $\mu$ l de Taq polimerasa, 7.5  $\mu$ l de albumina sérica bovina (BSA), 1.5 de dimetil sulfóxido y 9.125  $\mu$ l de  $H_2O$ .

Las condiciones de amplificación incluyeron un paso de pre-desnaturalización a 94°C por 4 minutos, seguidos de 35 ciclos a 94 °C (desnaturalización) por 1 minuto, a 57 °C (alineamiento) por 1 minuto, a 72°C (elongación) por 2 minutos y un paso final a 72 °C (extensión final) durante 10 minutos (Ruiz-Romero et al. 2013). La reacción de PCR fue llevada a cabo en un termociclador marca eppendorf modelo Temocycler Eppendorf.

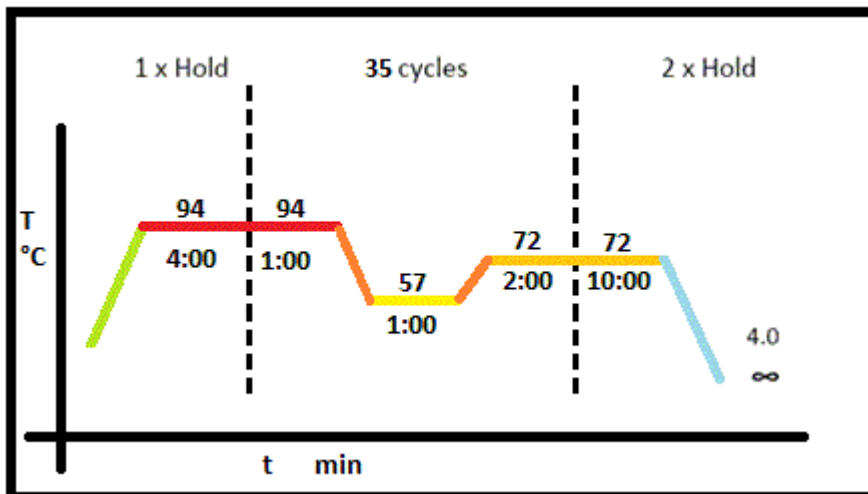


Figura 1. Condiciones de la reacción de PCR

Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis con un gel de agarosa al 1%, cargando en un pozo 2  $\mu$ l del marcador molecular de tamaño y en los demás pozos 3  $\mu$ l de cada muestra, todos previamente mezclados con 2  $\mu$ l de SyBr® y se usó un voltaje de 60 V durante 40 minutos.

### **Secuenciación y análisis bioinformático**

El producto de PCR fue purificado y secuenciado por MACROGEN (<http://dna.macrogen.com/eng/>). Las secuencias obtenidas fueron comparadas con secuencias de gen 16S rARN del banco de genes 'GenBank/EMBL' a través de un 'BLAST' (Chun & Lee, 2007). Se realizaron múltiples alineamientos con la bacteria relacionada más cercana, la similitud secuencial se calculó usando los programas FinchTV 1.4.0 y SeaView version4.2.6 como fue reportado por Ruiz-Romero et al. (2013).

## RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 1. Aislamiento de bacterias ácido lácticas a partir de la taberna

Las catorce muestras, producto de igual número de monitoreos (figura 2) diarios realizados por Alegría-Mundo (2012), nos fueron proporcionadas para la realización del proyecto, dichas muestras se encontraban almacenadas en glicerol (20%) a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

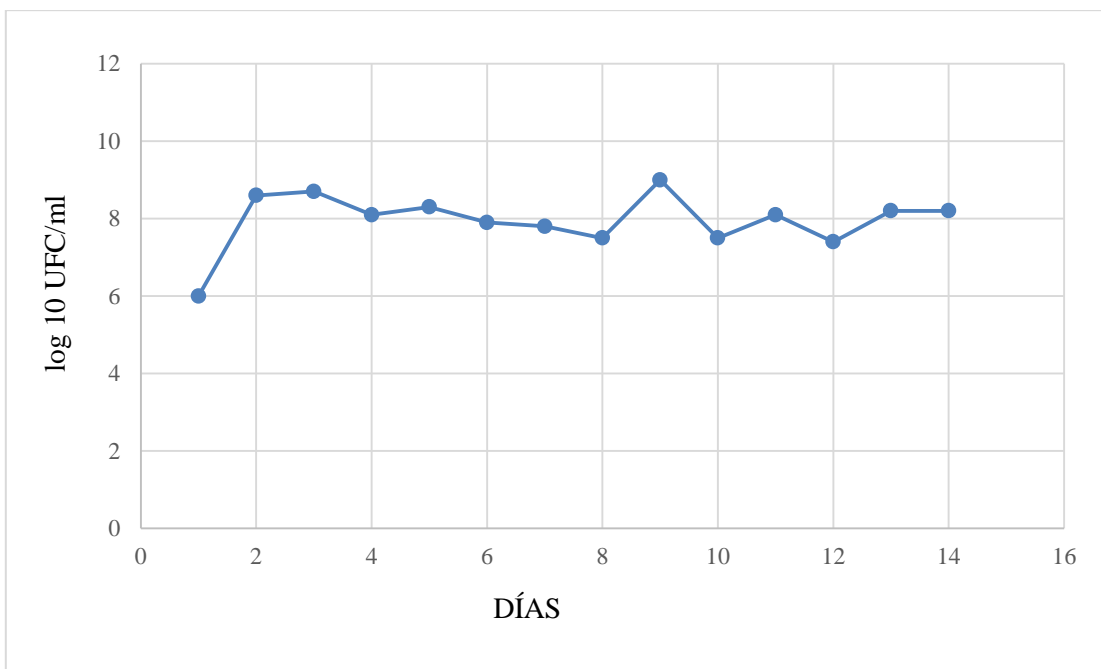


Figura 2. Cinética del crecimiento de las poblaciones de bacterias ácido lácticas.

Las muestras fueron inoculadas respectivamente en un medio selectivo, que contiene cicloheximida, el cual inhibe la síntesis de proteínas en células eucariotas, para evitar el crecimiento de hongos y levaduras, tal y como fue reportado por Alegría-Mundo (2012) cuando se usó en un medio MRS para incubar bacterias ácido lácticas.

El crecimiento bacteriano en cada uno de los tubos de ensaye fue evaluado de manera visual después de 24h de incubación.

Tabla 1 Crecimiento microbiano observado en cada tubo.

Tubo	Crecimiento
1	No
2	No
3	Si
4	Si
5	Si
6	Si
7	No
8	Si
9	Si
10	No
11	Si
12	No
13	No
14	No

Los medios de cultivo usados, el propuesto por Bandarú y el WL permitieron el crecimiento de las bacterias lácticas presentes en las muestras de taberna, Santiago-Urbina, utilizó medios similares (2013) cuando aisló bacterias ácido lácticas del mismo tipo de muestra.

## 2. Re-aislamiento de las bacterias

El re-aislamiento de las cepas que presentaron crecimiento se realizó en el medio WL (Hurtado & Ramos, 2011), que contiene verde de bromocresol, que sirve como indicador cuando hay un cambio de pH, un microorganismo que acidifica el medio genera un viraje de color, de azul a amarillo la cual es una característica de las bacterias ácido lácticas (BAL) (Parada & Caron, 2007) como se observa en la figura 2, en donde las cepas 3a, 4b, 5a, 6a, 8b, 9a, 11a, generaron un cambio en la coloración del medio, a causa de la acidificación, característica que las Bacterias Ácido Lácticas (BAL) presentan, debido a la transformación de los carbohidratos, presentes en el medio, en ácido láctico, resultados similares fueron reportados por Alvarado (2006) al trabajar con pulque (producido a partir de aguamiel extraído de diferentes especies de maguey *Agave atrovirens*, *A. mapisaga*, and *A. salmiana* ) y tepache (producido de la fermentación de piña con agua, panela y otras especias como canela) que aislaron bacterias del género *Lactobacillus* y *Lactococcus*.



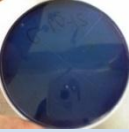
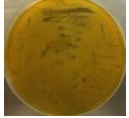

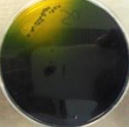


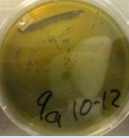
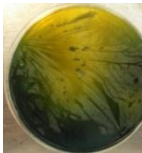
Cepas	Viraje de color	Imagen
<b>Control Negativo</b>	No	
3a	Si	
4b	Si	
5a	Si	
6a	Si	
8b	Si	
9a	Si	
11a	Si	

Figura 3. Acidificación de medio WL por las cepas aisladas del proceso de fermentación.

### Pruebas bioquímicas y fermentación de azúcares

Los resultados de las pruebas bioquímicas se observan en la tabla 3. Las cepas 3a, 4b, 5a, 6a, 8b, 9a, 11a tuvieron resultados positivos utilizando la técnica de tinción de Gram, esto se debe a que este tipo de microorganismos tienen una gruesa capa de peptidoglicano en su pared, la cual retiene el colorante, resultados similares a este fueron reportados por Estela (2007), quien al trabajar con *Lactobacillus plantarum* para optimizar la producción de ácido láctico comprobó que *Lactobacillus* es Gram positivo.

Tabla 2. Resultado de pruebas bioquímicas.

Cepa	Gram	Oxidasa	Catalasa	Manitol	Movilidad	Reducción de nitratos
3a	+	+	-	+	-	-
4b	+	+	-	+	-	-
5a	+	+	-	+	-	-
6a	+	+	-	+	-	-
8b	+	+	-	+	-	-
9a	+	+	-	+-	-	-
11b	+	+	-	+	-	-

Acerca de la prueba de la enzima oxidasa los resultados de todas las cepas resultaron negativas esto es debido a la ausencia del sistema de citocromo-oxidasa (Rodriguez-Gonzalez, 2009) que es una característica natural de *Lactobacillus*, a pesar de algunos estudios realizados, en los cuales se realizó la inclusión de cofactores para incrementar la actividad de la oxidasa (Li, 2015), se demostró contraproducente al haber una reducción del crecimiento y de la producción de lactato.

Por otro lado, en la prueba de catalasa todas las bacterias evaluadas presentaron resultados negativos, *Lactobacillus* tiene como característica el ser negativa a la prueba de catalasa, debido a que no descompone al peróxido de hidrógeno (Kasra-Kermanshahi & Peymanfar, 2012), esta característica hace que algunas cepas de *Lactobacillus* se hayan usado en pruebas de antagonismo con *Salmonella* (Luo, 2015).

En la prueba de manitol, las cepas 3a, 4b, 5a, 6a, 8b, 11a, presentaron resultados positivos, lo que comprueba que estas bacterias degradan manitol y lo utilizan como una fuente de carbono (Racine & Saha, 2007).

Con respecto a la prueba de movilidad, todas las bacterias evaluadas presentaron resultados negativos, esto es debido a la ausencia de flagelos (Ramirez-Muñoz, 2010), aunque excepcionalmente algunas cepas de *Lactobacillus* pueden poseer movilidad, debido a la ayuda de flagelos peritricos (Estela & Rychtera, 2007). En tanto que en la prueba de reducción de nitratos, todas las cepas evaluadas

demonstraron tener resultados negativos al no ser capaces de producir nitritos a partir de nitratos.

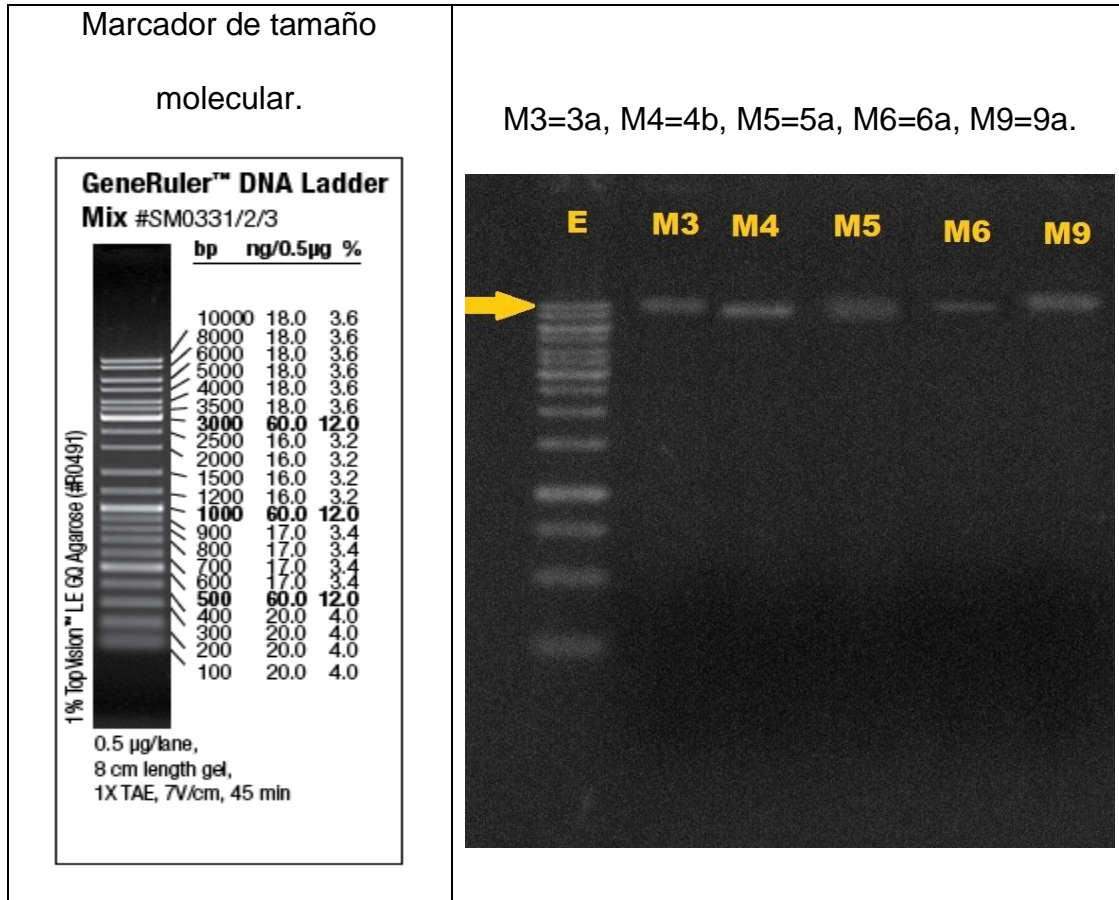
Tabla 3. Fermentación de azúcares

Cepa	Glucosa	Fructosa	Sacarosa	Lactosa	Maltosa
<b>3a</b>	+	+	+	+	-
<b>4b</b>	+	+	+	+	-
<b>5a</b>	+	+-	+-	+-	+-
<b>6a</b>	+	+	+	+	-
<b>8b</b>	+	+	+-	+	-
<b>9a</b>	+	+-	+-	+	-
<b>11b</b>	+	+-	+-	+	-

Es conocido que las bacterias ácido lácticas como *Lactobacillus* sp. tienen la capacidad de fermentar glucosa, lactosa, fructosa (Zourari, 1992) sacarosa (Badel & Michaud, 2011) y no maltosa. En cuanto a las cepas 3a, 4b, 6a, 8b, 9a y 11b presentan resultados similares con los reportados por la bibliografía, sin embargo la cepa 5a presentó resultados que aún no es definitivo por lo que es necesario llevar a cabo la siguiente etapa de análisis PCR, secuenciación y análisis de la secuencia obtenida.

### 3. Extracción de ADN

Se evaluó la presencia de ADN, de las muestras extraídas, mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% seguido de un revelado con bromuro de etidio. Los resultados se muestran en la figura 1.



ciones de ADN en gel de agarosa 1%.

El tamaño molecular del ADN fue determinado usando un marcador de tamaño de 10 Kb 'Thermo Scientific GeneRuler ADN Ladder Mix'. Así, de acuerdo a las bandas descritas, se calcula que la longitud de las muestras en los 5 carriles es de

aproximadamente 12,000 pb (pares de bases). Las muestras han sido refrigeradas a -20°C.

#### 4. Producto de PCR del gen 16S rARN

Los productos de PCR fueron verificados mediante un gel de agarosa al 0.8%, usando como marcador de tamaño molecular el 'AmpliSize Molecular Ruler, 50-2,000 pb Ladder', con el cual observamos que los amplicones tienen una longitud aproximada de 1500 pb.

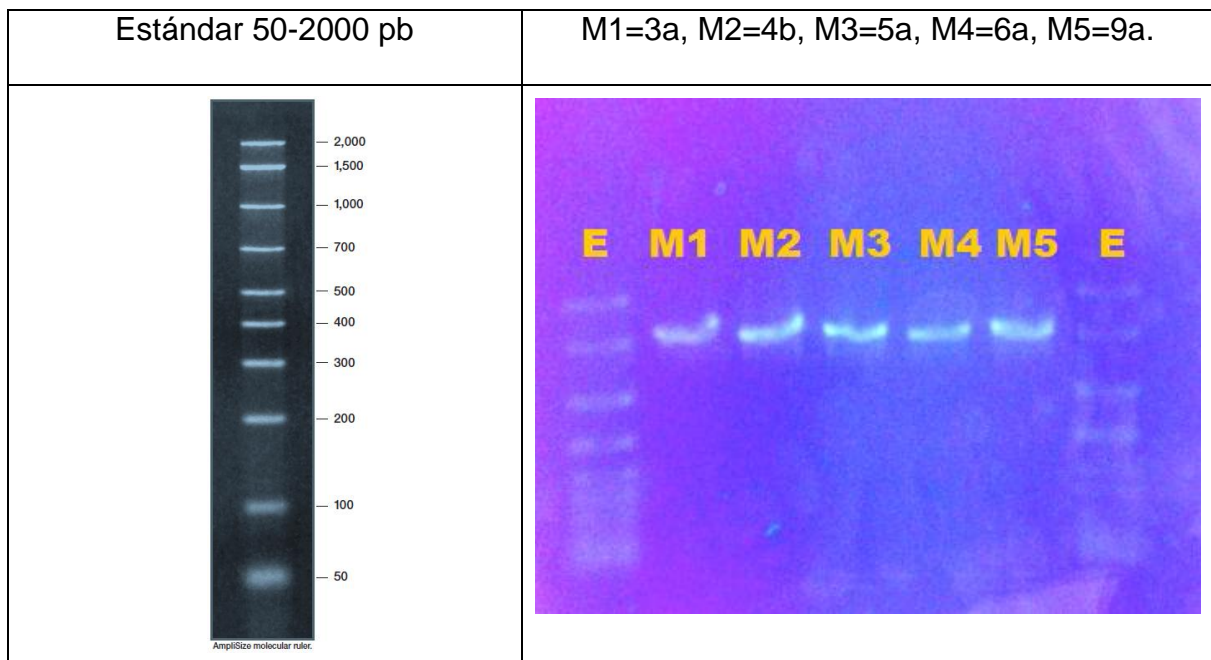


Figura 5. Producto de PCR en gel de agarosa 0,8%.

## 5.1 Criterio para la selección de las cepas para secuenciación

Empleando el medio Bandarú con cicloheximida y posteriormente el medio WL, se aislaron 7 cepas.

Las 7 cepas aisladas reportaron ser Gram positivas, oxidasa positivas, manitol, positivas, catalasa negativas, movilidad negativa y reducción de nitratos negativos; lo cual sugiere que las cepas son del género *Lactobacillus*. Las 7 cepas son capaces de degradar glucosa, fructosa, sacarosa y lactosa e incapaces de degradar maltosa.

Las 7 cepas aisladas se clasificaron en 2 grupos, siguiendo los siguientes criterios:

Grupo 1, abundante crecimiento en medio Bandarú, viraje total en medio WL, excelente fermentación de fructosa, sacarosa.

Grupo 2, crecimiento moderado en medio Bandarú, viraje parcial en medio WL, fermentación moderada de fructosa y sacarosa

De acuerdo a esta clasificación, las cepas 3a, 6a forman parte del grupo 1; las cepas 4b, 5a, 8b, 9a y 11a están incluidas en el grupo 2.

Las cepas 6a y 9a aisladas de los días 6 y 9 de la fermentación de la taberna respectivamente fueron escogidas como representantes de cada grupo para proceder a la purificación y secuenciación del ADN extraído.



## 5.2 Análisis de las secuencias y asignación taxonómica

La identificación de dos cepas a partir de las 7 que se aislaron se debe a que varias de ellas presentaron características morfológicas y bioquímicas similares por lo que se clasificaron en grupos tomando como criterio las características identificadas en las pruebas, logrando así encontrar dos grupos de cepas con características diferentes, de las cuales se tomaron una cepa de cada grupo para realizar su identificación a nivel molecular.

Se analizaron las secuencias de dos cepas, usando BLAST (The Basic Local Alignment Search Tool) para encontrar regiones similares entre secuencias, comparando las secuencias de nucleótidos obtenidas con las secuencias de la base de datos del NCBI (National Bank for Biotechnology Information).

Del análisis bioinformático se determinó que la cepa BAL6a tiene una similitud del 99% con *Lactobacillus plantarum* y la cepa BAL9a tiene una similitud del 97% con *Lactobacillus pentosus*.

Diversos estudios (Alcántara-Hernández, 2010; Alegría, 2012) han caracterizado molecularmente la cepa *Lactobacillus*, estos han sugerido que *Lactobacillus* tiene un papel importante durante la fermentación alcohólica de la 'taberna'. *Lactobacillus plantarum* ha sido reportado de formar parte de algunos alimentos africanos consistentes en cereales fermentados (Oyewole, 1997). Ciertas cepas de *L. plantarum* han sido reportadas de tener efectos probióticos (Lee & Salminen, 1995).

Por otro lado *Lactobacillus pentosus* ha sido aislada a partir de alimentos fermentados en diversas partes del mundo, como en Tailandia (Tanasupawat, 1992) India (Anandharaj, 2014), lo cual la ha propiciado conocer más acerca de ella y abordarla desde diferentes enfoques. Actualmente nuevas bacterias benéficas están siendo desarrolladas y aplicadas al mercado actual (Han & Li, 2013) por lo que haber encontrado a *L. pentosus*, proporciona la oportunidad de usarla en nuevos productos y aprovecharla para ser usada en beneficio del ser humano.

## CONCLUSIONES

Se logró el aislamiento de diversas cepas a partir de las muestras de los 14 días de fermentación, debido a los medios selectivos usados crecieron microorganismos con características concretas.

En las pruebas bioquímicas reportadas acerca de *Lactobacillus* se encuentran que son positivas para tinción de Gram, la prueba de oxidasa y manitol; presenta resultados negativos para las pruebas de catalasa, movilidad y reducción de nitratos.

*Lactobacillus* tiene resultados positivos para las pruebas de glucosa, fructosa, sacarosa y lactosa y un resultado negativo para maltosa, las 7 cepas presentan resultados similares pero se identificaron 2 grupos que presentan ligeras variaciones en sus resultados.

Se logró la identificación molecular mediante el análisis del gen 16S rARN de *Lactobacillus plantarum* con un 99% de similitud con respecto un genoma reportado de *Lactobacillus plantarum* en el banco de genes del NCBI (National Center for Biotechnology Information) y *Lactobacillus pentosus* con un 97% de similitud a un genoma de *Lactobacillus pentosus* presente en el banco de genes del NCBI durante el proceso de fermentación de la taberna en los días 6 y 9 respectivamente.



## BIBLIOGRAFIA

- Alcántara-Hernández, R. (2010). The bacterial community in 'taberna' a traditional beverage of southern Mexico. *Letter in Applied Microbiology*, 558-563.
- Alegria, H. (2012, Agosto). Evaluacion de la dinámica poblacional de levaduras, bacterias ácido lática y ácido acéticas durante la fermentacion de la taberna. Tuxtla Gutiérrez, México.
- Alvarado, C., & GARCÍA, B. (2006). Food-associated lactic acid bacteria with antimicrobial potential from traditional Mexcian foods. *Revista Lationamericana Microbiologia*, 260-268.
- Amoa-Awua, W., Sampson, E., & Tano-Debrah, K. (2007). Growth of yeasts, lactic and acetic bacteria in palm wine during tapping and fermetation from ffelled oil palm (*Elaeisguineensis*) in Ghana. *Journal of Applied Microbiology*, 599-606.
- Anandharaj, M. (2014). Fermented Fruits and Vegetables of Asia: A potential source of Probiotics. *Biotechnology Research International*, 1-19.
- Auler-Doamaral, C. (2012). Microbiological and physicochemical characterisation fo caxiri, an alcoholic beverage produced by the indigenous Juruna people of Brazil. *International Journal of Food Microbiology*, 112-121.
- Badel, S., & Michaud, T. (2011). New perspectives for Lactobacillus exopolisaccharides. *Biotechnology Advances* , 54-66.
- Balick, M. (1990). Production of Coyol wine from *Acrocomia mexicana* (Arecaceae) in Honduras. *New York Botanical Garden*, 84-93.
- Bandaru, V. (2005). Optimization of fermentation conditions for the production of ethanol from sago starch by co-immobilized amyloglucosidase and cells of zymomonas mobilis using response surface methodology. *Enzyme and Microbial Technology*.
- Barrera-Chavez, H. (2010). *Caracterización Molecular de la microbiota asociada al queso cotija*.
- Bayona, M. (2002). Determinin contaminating bacteria in the ethyl alcohol production process and their relationship to *Saccaromyces cervisiae* flocculation. *Revista Colombiana de Biotecnoloia*, 64-71.

- Cazetta, M. (2007). Fermentation of molasses by *Zymomonas mobilis*: effects of temperature and sugar concentration on ethanol production. *Science Direct*, 2824-2828.
- Chukeatirote, E. (2003). Potential use of probiotics. *Songklanakarin Journal of Science Technology*, 275-282.
- Chun, J., & Lee, K. (2007). Symbol detection in V-BLAST architectures under channel estimation errors. *IEEE-INST ELECTRONICS ENGINEERS INC.*, 593-597.
- Corzo, E. (1978). *Palabras de origen indigena en el estado de Chiapas*. Distrito Federal: ACIC Editores.
- Cruz, R. (2009, octubre). Evaluacion de los polifenoles de la palma de coyol (*Acrocomia aculeata*) sobre agentes causales de enfermedades. 3. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, Mexico.
- Danova, S., & Petrov, K. (2005). Isolation and characterization of *Lactobacillus* strains involved in koumiss fermentation. *International Journal of Dairy Technology*, 100-105.
- Díaz-Ruíz, G., & Wachter-Rodarte, C. (2003). Métodos para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados. *Revista latinoamericana de Microbiología*, 30-40.
- Dimarco, A., & Romano, H. (1985). D-glucose transport system of *Zymomonas mobilis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 151-157.
- Ercolini, D., Hill, P., & Dodd, C. (2003). Bacterial Community Structure and Location in Stilton Cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 3540-3548.
- Escalante, A. (2008). Analysis of bacterial community during the fermentation of pulque, a traditional Mexican alcoholic beverage, using a polyphasic approach. *International Journal of Food Microbiology*, 126-134.
- Escalante, A., Bolívar, F., & al, e. (2008). Analysis of bacterial community during the fermentation of pulque, a traditional Mexican alcoholic beverage, using a polyphasic approach. *International Journal of Food Microbiology*, 126-134.
- Esparza, E. (2012). *Producción de etanol por Zymomonas mobilis en fermentación en medio sólido*. Universidad Autónoma Metropolitana, Mexico D. F.

- Estela, W., & Rychtera, M. (2007). Producción de ácido láctico por *Lactobacillus plantarum* L10 en cultivos batch y continuo. *Revista Peruana de biología*, 271-275.
- fowler, S. (2013). *molecular biology*. HOuston: openstax.
- Gunasekaran, P. (1986). Fermentation pattern of *Zymomonas mobilis* strains on different sustrates- a comparative study. *J. Biosci*, 181-186.
- Han, J., & Li, X. (2013). Susceptibility of *Lactobacillus pentosus* strains isolated from fermented products to streptomycin and kanamycin. *International Food Research Journal*, 1927-1931.
- Hurtado, M. (2011). Aislamiento e Identificación de Bacterias Ácido Acéticas en Materia Prima y Tren de Fermentación en el Ingenio Providencia S.A. *Técnicaña*, 4-10.
- Hurtado, M., & Ramos, I. (2011). Aislamiento e Identificación de Bacterias Ácido Acéticas en Materia Prima y Tren de Fermentación en el Ingenio Providencia S.A. *Técnicana*, 4-10.
- Jeong-Sun, S., & Hyonyong, C. (2005). The genome sequence of the ethanologenic bacterium *Zymomonas mobilis* ZM4. *Nature Biotechnology*, 63-68.
- Kalscheuer, R., & al, e. (2006). Microdiesel; *Escherichia coli* engineered for fuel production. *Soc General Microbiology*, 2529-2536.
- Karamoko, D. (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*, 504-511.
- Kasra-Kermanshahi, R., & Peymanfar, S. (2012). Isolation and Identification of *Lactobacilli* from cheese, yoghurt and silage by 16S rDNA gene and study of Bacteriocin and Biosurfactant Production. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 528-532.
- Lee, Y., & Salminen, S. (1995). The coming of age of probiotics. *Trends in Food Sience*, 241-245.
- Li, N. (2015). Improvement of exopolysaccharide production in *Lactobacillus casei* LC2W by overexpression of NADH oxidase gene. *Microbiological Research*, 73-77.

- Lucena, B., & Dos-Santos, B. (2010). Diversity of lactic acid bacteria of the bioethanol process. *BioMed Central*, 1-8.
- Luo, W. (2015). Isolation of lactic acid bacteria from pao cai, a Chinese traditional fermented vegetable, with inhibitory activity against Salmonella associated with fresh-cut apple, using a modelling study. *Journal of Applied Microbiology*, 998-1006.
- Manual Básico de Microbiología* . (2009). Panreac.
- Manual Difco & BBL* . (n.d.).
- Martinez, M. (1976). *Catálogo de nombres vulgares y científico de plantas mexicanas*. Mexico, D. F.: Fondo de cultura económica.
- Obire, O. (2005). Activity of Zymomonas species in palm-sap obtained from their areas in Edo State, Nigeria. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, 25-30.
- Okafor, N. (1975). Microbiology of Nigerian Pal wine with particular reference to Bacteria. *The Journal of Applied Microbiology*, 81-88.
- Oyewole, O. (1997). Lactic fermented foods in Africa and their benefits. *Food Control*, 289-297.
- Parada, J., & Caron, C. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification properties and use as biopreservatives. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 521-542.
- Pentjuss, A., Odzina, I., Kostromins, A., Fell, D., Stalidzans, E., & Kalnenieks, U. (2013). Biotechnological potential of respiring Zymomonas mobilis: A stoichiometric analysis of its central metabolism. *Journal of Biotechnology*, 1-10.
- Poornachandra, R. (2015). Probiotic potential of Lactobacillus Strains Isolated from Sorghum-Based Traditional Fermented Food. *Probiotics Antimicrob Proteins*.
- R. S. Murray, E. G. (1948). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. London: Breed.
- Racine, M., & Saha, B. (2007). Production of mannitol by Lactobacillus intermedius NRRL B-3693 in fed-batch and continuous cell-recycle fermentations. *Process Biochemistry*, 1609-1613.



- Ramirez-Muñoz, F. (2010). *Aislamiento de bacterias lactobacillus sp. y levaduras a partir de productos lacteos artesanales*. Bogota.
- Reid, G. (2001). Oral probiotics can resolve urogenital infections. *Microbiology Immunology*, 49-52.
- Rodicio, M., & Mendoza, M. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades infecciosas Microbiología Clínica*, 238-45.
- Rodicio, M., & Mendoza, M. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. In *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica* (pp. 238-245).
- Rodríguez-Álvarez, J. (2006). *Análisis Microbiológico de la taberna*. Tuxtla Gutiérrez, México.
- Rodríguez-Álvarez, J. (2011). *Dinámica de la comunidad microbiana durante la fermentación de la taberna*. Tuxtla Gutierrez.
- Rodriguez-Gonzalez, M. (2009). *Aislamiento y seleccion de cepas del género Lactobacillus con capacidad probiotica e inmunomoduladora*. Barcelona.
- Rosello-Mora, R., & Amann, R. (2001). The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, 39-67.
- Ruiz-Romero, E. (2013). *Texcoconibacillus texcoconensis* gen. nov., sp. nov., alkalophilic and halotolerant bacteria isolated from soil of the former lake Texcoco. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 3336-3341.
- Ruiz-Romero, E., & Dendooven, L. (2013). *Natronobacterium texcoconense* sp. nov., haloalkaliphilic archaeon isolated from soil of a former lake. *International Journal of Systematic and evolutionary microbiology*, 4163-4166.
- Sahm, H. (2006). In M. Dworkin, & S. Falkow, *The Prokaryotes* (pp. 201-221). Standfor, California, United States of America: Springer.
- Salvador-Figueroa, M. (2015). Phenotypic and genotypic characteristics and symbiotic potential of a Rhizobium strain isolated from Musa spp. *Journal Plant Nutrition*.

- Samaniego-Fernandez, L. (2000). Lactobacillus spp: Importantes promotores de actividad probiotica, antimicrobiana y bioconservadora. 1-33. Matanzas, Cuba.
- Sanchez-Gonzalez, M., & al, e. (2011). Isolation and characterization of new facultative alkaliphilic Bacillus flexus strains from maiz processing waste water (nejayote). *Letters in Applied Microbiology*, 413-419.
- Sanchez-Leal, L., & Corrales-Ramirez, L. (2005). Evaluacion de la congelacion para conservacion de especies autóctonas bacterianas. *NOVA-Publicación científica*, 21-29.
- Santiago-Urbina, J. (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 Science & technology*, 58-62.
- Schoustra, S. (2013). Microbial Community structure of thre traditional zmbian fermented Products; Mabisi, Chibwantu and Munkoyo. *PLoS ONE*, 1-12.
- Scoustra, S., Kasase, C., Toarta, C., Kassen, R., & Poulain, A. (2013). Microbial community Structure of Three TraditionalZambian Fermented Products: Mabisi, Chibwantu and Munkoyo. *PLOS ONE*.
- Shaw, J., & Lynd, L. (2008). Metabolic engineering of a thermophilic bacterium to produce ethanol at high yield. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 13769-13774.
- Steinkraus, K. (2002). Fermentation in world Food Processing. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 23-32.
- Stringini, M., Comitini, F., Taccari, M., & Ciani, M. (2009). Yeast diversity during tapping and fermentation of palm wine from Cameroon. *Food Microbiology*, 415-420.
- Svanberg, I., Söukand, R., Łuczaj, Ł., Kalle, R., Zyryanova, O., Dénes, A., . . . Kolosova, V. (2012). Uses of tree saps in northern and eastern parts of Europe. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 343-357.
- Swings, J., & De ley, J. (1977). The Biology of Zymomonas. *American Society for Microbiology*, 1-46.
- Tanasupawat, S. (1992). Characterization and identification of lactobacillus pentosus and lactobacillus plantarum from fermented foods in Thailand. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 121-134.

- Thanokeo, P. (2011). Ethanol production from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) by *Zymomonas mobilis* TISTR548. *African Journal of Biotechnology*, 10691-10697.
- Vaughan, E. (2013). Food biotechnology. *Current opinion in Biotechnology*, 121-123.
- Xiao-Ran, L., En-Bo, M., Yan, L.-Z., Han, M., Xiao-Wei, D., & Zhe-Xue, Q. (2013). Bacterial and Fungal Diversity in the Starter Production Process of Fen Liquor, a Traditional Chinese Liquor. *The Microbiological Society of Korea*, 430-438.
- Zourari, A. (1992). Metabolism and biochemical characteristics of yogur bacteria. *Le Lait*, 1-34.
- Zuart-Macías, L., Ponce-Díaz, P., Santiago-Marroquin, G., & Quiroga-Madrigal, R. (1999). Coyol pal (*Acrocomia mexicana*), a phylogenetic resource from Chiapas, Mexico. *International Symposium on Ornamental Palms and other Monoctes from the Tropics*. ISHS Acta Horticulturæ 486.