

TORULOPSIS TABOADAЕ, UNA NUEVA
ESPECIE DE LEVADURA AISLADA DEL
COLONCHE DE ZACATECAS, MEXICO

Por Miguel Ulloa* y
Teófilo Herrera*

INTRODUCCION

El colonche es una bebida autóctona de México que se obtiene por fermentación del jugo de tunas de varias especies de nopales, entre las que se encuentran *Opuntia streptacantha* Lem. ("tuna cardona"), *O. robusta* Weld. ("tuna tapona"), *O. leucotricha* DC. ("duraznillo"), y *O. orbiculata* Salm-Dyck ("tuna pintadera"). Esta bebida alcohólica, de sabor dulce y color rojo, es muy apreciada por algunos grupos indígenas de las zonas áridas del noroeste del país, tales como los tarahumares de Chihuahua y los yaquis de Sonora, aunque también es preparada y consumida rutinariamente en San Luis Potosí y Zacatecas (Diguët, 1928; Santamaría, 1959).

El origen de la palabra colonche parece ser desconocido aunque es probable que, al igual que la palabra pulque, el término sea de procedencia española. Los nahuas designaban al colonche con el nombre de *nochoctli* (vino de cactus) y al pulque lo llamaban *metoctli* (vino de maguey). La invención del pulque se remonta a épocas muy antiguas, quizá de hace unos dos mil años y es probable que el colonche también se preparara desde entonces (Diguët, 1928).

El procedimiento de elaboración del colonche, tal como se practica en la actualidad, casi no ha sufrido modificaciones y parece ser una costumbre que ha sobrevivido durante siglos. La tarea la realizan principalmente las mujeres, quienes exprimen el jugo de las tunas, una vez que éstas han sido peladas, a través de un tamiz hecho de paja, o bien obtienen el jugo al triturar las tunas en un molino de mano. El jugo es entonces mantenido en ebullición lenta y ligera durante dos o tres horas, añadiendo de vez en cuando líquido nuevo para compensar el agua que se pierde por evaporación. Después, el jugo es dejado enfriar y abandonado a una fermentación espontánea; en ocasiones, para

* Laboratorio de Micología, Departamento de Botánica, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México 20, D. F.

acelerar la fermentación se añade un poco de colonche viejo, ya fermentado, o algunas cáscaras de tunas, las cuales contienen las zoogleas conocidas vulgarmente con el nombre de "tibicos" y que según Lutz (1898, 1899a, 1899b) constituyen el inóculo de microorganismos (bacterias y levaduras) que llevan a cabo la fermentación del colonche en unas horas. El colonche de pocas horas de fermentación es una bebida dulce, gaseosa, de sabor agradable, ligeramente butiráceo, pero con el paso de los días se torna ácido, debido a la producción de ácidos orgánicos, por lo que es desechado (Diguét, 1928).

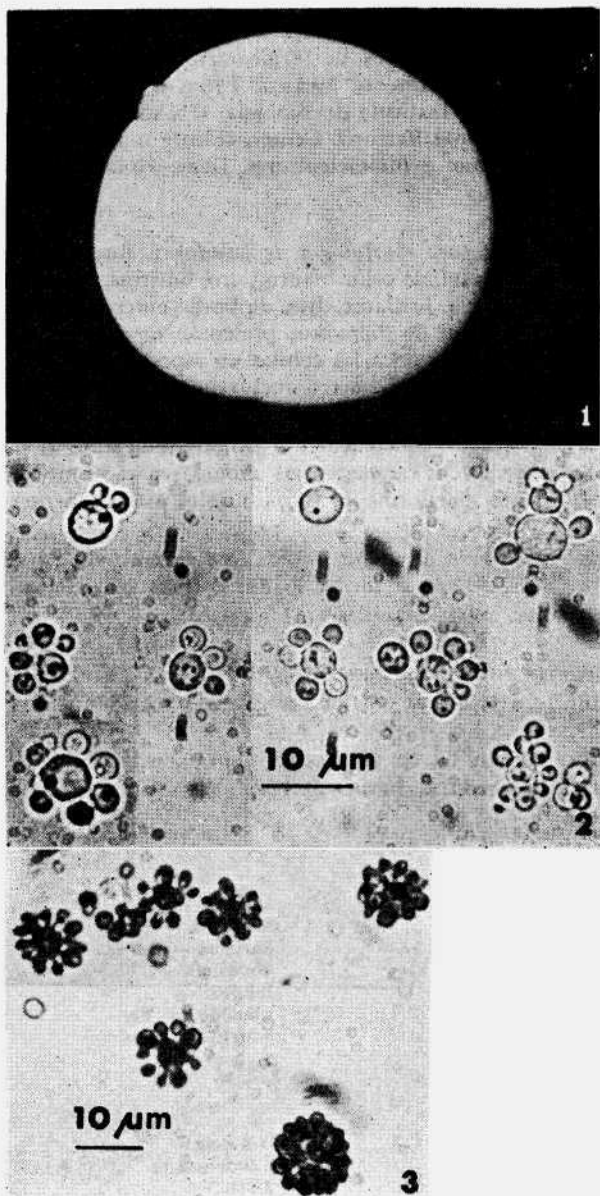
La levadura objeto del presente trabajo fue aislada por los autores a partir de una muestra de colonche ácido (pH_8), proveniente de la ciudad de Zacatecas, Zacatecas, México, la cual fue amablemente proporcionada por el M. en C. Javier Taboada (del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México), a quien, como muestra de reconocimiento a su interés por el estudio de las bebidas fermentadas originarias de México, está dedicada la especie aquí descrita.

El aislamiento de la levadura se hizo por el método de múltiples estrías en medio de V8 agar. A partir de una colonia pura se hicieron resiembras a los medios de cultivo utilizados en el presente estudio, todos ellos de la marca Difco, excepto los de V8 agar, de Fowell, de Gorodkova, y los de fermentación y asimilación, los cuales fueron preparados en el laboratorio a partir de los ingredientes correspondientes. Las pruebas de fermentación de carbohidratos, las de asimilación de éstos y de otros compuestos del carbono, así como las de asimilación de nitrato, crecimiento en medio libre de vitaminas, tolerancia al cloruro de sodio, cultivo en medio líquido, cultivo en placa de Dalmau, además de otras pruebas indicadas en el presente trabajo, fueron hechas de acuerdo a la metodología recomendada en el tratado de Lodder (1970).

A continuación se describen las características morfológicas y fisiológicas de la cepa estudiada.

Torulopsis taboadae Ulloa & Herrera, sp. nov.

Species sine ascosporae. In agaro morphologiam levedinis colonia discoidea, albida, suave, nitida, complanata, aliquid umbonata; mycelium verum et pseudomycelium non formatur; cellulae globosae, 3-8 μm diametrum, cum unus vel plures gemmae (usque 15 gemmae). In decoctione maltosa pellicula et annulus non formatur, sed sedimentum formatur. Fermentatur glucosum et galactosum debilis. Non fermentatur sucrosus, maltosus, cellobiosus, trehalosus, lactosus, melibiosus, raffinosis, melezitosis, inulinum, amyllum et α -methyl-D-glucosidum. Assimilantur nitras kalicus, glucosus, galactosus, thehalosus, inulinum D-xylosus, D-mannitolus, D-glucitolus et acidum DL-lacticum. Non assimilantur L-sorbosus, sucrosus, maltosus, cellobiosus, lactosus, melibiosus, raffinosis, melezitosis, amyllum, L-arabiosus, D-arabiosus, D-ribosus, L-rhamnosus, ethanolus, glycerolus, erythritolus, ribitolus, galactitolus, α -methyl-D-glucosidum, salicinum, acidum succinicum, acidum citricum et inositolus. In medium sine vitaminae augmentum presens. Sodium chloricum



FIGS. 1-3. *Torulopsis taboadae* Ulloa & Herrera. 1: Colonia gigante a los 20 días en medio de agar para morfología de levaduras. 2: Gemación multipolar de células procedentes de medio V8 agar. 3: Gemación multipolar de células procedentes de medio V8 agar, teñidas con azul algodón.

tolerancia 15-16%. Hab. Isolatus de fermentacio succus fructi opuntiae, vel "colonche" ex Zacatecas, Zacatecas, Mexico. *Typus* depositus in Lab. de Micología, Dept. de Botánica, Instituto de Biología, UNAM, México 20, D. F., México; in Northern Regional Research Center, culture numerus NRRL Y-11,634; et in Centraalbureau voor Schimmelcultures, Delft, Holanda, culture numerus CBS 6991.

Crecimiento en agar para morfología de levaduras. Bueno. A los 20 días la colonia gigante es discoidal, de color blanco puro, butirosa, aplanada, ligeramente umbonada en el centro, brillante, lisa, de borde entero (Fig. 1). Las células son esféricas, de 3 a 8 μm de diámetro; presentan de uno a múltiples brotes (hasta 15 brotes), lo que les da a las células un aspecto moriforme, alcanzando entonces hasta 10 a 12 μm de diámetro, incluyendo los brotes (Figs. 2 y 3).

Crecimiento en V8 agar. El crecimiento es muy semejante al del medio anterior. Las células tienen las características anotadas para el medio previamente citado, pero el aspecto moriforme de las mismas es más frecuente.

Crecimiento en extracto de malta líquido. No forma película ni anillo, aún después de dos meses, pero sí forma sedimento. Las características microscópicas son semejantes a las indicadas anteriormente.

Placa de Dalmau en harina de maíz agar. No forma pseudomicelio, o éste es muy rudimentario, con cortas cadenas simples o poco ramificadas.

Esporulación. Ausente en los medios de Gorodkova, Fowell, V8 agar, agar para morfología de levaduras, harina de maíz agar y extracto de malta líquido.

Fermentación

Glucosa + (débil)	Lactosa -
Galactosa + (débil)	Melibiosa -
Sucrosa -	Rafinosa -
Maltosa -	Melezitosa -
Celobiosa	Inulina -
Trehalosa -	Almidón soluble -
	α -Metil-D-Glucósido-

Asimilación

Glucosa +	D-Ribosa -
Galactosa +	L-Ramnosa -
L-Sorbosa -	Etanol -
Sucrosa -	Glicerol -
Maltosa -	Eritritol -
Celobiosa -	Ribitol -

Trehalosa +	Galactitol -
Lactosa -	D-Manitol +
Melibiosa -	D-Glucitol + (débil)
Rafinosa -	α -Metil-D-Glucósido -
Melezitosa -	Salicina -
Inulina +	DL-Acido láctico +
Almidón soluble-	Acido succínico -
D-Xilosa +	Acido cítrico -
L-Arabinosa -	Inositol -
D-Arabinosa -	

Asimilación de nitrato de potasio. Positiva.

Crecimiento en medio libre de vitaminas. Positivo.

Tolerancia al cloruro de sodio 15-16% (peso/volumen).

Crecimiento a 30°C. Positivo.

Crecimiento a 32°C. Positivo.

Crecimiento a 37°C. Negativo.

DISCUSION

Al parecer, *T. taboadae* es la primera levadura aislada y descrita del colonche. No obstante, Lutz (1898, 1899a, 1899b) supuso que la fermentación del colonche era debida a la acción combinada de una bacteria y una levadura (fenómeno que él llamó simbiosis y que posteriormente recibió el nombre, más apropiado, de sinergismo), que se encuentran en las masas blancas globulosas, translúcidas, semejantes a los granos de arroz cocidos (que Lutz llamó tibi y otros autores denominan tibicos) y que crecen sobre los artículos o sobre los frutos de diversas especies de *Opuntia*. Estos tibicos han sido utilizados en México desde hace tiempo en la elaboración del tepache y otras bebidas fermentadas hechas con frutas. La bacteria que Lutz describió como *Bacillus mexicanus* es aerobia y al desarrollarse crea un medio anaerobio para la levadura ascospórogena, que el mismo autor denominó *Saccharomyces radaisii*, la cual ejerce su poder fermentativo en anaerobiosis. Según los estudios del mencionado autor, sólo cuando se desarrollan juntas ambas especies en un medio azucarado pueden efectuar una fermentación alcohólica. Hay que hacer notar que Lutz no realizó sus aislamientos a partir del colonche mismo, sino del tibi.

Al desarrollar el presente trabajo, también se observó la presencia de bacilos en el colonche, los cuales al crecer en medio de V8 agar formaron colonias amarillentas, viscosas.

Ruiz Oronoz (1932), al hacer un estudio micológico de los tibicos, registró la levadura aislada de éstos como *Pichia radaisii* (Lutz) Guillermond, pasando *S. radaisii* a sinonimia. No obstante, Lodder (1970) no acepta esta especie en el género *Pichia*, por lo que la clasificación de la misma queda pendiente hasta que se pudiera hacer una revisión de ella.

Mascott y Terrés (1952) estudió dos especies de levaduras aisladas de los tibicos, las cuales fueron determinadas como *Saccharomyces oviformis* Osterwalder y *Pichia chodati* var. *trumpyi* (Zender et Bevan) Dekker. La primera

ha pasado a sinónimo de *Saccharomyces bayanus* Sacc. y la segunda a sinónimo de *Pichia membranaefaciens* Hansen (Lodder, 1970).

Además de haber estudiado las dos levaduras antes citadas, Mascott y Terrés realizó aislamientos de diversas cepas de bacterias a partir de los tибicos y, aunque no las identificó, indicó que la bacteria clasificada como *Bacillus mexicanus* por Lutz no puede pertenecer al género *Bacillus* por haber señalado aquél que era Gram negativa.

Considerando la discrepancia entre los registros de Lutz y Ruiz Oronoz, en relación a los de Mascott y Terrés, puede deducirse que la microflora de los tибicos es variable según el hábitat, la procedencia y el momento de desarrollo de los mismos. Según esto, queda mucho por estudiar en relación a dicha microflora. Por tal motivo, el registro que aquí se hace del *T. taboadae* no significa que dicha especie sea la única ni la más importante de las que intervienen en la fermentación del colonche.

T. taboadae es descrita aquí como especie nueva por diferir de *T. nitrato-phila* Schiffrine et Phaff, a la que se llega siguiendo la clave de identificación de levaduras más aceptada en la actualidad (Lodder, 1970); y porque tampoco concuerda en varias características fisiológicas importantes con las otras 13 especies reconocidas del género *Torulopsis* que asimilan nitrato de potasio como única fuente de nitrógeno, ni con las 20 especies del mismo género que no lo asimilan; además, el aspecto moriforme de *T. taboadae* es muy notorio.

Las diferencias entre *T. taboadae* y *T. nitrato-phila* son las siguientes:

En contraste con la segunda especie mencionada, *T. taboadae* no fermenta trehalosa, asimila inulina y DL-ácido láctico; y no asimila L-arabinosa, D-ribosa, L-ramnosa, etanol, glicerol y ribitol. Además, la especie aquí descrita tiene una tolerancia al cloruro de sodio de 15-16%, y crece bastante bien en medio libre de vitaminas, en tanto que *T. nitrato-phila* sólo tolera 5-6% de cloruro de sodio, y necesita ser estimulada por tiamina pues su crecimiento en medio libre de vitaminas es débil.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece la asistencia técnica de la M. en C. Cora Salinas, en la elaboración de los medios de cultivo utilizados en el presente estudio. A la Dra. Helia Bravo Hollis, Lic. Hernando Sánchez Mejorada y Sr. Rafael Hernández, por los datos proporcionados sobre las especies de nopales citadas en este trabajo.

LITERATURA CITADA

- Diguet, L., 1928. *Les Cactacées Utiles du Mexique*. Archives D'Histoire Naturelle. Société Nationale D'Acclimatation de France, París, pp. 139-142.
- Lodder, J., 1970. *The yeasts, a taxonomic study*. North Holland Publishing Co., Amsterdam, 1385 p.
- Lutz, M. L., 1898. Recherches biologiques sur la constitution du tibi. *Comp. rendus Soc. Biol.* 5:1124-1126.

- , 1899a. Recherches biologiques sur la constitution du tibi. *Bull. Soc. Myc. Fr.* 15:68.
- , 1899b. Nouvelles recherches sur le tibi. *Bull. Soc. Myc. Fr.* 15:157.
- Mascott y Terrés, M., 1952. *Contribución al conocimiento de las levaduras de los tibicos del arroz*. Tesis profesional, Fac. Ciencias, Univ. Nal. Autón. México, D. F., 60 p.
- Ruiz-Oronoz, M., 1932. Estudio micológico de las zoogleas conocidas vulgarmente con el nombre de tibicos. *An. Inst. Biol. Univ. Nal. Autón. México* 3:183-191.
- Santamaría, F. J., 1959. *Diccionario de mejicanismos*. Editorial Porrúa, S. A. México, D. F., p. 274.

RESUMEN

En este trabajo se describe como especie nueva de levadura, *Torulopsis taboadae* Ulloa & Herrera, aislada a partir de una muestra de "colonche", una bebida de México que se obtiene por fermentación del jugo de tunas de varias especies de nopales, tales como *Opuntia streptacantha*. El colonche estudiado fue elaborado en Zacatecas, Zac. *T. taboadae* es anascosporógena. Forma colonias discoidales, blancas, butirosas, aplanadas, ligeramente umbonadas, brillantes, lisas, de borde entero. Las células son esféricas, de 3 a 8 μ m de diámetro, con uno a múltiples brotes, lo que les da a las células un aspecto moriforme. No forma película ni anillo, pero sí sedimento. No forma micelio ni pseudomicelio. Fermenta débilmente glucosa y galactosa. No fermenta sucrosa, maltosa, celobiosa, trehalosa, lactosa, melibiosa, rafinosa, melezitosa, inulina, almidón soluble y α -metil-D-glucósido. Asimila nitrato de potasio, glucosa, galactosa, trehalosa, inulina, D-xilosa, D-manitol, D-glucitol y DL-ácido láctico. No asimila L-sorbosa, sucrosa, maltosa, celobiosa, lactosa, melibiosa, rafinosa, melezitosa, almidón soluble, L-arabinosa, D-arabinosa, D-ribosa, L-rambosa, etanol, glicerol, eritritol, ribitol, galactitol, α -metil-D-glucósido, salicina, ácido succínico, ácido cítrico e inositol. Crece bien sin fuente externa de vitaminas. Tolerancia 15-16% (peso/volumen) de cloruro de sodio. No crece a 37°C.

SUMMARY

In this paper it is described a new yeast species, *Torulopsis taboadae* Ulloa & Herrera, isolated from a sample of "colonche", a beverage of Mexico that is obtained by fermentation of the juice of "tunas" (prickly pears) of several species of prickly pear cacti, such as *Opuntia streptacantha*. The studied colonche was elaborated in Zacatecas, Zac. *T. taboadae* is anascosporogenous. It forms colonies which are discoidal, white, butyrous, glossy smooth, slightly umbonate, with an entire border. The cells are spherical, from 3 to 8 μ m in diameter, with one to many buds which gives the cells a moriform aspect. Neither pellicle nor ring are formed, but a sediment appears. No mycelium or pseudomycelium are formed. Weakly ferments glucose and galactose. Sucrose, maltose, cellobiose, thalose, lactose, melibiose, raffinose, melezitose, inulin, soluble starch, and α -methyl-D-glucoside are not fermented. Potassium nitrate, glucose, galactose, trehalose, inulin, D-xylose, D-mannitol, D-glucitol, and DL-lactic acid are assimilated. L-sorbose, sucrose, maltose, cellobiose, lactose, L-arabinose, D-arabinose,

D-ribose, L-rhamnose, ethanol, glycerol, erythritol, ribitol, galactitol, α -methyl-D-glucoside, salicin, succinic acid, citric acid, and inositol are not assimilated. Good growth without external source of vitamins. Sodium chloride tolerance 15-16% (w/v). No growth at 37°C.