

ESTUDIO DE *KLOECKERA APICULATA*
Y *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*, LEVA-
DURAS AISLADAS DE LA TUBA DE
COLIMA, MEXICO

Por Teófilo Herrera*
y Miguel Ulloa*

STUDY OF *KLOECKERA APICULATA* AND *SACCHAROMYCES*
CEREVISIAE, TWO YEASTS ISOLATED FROM TUBA FROM
COLIMA, MEXICO

SUMMARY

Two yeast species, *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae* isolated from tuba, a fermented liquid obtained from the juice of coconut palm (*Cocos nucifera*), were studied. The two studied samples of tuba were from Colima city, State of Colima (Mexico). The first mentioned species was isolated from tuba fermented with strawberries, and the second species was obtained from tuba fermented with apples. It seems that these are the two first microorganisms of this beverage that have been studied in Mexico.

RESUMEN

Se estudiaron dos especies de levaduras, *Kloeckera apiculata* y *Saccharomyces cerevisiae*, aisladas de la tuba, líquido fermentado obtenido de la savia del cocotero (*Cocos nucifera*). Las dos muestras de tuba estudiadas provinieron de la Ciudad de Colima, Col. (México). La primera especie mencionada fue aislada de tuba fermentada con fresas; y la segunda especie fue obtenida de tuba fermentada con manzanas. Al parecer, son los dos primeros microorganismos de esta bebida que han sido estudiados en México.

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

INTRODUCCION

La tuba es una bebida que se obtiene del jugo del tallo o de las inflorescencias de algunas especies de palmeras, principalmente del cocotero común (*Cocos nucifera* L.). Recién obtenida, la tuba es utilizada como bebida dulce y refrescante en las costas occidentales del país, especialmente en Colima. Después de la fermentación se torna en una bebida gaseosa, alcohólica, que puede ser consumida directamente o servir para obtener aguardiente y licor, o para hacer vinagre. Por su consistencia algo viscosa, su color blanquecino, su olor y su sabor, la tuba fermentada se asemeja al pulque y, además, del mismo modo en que este último puede ser bebido adicionado de diversos vegetales, principalmente frutas, la tuba también suele tomarse compuesta con fresa, piña, manzana, limón, apio, cebolla, chile, canela y otros (Santamaría, 1959).

Montaner y Simón (1897) describieron la tuba como un licor filipino, suave y algo viscoso, que por destilación se obtiene del coco y otras palmeras, cortando el extremo superior de la espata antes de que se abran las flores. El Diccionario de la Lengua Española (Real Academia Española, 1970), indica que la palabra tuba procede de la lengua tagala, que es la que se habla en gran parte del archipiélago filipino. Según esto, parece ser que el origen del término tuba, así como el modo de obtención de esta bebida para consumo humano han sido introducidos a México desde las Filipinas.

MATERIAL Y METODOS

Las levaduras objeto de la presente comunicación fueron aisladas por los autores a partir de muestras de tuba procedentes de la Ciudad de Colima, Col. *Kloeckera apiculata* fue aislada de una muestra de tuba fermentada con trozos de fresa, y *Saccharomyces cerevisiae* fue aislada de una muestra de tuba fermentada con trozos de manzana.

Los aislamientos de las dos cepas de levaduras estudiadas fueron hechos por inoculación directa de una asada de tuba en placas de medio V8 agar, diluyendo el inóculo en el asa por medio de múltiples esurias en varias placas del medio de cultivo. A partir de una de las colonias puras desarrolladas, se hicieron resiembras a todos los medios de cultivo necesarios para el estudio de las características morfológicas y fisiológicas de cada cepa, siguiendo los métodos descritos por Lodder (1970).

DESCRIPCION DE LAS CEPAS DE LEVADURAS AISLADAS DE LA TUBA

Kloeckera apiculata (Reess emend. Kloecker) Janke

Figs. 1-2

Crecimiento en V8 agar. Bueno. A los 20 días la colonia gigante es discooidal, cremosa brillante, convexa, de bordes ondulados, primero blanca y después

moreno amarillenta, con elevaciones granulares en el centro (Fig. 1). Las células son de variados tamaños y formas, pero predominan las uni- o bi-apiculadas, de 1.0 a 4.5 μm \times 1.5 a 12 μm , con los apículos redondeados o piriformes, de donde se forman las yemas que posteriormente se separan de la célula madre por medio de un septo ancho. Al gemar las células, las yemas pueden permanecer unidas a la célula madre formando cadenas de 2 ó 3 elementos, y adoptan con frecuencia la forma de boliche (Fig. 2).

Crecimiento en extracto de malta líquido. Buen desarrollo con turbidez y sedimento pero sin formación de anillo y velo. La morfología de las células es semejante a la descrita para el medio anterior.

Placa de Dalmau en harina de maíz agar. Forma un pseudomicelio poco desarrollado, con células en cadenas rectas y ramificadas.

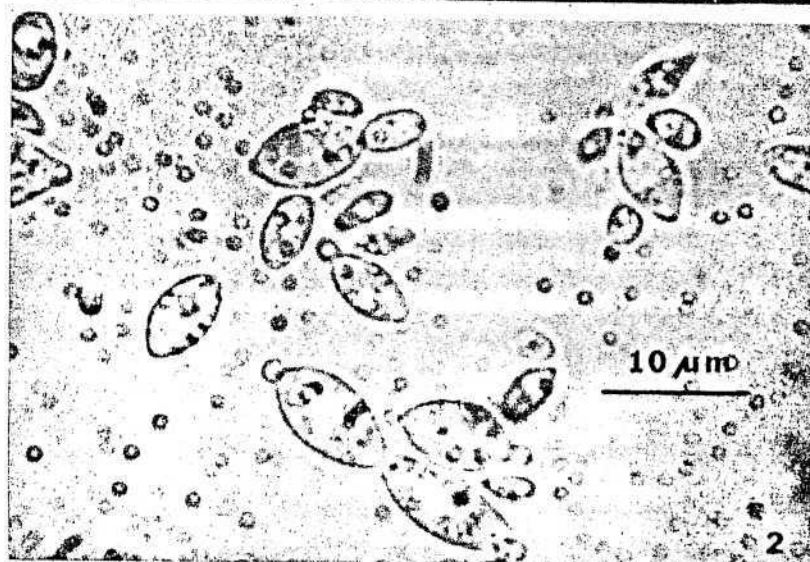
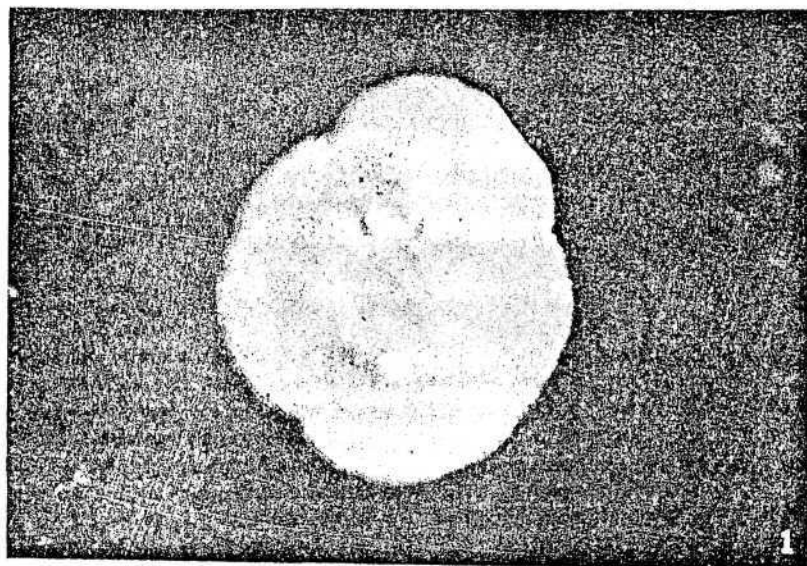
Esporulación. No forma ascosporas en ninguno de los medios probados: Gorodkova, Fowell, V8 agar, harina de maíz agar y extracto de malta con y sin agar.

Fermentación

Glucosa + (débil)	Lactosa -
Galactosa -	Melibiosa -
Sucrosa -	Rafinosa -
Maltosa -	Melezitosa -
Celobiosa -	Inulina -
Trehalosa --	

Asimilación

Glucosa +	D-Ribosa -
Galactosa -	L-Ramnosa -
L-Sorbosa -	Etanol -
Sucrosa -	Glicerol -
Maltosa -	Eritritol -
Celobiosa +	Ribitol -
Trehalosa -	Galactitol -
Lactosa -	D-Manitol -
Melibiosa -	D-Glucitol -
Rafinosa -	α -Metil-D-Glucósido -
Melezitosa -	Salicina +
Inulina -	DL-Acido láctico -
Almidón soluble --	Acido succínico -
D-Xilosa -	Acido cítrico -
L-Arabinosa -	Inositol -
D-Arabinosa -	



FIGS. 1-2. *Kloeckera apiculata*. 1: colonia gigante en medio de V8 agar, a los 20 días, X3.
2: células vegetativas, de un cultivo en el mismo medio.

Asimilación de nitrato de potasio. Negativa.

Crecimiento en medio libre de vitaminas. Negativo.

Vitaminas que estimulan el crecimiento. Acido pantoténico e inositol.

Tolerancia al cloruro de sodio. De 12 a 13%.

Crecimiento a 37° C. Negativo.

Saccharomyces cerevisiae Hansen

(Figuras 3-4)

Crecimiento en V8 agar. Vigoroso. A los 30 días, la colonia gigante es de color blanco crema, butirosa, convexa, semibrillante, de borde lobulado y entero, y con surcos radiales (Fig. 3). Las células vegetativas son esferoidales, ovoides o elipsoidales, con uno o dos brotes polares o subpolares; miden de 1.6 a 7.0 \times 2.5 a 9.0 μ m. Las ascas son globosas y miden de 6 a 10 μ m; cada cada asca contiene de 1 a 4 ascosporas esferoidales, de 2 a 2.5 μ m de diámetro.

Crecimiento en extracto de malta liquido. Buen desarrollo con turbidez y sedimento; con película fina y anillo en cultivos de 2 a 3 semanas. Las células muestran una morfología similar a la descrita en el medio anterior.

Placa de Dalmau en harina de maíz agar. No forma pseudomicelio tanto debajo del cubreobjetos como fuera de él.

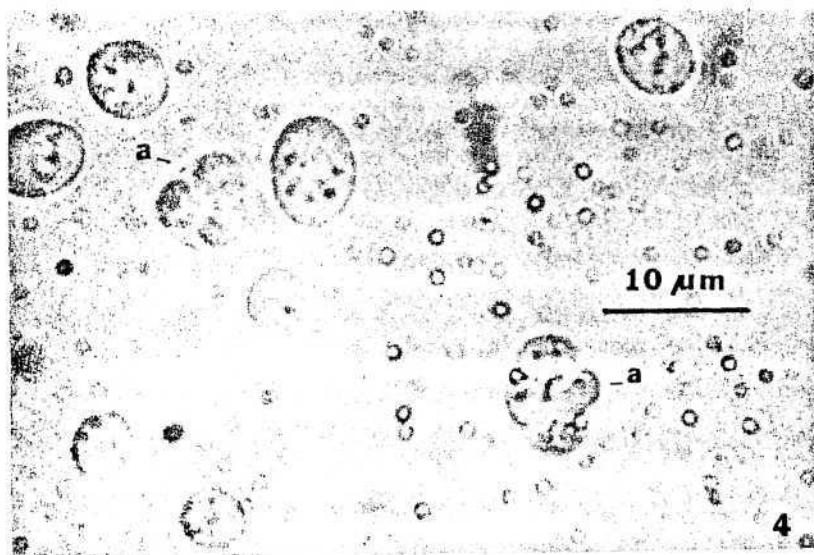
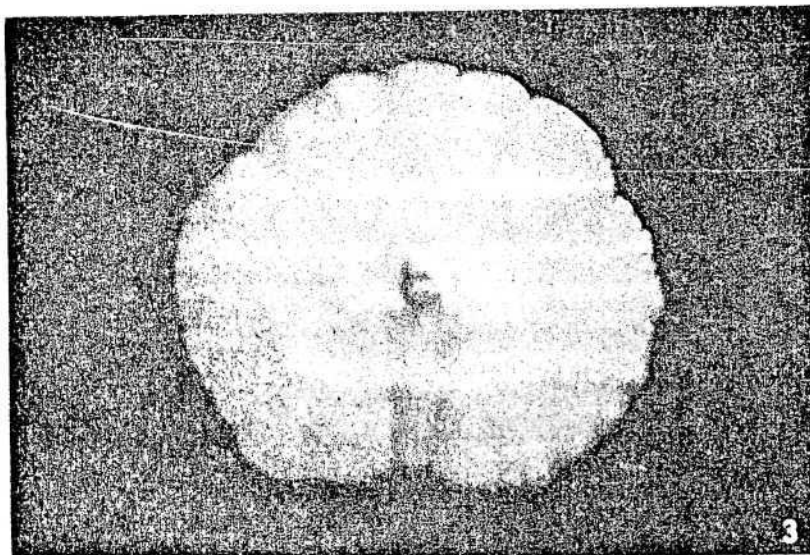
Esporulación. Abundante en V8 agar, Fowell y Gorodkova. Las ascosporas liberadas de las ascas tienden a aglutinarse.

Fermentación

Glucosa +	Lactosa -
Galactosa + (lenta)	Melibiososa -
Sucrosa +	Rafinosa + 1/3
Maltosa +	Melcitososa -
Celobiososa + (lenta y débil)	Inulina -
Trehalosa + (lenta y débil)	

Asimilación

Glucosa +	D-Ribosa -
Galactosa +	L-Rammosa -
L-Sorbosa -	Etanol + (lenta)



FIGS. 3-4. *Saccharomyces cerevisiae*. 3: colonia gigante en medio de V8 agar, a los 30 días, X3.
4: ascas (a) y células vegetativas, de un cultivo en el mismo medio.

Sucrosa +	Glicerol +
Maltosa +	Eritritol -
Celobiosa -	Rabitol -
Trehalosa + (lenta)	Galactitol -
Lactosa -	D-Manitol -
Melibiosa -	D-Glucitol -
Rafinosa +	α -Metil-D-Glucósido -
Melezitosa -	Salicina -
Inulina -	Dt.-Acido láctico + (lenta)
Almidón soluble -	Acido succínico -
D-Xilosa +	Acido cítrico -
L-Arabinosa -	Inositol -
D-Arabinosa -	

Asimilación de nitrato de potasio. Negativa.

Crecimiento en medio libre de vitaminas. Positivo (débil).

Vitaminas que estimulan el crecimiento. Tiamina, piridoxina, niacina, pantotenato de calcio, inositol, ácido fólico, riboflavina, biotina y ácido paraminobenzoico.

Tolerancia al cloruro de sodio. De 9 a 10%.

Crecimiento a 37° C. Negativo.

DISCUSION

No obstante que la tuba ha sido apreciada en varias regiones costeras de México, desde hace mucho tiempo, parece ser que el presente trabajo es el primero de tipo microbiológico sobre este líquido fermentado, aunque sí hay un estudio químico sobre el mismo (Massieu *et al.*, 1959) en el cual se registra que su composición es similar a la del pulque.

Se consideró importante comenzar a estudiar las levaduras que están involucradas en la fermentación de la tuba ya que, de la misma forma que con otras bebidas fermentadas indígenas de México, es preparada sin control microbiológico y es consumida (en los casos en que no se realiza una destilación para obtener un licor) conteniendo los microorganismos vivos que se desarrollan durante dicha fermentación. Las dos especies de levaduras encontradas, sin embargo, son consideradas como inocuas para la salud del hombre; por el contrario, *S. cerevisiae* es una especie comestible que proporciona vitaminas del complejo B y aminoácidos a la dieta.

K. apiculata fue registrada en México de una muestra de pulque (Herrera y Ulloa, 1975), y *S. cerevisiae*, especie de muy amplia distribución en la naturaleza, ha sido aislada en varias ocasiones de diversas bebidas fermentadas ori-

ginarias de México, como son el pulque, el pozol y el tesgüino; de este último tanto del elaborado por los tarahumares de Chihuahua como del mestizo preparado en Jalisco (Sánchez-Marroquín, 1962; Herrera y Ulloa, 1973; Ulloa y Kurtzman, 1975; Ulloa *et al.*, 1977).

Es importante hacer notar que la cepa de *S. cerevisiae* obtenida correspondió en sus caracteres morfológicos y fisiológicos con los anotados por Lodder (1970), excepto en la fermentación positiva, aunque lenta y débil, de la celobiosa, y en la asimilación positiva de la D-xilosa, ambas negativas en la típica *S. cerevisiae*. No obstante estas dos diferencias fisiológicas, se tomó en cuenta que existe una considerable variación entre las cepas de *S. cerevisiae*, en relación a varias de sus características morfológicas y fisiológicas, lo que indica que *S. cerevisiae* podría ser un complejo de especies, o por lo menos de variedades.

Debido a la variedad de ambientes ecológicos en que se prepara la tuba y a la diversidad de ingredientes que con frecuencia se añaden para la elaboración de ciertas modalidades de la bebida, es posible que, aunque ciertos microorganismos sean más o menos constantes, exista también una considerable cantidad de especies diferentes de microorganismos en cada caso; según esto, puede considerarse que los estudios microbiológicos sobre la tuba, así como los aspectos aplicados que pudieran derivar de los datos obtenidos de los mismos, están aún en una etapa incipiente.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al M. en C. Rafael Lamothe Argumedo el haber proporcionado las muestras de tuba utilizadas en el presente estudio. A la M. en C. Cora Salinas se le reconoce su valiosa ayuda en la elaboración de los medios de cultivo usados en el estudio de las especies.

LITERATURA CITADA

- Herrera, T. y M. Ulloa, 1975. Reconsideraciones sobre dos trabajos anteriores, para la identificación de *Kluyveromyces fragilis* y *Candida guilliermondii* en el pozol, y de *Kloeckera apiculata* en el pulque. *Bol. Soc. Mex. Mic.* 9:13-15.
- Lodder, J., 1970. *The yeasts, a taxonomic study*. North Holland Publishing Co., Amsterdam.
- Massieu, C., R. O. Cravioto, J. Guzmán y H. Olivera, 1959. Contribución adicional al estudio de la composición de alimentos mexicanos. *Ciencia, Méx.*, 19:53-66.
- Montaner y Simón, Editores, 1897. *Diccionario Enciclopédico Hispano-Americano de Literatura, Ciencia y Artes*, Barcelona, Vol. 21.
- Real Academia Española, 1970. *Diccionario de la Lengua Española*, 19a. ed., Madrid.
- Sánchez-Marroquín, A., 1962. Aspectos metabólicos de las levaduras del pulque. *Rev. Soc. Mex. Hist. Nat.* 23:1-20.
- Santamaría, F. J., 1959. *Diccionario de Mejianismos*. Editorial Porrúa, S. A., México, D. F.
- Ulloa, M. y C. P. Kurtzman, 1975. Occurrence of *Candida parapsilosis*, *C. tropicalis* and *Saccharomyces cerevisiae* in pozol from Tabasco, México. *Bol. Soc. Mex. Mic.* 9:7-12.
- , T. Herrera y J. Taboada, 1977. *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces uvarum* aislados de diferentes muestras de tesgüino de Jalisco, México. *Bol. Soc. Mex. Mic.* 11:15-22.