

**PICHIA MEMBRANAEFACIENS Y SACCHAROMYCES CEREVISIAE,  
LEVADURAS QUE INTERVIENEN EN LA FERMENTACION DE LA  
BEBIDA LLAMADA TEPACHE EN MEXICO**

Por Teófilo Herrera\*  
y Miguel Ulloa\*

**PICHIA MEMBRANAEFACIENS AND SACCHAROMYCES CEREVISIAE,  
YEASTS INVOLVED IN THE FERMENTATION OF THE  
BEVERAGE CALLED TEPACHE IN MEXICO**

**SUMMARY**

This paper describes the morphological and physiological characteristics of two yeast species, *Pichia membranaefaciens* and *Saccharomyces cerevisiae*, isolated from the fermented beverage prepared with water, brown sugar, pineapple and/or other fruits, called "tepache" in México, which is consumed in many places of this country. The tepache utilized in this study was obtained from a market place at Mexico City. *P. membranaefaciens* is registered for the first time and the presence of *S. cerevisiae* is confirmed in this beverage. Some considerations are made on the elaboration, the importance of microbiological studies, the possible quality control and the industrial production of the various kinds of tepache.

**RESUMEN**

Este trabajo describe las características morfológicas y fisiológicas de dos especies de levaduras, *Pichia membranaefaciens* y *Saccharomyces cerevisiae*, aisladas de la bebida fermentada que se prepara con agua, azúcar morena y diversas frutas, principalmente piña, que recibe el nombre de "tepache" en México, y que es consumida en muchas partes

\*Laboratorio de Micología, Departamento de Botánica, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México 04510, D. F.

de este país. El tepache utilizado en este estudio fue obtenido en un mercado de la Ciudad de México. *P. membranaefaciens* es registrada por primera vez y la presencia de *S. cerevisiae* es confirmada en esta bebida. Se hacen algunas consideraciones sobre la elaboración, la importancia de los estudios microbiológicos y la posibilidad del control de calidad y de la producción industrial de las diferentes clases de tepache.

## INTRODUCCION

La palabra "tepache" es de etimología dudosa, de origen náhuatl, pues algunos autores consideran que deriva de "tépiatl" o de su diminutivo "tepiatzin", que significa agua o bebida ("atl") de una variedad de maíz llamada "tépitl" (Santamaría, 1942, 1959); en tanto que, otros autores indican que deriva de "tepachoa" que significa aprensar o moler algo con una piedra (Cabrera, 1974).

El tepache es una bebida fermentada, que en épocas precortesianas era elaborada en México con granos de maíz, con el jugo de la caña de azúcar y rara vez con pulque (Santamaría, 1942, 1959); no obstante, en la actualidad la bebida es preparada, de preferencia, con diversas frutas como la piña, la manzana, la naranja, la guayaba y otras, las cuales son machacadas o molidas, puestas en agua endulzada con piloncillo o azúcar morena y dejadas a fermentar en barriles de madera, llamados "tepacheras", los cuales son tapados con tela de manta de cielo o un material similar, con el objeto de evitar la entrada de insectos y de permitir el escape del gas generado durante la fermentación. Después de uno o dos días de fermentación, el tepache es una bebida de color moreno amarillento, de sabor dulce y agradable, con un contenido alcohólico casi imperceptible, y muy refrescante, por lo que es consumida principalmente durante las épocas cálidas del año, aunque por su aceptabilidad popular es de consumo cotidiano entre ciertos sectores de la sociedad. Cuando el tiempo de fermentación se prolonga durante algunos días más, el tepache adquiere un sabor agrio y avinagrado después de transformarse en una bebida que puede ser embriagante debido a su considerable contenido alcohólico. En ocasiones, el líquido es deliberadamente dejado a fermentar por más tiempo, con el objeto de obtener vinagre.

Las muestras de tepache, de donde fueron aisladas las cepas de levaduras descritas en este trabajo, se obtuvieron directamente de su elaborador, el señor Daniel Barrueta, en su puesto de tepache situado en la calle de Cerro del Agua, cerca de la calle de Copilco, a un lado de la Ciudad Universitaria de la Ciudad de México. El señor Barrueta es un "tepachero" muy popular en la zona sur de la ciudad, quien tiene como principal modo de vida, de él y de su familia, la elaboración casera y semindustrial de tepache para su venta diaria en diversos mercados ambulantes en dicha zona.

Por indicaciones del tepachero antes mencionado, se sabe que la bebida utilizada en el presente estudio fue hecha con la pulpa, la cáscara y el jugo de las siguientes frutas: piña, manzana, guayaba, naranja y arrayanes. Dichas frutas fueron lavadas con agua corriente, trituradas, coladas y dejadas a fermentar en agua con piloncillo durante un día. Debido al recelo natural del fabricante de tepache entrevistado, para quien la receta de elaboración de esta bebida es de su uso exclusivo y hasta cierto punto secreto, por el valor económico que le representa la práctica de dicha receta, no se pudieron obtener más detalles respecto al proceso de elaboración del tepache utilizado para el presente estudio, como, por ejemplo, qué cantidades de frutas, azúcar y agua son utilizadas, o

cuál es el tiempo óptimo de fermentación para obtener un producto con las características deseadas, aunque parece ser que dicho tiempo es de aproximadamente un día.

Por otra parte, la elaboración del tepache es muy variable según la región, los gustos de los consumidores, los ingredientes utilizados y las circunstancias en que se efectúa la fermentación del mismo, lo cual puede repercutir en el tipo de flora microbiana que se desarrolle y, por lo tanto, en las características del producto.

En cuanto al aspecto microbiológico del tepache, se puede mencionar que de éste han sido aisladas y citadas en dos trabajos previos las siguientes especies de levaduras: *Torulopsis inconspicua* Lodder y Kreger van Rig y *Saccharomyces cerevisiae* Hansen, de un tepache obtenido de un expendio en la Ciudad de México (Nava-Garduño, 1953); y *Candida queretana* Herrera y Ulloa, de un tepache procedente de la Ciudad de Querétaro, Qro., México (Herrera y Ulloa, 1978). En ambos casos, las levaduras fueron aisladas de muestras de tepache cuyo proceso de elaboración y tiempo de fermentación eran desconocidos.

La presente comunicación pretende contribuir al conocimiento de las levaduras del tepache, considerando la importancia biológica y práctica que tiene la microbiología de esta bebida, sobre la cual sólo existen los dos trabajos antes mencionados. El trabajo de Nava-Garduño fue presentado como tesis profesional y no se publicó en alguna revista científica, por lo que su divulgación fue muy restringida; por otro lado, solamente el segundo trabajo fue hecho siguiendo la metodología moderna, en la cual se toman en consideración otras muchas características fisiológicas y bioquímicas de las levaduras, que antes no se requerían para lograr la identificación de las especies.

## MATERIAL Y METODOS

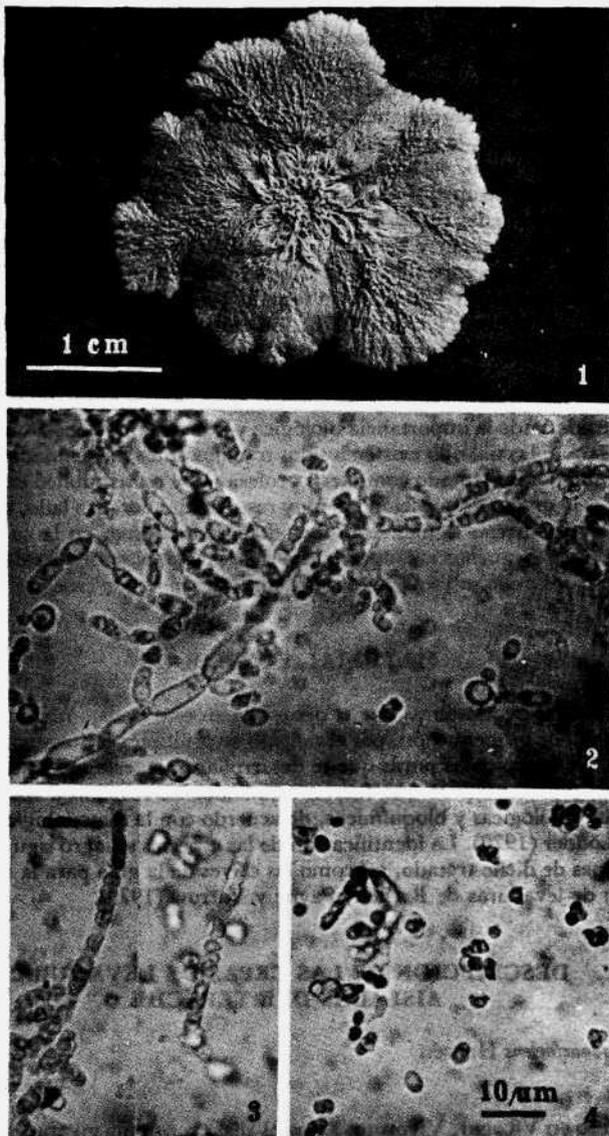
Las dos especies de levaduras que se describen en este trabajo fueron aisladas de tepache de un día de fermentación, por el método de múltiples estrías en placas de medio de V8 agar. De las colonias puras que se desarrollaron en este medio se seleccionaron las dos cepas representativas que fueron estudiadas en relación a sus características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas, de acuerdo con la metodología indicada en el tratado de Lodder (1970). La identificación de las especies se logró siguiendo las claves y descripciones de dicho tratado, así como las claves de la guía para la identificación y clasificación de levaduras de Barnett, Payne y Yarrow (1979).

## DESCRIPCION DE LAS CEPAS DE LEVADURAS AISLADAS DEL TEPACHE

*Pichia membranaefaciens* Hansen

Figs. 1 - 4

Crecimiento en V8 agar. Vigoroso. A los 21 días, la colonia gigante es de aproximadamente 3 cm de diámetro, de color moreno rosado, consistencia pastosa suave, opaca a semibrillante, con la superficie completamente cubierta de pliegues más o menos delimitados en sectores coraloides o flabeliformes, de moderada e irregular elevación y de borde finamente ondulado (Fig. 1). Las células vegetativas son esferoidales, ovoides,



Figuras 1-4. Diversas estructuras de *Pichia membranaefaciens* formadas en medio de V8 agar. 1: colonia gigante, de 21 días,  $\times 3$ . 2: pseudomicelio con células vegetativas y ascas cilíndricas y elipsoidales encadenadas,  $\times 1000$ . 3: ascas encadenadas, conteniendo cada una cuatro ascosporas en forma de sombrero,  $\times 1000$ . 4: ascosporas libres,  $\times 1000$ .

elipsoidales o cilíndricas, de 2 a 4.5  $\mu\text{m}$  de ancho por 3 a 12  $\mu\text{m}$  de largo; independientes, con un brote polar o subpolar y en cadenas cortas, simples o ramificadas. Desarrolla abundantes ascas con las mismas formas indicadas para las células vegetativas, de 2.5 a 4.5  $\mu\text{m}$  de ancho por 4 a 12  $\mu\text{m}$  de largo, conteniendo cada una cuatro ascosporas en forma de sombrero, de 2.3 a 2.5  $\mu\text{m}$  de ancho por 2  $\mu\text{m}$  de alto, las cuales son liberadas fácilmente por rompimiento de la pared de las ascas (Figs. 2-4).

Crecimiento en glucosa — extracto de levadura — peptona — agar. Moderado. Después de tres días, el cultivo en estría es de color blanco amarillento, opaco, rugoso, con la superficie plegada y alveolada, muy poco elevado y con el margen ondulado. Las células vegetativas y las ascas presentan una morfología semejante a la indicada para el medio anterior.

Crecimientos en medios líquidos de extracto de malta y de glucosa — extracto de levadura — peptona. Después de un día forma una película blanca, cerosa, opaca, seca y ascendente, y un sedimento blanco floculento.

Placa de Dalmau en harina de maíz agar. Forma abundante pseudomicelio con células esferoidales, elipsoidales y cilíndricas (Figs. 2-3). El pseudomicelio no sólo se forma en la placa de Dalmau, sino en todos los medios de cultivo utilizado en este estudio.

Esporulación. Abundante formación de ascas, con las características morfológicas indicadas para el medio de V8 agar, tanto en este último medio como en glucosa — extracto de levadura — peptona — agar, medios de Fowell y de Gorodkova, y trozos de pepino y zanahoria. En el medio de Fowell, las células vegetativas mostraron una notoria gemación multipolar con las yemas persistentes.

Fermentación de carbohidratos y de otros compuestos del carbono.

Glucosa + (muy débil y lenta), galactosa —, sacarosa —, maltosa —, celobiosa —, trehalosa —, lactosa —, melibiosa —, rafinosa —, melecitosa —, inulina — y  $\alpha$  — metil — D — glucósido —.

Asimilación de carbohidratos y de otros compuestos del carbono.

Glucosa +, galactosa —, L-sorbose —, sacarosa —, maltosa —, celobiosa —, trehalosa —, lactosa —, melibiosa —, rafinosa —, melecitosa —, inulina —, almidón soluble —, D-xilosa +, L-arabinosa —, D-arabinosa —, D-ribose —, L-ramnosa —, metanol —, etanol +, glicerol —, eritritol —, ribitol —, galactitol —, D-manitol —, D-glucitol —,  $\alpha$  -metil — D-glucósido —, salicina —, arbutina —, DL-ácido láctico +, ácido succínico + (débil), ácido cítrico +, inositol —, gluconolactona —, 2-cetogluconato —, 5-cetogluconato —, D-glucosamina + (débil), 0.1% cicloheximida —, y 0.01% cicloheximida —.

Asimilación de nitrato de potasio o de nitrito de sodio. Negativa.

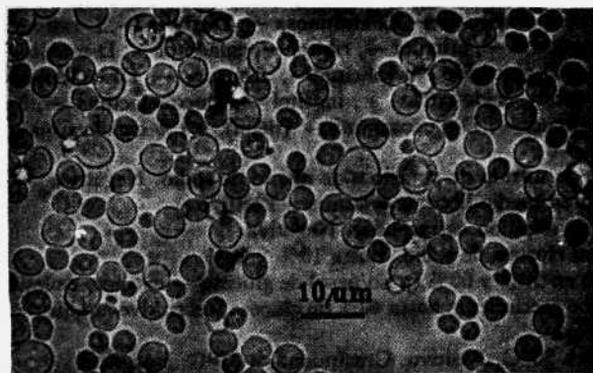
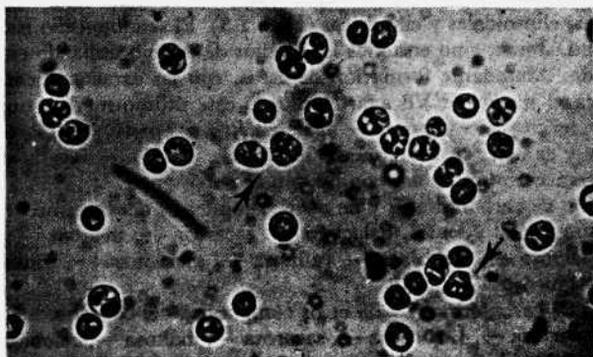
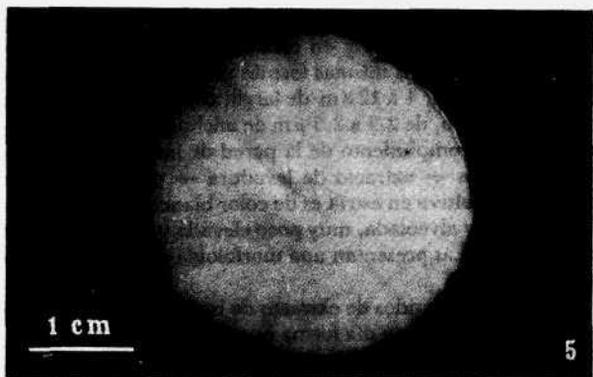
Crecimiento en medio libre de vitaminas. Positivo.

Formación de almidón extracelular. Negativa.

Tolerancia al cloruro de sodio. Entre 13% y 14%.

Crecimiento en 50% y 60% (peso/peso) de glucosa — extracto de levadura — agar. Negativo. Hubo crecimiento hasta 40% de glucosa y el cultivo adquirió una coloración amarillenta rosada.

Crecimiento a 30°C. Positivo. Crecimiento a 37°C. Negativo.



Figuras 5-7. *Saccharomyces cerevisiae*. 5: colonia gigante, de 21 días, en medio de V8 agar,  $\times 3$ . 6: ascas con dos, tres y cuatro ascosporas esteroidales en foco (flechas), en medio de glucosa — extracto de levadura — peptona — agar,  $\times 1000$ . 7: células vegetativas en medio de V8 agar,  $\times 1000$ .

*Saccharomyces cerevisiae* Hansen

Figs. 5-7

Crecimiento en V8 agar. Vigoroso. A los 21 días la colonia gigante es de, aproximadamente, 2 cm de diámetro, de color blanco crema, consistencia butirosa, brillante o semibrillante, con la superficie lisa y con los surcos radiales, en su mayor parte limitados a la parte periférica, algo elevada y de borde entero o levemente ondulado (Fig. 5). Las células vegetativas son esféricas u ovals, de 2 a 7  $\mu\text{m}$  de ancho por 3 a 9  $\mu\text{m}$  de largo (Fig. 7). Las ascas jóvenes son esferoidales o elípticas, y las maduras con lóbulos o protuberancias debido a la presión de las ascosporas, de 2.5 a 5  $\mu\text{m}$  de ancho por 5 a 8  $\mu\text{m}$  de largo. Ascosporas esferoidales, de 2 a 4 por asca, de 2.5 a 4  $\mu\text{m}$  de diámetro.

Crecimiento en glucosa — extracto de levadura — peptona — agar. Bueno o moderado. Después de tres días, el cultivo en estría es de color blanco, brillante, liso, poco elevado, y con el margen entero o poco ondulado. Las células vegetativas y las ascas (Fig. 6) muestran un aspecto semejante al indicado para el medio anterior.

Crecimiento en medios líquidos de extracto de malta y de glucosa — extracto de levadura — peptona. Aún después de un mes no forma velo ni anillo; con poca turbidez pero con abundante sedimento de color blanco.

Placa de Dalmou en harina de maíz agar. No forma pseudomicelio ni en éste ni en ningún otro medio utilizado.

Esporulación. Abundante formación de ascas en V8 agar, glucosa — extracto de levadura — peptona — agar, medios de Fowell y de Gorodkova, y trozos de pepino o zanahoria.

Fermentación de carbohidratos y de otros compuestos del carbono.

Glucosa +, galactosa +, sacarosa +, maltosa + (débil), celobiosa + (débil y tardía), trehalosa —, lactosa —, rafinosa +, melecitosa —, inulina — y  $\alpha$ -metil — D-glucósido —.

Asimilación de carbohidratos y de otros compuestos del carbono.

Glucosa +, galactosa +, L-sorbosa +, sacarosa +, maltosa +, celobiosa +, trehalosa +, lactosa —, melibiosa —, rafinosa +, melecitosa +, inulina +, almidón soluble —, D-xilosa —, L-arabinosa —, D-arabinosa —, D-ribosa +, L-ramnosa —, metanol —, etanol +, glicerol —, eritritol —, ribitol —, galactitol —, D-manitol —, D-glucitol —,  $\alpha$ -metil — D-glucósido +, salicina —, arbutina —, DL-ácido láctico +, ácido succínico —, inositol —, gluconolactona —, 2-cetogluconato —, 5-cetogluconato —, D-glucosamina —, 0.1% cicloheximida — y 0.01% cicloheximida —.

Asimilación de nitrato de potasio o de nitrito de sodio. Negativa.

Crecimiento en medio libre de vitaminas. Positivo.

Formación de almidón extracelular. Negativa.

Tolerancia al cloruro de sodio. Entre 12% y 13%.

Crecimiento en 50% y 60% (peso/peso) de glucosa — extracto de levadura — peptona — agar. Negativo. Hubo crecimiento hasta 40% de glucosa y el cultivo adquirió una coloración morena.

Crecimiento a 30°C. Positivo. Crecimiento a 37°C. Positivo.

## DISCUSION

Aunque no se realizaron recuentos de las colonias de levaduras que crecieron en las placas de medio de V8 agar inoculado con el tepache para hacer el aislamiento de las

cepas estudiadas, hay que hacer notar que la gran mayoría de las colonias presentes en las placas fueron blancas, brillantes y lisas (posteriormente identificadas como pertenecientes a *Saccharomyces cerevisiae*), hubo un menor número de colonias morenas rosadas, opacas y rugosas (posteriormente identificadas como pertenecientes a *Pichia membranaefaciens*) y sólo unas cuantas colonias de bacterias. Esto parece indicar que las levaduras en discusión constituyan la micoflora principal del tepache al tiempo de fermentación en que éste es normalmente consumido.

En la elaboración del tepache, algunas veces se acostumbra utilizar un cierto volumen de la bebida ya fermentada, o un grumo de tibicos, como "pie" (inóculo) para acelerar la fermentación del nuevo sustrato; no obstante, de la información proporcionada por el fabricante del tepache que sirvió de base para el presente estudio micológico, se sabe que dicho fabricante no utiliza ninguna de las dos cosas, por lo que se deduce que el inóculo se debió originar principalmente de los microorganismos presentes en las frutas utilizadas como materia prima y en las paredes de las tepacheras que rutinariamente sirven para contener la bebida en fermentación.

Las dos especies de levaduras aisladas e identificadas del tepache ya habían sido encontradas como constituyentes de los tibicos, los cuales son masas gelatinosas, visibles a simple vista, compuestas de bacterias y levaduras, que en ocasiones son utilizadas como inóculo para elaborar tepache y vinagre (Ulloa y Herrera, 1981).

Es interesante que se hayan encontrado las mismas especies de levaduras tanto en los tibicos como en el tepache que fue elaborado sin la intervención de los mismos, pero puede considerarse que, probablemente, cuando en los procesos iniciales se utilizan tibicos como iniciadores de la fermentación de dicha bebida, se pueden conservar las levaduras, junto con otros microorganismos, en las paredes de los recipientes de madera en que se elabora la misma, de manera que el proceso podría repetirse indefinidamente al añadir sustratos frescos a dichos recipientes. Por otra parte, se sabe que los tibicos pueden formarse, ocasionalmente, en tepaches con un tiempo prolongado de fermentación. Se desconocen los factores que influyen en la formación de los tibicos, tanto en condiciones naturales como artificiales, por lo que sería importante conocer desde el punto de vista biológico, y quizá con posible aplicación práctica, el mecanismo de integración de levaduras y bacterias en las mencionadas masas gelatinosas.

Aunque a nivel de especie las cepas aisladas de los tibicos concuerdan con las cepas aisladas del tepache, existen varias características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas diferentes entre dichas cepas, y lo mismo sucede con otras cepas, también pertenecientes a las especies *P. membranaefaciens* y *S. cerevisiae*, que han sido aisladas de otras bebidas fermentadas indígenas de México. No obstante estas diferencias intraespecíficas, es interesante el hecho de que las mismas dos especies de levaduras estén constantemente involucradas en los procesos de fermentación de bebidas elaboradas con distintos ingredientes, por diversos grupos étnicos de México, como son el tesgüino (de maíz), el pulque (de savia de maguey) y el colonche (de jugo de tuna); por otra parte, *S. cerevisiae* ha sido aislada de las bebidas antes mencionadas y, además, del pozol (de maíz) y de la tuba (de savia de palma de coco), como ya fue indicado en trabajos previos (Ulloa y Herrera, 1979; Herrera y Ulloa, 1981).

En un trabajo anterior, sobre una especie nueva de levadura aislada del tepache, los autores de este estudio hicieron la descripción de *Candida queretana* Herrera y Ulloa (Herrera y Ulloa, 1978) que, según otros autores corresponde a *C. boidinii* Ramírez Gómez (Barnett, Payne y Yarrow, 1979); la descripción de la especie nueva menciona-

da, se basa en que ésta asimila L-sorbosa, inulina y ácido succínico, no asimila glicerol y se desarrolla bien en medio libre de vitaminas, características que contrastan con las de *C. boidinii*. Trabajos posteriores permitirán definir si se trata de una o de dos especies diferentes.

Con la presente comunicación se confirma la intervención de *S. cerevisiae* en la fermentación del tepache; como puede verse en los resultados de las pruebas de fermentación, la cepa aislada del tepache es una buena fermentadora, ya que dentro de las primeras 24 horas produjo abundantemente ácido y gas a partir de seis carbohidratos (glucosa, galactosa, sacarosa, maltosa, celobiosa y rafinosa), no así la cepa de *P. membranaefaciens* que sólo fermentó la glucosa leve y tardíamente. Aun cuando *P. membranaefaciens* no produce gas a partir de los carbohidratos probados, con excepción de la glucosa, su presencia, por primera vez registrada en este trabajo, en el proceso de fermentación del tepache, también debe contribuir a dar algunas de las características al producto. Es importante señalar que no hay estudios químicos o bioquímicos sobre el tepache, que relacionen los cambios producidos en el sustrato en fermentación con las especies de microorganismos que se desarrollan durante dicha fermentación.

En general, el tepache es un producto de elaboración doméstica para consumo familiar, en el que se usa como materia prima principal la cáscara y la pulpa de la piña, o bien, es un producto que se elabora en mayores cantidades con fines comerciales, utilizando también piña aunque, con frecuencia, además otras frutas; pero, en ambos casos, el proceso de preparación no incluye un control de calidad de las materias primas utilizadas y, menos aún, un control microbiológico. Aunque esto último no parece repercutir desfavorablemente en la salud de los consumidores de tepache, no hay ningún estudio sobre las características sanitarias de la bebida y, pese a que las levaduras aisladas e identificadas hasta el momento no son consideradas como patógenas, es probable que también puedan desarrollarse gérmenes nocivos para la salud, como por ejemplo algunas enterobacterias procedentes de la contaminación fecal, cuando no se han seguido las medidas higiénicas rutinarias que impidan la proliferación de estas últimas en el tepache.

Aunque es muy probable que la elaboración casera del tepache continuará realizándose empíricamente, de la misma manera como se elaboran algunos productos lácteos agrios, como la leche búlgara y el "yoghourt", sería deseable profundizar más en los estudios microbiológicos del tepache, incluyendo algunos sobre las bacterias, e iniciar estudios biotecnológicos, con el fin de elaborar esta bebida popular a un nivel industrial, bajo un sistema de controles semejantes a los que se usan en la producción de la cerveza y del vino, utilizando cepas seleccionadas de levaduras, de preferencia las aisladas del mismo tepache, y un proceso de pasteurización para poder obtener un producto de calidad y sanidad controladas.

## AGRADECIMIENTOS

Se agradece la asistencia técnica de la M. en C. Cora Salinas en la elaboración de los medios de cultivo básicos utilizados en el presente estudio.

## LITERATURA CITADA

Barnett, J. A., R. W. Payne y D. Yarrow, 1979. *A guide to identifying and classifying yeasts*. Cambridge University Press, Cambridge, 315 p.

- Cabrera, L. 1974. *Diccionario de Aztequismos*. Ediciones Oasis, S. A., México, D. F., 166 p.
- Herrera, T. y M. Ulloa, 1978. Descripción de una especie nueva de levadura, *Candida queretana*, aislada del tepache de Querétaro, México. *Bol. Soc. Mex. Mic.* 12: 13-18.
- Herrera, T. y M. Ulloa, 1981. Estudio de *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida valida*, levaduras aisladas del colonche de San Luis Potosí, México. *Rev. lat-amer. Microbiol.* 23 (4):219-223.
- Lodder, J., 1970. *The yeasts, a taxonomic study*. North Holland Publishing Co., Amsterdam, 1385 p.
- Nava-Garduño, D., 1953. Contribución al estudio de las levaduras del tepache. Tesis profesional. Fac. Ciencias, Univ. Nal. Autón. México, 51 p.
- Santamaría, F. J., 1942. *Diccionario general de americanismos*. Espasa Calpe. Editorial Robredo, México, D. F.
- Santamaría, F. J., 1959. *Diccionario de mejicanismos*. Editorial Porrúa, S. A.
- Ulloa, M. y T. Herrera, 1979. Aspectos generales sobre etnología, microbiología y química de bebidas fermentadas indígenas de México. *Bol. Soc. Mex. Hist. Nat.* 39 (en prensa).
- Ulloa, M. y T. Herrera, 1981. Estudio de *Pichia membranaefaciens* y *Saccharomyces cerevisiae*, levaduras que constituyen parte de las zoogreas llamadas tibicos en México. *Bol. Soc. Mex. Mic.* 16: 63-75.