

Identificación de levaduras aisladas del Tepache tradicional de Guerrero, México

Identification of yeasts isolated of the traditional Tepache of Guerrero, Mexico

Recepción del artículo: 17/05/2023 • Aceptación para publicación: 13/06/2023 • Publicación: 30/06/2023

● <https://doi.org/10.32870/ecucba.vi20.305>

José Alberto Lucas-López

Universidad de Guadalajara. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Departamento de Botánica y Zoología. Laboratorio de Biotecnología. Zapopan, Jalisco. México.

Olivia Rodríguez Alcántar

Universidad de Guadalajara. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Departamento de Botánica y Zoología. Instituto de Botánica. Zapopan, Jalisco. México.

José Armando Arias García*

Universidad de Guadalajara. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Departamento de Botánica y Zoología. Laboratorio de Biotecnología. Zapopan, Jalisco. México.

*Autor para correspondencia: armando.arias@academicos.udg.mx

Resumen

En México existe una gran diversidad de bebidas fermentadas y una de ellas es el tepache, de origen Mixteca, y elaborado actualmente con piña, panela de azúcar (piloncillo) y agua. Se desconoce con exactitud la microbiología del tepache de Guerrero, por lo que es importante identificar las especies de levaduras implicadas en la fermentación de la piña para reconocer y optimizar su proceso. El objetivo del estudio fue determinar con la técnica molecular PCR-RFLP a las especies de levaduras que participan en la fermentación del tepache de Guerrero. Los resultados obtenidos incluyen los patrones de restricción de la región genética ITS-5.8S del DNAr de 195 cepas aisladas de levaduras, lográndose determinar ocho patrones de restricción diferentes que corresponden a diferentes especies de levaduras. Las especies de levaduras involucradas en la fermentación de esta bebida son: *Candida apicola*, *C. ethanolica*, *C. oregonensis*, *C. tropicalis*, *Pichia galeiformis*, *Rhodotorula graminis*, *Saccharomyces kluyveri* y *Zygosaccharomyces florentinus*; siendo las más abundantes *C. apicola* con 51.3% y *Z. florentinus* 24.1%. En conclusión, en el tepache de Guerrero ocurre una fermentación de las piñas maduras por levaduras del grupo no-*Saccharomyces* correspondientes a la primera etapa fermentativa, obteniéndose una bebida parcialmente fermentada.

Palabras clave: PCR-RFLP-ITS, fermentación, levaduras no-*Saccharomyces*, bebida autóctona.

Abstract

Mexico has a great diversity of fermented beverages and Tepache, is a popular drink with Mixtec origins. Actually is prepared with pineapple, panela-sugarcane and water. The microbiology of the tepache is not known with exactitude, but it is important to know the species of yeast involved in the fermentation of the pineapple to know it and optimize its process. The aim of this study was to define with the molecular technique PCR-RFLP the species that participate in the fermentation of the Tepache from Guerrero. The results obtained included a total of eight different restriction patterns of ITS 5.8S region of rDNA from 195 strains isolated from yeast, corresponding to different species of yeasts. According to these restriction patterns, the yeast species involved in the fermentation of this beverage belong to *Candida apicola*, *C. ethanolica*, *C. oregonensis*, *C. tropicalis*, *Pichia galeiformis*, *Rhodotorula graminis*, *Saccharomyces kluyveri* and *Zygosaccharomyces florentinus*. Considering the frequency of the isolates from species, the most abundant species was *C. apicola* with 51.3% and *Z. florentinus* 24.1% of the isolates. According to these results Tepache from Guerrero is partly fermented with non-*Saccharomyces* yeast of mature pineapples corresponding to the first fermentative stage. In conclusion, in the Tepache from Guerrero a fermentation of the mature pineapples by yeasts of the non-*Saccharomyces* group corresponding to the first fermentative stage occurs, and a partially fermented beverage is obtained.

Keywords: PCR-RFLP-ITS, fermentation, non-*Saccharomyces*, autochthonous beverage, yeasts.

Introducción

Los pueblos establecidos en México, han desarrollado más de 40 bebidas fermentadas con una gran variedad de ingredientes como la miel de abeja, savia de palma, ciruelas silvestres, piña, maguey, chile, maíz, tunas, nopal, pitahaya, guayaba, mezquite, yuca y chirimoya, hierbas, cortezas y otros frutos (Abbott, 1996). El consumo de estas bebidas tenía un importante propósito en los ritos religiosos, en las prácticas profilácticas y médicas, dando un componente tradicional y festivo entre los grupos étnicos mexicanos. No obstante, el pulque, el colonche, el pozol, el tejuino, el tepache y la tuba, son las bebidas que permanecieron a través del tiempo hasta la actualidad ya que siguen formando parte de las tradiciones y la gastronomía cultural del país.

Una de las bebidas autóctonas mexicanas degustada hasta la actualidad es el tepache; su nombre proviene del náhuatl “*tepiatl*” y “*tepiatzin*” que significa "agua o bebida de maíz", también puede derivar del vocablo “*tepachoa*” que significa "moler o prensar algo con piedra" (Herrera y Ulloa, 1982; Herrera, 2005; Godoy *et al.*, 2003). Está bebida es originaria de la región centro-sur de México donde se localiza la región Mixteca (Cruz y Ulloa, 1973).

El centro de origen del tepache es la parte centro-sur de México en donde se localiza la región Mixteca; y está formado por los estados de Chiapas, Guerrero, Oaxaca, Puebla y Veracruz. Los grupos étnicos actuales ubicados en la zona de origen que ingieren la bebida, son los amuzgos, chinantecos, mixtecos y triques; y en Sonora, los pápagos (Cruz y Ulloa, 1973, Godoy *et al.*, 2003).

La elaboración del tepache en la época prehispánica consistía en mezclar agua, granos de maíz molidos, miel y un poco de pulque como inóculo, después se dejaba fermentar en recipientes llamadas tepacheras por un tiempo máximo de dos días (Cruz y Ulloa, 1973; Herrera y Ulloa, 1982). Sin embargo, ahora ésta técnica artesanal cambió a través del tiempo sustituyendo los ingredientes principales por brácteas y carpelos (cáscara) y la pulpa (sincarpio de la baya) de la piña (*Anana comusus*) y por panela o "piloncillo" de caña de azúcar, y en ocasiones añadiéndosele típicos como inóculos (Herrera y Ulloa, 1978).

Actualmente, la elaboración del tepache es más común prepararlo a base de piña. Su color es amarillo oscuro, de aspecto turbio más no viscoso, de aroma y sabor agradable; y es consumido entre comidas, diariamente, en fiestas religiosas; también puede ser ligeramente alcohólico, y si se prolonga su tiempo de fermentación puede llegar a obtener vinagre (Godoy *et al.*, 2003). Esta bebida es confundida con el “charape” que se elabora de igual manera pero se le adiciona remanentes de pulque, especias (canela y clavo de olor), guayaba, manzana, naranja u otras frutas (Godoy *et al.*, 2004; Herrera y Ulloa, 1982). No obstante, el tepache del estado de Guerrero, es preparado con piña depositada dentro de un recipiente (barro o vidrio) al que se le añade agua de pozo caliente, piloncillo (llamado “panocha”), y se deja fermentar tapado de 2 a 4 días hasta su consumo.

El tepache, es una bebida alcohólica, aromática y de sabor agradable. Tiene una alta aceptación por la población mexicana, y forma parte de la gastronomía típica del país. Esta bebida deriva de un proceso de fermentación natural en condiciones ambientales desconocidas, en las distintas regiones en donde se elabora y consume. También se desconoce los microorganismos involucrados en la fermentación del tepache, que le confieren a esta bebida las características particulares en cada región, dado a que no existe un control o norma para su elaboración. Este hecho hace imposible saber el potencial tecnológico de las especies de levaduras implicadas. Por lo anterior, es importante identificar los aislados de levaduras cultivables de la bebida con la posibilidad de conocer y mejorar las características productivas del tepache; al mismo tiempo las viables aplicaciones de las cepas de levaduras para el proceso de elaboración de otros productos fermentativos de valor agregado.

Hasta el momento, la identificación de levaduras en bebidas fermentadas se realiza convencionalmente con el uso de pruebas bioquímicas y morfológicas. Sin embargo, estas técnicas demandan mucho tiempo y no son tan exactas como son los métodos moleculares y que no dependen del estado fisiológico en que se encuentren las cepas. El uso de estas herramientas moleculares permite contar con certeza las poblaciones de levaduras presentes en las bebidas fermentadas tradicionales como el tepache, y observar el comportamiento de la diná-

mica ecológica que presenta cada población dentro de la fermentación.

El objetivo de este estudio pretende abordar dos aspectos: reportar registros nuevos de levaduras presentes en el tepache de Guerrero (México), área perteneciente al centro de origen a través de la identificación con técnicas de biología molecular (PCR-RFLP); y conocer la composición de especies involucradas en el proceso fermentativo, información útil para futuras aplicaciones industriales.

Materiales y Métodos

Muestreo

En la comunidad llamada La Sabana, municipio de Acapulco de Juárez, Guerrero, México, se adquirió una muestra de tepache tradicional. La ubicación geográfica del sitio del muestreo está georreferenciada en las coordenadas N 16°52'43.42440'' y O 99°49'30.25560'' a 9.16 m snm. La bebida se recolectó de acuerdo como se establece la NOM-110-SSA1-1994 de Bienes y Servicios.

Aislamiento

Para el aislamiento de las cepas de levaduras del tepache se tomaron 10 mL de la muestra de forma homogénea y se realizaron diluciones seriadas (10^1 a 10^4). Después se inoculó con la técnica de extensión en placa en medio GPYA (40 g de glucosa, 5 g de peptona de caseína, 5 g de extracto de levadura, 20 g de agar y 0.1 g de cloranfenicol) una alícuota de 100 μ L y se incubó a 28 ± 1 °C por 24 a 48 h. Las colonias aisladas se purificaron en medio GPYA y se conservaron a -20°C en glicerol 20%.

Identificación de levaduras por PCR-RFLPs de la región ITS-5.8 DNAr

Para la identificación de cada uno de los aislados de levadura se siguió el protocolo propuesto por Esteve-Zarzoso *et al.* (1998). Este método se basa en el uso de enzimas de restricción con los productos de PCR de la región génica ITS 5.8S para obtener un patrón de restricción, el cual se comparó con los registrados en la base de datos Yeast-id

(www.yeast-id.com) del Consejo Superior de Investigación Científica (CSIC), España y los reportados en la literatura.

Extracción de DNA

La extracción de DNA se llevó a cabo de acuerdo a método propuesto por Querol *et al.* (1992) que se basa en el uso de la enzima liticase de la bacteria *Arthrobacter luteus*, para hidrolizar la pared celular formada de quitina y β -glucanos de la levadura y formar esferoplastos. A través de cambios de osmolaridad se libera el contenido celular, y con la adición de compuestos desnaturizantes de proteínas (acetato de potasio) junto con un choque térmico se obtiene DNA de alta calidad.

Amplificación de la región ITS 5.8S del DNAr

Para la amplificación de la región génica ITS 5.8S del DNAr se realizó una extracción de DNA de acuerdo al método propuesto por Querol *et al.* (1992). En la PCR se utilizaron los cebadores universales para hongos y levaduras, el ITS-1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') y el ITS-4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') que incluye la región intergénica 5.8S que se encuentran entre las secuencias transcritas internas (ITS) 1 y 2 del DNA ribosomal (White *et al.*, 1990). La reacción se llevó a cabo en volumen final de 25 μ L con 10 ng de DNA genómico, 0.2 μ M de cada cebador, 4.5 mM de $MgCl_2$, 0.0175 mM de cada dNTPs, 1X de amortiguador para PCR Invitrogen® y 1 U de Taq polimerasa Invitrogen®. La polimerización se realizó en un termociclador (Techne, TC 3000) con el siguiente programa: desnaturización inicial 95°C por 5 minutos, 30 ciclos (94 °C por 30 s, 55.5 °C por 30 s y 72 °C por 60 s) y una extensión final a 72 °C por 10 minutos. Los productos de PCR se separaron y se visualizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.4% Ultrapure Invitrogen®, teñido con 0.5 μ g de RedGel™ BIOTUM®, expuesto en luz ultravioleta para estimar el tamaño de los productos de PCR y fue por comparación con un marcador de peso molecular de 100 pb.

Restricción de la región ITS 5.8 DNAr

Los productos de PCR fueron digeridos con las enzimas

de restricción *HhaI*, *HinfIII* y *HaeIII* para obtener el patrón de restricción (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1998). Para ello, se preparó por cada enzima de restricción una mezcla de reacción con 10 μ L de producto de PCR, 1 μ L de amortiguador enzimático Invitrogen® y 0.03 U de cada una de las tres enzimas *HinfI*, *HindIII* y *HhaI* y 4 μ L de agua mQ. Se incubaron a 37°C por 24 h. Los fragmentos de restricción fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 3% teñido con 0.5 μ g de RedGel™ BIOTUM® y para estimar el tamaño de los fragmentos de restricción se realizó por comparación con un marcador de peso molecular de 100 pb.

Resultados

De la muestra de tepache tradicional de Guerrero analizada se aislaron un total de 203 cepas axénicas, que están criopreservados a -20 C en glicerol 20% y forman parte del cepario del Laboratorio de Biotecnología: sección Levaduras, del Departamento de Botánica y Zoología del CUCBA.

Se obtuvo el DNA genómico total de las cepas aisladas y se determinó la calidad y la pureza del DNA por espectrofotometría (A_{260}/A_{280}). En cuanto a la pureza se determinó que las extracciones son buenas, ya que la relación espectrofotométrica (A_{260}/A_{280}) mostró un rango de 1.8 - 2.0 en cada caso. Al mismo tiempo, se comprobó la integridad del DNA con una evaluación visual con una electroforesis en agarosa al 1% de cada aislado (Figura 1).

Amplificación de la región génica ITS-5.8 S del DNA ribosomal

El DNA genómico aislado de cada cepa se utilizó

como molde para amplificar la región génica ITS-5.8S con los cebadores descritos por White (1990) por la técnica de PCR. Los productos de PCR obtenidos se observaron en agarosa al 1.4% como se muestra en la Figura 2 y presentaron un intervalo de 450 a 900 pb.

Polimorfismos de los Fragmentos Largos de Restricción (RFLPs) de la región génica ITS-5.8S del DNA ribosomal

Los productos de PCR de cada cepa de levadura fueron digeridos enzimáticamente con endonucleasas (*HinfI*, *HhaI* y *HaeIII*) y los fragmentos de restricción resultantes se les determinó el tamaño con una electroforesis y visualización en un gel de agarosa al 3% (Figura 3).

Determinación de la especies

A partir de los patrones de restricción que se muestran en el Cuadro 1, se identificaron 195 cepas y corresponden a ocho especies de levaduras de acuerdo a la base de datos del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) de la Universidad de Valencia, España (www.yeast-id.org). Las especies de levaduras identificadas son: *Candida apicola*, *C. ethanolica*, *C. oregonensis*, *C. tropicalis*, *Pichia galeiformis*, *Rhodotorula graminis*, *Saccharomyces kluyveri* y *Zigosaccharomyces florentinus*.

Al analizar la frecuencia de especies aisladas del tepache se encontró que las más abundantes en la fermentación fueron *C. apicola* con 51.3%, seguido de *Z. florentinus* con 24.1%. Las levaduras *C. oregonensis* y *S. kluyveri* con 0.5% respectivamente fueron las menos abundantes (Figura 4).

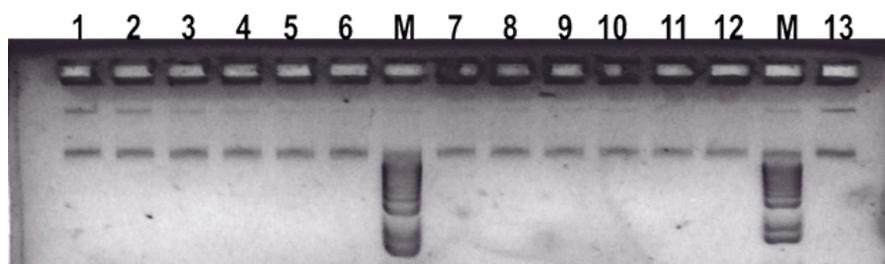


Figura 1. Gel de electroforesis del DNA genómico de las levaduras aisladas del tepache tradicional de Guerrero. Carril 1 – 13 muestras de DNA extraído de los aislados de levaduras. M = marcador de peso molecular de 1 kb.

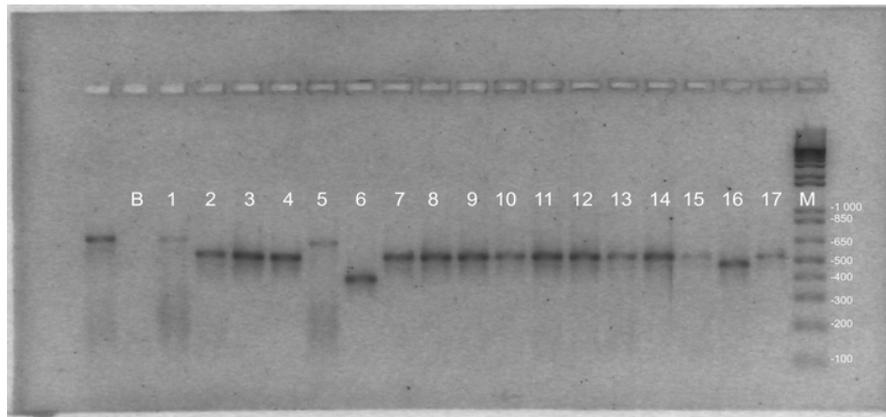


Figura 2. Amplificaciones de la región ITS-5.8S de DNAr de cepas levaduras de tepache tradicional de Guerrero. Las muestras 2-4, 7-15 y 17 presentan un producto de PCR de 520 pb; la 6 de 450 pb; 16 de 480 pb; y la 1 y 2 de 650 pb. B = blanco, M = marcador de peso molecular de 1 kb.

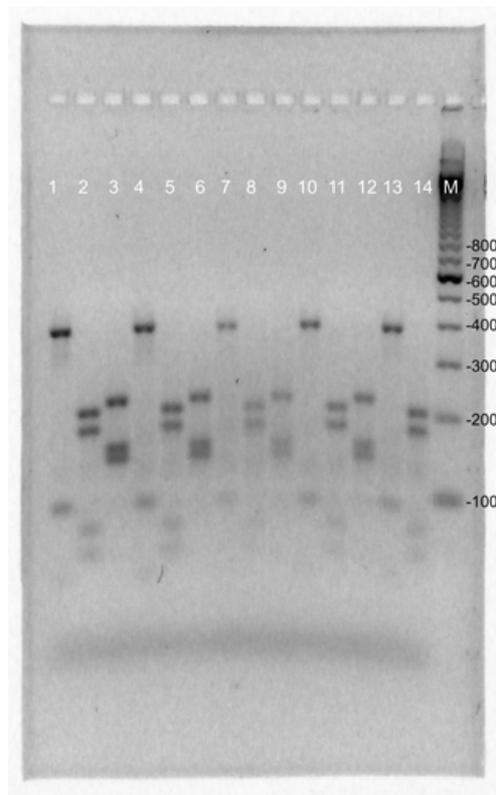


Figura 3. Gel de agarosa con los productos de la digestión enzimática de la región ITS 5.8 del DNAr de las levaduras de tepache. En los carriles 1, 4, 7, 10 y 13 para la enzima *Hae* III (95 + 400 pb); en los carriles 2, 5, 8, 11 y 14 de la enzima *Hha* I (50 + 80 + 180 + 210 pb); y en los carriles 3, 6, 9 y 12 la enzima *Hinf*I (140 + 160 + 220 pb). En todos los casos corresponde a la misma especie determinada como *Candida apicola*. M = marcador de peso molecular de 1kb.

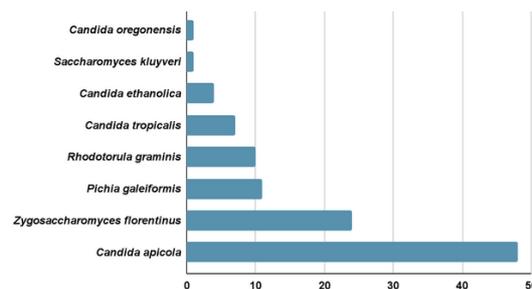


Figura 4. Abundancia de especies de levaduras en el tepache tradicional de Guerrero.

Cuadro 1. Especies de levaduras identificadas del tepache de Guerrero de acuerdo al tamaño del amplicón y los patrones de restricción obtenidos por RFLP-PCR de la región génica ITS 5.8S DNAr.

Grupo	Especie identificada	Amplicón ITS (pb)	Tamaño de los fragmentos de restricción (pb)		
			<i>Hae</i> III	<i>Hinf</i> I	<i>Hha</i> I
I	<i>Candida apicola</i>	500	95 + 400	145 + 155 + 220	80 + 180 + 210
II	<i>Candida ethanolica</i>	480	110 + 300	200 + 260	60 + 110 + 240
III	<i>Candida oregonensis</i>	380	70 + 60 + 100 + 150	180 + 220	80 + 300
IV	<i>Candida tropicalis</i>	520	70 + 450	240 + 260	260 + 280
V	<i>Pichia galeiformis</i>	450	50 + 80 + 300	200 + 250	60 + 110 + 240
VI	<i>Rhodotorula graminis</i>	650	200 + 400	130 + 210 + 240	90 + 210 + 300
VII	<i>Saccharomyces kluyveri</i>	710	225 + 425	70 + 120 + 220 + 245	110 + 230 + 310
VIII	<i>Zygosaccharomyces florentinus</i>	900	140 + 160 + 220 + 300	120 + 380	150 + 340 + 380

Discusión

En el tepache de Jalisco, Corona-González *et al.* (2013) identificaron a *C. apicola*, *Cryptococcus skinneri*, *Hanseniaspora sp.* y *S. cerevisiae*, esta última dominante en la fermentación. En este estudio se propone por primera vez, un método estandarizado y viable para la industrialización de tepache, considerando la aceptación del producto por el consumidor. Las condiciones de fermentación consisten en realizarla a una temperatura de 22°C durante 72 h con 9% de piña, 10% de azúcar morena o "piloncillo" y un pH de 5, para obtener un producto con un contenido de 7 g/L de etanol, 5 g/L de ácido acético y ácido láctico y 70% de sacarosa (Corona-González *et al.*, 2013).

En nuestro estudio, el grupo de las no-*Saccharomyces* son las que efectuaron la fermentación del tepache de Guerrero, principalmente las especies de los géneros *Candida* y *Zygosaccharomyces*, así como sucede con las bebidas tradicionales como chicha (López-Arboleda *et al.*, 2010), champús (Osorio-Cadavid *et al.*, 2008)

pulque, raicilla, mosto de mezcal y tequila (Lappe-Oliveras *et al.*, 2008; Valadez-Blanco *et al.*, 2012), vino y cerveza tradicional (Zott *et al.*, 2008).

Herrera y Ulloa (1978, 1982) aislaron levaduras de una muestra de tepache de Querétaro y D. F. y con técnicas morfológicas identificaron que las cepas corresponden también al grupo no-*Saccharomyces*, en donde detectaron a *Candida queretana* y *Pichia membraniaefaciens*. Las especies detectadas son diferentes a las identificadas en este trabajo ya que se utilizaron técnicas morfológicas mientras que en el tepache de Guerrero se utilizaron técnicas moleculares que presentan mayor rapidez, elevada sensibilidad, eficiencia para la identificación y no dependen de las condiciones de cultivo (Ciardo *et al.*, 2006). No se logró aislar la especie *Saccharomyces cerevisiae* y esto es debido a que en el tepache de Querétaro y D. F. se utilizan tíficos en los cuales se han asociado especies de levaduras del grupo no-*Saccharomyces*, pero también de *S. cerevisiae* (Godoy *et al.*, 2003).

En el inicio de la fermentación, el dominio de ciertas especies de levaduras pertenecientes al grupo

no-*Saccharomyces* es muy común en las bebidas autóctonas (Fleet, 2003 Romano et al. 2003), esto es por la versatilidad para metabolizar diferentes sustratos y de ellos producir metabolitos de valor agregado que resultan en caracteres organolépticos únicos en las bebidas autóctonas (Jolly et al., 2006).

Las especies de levaduras representativas de este tepache de Guerrero con respecto a su abundancia o presencia son *C. apicola* y *Z. florentinus* (Figura 4). Se ha señalado la participación de *C. apicola* en piñas maduras de Australia y Tailandia (Chanprasartsuk et al., 2010), así como en flores permitiendo el desarrollo de aromas para atraer a los polinizadores y dispersadores en etapas reproductivas, estrategia ecológica denominada como el sistema Insecto-Flor-Levadura (Lachance et al., 2010; Sukriadi et al., 2010). Ésta misma se encuentra presente en mostos de vino cotto italiano (Tofalo et al., 2009), mezcal (Arrizona et al., 2012) y cachaça (Souza-Oliveira, et al., 2005). La prevalencia de dichas levaduras tolerantes a temperatura entre 35 a 45°C en el tepache de Guerrero fue la presión de selección efectuada por el tepachero, quien agregó a la mezcla de ingredientes (piña y piloncillo) agua caliente y dejó fermentar, como sucede en la preparación de chicha en Perú (López-Arboleda, et al., 2010). La especie *Z. florentinus*, puede habitar en alimentos con poca agua y alta salinidad, jugos con alto contenido en azúcar, frutos y flores (Esteve-Zarzoso et al., 2003). Aunque para muchos alimentos y bebidas, como el vino y la cerveza, altera las características organolépticas además de oxidar el alcohol a ácidos orgánicos (Fleet, 2003), en el caso del tepache, lo favorece dándole el sabor ligeramente avinagrado (Godoy et al., 2003).

Conclusiones

La identificación molecular de las cepas de levaduras aisladas del tepache de Guerrero, permitió determinar la composición de especies involucradas en este proceso fermentativo y concluir que las especies que predominan en esta fermentación son *Candia apicola* y *Zigosaccharomyces florentinus*, levaduras del grupo no-*Saccharomyces*. Por otro lado, se registra por primera vez para el tepache, la presencia de

Candida ethanolica, *C. oregonensis*, *C. tropicalis*, *Pichia galeiformis*, *Rhodotorula graminis*, *Saccharomyces kluyveri* y *Zygosaccharomyces florentinus*.

Agradecimientos

Se agradece el apoyo obtenido por los proyectos COECYTJAL-UDG 2010 con número de clave de 5-2010-1-979. A la beca otorgada a J. A. L. L. por el programa de estímulos a estudiantes sobresalientes del CGSU-UdeG en el periodo 2012-2014.

Literatura citada

- Abbott, P. J. (1996). American Indian and Alaska native aboriginal use of alcohol in the United States. *American Indian and Alaska Native Mental Health Research*, 7(2), 1- 13. DOI: [10.5820/aian.0702.1996.1](https://doi.org/10.5820/aian.0702.1996.1).
- Arrizona, J., S. Morelb, A. Gschaedlera y P. Monsanb. (2012). Fructanase and fructosyltransferase activity of non-*Saccharomyces* yeasts isolated from fermenting musts of Mezcal. *Bioresource Technology*, 110, 560-565. DOI:[10.1016/j.biortech.2012.01.112](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.112).
- Bruman, H. J. (2000). *Alcohol in ancients México*. University of Utah Press, Salt Lake City.
- Chanprasartsuk, O., C. Prakitchaiwattana, R. Sanguandeeikul y G. H. Fleet. (2010). Autochthonous yeasts associated with mature pineapple fruits, freshly crushed juice and their ferments and the chemical changes during natural fermentation. *Bioresource Technology* 101(19), 7500-7509. DOI: [10.1016/j.biortech.2010.04.047](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.04.047).
- Ciardo D.E., G. Schär, E. C. Böttger, M. Altwegg, P. P. Bosshard. (2006). Internal transcribed spacer sequencing versus biochemical profiling for identification of medically important yeasts. *J Clin Microbiol.* 44(1), 77-84. DOI: [10.1128/JCM.44.1.77-84.2006](https://doi.org/10.1128/JCM.44.1.77-84.2006).
- Corona-González, R. T., J. R. Ramos-Ibarra, P. Gutiérrez-González, C. Pelayo-Ortiz, G. M. Guatemala-Morales y E. Arriola-Guevara. (2013). The use of response surface methodology to evaluate the fermentation conditions in production of tepache. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 12(1), 19-28.
- Cruz U. S. y M. Ulloa. (1973). Alimentos fermentados de maíz consumidos en México y otros países latinoamericanos. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural*, 34: 423-457.
- Esteve-Zarzoso, B., C. Belloch, F. Uruburu y A. Querol. (1998). Identification of yeast by RFLP analysis of the 5.8 rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49, 329-337. DOI: [10.1099/00207713-49-1-329](https://doi.org/10.1099/00207713-49-1-329).
- Esteve-Zarzoso, B., T. Zorman, C. Belloch y A. Querol. (2003). Molecular Characterization of the species of the genus *Zygosaccharomyces*. *Systematic and Applied Microbiology* 26, 404-411. DOI: [10.1078/072320203322497437](https://doi.org/10.1078/072320203322497437).
- Fleet, G. H. (2003). Yeast interactions and wine flavor. *International Journal of Food Microbiology*, 86, 11-22. DOI: [10.1016/s0168-1605\(03\)00245-9](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(03)00245-9).
- Godoy, A., T. Herrera y M. Ulloa. (2003). *Más allá del pulque y el tepache: las bebidas alcohólicas no destiladas indígenas de México*. UNAM. México, D.F.
- Herrera, T. y M. Ulloa. (1978). Descripción de una especie nueva de levadura *Candida queretana*, aislada de tepache de Querétaro, México. *Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología* 12, 13-18. DOI:[10.33885/sf.1978.2.477](https://doi.org/10.33885/sf.1978.2.477).
- Herrera, T. y M. Ulloa. (1982). *Pichia membranaefaciens* y *Saccharomyces cerevisiae* levaduras que intervienen en la fermentación de la bebida llamada tepache en México. *Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología*, 17,15-24. DOI: [10.33885/sf.1982.2.546](https://doi.org/10.33885/sf.1982.2.546).
- Jolly, N. P., O. P. H. Augistyn y I. S. Pretorius. (2006). The role and use non-*Saccharomyces* yeasts in wine. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 27(1),15-39. DOI: [10.21548/27-1-1475](https://doi.org/10.21548/27-1-1475).
- Lachance, M. A., J. Dobson, D. N. Wijayanayaka y A. M. E. Smith. (2010). The use of parsimony network analysis for the formal delineation of phylogenetic species of yeasts: *Candida apicola*, *Candida azyma*, and *Candida parazyza* sp. nov., cosmopolitan yeasts associated with floricolous insects. *Antonie van Leeuwenhoek*, 97, 155-170. DOI: [10.1007/s10482-009-9399-3](https://doi.org/10.1007/s10482-009-9399-3).
- Lappe-Oliveras, P., R. Moreno-Terrazas, J. Arrizón-Gaviño, T. Herrera-Suárez, A. García-Mendoza y A. Gschaedler-Mathi. (2008). Yeast associated with production of Mexican alcoholic nondestilled and distilled Agave beverages. *FEMS Yeast Research* 8, 1037-1052. DOI: [10.1111/j.1567-1364.2008.00430.x](https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00430.x).

- López-Arboleda, W. A., M. Ramírez-Castrillón, L. A. Mambuscay-Mena y E. Osorio-Cadavid, (2010). Diversidad de levaduras asociadas a chichas tradicionales de Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 12(2), 176-186. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-34752010000200014&lng=en&tlng=es.
- Osorio-Cadavid, E., C. Chaves-López, R. Tofalo, A. Paparella y G. Suzzi. (2008). Detection and identification of wild yeast in Champús, a fermented Colombian maize beverage. *Food Microbiology*, 28, 771-777. DOI: [10.1016/j.fm.2008.04.014](https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.04.014).
- Querol, A., E. Barrio y D. Ramón (1992). A comparative study of different methods of yeast-strain characterization. *Systematic and Applied Microbiology* 15, 439-446. DOI: [10.1016/S0723-2020\(11\)80219-5](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(11)80219-5).
- Rodríguez-Lázaro D, Hernández M. (2006). Molecular methodology in food microbiology diagnostics: trends and current challenges. *IUFoST*, 2006, 1085-99. DOI: [10.1051/IUFoST:20060643](https://doi.org/10.1051/IUFoST:20060643).
- Romano, P., C. Fiore, M. Paraggio, M. Caruso y A. Capece. (2003). Function of yeast species and strains in wine flavor. *International Journal of Food Microbiology*, 86, 169-180. DOI: [10.1016/S0168-1605\(03\)00290-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00290-3).
- Souza-Oliveira, E., C. A. Rosa, M. A. Morgano y G. E. Serra. (2005). Fermentation characteristics as criteria for selection of cachaça yeast. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(1), 19-24. DOI: [10.1023/B:WIBI.0000013286.30695.4e](https://doi.org/10.1023/B:WIBI.0000013286.30695.4e).
- Sukriadi, A., W. Sjamsuridzal y B. B. Putra (2010). Molecular identification and diversity of yeast associated with *Apis cerena* foraging on flower of *Jatropha integerima*. *Microbiology Indonesia*, 4 (1), 44-48. DOI: [10.5454/mi.4.1.9](https://doi.org/10.5454/mi.4.1.9).
- Tofalo R, C. Chaves-López, F. Di Fabio, M. Schirone, G. E. Felis, S. Torriani, A. Paparella y G. Suzzi. (2009). Molecular identification and osmotolerant profile of wine yeasts that ferment a high sugar grape must. *International Journal of Food Microbiology*, 130(3), 179-87. DOI: [10.1016/j.ijfoodmicro.2009.01.024](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.01.024)
- Valadez-Blanco, R., G. Bravo-Villa, N. F. Santos-Sánchez, S. L. Velasco-Almendarez y T. J. Monteville. (2012). The artisanal production of pulque, a traditional beverage of Mexican highland. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* 4(2), 140-144. DOI: [10.1007/s12602-012-9096-9](https://doi.org/10.1007/s12602-012-9096-9).
- White, T. J., T. Bruns, S. Lee y J. W. Taylor. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics pp. 315-322. En: Innis. M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, T. J. White. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Application*. Academic Press, Inc., Nueva York.
- Zott, K., C. Miot-Sertier, O. Claisse, A. Lonvaud-Funel y I. Masneuf-Pomarede. (2008). Dynamics and diversity of non-*Saccharomyces* yeast during the early stages in winemaking. *International Journal of Food Microbiology*, 125, 197-203. DOI: [10.1016/j.ijfoodmicro.2008.04.001](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.04.001).