

<https://doi.org/10.15517/rev.biol.trop..v73iS2.64703>

Diversidad de levaduras en frutas tropicales de Costa Rica

Keilor Rojas-Jiménez^{1*};  <https://orcid.org/0000-0003-4261-0010>
Andrés Quirós-Castegnaro¹;  <https://orcid.org/0009-0000-7599-8352>
Ivonne Ramirez-Rodríguez¹;  <https://orcid.org/0009-0006-1020-3620>
Priscila Solera-Rodríguez¹;  <https://orcid.org/0009-0001-2139-4817>
Jéssica Morera-Huertas¹;  <https://orcid.org/0000-0003-4066-4373>
Mónica Vallejo-Arróliga¹;  <https://orcid.org/0000-0001-9651-891X>

1. Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica, 11501 San José, Costa Rica; keilor.rojas@ucr.ac.cr (*correspondencia), andres.quiros@ucr.ac.cr, priscilla.solera@ucr.ac.cr, ivonne.rodriguezramirez@ucr.ac.cr, jessica.morera@ucr.ac.cr, monica.vallejo@ucr.ac.cr

Recibido 31-VIII-2024. Corregido 13-III-2025. Aceptado 25-III-2025.

ABSTRACT

Yeast diversity in tropical fruits from Costa Rica

Introduction: The yeasts consumed by the population in foods such as tropical fruits remain relatively unknown, despite being an important component of the human microbiota and having multiple biotechnological applications.

Methods: In this work we isolated and characterized the diversity of yeasts in fruits regularly ingested in Costa Rica, using culture-dependent methods, morphological characterization, and ITS marker sequencing.

Results: We isolated 118 yeasts from the 26 species of tropical fruits sampled, grouped into 7 families, 11 genera, and 19 species. *Hanseniaspora pseudoguilliermondii*, *Pichia kluyveri* and *Hanseniaspora uvarum* were the most abundant species. Notably, some species were present on several fruits, others presented a more specific host range, and some were only isolated after several months of fermentation.

Conclusion: Our work evidences the large diversity of yeasts present in tropical fruits, which motivates further study of their ecology, physiology, and potential biotechnological uses.

Keywords: Tropical yeast, biodiversity, tropical fruits, tropical fruits, biotechnology.

RESUMEN

Introducción: Las levaduras que consume la población en alimentos como las frutas tropicales permanecen relativamente desconocidas, a pesar de ser un componente importante de la microbiota humana y tener múltiples aplicaciones biotecnológicas.

Métodos: En este trabajo aislamos y caracterizamos la diversidad de levaduras en frutas ingeridas regularmente en Costa Rica, utilizando métodos dependientes de cultivo, caracterización morfológica, y secuenciación de marcador ITS.

Resultados: Se aislaron 118 levaduras de las 26 especies de frutas tropicales muestreadas, agrupándose en 7 familias, 11 géneros y 19 especies. *Hanseniaspora pseudoguilliermondii*, *Pichia kluyveri* y *Hanseniaspora uvarum* fueron las especies más abundantes. Notablemente, algunas especies estuvieron presentes en varias frutas, otras presentaron un rango de hospedero más específico, y algunas solamente se aislaron luego de varios meses de fermentación.



Conclusión: Nuestro trabajo evidencia la gran diversidad de levaduras presentes en las frutas tropicales, que motiva a estudiar con mayor profundidad su ecología, fisiología, y usos biotecnológicos potenciales.

Palabras clave: levaduras tropicales, biodiversidad, frutas tropicales, biotecnología.

INTRODUCCIÓN

Las levaduras constituyen un grupo diverso de hongos predominantemente unicelulares en su ciclo de vida, ampliamente distribuidos, y caracterizados por dividirse asexualmente por gemación o bipartición. Se caracterizan por su capacidad de fermentar azúcares en alcohol y dióxido de carbono, por lo que desde la antigüedad se han utilizado en la producción de una variedad de alimentos y bebidas, como cerveza, vino, pan y productos lácteos fermentados (Johnson & Echavarri-Erasun, 2011). Al ser organismos altamente versátiles, también se han utilizado en diversos procesos biotecnológicos con aplicaciones en áreas como salud, ambiente, energía e industria (Tullio, 2022).

Las levaduras pueden tener un modo de vida saprotrófico o pueden ser parásitos de plantas, animales, o incluso otros hongos. En los últimos años ha habido un creciente interés por investigar las levaduras, tanto para el descubrimiento de nuevas especies, así como para desarrollar nuevas aplicaciones (Boekhout et al., 2022; Geijer et al., 2022). Esto ha permitido obtener nuevas cepas de levaduras con capacidad de realizar diversos procesos de producción de forma más eficiente y con menores costos (Abdel-Banat et al., 2010; Pongcharoen et al., 2018).

Las levaduras también han jugado un papel importante como modelo de estudio en biología celular y la genética de células eucariotas, incluyendo el estudio de la regulación de genes, la división celular y el metabolismo celular (Botstein et al., 1997; Goffeau et al., 1996). En el campo de la evolución y la ecología, se han utilizado para estudiar, por ejemplo, el origen de la multicelularidad y la evolución de la reproducción sexual, así como asociaciones simbióticas con otros organismos y su papel en las cadenas

alimenticias de ecosistemas naturales (Starmer & Lachanc, 2011).

Desde un enfoque filogenético, las levaduras conforman un grupo heterogéneo. No representan una unidad taxonómica, sino un estilo de vida fúngico que ha surgido de forma independiente en varios linajes no relacionados (Barnett, 2004; Boekhout et al., 2022; Deák & Péter, 2013; Gouliamova et al., 2009). Por tradición, se han dividido en levaduras asociadas a *Saccharomyces*, conocidas por su utilización en las industrias de alimentos y bebidas (ej.; *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces pastorianus*) y levaduras no asociadas a *Saccharomyces*, las cuales son propias de ambientes naturales y participan en procesos como la descomposición de materia orgánica (ej.: *Candida*, *Pichia* y *Rhodotorula*) (Kurtzman et al., 2011).

Desde un punto de vista taxonómico formal, las levaduras del filo Ascomycota se clasifican principalmente dentro de la subdivisión Saccharomycotina y en las clases Schizosaccharomycetes, Pneumocystidomycetes, Eurotiomycetes, Dothideomycetes. Las levaduras del filo Basidiomycota se clasifican en las clases Cystobasidiomycetes, Microbotryomycetes, Tremellomycetes. Incluso, también se pueden encontrar hongos unicelulares en los filos Chytridiomycota y Rozellomycota (Kurtzman, 1994; Kurtzman & Piškur, 2006).

En general, la diversidad de levaduras y su amplia gama de propiedades las convierten en un importante grupo de microorganismos para estudiar y comprender. En particular, las frutas tropicales pueden constituir una rica fuente natural de levaduras, por su alto contenido de azúcares, y de donde muchas especies han sido aisladas y caracterizadas en términos de su taxonomía y fisiología (Amorim et al., 2018; Dasilva et al., 2005; Trindade et al., 2002). Algunas han mostrado propiedades únicas con

alto potencial de utilización en la industria de alimentos y bebidas.

En países tropicales como Costa Rica se han desarrollado muy pocos estudios sobre la diversidad de levaduras, de aquellas presentes en ambientes naturales y, en particular, de las que forman parte del microbioma de frutas tropicales (Lachance et al., 2001; Lachance & Bowles, 2004; Morais et al., 2004; Rojas-Jimenez et al., 2020). Esta situación representa una limitación y a la vez una oportunidad de generar novedoso conocimiento sobre este grupo de microorganismos, importantes desde un punto de vista ecológico y biotecnológico.

Este trabajo tiene como objetivo contribuir a la generación de conocimiento sobre la diversidad de levaduras en frutas tropicales comúnmente ingeridas por la población costarricense. Particularmente pretende determinar qué tan diversa es la comunidad de levaduras cultivables en las frutas, estudiar la distribución por rango de hospedero, es decir, la cantidad de levaduras generalistas (presentes en varias frutas) en relación a las especialistas (restringidas a hospederos particulares). Por otro lado, se pretende también determinar posibles interacciones que pueda haber entre ellas. Esta caracterización, hasta donde sabemos única para la región, además servirá para analizar su potencial aplicación biotecnológica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de frutas tropicales: Las frutas usadas en este proyecto se adquirieron en ferias del agricultor en el Gran Área Metropolitana, en el centro del país. En total, se utilizaron frutas de 26 especies, agrupadas en 14 familias de plantas. Se seleccionaron frutas lo más maduras posibles (un ejemplar por especie), tanto de especies nativas como introducidas (Tabla 1). Este proyecto contó con el respectivo permiso de la Comisión Institucional de Biodiversidad de la Universidad de Costa Rica (CBio-74-2023).

Fermentación: Del mesocarpio de cada fruta se tomaron aproximadamente 5 gramos

Tabla 1

Lista de las 26 especies de frutas tropicales utilizadas en este estudio. Se indica la familia taxonómica, el género, especie y el nombre común. / **Table 1.** List of the 26 species of tropical fruits used in this study. Taxonomic family, genus, species, and common name are provided.

Familia	Nombre científico	Nombre común
Anacardiaceae	<i>Spondias purpurea</i>	Jocote
	<i>Mangifera indica</i>	Mango
	<i>Anacardium occidentale</i>	Marañón
	<i>Spondias dulcis</i>	Yuplón
Annonaceae	<i>Annona muricata</i>	Guanábana
Bromeliaceae	<i>Ananas comosus</i>	Piña
Caricaceae	<i>Carica papaya</i>	Papaya
Fabaceae	<i>Tamarindus indica</i>	Tamarindo
Malpighiaceae	<i>Byrsonima crassifolia</i>	Nance
Myrtaceae	<i>Psidium</i>	Cas
	<i>friedrichsthalianum</i>	
	<i>Psidium guajava</i>	Guayaba
	<i>Psidium cattleianum</i>	Guayabita del Perú
	<i>Syzygium malaccense</i>	Manzana de Agua
Oxalidaceae	<i>Averrhoa carambola</i>	Carambola
	<i>Averrhoa bilimbi</i>	Mimbro
Passifloraceae	<i>Passiflora adenopoda</i>	Estococa
	<i>Passiflora ligularis</i>	Granadilla
	<i>Passiflora edulis</i>	Maracuyá
Rosaceae	<i>Fragaria chiloensis</i>	Fresa
	<i>Rubus ulmifolius</i>	Mora
	<i>Eriobotrya japonica</i>	Níspero
Rubiaceae	<i>Coffea arabica</i>	Café
Sapotaceae	<i>Chrysophyllum cainito</i>	Caimito
	<i>Pouteria sapota</i>	Zapote
Solanaceae	<i>Physalis peruviana</i>	Uchuva
Zingiberaceae	<i>Curcuma longa</i>	Cúrcuma

de tejido, el cual se maceró y posteriormente se colocó en un tubo Falcon de 50 mL con 30 mL de agua destilada autoclavada. El macerado de fruta se agitó vigorosamente y se dejó fermentar por 7 días. El frasco se revisó y agitó cada día durante el periodo de fermentación.

Aislamiento y Cultivo: Luego del periodo de fermentación se tomaron 100 µL de la parte líquida del fermento y se le agregaron 900 µL de PBS1X (autoclavado) para hacer disolución de 1/10 (dilución 10⁻¹). De esta solución, se



preparará una segunda dilución 1/10 (para quedar en 10^{-2}). Se tomaron 50 μL de las diluciones 10^{-1} y 10^{-2} y se esparcieron con asa de vidrio (previamente flameada) en placas Petri de medio PDA (Potato Dextrose Agar) con antibiótico (streptomycin 100 mg/ml + penicilina 100 mg/ml). Como control positivo se utilizó una levadura comercial de pan (*Saccharomyces cerevisiae*) y como control negativo la solución de PBS1X sobre la placa de medio. Adicionalmente, en el momento de generar los cultivos se mantuvieron placas con medio abiertas para detectar posibles contaminaciones del ambiente. Las placas se incubaron a 28°C y se revisaron diariamente hasta que aparecieran las levaduras. Alrededor de 5 colonias por fenotipo se sembraron por método de estriado en nuevas placas del mismo medio de cultivo descrito anteriormente. Una vez crecidas, una parte del aislamiento se preservó en -80°C en medio PDB (Potato Dextrose Broth) con glicerol al 20%. Por otro lado, se tomó 10 mg de células, se disolvieron en 300 μL de PBS1X y se almacenaron a -20°C para la posterior extracción de ADN.

Caracterización morfológica: Utilizando un asa microbiológica de 10 μL , se tomó la muestra de levadura previamente cultivada en un plato Petri, la cual se dispuso en un portaobjetos conteniendo una gota de agua. La muestra se distribuyó uniformemente en la gota para asegurar una dispersión adecuada de las células. Posteriormente, se cubrió con un cubreobjetos y se tomó un registro fotográfico inmediatamente después de montar la muestra. Las imágenes fueron capturadas utilizando el software de AmScope, junto con una cámara digital MU1803 de la misma marca. Esta cámara se acopló al microscopio de luz Olympus CH30, a través del cual se observaron las muestras, utilizando un objetivo de 40X, para la toma de las fotografías.

Caracterización molecular: El ADN genómico de las cepas de levaduras se aisló utilizando el kit DNEasy Power soil kit® de QIAGEN (Carlsbad, CA, Estados Unidos),

siguiendo las instrucciones del fabricante. Se amplificó el marcador molecular ITS a partir de los extractos de ADN total utilizando los primers ITS1 y ITS4 (White et al., 1990). Las reacciones se realizaron con el siguiente programa de temperatura: 98°C durante 2 min seguido de 32 ciclos de 96°C durante 30s, 52°C durante 30s y 72°C durante 30s y 10 min de extensión a 72°C . La amplificación de los productos se verificó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1,5% por 30 min a 90v y 200 mA. La secuenciación tipo Sanger se llevó a cabo en la empresa Macrogene (Corea del Sur). Las secuencias se ensamblaron y editaron usando el programa BioEdit (Hall, 1999). La asignación taxonómica se realizó mediante comparaciones de las secuencias con las bases de datos UNITE y NCBI. Una vez identificadas las cepas se procedió a generar un árbol filogenético. Para esto, las secuencias se alinearon utilizando la herramienta MAFFT v7. La calidad del alineamiento fue revisada con el servidor GUIDANCE2 (Penn et al., 2010). La plataforma ATGC bioinformatics (Guindon & Gascuel, 2003) con el criterio de información Akaike fue utilizada para la determinación del mejor modelo de evolución y GTR con distribución gamma y sitios invariables fue aplicado (GTR+G+I). Se generó un árbol filogenético de máxima verosimilitud utilizando el programa FastTree versión 2.1.9 (Price et al., 2010) El árbol filogenético resultante se visualizó y editó en MEGA7 (Kumar et al., 2018).

RESULTADOS

Los análisis de morfología permitieron determinar formas esféricas y cilíndricas entre los diferentes géneros de levadura. También diferentes colores, tamaños y cuerpos de inclusión (Fig. 1).

En total, se aislaron 118 levaduras de las 26 especies de frutas tropicales. Por medio de la identificación de la región ITS, las levaduras se agruparon en 7 familias, 11 géneros y 19 especies, donde *Hanseniaspora pseudoguilliermondii*, *Pichia kluyveri* y *Hanseniaspora uvarum* fueron particularmente las que presentaron el

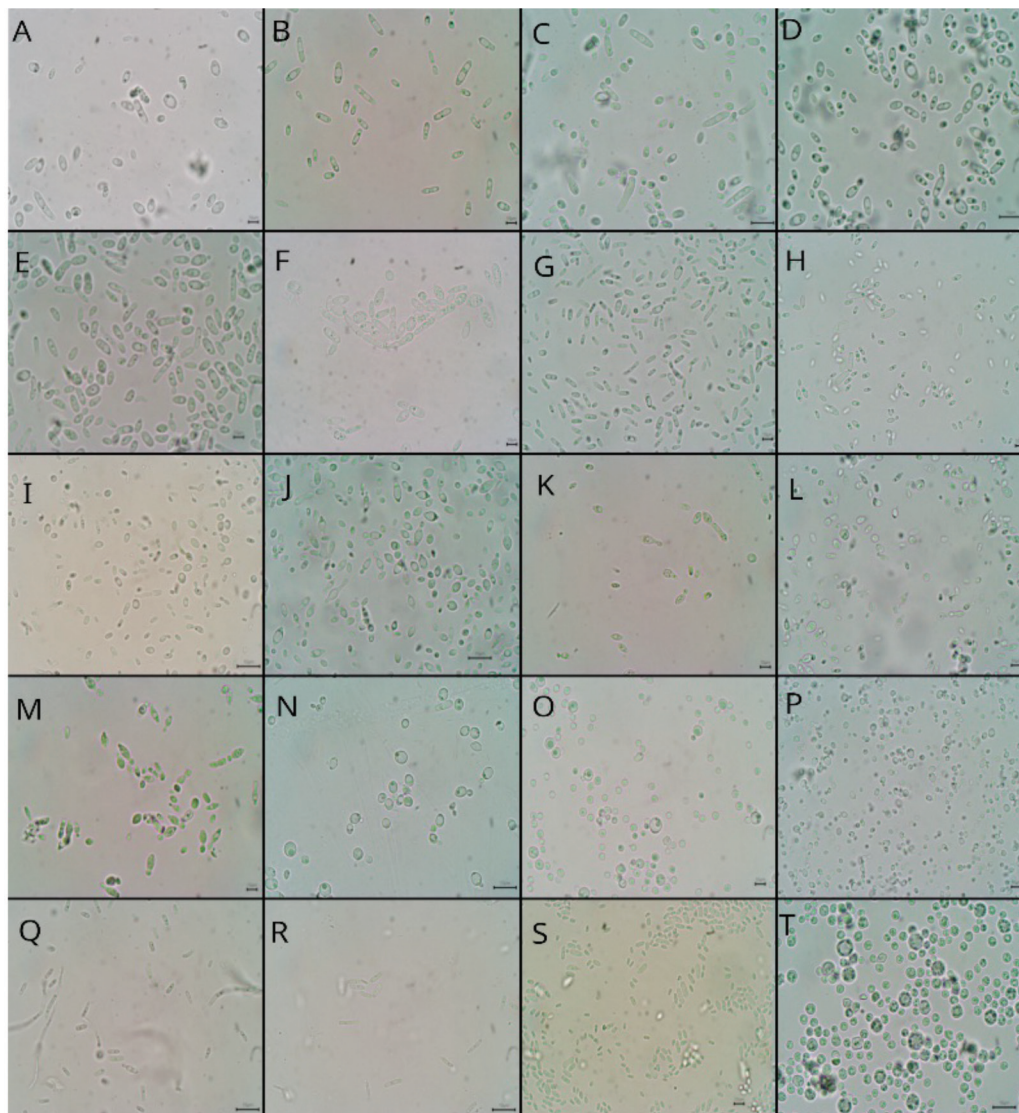


Fig. 1. Micrografías a 40x de las especies de levaduras aisladas de frutas tropicales. **A.** *Pichia kluyveri*, **B.** *Pichia occidentalis*, **C.** *Pichia kudriavzevii*, **D.** *Pichia terricola*, **E.** *Pichia membranifaciens*, **F.** *Pichia manshurica*, **G.** *Pichia californica*, **H.** *Saturnispora diversa*, **I.** *Starmeria stellimalicola*, **J.** *Hanseniaspora opuntiae*, **K.** *Hanseniaspora pseudoguilliermondii*, **L.** *Hanseniaspora uvarum*, **M.** *Hanseniaspora occidentalis*, **N.** *Wickerhamomyces anomalus*, **O.** *Debaryomyces hansenii*, **P.** *Candida chilensis*, **Q-R** *Candida boidinii*, **S.** *Zygoascus meyeriae*, **T.** *Kazachstania gamospora*. En la esquina inferior derecha de cada cuadrícula se encuentra una escala de 10 µm. / **Fig 1.** Micrographs at 40x of yeast species isolated from tropical fruits. **A.** *Pichia kluyveri*, **B.** *Pichia occidentalis*, **C.** *Pichia kudriavzevii*, **D.** *Pichia terricola*, **E.** *Pichia membranifaciens*, **F.** *Pichia manshurica*, **G.** *Pichia californica*, **H.** *Saturnispora diversa*, **I.** *Starmeria stellimalicola*, **J.** *Hanseniaspora opuntiae*, **K.** *Hanseniaspora pseudoguilliermondii*, **L.** *Hanseniaspora uvarum*, **M.** *Hanseniaspora occidentalis*, **N.** *Wickerhamomyces anomalus*, **O.** *Debaryomyces hansenii*, **P.** *Candida chilensis*, **Q-R** *Candida boidinii*, **S.** *Zygoascus meyeriae*, **T.** *Kazachstania gamospora*. A 10 µm scale is located in the lower right corner of each grid.



Tabla 2

Distribución del número de aislamientos de levaduras obtenidos de frutas tropicales, identificados taxonómicamente a nivel de familia, género y especie. / **Table 2.** Distribution of the number of yeast isolates obtained from tropical fruits, taxonomically identified to family, genus and species level.

Familia	Genero	Especie	Nr.
Debaryomycetaceae	<i>Debaryomyces</i>	<i>Debaryomyces hansenii</i>	4
Phaffomycetaceae	<i>Starmera</i>	<i>Starmera stellimalicola</i>	1
	<i>Wickerhamomyces</i>	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	2
Pichiaceae	<i>Candida</i>	<i>Candida boidinii</i>	3
	<i>Pichia</i>	<i>Pichia californica</i>	5
		<i>Pichia kluyveri</i>	14
		<i>Pichia kudriavzevii</i>	4
		<i>Pichia manshurica</i>	7
		<i>Pichia membranifaciens</i>	6
		<i>Pichia terricola</i>	4
		<i>Pichia occidentalis</i>	2
	<i>Saturnispora</i>	<i>Saturnispora diversa</i>	7
Saccharomycetaceae	<i>Kazachstania</i>	<i>Kazachstania gamospora</i>	4
Saccharomycodaceae	<i>Hanseniaspora</i>	<i>Hanseniaspora occidentalis</i>	3
		<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	9
		<i>Hanseniaspora pseudoguilliermondii</i>	24
		<i>Hanseniaspora uvarum</i>	14
Trichomonascaceae	<i>Zygoascus</i>	<i>Zygoascus meyeriae</i>	3
CUG-Ser1 clade	<i>Candida</i>	<i>Candida chilensis</i>	1

mayor número de aislamientos (Tabla 2). Todas las secuencias de nucleótidos obtenidas en este trabajo se depositaron en la base de datos Gen-Bank del NCBI (Tabla S1).

Al analizar el rango de hospedero de las levaduras, se notó que *Hanseniaspora pseudo-guilliermondii* y *Hanseniaspora uvarum* fueron las más generalistas, presentes en 9 y 8 especies de frutas, respectivamente. De la misma manera, *Pichia kluyveri* se encontró en 5 especies de frutas. Por otro lado, hubo nueve especies de levaduras con un rango de distribución más específico, encontrándose solamente en una especie de fruta (Fig. 2).

En la mayoría de especies de frutas estudiadas (60%) los aislamientos de levaduras pertenecieron a una única especie fúngica. Sin embargo, hubo algunas especies de frutas donde fue posible aislar varias especies de levaduras, como en jocote (*Spondias purpurea*) y en cas (*Psidium friedrichsthalianum*) con cuatro especies (Fig. 3). También fue

posible identificar especies adicionales luego de 8 meses de fermentación. En esta etapa de añejamiento algunas de las especies identificadas en varias frutas fueron *Pichia manshurica* y *Saturnispora diversa*.

El análisis de las relaciones filogenéticas entre los aislamientos, determinada con el marcador ITS, nos permitió evidenciar que las frutas tropicales constituyen una fuente de una gran variedad de levaduras. En general, se observó que la mayoría de géneros de levaduras solamente tenía una especie asociada, sin embargo, en *Pichia* y *Hanseniaspora* se observaron siete y cuatro especies asociadas, respectivamente (Fig. 4).

DISCUSION

En este estudio, se aislaron e identificaron por medio de la secuenciación de la región ITS, 118 cepas de levaduras pertenecientes a 19 especies, distribuidas en 9 géneros y 6 familias,

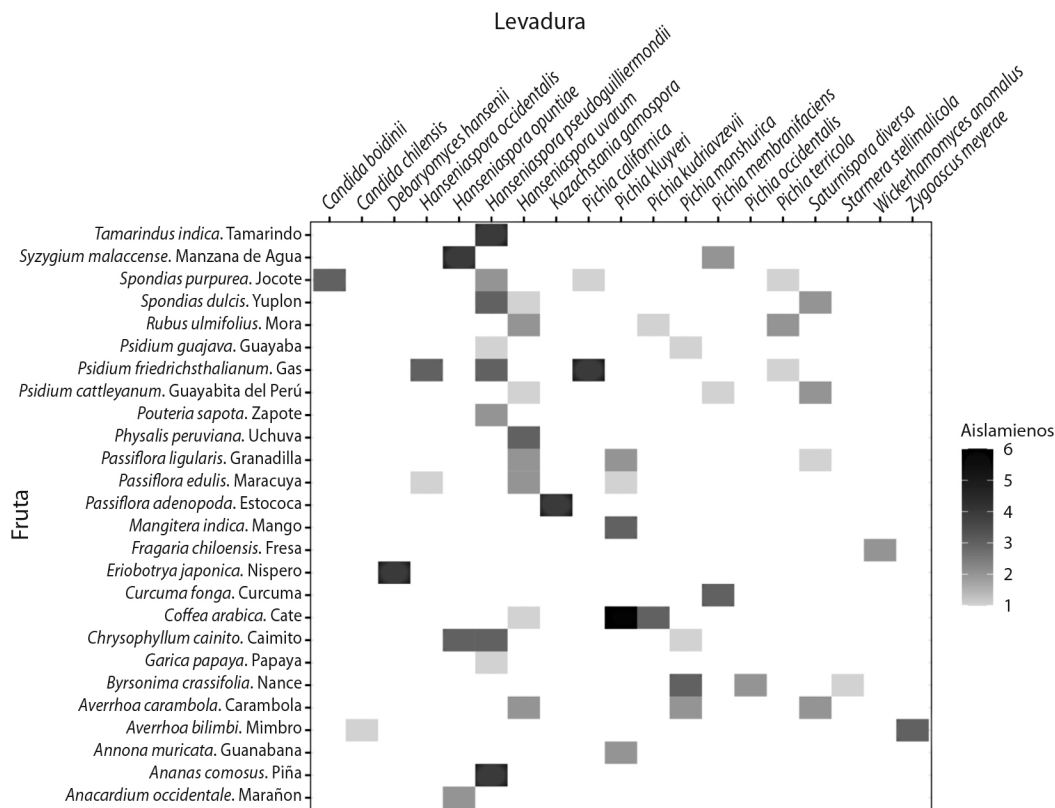


Fig. 2. Mapa de calor de la distribución de los aislamientos de levaduras obtenidos por especie de fruta. / **Fig 2.** Heat map of the distribution of yeast isolates obtained by fruit species.

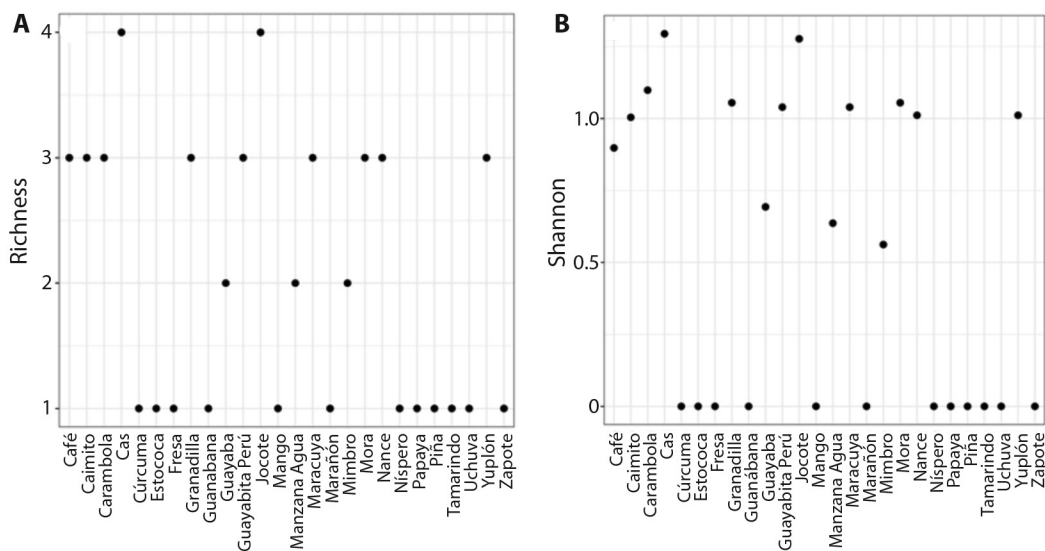


Fig. 3. A. Diversidad alfa de las comunidades de levaduras presentes en frutas tropicales de Costa Rica, **B.** Valores del índice de Shannon. / **Fig. 3. A.** Alpha diversity of yeast communities present in tropical fruits from Costa Rica, **B.** Values of the Shannon Index.

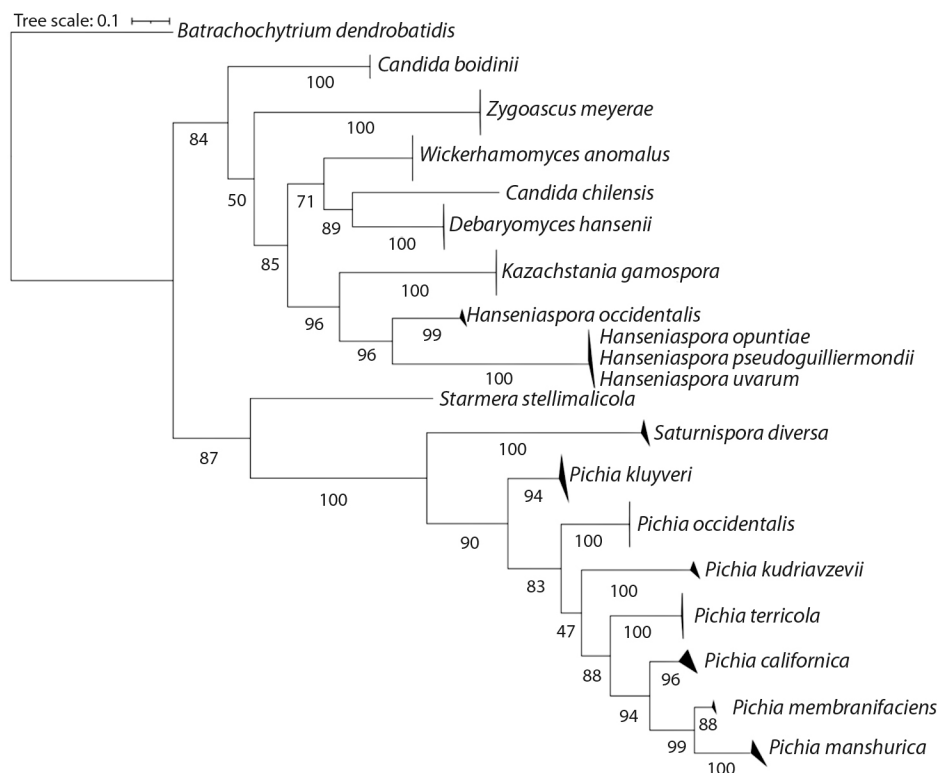


Fig. 4. Relaciones filogenéticas de los 118 aislamientos de levaduras obtenidos de 26 frutas tropicales. El árbol de máxima verosimilitud se basó en secuencias del marcador ITS utilizando un modelo GTR. Los valores de Bootstrap se muestran en los nodos. / **Fig.4** Phylogenetic relationships of 118 yeast isolates obtained from 26 tropical fruits. The maximum likelihood tree was based on ITS marker sequences using a GTR model. Bootstrap values are shown at the nodes.

a partir de 26 especies de frutas tropicales. Las 19 especies de levaduras identificadas corresponden al filo Ascomycota, lo que coincide con estudios previos que destacan la predominancia de este grupo en frutas (Sperandio et al., 2023; Trindade et al., 2002; Vale et al., 2021). Esta predominancia se ha asociado con la mayor eficiencia de las levaduras del filo Ascomycota en el metabolismo de carbohidratos simples, como glucosa y fructosa, que se encuentran en abundancia en los tejidos de las frutas, en contraste con las levaduras del filo Basidiomycota, que presentan una mayor adaptación para degradar fuentes de carbono más complejas (Ganter et al., 2017).

La alta presencia de levaduras de los géneros *Hanseniaspora* y *Pichia* coincide con estudios previos que las identifican como grupos

comunes en frutas maduras (Lorenzini et al., 2018; Ramírez-Castrillón, 2019; Trindade et al., 2002; Vale et al., 2021). Además, especies de los géneros *Candida*, *Debaryomyces* y *Wickerhamomyces* también han sido frecuentemente reportadas en estos ambientes (Vadkertiová et al., 2012; Vale et al., 2021; Sperandio et al., 2023; Rao et al., 2008; Trindade et al., 2002). En contraste, los géneros *Zygoascus*, *Kazachstania*, *Saturnispora* y *Starmera* presentan pocos o nulos reportes, según la información disponible.

Las levaduras del género *Hanseniaspora* han sido vinculadas con diversas aplicaciones biotecnológicas (Van Wyk et al., 2024). Por ejemplo, *H. opuntiae* ha demostrado mejorar el perfil aromático de la cerveza (Bourbon-Melo et al., 2021) y ser eficaz en el control biológico de *Aspergillus ochraceus*, un hongo que afecta

Tabla 3

Usos potenciales de los principales géneros de levaduras identificados en este estudio. / **Table 3.** Potential uses of the main yeast genera identified in this study.

Género levadura	Usos potenciales	Referencias
<i>Debaryomyces</i>	- Probiótico intestinal en humanos, control biológico de hongos en cultivos agrícolas, antagonista fúngico, mejorador de contenido de nutrientes en forrajes. - Producción de proteína para acuicultura. Fermentación de productos alimentarios por su capacidad halotolerante. - Producción de biocombustibles, aplicaciones biomédicas, en biorremediación de suelos salinos promoviendo e reciclaje de nutrientes y biocatálisis.	(Bedolla-Torres et al., 2015; Caruffo et al., 2015; Ramos et al., 2017)
<i>Hanseniaspora</i>	- Mejoras aromáticas y en sabor para fermentaciones primarias en cerveza y vino. Control biológico de plagas, potencial de biotransformación de compuestos. - Reducción el olor a pescado y el amargor de los hidrolizados de proteínas de pescado. - Producción de proteasas usadas en industria láctea, cárnica y de panificación. - Bioconservante por su actividad inhibitoria de <i>Aspergillus</i>.	(Bourbon-Melo et al., 2021; Liu et al., 2022; López et al., 2014; Tejero et al., 2021)
<i>Kazachstania</i>	- Usos en fermentación de bebidas alcohólicas. - Aplicaciones dermatológicas al reducir los síntomas de la dermatitis atópica. - Biorefinería. - Potenciales en panificación, probiótico intestinal en humanos. Modula respuesta inmune y microbiota intestinal. - Fuente de proteína en alimentación animal.	(Nisiotou and Nychas, 2008; Kim et al., 2019; Balarezo-Cisneros et al., 2023; Urubschurov et al., 2018)
<i>Candida</i>	- Purificación de xilitol a partir del proceso de fermentación del hidrolizado de bagazo de caña de azúcar. - Producción de biosurfactantes. - Producción ácido cítrico, etanol, xilitol, eritritol.	(Cardoso & Forte, 2021; Pinto et al., 2022; Kieliszek et al., 2017)
<i>Pichia</i>	- Mejoras aromáticas y en sabor para fermentaciones primarias en vinos, cervezas, pan, agente bioprotector en la vinificación. Aplicaciones en conservación de jugos naturales, bio-fábrica de compuestos medicinales y biotecnológicos. Producción de biocombustible. - Probiótico en industria médica al ser tolerante al ácido estomacal y la bilis. - Biocontrol de patógenos. - Bioremediación. Mejora de la capacidad de degradación de fitatos y colorantes. - Como base industrial para la producción de ácidos orgánicos.	(Fai et al., 2014; Ganapathiwar & Bhukya, 2023; Englezos et al., 2022; Isia et al., 2019; Qvirist et al., 2016)
<i>Starmera</i>	- Grupo con fisiología y bioquímica diversa. - Presenta especies homotéticas y heterotéticas. Pueden tener fermentación de glucosa o asimilación de nitrato.	(Kurtzman, 2011a)
<i>Saturnispora</i>	- Género asociado a suelos en vida libre, así como a plantas e insectos como simbioses. - Aplicaciones biotecnológicas potenciales debido a su reproducción asexual y a sus estructuras celulares particulares.	(Kurtzman, 2011b)
<i>Wickerhamomyces</i>	- Mejora aromática y fermentación bebidas alcohólicas y destilados, usos en panificación, controlador de plagas en cultivos agrícolas y protección contra infecciones vegetales mediante metabolitos. - Producción de enzimas de importancia biotecnológica como Xilanasas, glucosidasa, lipasa, esterasa, proteasa y pectinasa.	(Druvefors et al., 2005; Sabel et al., 2014; Madrigal et al., 2013)
<i>Zygoascus</i>	- Contiene poligalacturonasa que tiene aplicaciones en la clarificación de zumos de frutas. - Su lipasa es un biocatalizador clave en las industrias de detergentes, alimentaria y farmacéutica. - Procesamiento de alimentos por su resistencia a la inactivación a alta presión. - Fertilizante al inducir fitoalexinas glicerolinas y aumentar la actividad de peroxidasa, polifenoloxidasas y fenilalanina amonio-liasa en cotiledones.	(Lu et al., 2016; Elyasi-Far et al., 2023; Reyns et al., 2000; Lorenzetti et al., 2020)



los frutos del café (Gimenes et al., 2023). Por su parte, *H. uvarum* presenta actividad β -D-xilosidasa, una enzima clave en la liberación de compuestos aromáticos (Manzanares et al., 1999) y en la degradación de xilano, principal componente hemicelulósico de las paredes celulares vegetales y el segundo polisacárido natural más abundante después de la celulosa (Basit et al., 2019). Además, *H. uvarum* ha sido asociada con la desnitrificación, lo que la convierte en una posible candidata para la eliminación de nitrógeno en sistemas de tratamiento de aguas residuales (Zhang et al., 2018). En cuanto a *H. pseudoguilliermondii*, la especie más frecuentemente aislada en este estudio, se ha reportado su utilidad en la mejora del sabor y el olor de hidrolizados de pescado (Liu et al., 2022). Aunque existen pocos estudios adicionales sobre las propiedades y aplicaciones de esta especie, su alta prevalencia y el potencial biotecnológico demostrado en otras especies del género sugieren que podría ser de interés para futuras investigaciones.

Pichia fue el género con el mayor número de especies aisladas en este estudio, siendo *Pichia kluyveri* la más abundante. Actualmente, esta especie se emplea principalmente en la fermentación de vino, pero también ha demostrado ser eficaz en la fermentación de cerveza, sidra, durián y tequila (Vicente et al., 2021). Recientemente, otras especies del género *Pichia* han sido investigadas por su potencial en la industria del vino (Vicente et al., 2021; Zhao et al., 2022), así como en la biosíntesis de bio-productos de interés industrial (Shrivastava & Sharma, 2023). En la Tabla 3 se resumen los posibles usos biotecnológicos adicionales de los géneros de levaduras aislados en este trabajo, destacando aplicaciones en el desarrollo de probióticos, mejora de aromas en fermentaciones, producción de compuestos medicinales y biocontrol. No obstante, para algunas de estas especies, la información disponible es limitada y sus posibles aplicaciones aún requieren evaluación.

Por otra parte, especies como *Pichia manshurica* y *Saturnispora diversa*, fueron identificadas en etapas avanzadas de la fermentación,

lo que indica una dinámica cambiante en la comunidad de levaduras a lo largo del tiempo. Este fenómeno es común en fermentaciones naturales, donde inicialmente predominan especies adaptadas a azúcares simples, mientras que, con el avance del proceso, emergen aquellas capaces de metabolizar compuestos más complejos generados durante la fermentación (Xie et al., 2013). Además, factores como la temperatura y la humedad podrían influir en la composición de estas comunidades, por lo que será necesario un análisis más detallado en futuras investigaciones.

Este trabajo representa, según nuestro conocimiento, el primer estudio enfocado en la descripción de la diversidad de levaduras asociadas a frutas tropicales en el país. Los resultados obtenidos evidencian la variabilidad en las comunidades de levaduras, algunas frutas albergan especies dominantes, mientras que otras presentan una alta diversidad. Esta variabilidad subraya la importancia de investigar las comunidades microbianas presentes en estos entornos. Además, la identificación de levaduras con potenciales aplicaciones biotecnológicas destaca la necesidad de llevar a cabo estudios más detallados, aumentando el número de muestras analizadas por especie y la caracterización de perfiles enzimáticos, que permitan explorar y aprovechar el potencial biotecnológico de las cepas aisladas de estas frutas.

Ethical statement: The authors declare that they all agree with this publication and made significant contributions; that there is no conflict of interest of any kind; and that we followed all pertinent ethical and legal procedures and requirements. All financial sources are fully and clearly stated in the acknowledgments section. A signed document has been filed in the journal archives.

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto fue apoyado por la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de

Costa Rica (proyecto C3282). Se agradece la colaboración de Gabriel Ramírez-Torres.

REFERENCIAS

- Abdel-Banat, B. M., Hoshida, H., Ano, A., Nonklang, S., & Akada, R. (2010). High-temperature fermentation: how can processes for ethanol production at high temperatures become superior to the traditional process using mesophilic yeast?. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85, 861–867.
- Amorim, J. C., Piccoli, R. H., & Duarte, W. F. (2018). Probiotic potential of yeasts isolated from pineapple and their use in the elaboration of potentially functional fermented beverages. *Food Research International*, 107, 518–527.
- Balarezo-Cisneros, L. N., Timouma, S., Hanak, A., Currin, A., Valle, F., & Delneri, D. (2023). High quality de novo genome assembly of the non-conventional yeast *Kazachstania bulderi* describes a potential low pH production host for biorefineries. *Communications Biology*, 6(1), 918.
- Barnett, J. A. (2004). A history of research on yeasts 8: taxonomy. *Yeast*, 21(14), 1141–1193.
- Basit, A., Miao, T., Liu, J., Wen, J., Song, L., Zheng, F., Lou, H., & Jiang, W. (2019). Highly efficient degradation of xylan into xylose by a single enzyme. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 7(13), 11360–11368.
- Bedolla-Torres, M. H., Palacios-Espinosa, A., Palacios, O. A., Choix, F. J., Ascencio-Valle, F., López-Aguilar, D. R., Espinoza-Villavicencio, J. L., de Luna de la Peña, R., Guillen-Trujillo, A., Avila-Serrano, N. Y., & Ortega-Pérez, R. (2015). La irrigación con levaduras incrementa el contenido nutricional del forraje verde hidropónico de maíz. *Revista Argentina de Microbiología*, 47(3), 236–244.
- Boekhout, T., Amend, A. S., El Baidouri, F., Gabaldón, T., Geml, J., Mittelbach, M., Robert, V., Tan, C. S., Turchetti, B., Vu, D., Wang, Q. M., & Yurkov, A. (2022). Trends in Yeast Diversity Discovery. *Fungal Diversity*, 114(1), 491–537.
- Botstein, D., Chervitz, S. A., & Cherry, M. (1997). Yeast as a Model Organism. *Science*, 277(5330), 1259–1260.
- Bourbon-Melo, N., Palma, M., Rocha, M. P., Ferreira, A., Bronze, M. R., Elias, H., & Sá-Correia, I. (2021). Use of *Hanseniaspora guilliermondii* and *Hanseniaspora opuntiae* to enhance the aromatic profile of beer in mixed-culture fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food microbiology*, 95, 103678.
- Caruffo, M., Navarrete, N., Salgado, O., Díaz, A., López, P., García, K., Feijóo, C. G., & Navarrete, P. (2015). Potential probiotic yeasts isolated from the fish gut protect zebrafish (*Danio rerio*) from a *Vibrio anguillarum* challenge. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1093.
- Cardoso, B. S., & Forte, M. B. S. (2021). Purification of biotechnological xylitol from *Candida tropicalis* fermentation using activated carbon in fixed-bed adsorption columns with continuous feed. *Food and Bioproducts Processing*, 126, 73–80.
- Dasilva, E., Borges, M., Medina, C., Piccoli, R., & Schwan, R. (2005). Pectinolytic enzymes secreted by yeasts from tropical fruits. *FEMS Yeast Research*, 5(9), 859–865.
- Deák, T. & Péter, G. (2013). Developments in yeast taxonomy. *Acta Alimentaria*, 42(1), 55–68.
- Druvefors, U. A., Passoth, V., & Schnürer, J. (2005). Nutrient Effects on Biocontrol of *Penicillium roqueforti* by *Pichia anomala* J121 during Airtight Storage of Wheat. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(4), 1865–1869.
- Elyasi-Far, B., Sajadi, F., Nazemiyeh, H., Mehdizadeh Aghdam, E., & Dilmaghani, A. (2023). Study of Hydrolytic Enzymes Activity and Stability of the Isolated Yeast Close to *Zygoascus hellenicus*. *Current Biotechnology*, 12(2), 118–123.
- Englezos, V., Di Gianvito, P., Peyer, L., Giacosa, S., Río Segade, S., Edwards, N., Rolle, L., Rantsiou, K., & Cocolin, L. (2022). Bioprotective effect of *Pichia kluyveri* and *Lactiplantibacillus plantarum* in winemaking conditions. *American Journal of Enology and Viticulture*, 73(4), 294–307.
- Fai, A. E. C., da Silva, J. B., de Andrade, C. J., Bution, M. L., & Pastore, G. M. (2014). Production of prebiotic galactooligosaccharides from lactose by *Pseudozyma tsukubaensis* and *Pichia kluyveri*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3(4), 343–350.
- Ganapathiwar, S., & Bhukya, B. (2023). In vitro assessment for the probiotic potential of *Pichia kudriavzevii*. *Bioinformation*, 19(4), 441.
- Ganter, P. F., Morais, P. B., & Rosa, C. A. (2017). Yeasts in Cacti and Tropical Fruit. In P. Buzzini, M. A. Lachane, & A. Yurkov (Eds.), *Yeasts in natural ecosystems: diversity* (pp. 331–365). Springer International Publishing.
- Geijer, C., Ledesma-Amaro, R., & Tomás-Pejó, E. (2022). Unraveling the potential of non-conventional yeasts in biotechnology. *FEMS Yeast Research*, 22(1), foab071.
- Gimenes, D. C., Ono, M. A., de Souza Suguiura, I. M., Macagnan, R., Sartori, D., Pelegrinelli-Fungaro, M. H., Furlaneto, M. C., & Sataque-Ono, E. Y. (2023). *Aspergillus ochraceus* biocontrol by *Hanseniaspora opuntiae* in vitro and on coffee fruits. *Food Research International*, 173, 113388.
- Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J. D., Jacq, C.,



- Johnston, M., Louis, E. J., Mewes, H. W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., & Oliver, S. G. (1996). Life with 6000 Genes. *Science*, 274(5287), 546–567.
- Gouliamova, D., Dimitrov, R., Petrova, P., Stoyancheva, G., & Petrov, K. (2009). Genomic Approaches to Yeast Taxonomy. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 23, 519–523.
- Guindon, S., & Gascuel, O. (2003). A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic biology*, 52(5), 696–704.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41(41), 95–98.
- Isia, I., Hadibarata, T., Sari, A. A., Al Farraj, D. A., Elshikh, M. S., & Al Khulaifi, M. M. (2019). Potential use of a pathogenic yeast *Pichia kluyveri* FM012 for degradation of dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT). *Water, Air, & Soil Pollution*, 230, 1–11.
- Johnson, E. A., & Echavarri-Erasun, C. (2011). Yeast biotechnology. In C. P. Kurtzman, J. W. Fell, T. Boekhout (Eds.), *The Yeasts* (pp. 21–44). Elsevier.
- Kieliszek, M., Kot, A. M., Bzducha-Wróbel, A., Błażej, S., Gientka, I., & Kurcz, A. (2017). Biotechnological use of *Candida* yeasts in the food industry: A review. *Fungal Biology Reviews*, 31(4), 185–198.
- Kim, J. H., Kim, K., Kanjanasuntree, R., & Kim, W. (2019). *Kazachstania turicensis* CAU Y1706 ameliorates atopic dermatitis by regulation of the gut-skin axis. *Journal of Dairy Science*, 102(4), 2854–2862.
- Kumar, S., Stecher, G. Li. M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547–1549.
- Kurtzman, C. P. (1994). Molecular taxonomy of the yeasts. *Yeast*, 10 (13), 1727–1740.
- Kurtzman, C. P. (2011a). *Starmeria* Y. Yamada, Higashi, Ando & Mikata (1997). In C. P. Kurtzman, J. W. Fell, T. Boekhout (Eds.), *The Yeasts* (pp. 805–810). Elsevier.
- Kurtzman, C. P. (2011b). *Saturnispora* Liu & Kurtzman (1991). In C. P. Kurtzman, J. W. Fell, T. Boekhout (Eds.), *The Yeasts* (pp. 387–390). Elsevier.
- Kurtzman, C. P. & Piškur, J. (2006). Taxonomy and phylogenetic diversity among the yeasts Comparative. In P. Sunnerhagen & J. Piškur (Eds.), *Genomics: Using Fungi as Models* (pp. 29–46). Springer.
- Kurtzman, C. P., Fell, J. W., & Boekhout, T. (2011). Definition, Classification and Nomenclature of the Yeasts. In C. P. Kurtzman, J. W. Fell, T. Boekhout (Eds.), *The Yeasts* (pp. 3–5). Elsevier.
- Lachance, M. A., & Bowles, J. M. (2004). *Metschnikowia similis* sp. nov. and *Metschnikowia colocasiae* sp. nov., two ascomycetous yeasts isolated from *Conotelus* spp. (Coleoptera: Nitidulidae) in Costa Rica. *Studies in Mycology*, 50, 69–76.
- Lachance, M. A., Klemens, J. A., Bowles, J. M., & Janzen, D. H. (2001). The yeast community of sap fluxes of Costa Rican *Maclura* (Chlorophora) *tinctoria* and description of two new yeast species, *Candida galis* and *Candida ortonii*. *FEMS Yeast Research*, 1(2), 87–92.
- Liu, S., Zhang, Q., Xiang, Q., Duan, L., Pei, Z., & Li, Y. (2022). *Hanseniaspora pseudoguilliermondii* improves the flavor of tilapia fish protein hydrolysates. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 31(4), 297–310.
- López, S., Mateo, J. J., & Maicas, S. (2014). Characterisation of *Hanseniaspora* isolates with potential aroma-enhancing properties in Muscat wines. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 35(2), 292–303.
- Lorenzetti, E., Carvalho, J. C., Alves Neto, A. J., Hendges, C., Kohler, T. R., da Mata, T. C., Alves da Silva, J. C., Costa Brito, O. D., Faria, V. de O., Feroldi, L. T., Hoepers, L. M. L., & Kuhn, O. J. (2020). Induction of Phytoalexins Gliceoline and Proteins Related to Defense in Soybean Cotyledon Treated With Yeast. *Journal of Agricultural Science*, 12(12), 156–162.
- Lorenzini, M., Simonato, B., & Zapparoli, G. (2018). Yeast species diversity in apple juice for cider production evidenced by culture-based methods. *Folia microbiologica*, 63, 677–684.
- Lu, X., Lin, J., Wang, C., Du, X., & Cai, J. (2016). Purification and characterization of exo-polygalacturonase from *Zygoascus hellenicus* V25 and its potential application in fruit juice clarification. *Food science and biotechnology*, 25, 1379–1385.
- Madrigal, T., Maicas, S., & Tolosa, J. J. M. (2013). Glucose and ethanol tolerant enzymes produced by *Pichia* (Wickerhamomyces) isolates from enological ecosystems. *American journal of enology and viticulture*, 64(1), 126–133.
- Manzanares, P., Ramón, D., & Querol, A. (1999). Screening of non-Saccharomyces wine yeasts for the production of β -D-xylosidase activity. *International journal of food microbiology*, 46(2), 105112.
- Morais, P., Teixeira, L., Bowles, J., Lachance, M., & Rosa, C. (2004). *Ogataea falcaomoraisii* sp. nov., a sporogenous methylotrophic yeast from tree exudates. *FEMS Yeast Research*, 5(1), 81–85.
- Nisiotou, A. A., & Nychas, G. J. E. (2008). *Kazachstania hellenica* sp. nov., a novel ascomycetous yeast from a Botrytis-affected grape must fermentation. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(5), 1263–1267.

- Penn, O., Privman, E., Ashkenazy, H., Landan, G., Graur, D., & Pupko, T. (2010). GUIDANCE: a web server for assessing alignment confidence scores. *Nucleic acids research*, 38, W23–W28.
- Pinto, M. I. S., Campos Guerra, J. M., Meira, H. M., Sarubbo, L. A., & de Luna, J. M. (2022). A biosurfactant from *Candida bombicola*: its synthesis, characterization, and its application as a food emulsions. *Foods*, 11(4), 561.
- Pongcharoen, P., Chawneua, J., & Tawong, W. (2018). High temperature alcoholic fermentation by new thermotolerant yeast strains *Pichia kudriavzevii* isolated from sugarcane field soil. *Agriculture and Natural Resources*, 52(6), 511–518.
- Price, M. N., Dehal, P. S., & Arkin, A. P. (2010). FastTree 2—approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS One*, 5(3), e9490.
- Qvirist, L., Vorontsov, E., Veide Vilg, J., & Andlid, T. (2017). Strain improvement of *Pichia kudriavzevii* TY13 for raised phytase production and reduced phosphate repression. *Microbial biotechnology*, 10(2), 341–353.
- Ramírez-Castrillón, M., Usman, L. M., Silva-Bedoya, L. M., & Osorio-Cadavid, E. (2019). Dominant yeasts associated to mango (*Mangifera indica*) and rose apple (*Syzygium malaccense*) fruit pulps investigated by culture-based methods. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 91(04), e20190052.
- Ramos, J., Melero, Y., Ramos-Moreno, L., Michán, C., & Cabezas, L. (2017). *Debaryomyces hansenii* strains from valle de los pedroches iberian dry meat products: Isolation, identification, characterization, and selection for starter cultures. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(9), 1576–1585.
- Rao, R. S., Bhadra, B., & Shivaji, S. (2008). Isolation and characterization of ethanol-producing yeasts from fruits and tree barks. *Letters in Applied Microbiology*, 47(1), 19–24.
- Reyns, K. M., Soontjens, C. C., Cornelis, K., Weemaes, C. A., Hendrickx, M. E., & Michiels, C. W. (2000). Kinetic analysis and modelling of combined high-pressure-temperature inactivation of the yeast *Zygosaccharomyces bailii*. *International Journal of Food Microbiology*, 56(2–3), 199–210.
- Rojas-Jimenez, K., Grossart, H. P., Cordes, E., & Cortés, J. (2020). Fungal communities in sediments along a depth gradient in the Eastern Tropical Pacific. *Frontiers in microbiology*, 11, 575207.
- Sabel, A., Martens, S., Petri, A., König, H., & Claus, H. (2014). *Wickerhamomyces anomalus* AS1: a new strain with potential to improve wine aroma. *Annals of Microbiology*, 64, 483–491.
- Shrivastava, A., Pal, M., & Sharma, R. K. (2023). *Pichia* as yeast cell factory for production of industrially important bio-products: Current trends, challenges, and future prospects. *Journal of Bioresources and Bio-products*, 8(2), 108–124.
- Sperandio, E. M., Reis, J. B. A. D., Coelho, L. G. F., & Vale, H. M. M. D. (2023). Occurrence and diversity of yeast associated with fruits and leaves of two native plants from Brazilian neotropical savanna. *Diversity*, 15(9), 1010.
- Starmer, W. T., & Lachance, M. A. (2011). Yeast Ecology. In C. P. Kurtzman, J. W. Fell, T. Boekhout (Eds.), *The Yeasts* (pp. 65–83). Elsevier.
- Tejero, P., Martín, A., Rodríguez, A., Galván, A. I., Ruiz-Moyano, S., & Hernández, A. (2021). In vitro biological control of *Aspergillus flavus* by *Hanseniaspora opuntiae* L479 and *Hanseniaspora uvarum* L793, producers of antifungal volatile organic compounds. *Toxins*, 13(9), 663.
- Trindade, R. C., Resende, M. A., Silva, C. M., & Rosa, C. A. (2002). Yeasts Associated with Fresh and Frozen Pulps of Brazilian Tropical Fruits. *Systematic and Applied Microbiology*, 25(2), 294–300.
- Tullio, V. (2022). Yeast genomics and its applications in biotechnological processes: what is our present and near future? *Journal of Fungi*, 8(7), 752.
- Urubschurov, V., Büsing, K., Souffrant, W. B., Schauer, N., & Zeyner, A. (2018). Porcine intestinal yeast species, *Kazachstania slooffiae*, a new potential protein source with favourable amino acid composition for animals. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 102(2), e892-e901.
- Vadkertiová, R., Molnárová, J., Vránová, D., & Sláviková, E. (2012). Yeasts and yeast-like organisms associated with fruits and blossoms of different fruit trees. *Canadian Journal of Microbiology*, 58(12), 1344–1352.
- Vale, H. M. M. D., Reis, J. B. A. D., Oliveira, M. D., Moreira, G. A. M., & Bomfim, C. A. (2021). Yeasts in native fruits from Brazilian neotropical savannah: occurrence, diversity and enzymatic potential. *Biota Neotropica*, 21(4), e20201184.
- Van Wyk, N., Badura, J., von Wallbrunn, C., & Pretorius, I. S. (2024). Exploring future applications of the apiculate yeast *Hanseniaspora*. *Critical Reviews in Biotechnology*, 44(1), 100–119.
- Vicente, J., Calderón, F., Santos, A., Marquina, D., & Benito, S. (2021). High potential of *Pichia kluyveri* and other *Pichia* species in wine technology. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3), 1196.



- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, & T. J. White (Eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (pp. 315–322). Academic Press, Inc.
- Xie, G., Wang, L., Gao, Q., Yu, W., Hong, X., Zhao, L., & Zou, H. (2013). Microbial community structure in fermentation process of Shaoxing rice wine by Illumina-based metagenomic sequencing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(12), 3121–3125.
- Zhang, H., Zhao, Z., Kang, P., Wang, Y., Feng, J., Jia, J., & Zhang, Z. (2018). Biological nitrogen removal and metabolic characteristics of a novel aerobic denitrifying fungus *Hanseniaspora uvarum* strain KPL108. *Bioresource technology*, 267, 569–577.
- Zhao, H., Li, Y., Liu, L., Zheng, M., Feng, Z., Hu, K., & Tao, Y. (2022). Effects of inoculation timing and mixed fermentation with *Pichia fermentans* on *Oenococcus oeni* viability, fermentation duration and aroma production during wine malolactic fermentation. *Food Research International*, 159, 111604.