

Artículo original

Evaluación de dos métodos de conservación para *Kluyveromyces marxianus* CCEBI 2011 en la Colección de Cultivos del CEBI

Miladis Isabel Camacho Pozo*, Manuel de Jesús Serrat Díaz, Teresa Orberá Ratón, Suyén Rodríguez Pérez

Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI). Facultad de Ciencias Naturales. Universidad de Oriente. Santiago de Cuba, Cuba.

Recibido 24 de enero de 2014; aceptado 27 de junio de 2014

Resumen: La elección de un método de conservación debe permitir mantener, entre otros parámetros, la viabilidad, pureza y estabilidad de las propiedades de una cepa. *Kluyveromyces marxianus* CCEBI 2011 es una levadura con atractivas potencialidades biotecnológicas, conservada en la Colección de Cultivos del CEBI mediante dos métodos: transferencia periódica y agua destilada estéril (método de Castellani). En este trabajo, para determinar la eficacia y calidad de los dos métodos utilizados para la conservación de *K. marxianus* CCEBI 2011, se evaluaron parámetros como viabilidad, pureza e identidad y propiedades biotecnológicas. Por ambos métodos se obtuvo una elevada pureza y una viabilidad de $5,31 \times 10^{10}$ células/mL y $6,8 \times 10^{10}$ células/mL por el método de Castellani y transferencia periódica, respectivamente. En este último se alcanzaron los mayores valores de tolerancia a etanol (11%), producción de etanol ($6,08 \pm 0,11$ g/L) y actividad pectinolítica ($15,29 \pm 1,71$ U/mL). En los dos métodos se corroboró la clasificación taxonómica de esta cepa como *K. marxianus*, según el análisis de las regiones ITS1-gen 5,8S ARNr-ITS2. Se demostró que los métodos de conservación empleados son efectivos, y que han mantenido con calidad las potencialidades biotecnológicas de este microorganismo por más de 10 años.

Palabras clave: métodos de conservación, levadura, *Kluyveromyces marxianus*, viabilidad, pureza, potencialidades biotecnológicas, ITS.

Evaluation of two conservation methods for *Kluyveromyces marxianus* CCEBI 2011 at the CEBI Culture Collection

Abstract: The election of a conservation method should allow maintaining, among other parameters, the viability, purity and stability of the properties of a strain. *Kluyveromyces marxianus* CCEBI 2011 is a yeast with attractive biotechnological potentialities, conserved at the CEBI Culture Collection by two methods: periodic transfer and sterile distilled water (Castellani method). In this study for determining the efficacy and quality of the two methods being used for the conservation of *K. marxianus*, we evaluated parameters such as viability, purity, identity and biotechnological properties. For both methods we obtained a high purity and a viability of 5.31×10^{10} cells/mL and 6.8×10^{10} cells/mL, for the Castellani method and the periodic transfer method respectively. In this last method we obtained the highest values for ethanol tolerance (11%), ethanol production (6.08 ± 0.11 g/L) and pectonolitic activity (15.29 ± 1.71 U/mL). For the two methods the taxonomic classification of this strain as *K. marxianus* was corroborated according to the analysis of the ITS1-gen 5.8S ARNr-ITS2 regions. It was shown that the conservation methods being used are effective and that they have maintained the quality of the biotechnological potentialities of this microorganism during more than 10 years.

Keywords: conservation method, yeast, *Kluyveromyces marxianus*, viability, biotechnological potentialities, ITS.

* Correspondencia:
E-mail: mcamacho@cnt.uo.edu.cu

Introducción

El creciente uso de los microorganismos en la biotecnología y en la protección medioambiental ha fortalecido la necesidad de mantener los cultivos microbianos, de manera que las propiedades que los hacen importantes permanezcan estables [1]. Una de las formas de garantizar el seguimiento

continuo de las propiedades de las cepas, y que permiten su utilización en un proceso dado, es mediante la conservación “*ex situ*” en colecciones de cultivos o ceparios.

Las colecciones de cultivos deben aplicar un sistema de control de calidad que responda a las necesidades del usuario y que se adapte a las facilidades y recursos disponibles. Dentro de este sistema deben tomarse en cuenta, y aplicarse

de forma invariante, criterios que aseguren la calidad y confiabilidad en la utilización de los cultivos; entre ellos se encuentran la viabilidad, pureza e identidad de las cepas, depósito, estabilidad genética, recepción, almacenamiento de la información y distribución [1,2].

En un cepario pueden emplearse diversos métodos de conservación: liofilización, cultivo periódico en cuñas de agar, congelación en nitrógeno líquido, agua destilada estéril, etc. La mayoría de ellos logran reducir el ritmo metabólico de los organismos por retención de nutrientes, agua y oxígeno, por reducción de la temperatura de conservación, o por combinación de ambos [3].

Kluyveromyces marxianus CCEBI 2011 es una levadura que exhibe atractivas potencialidades biotecnológicas, como son su capacidad de crecer en concentraciones relativamente altas de solutos y a elevadas temperaturas (42 °C); puede asimismo ser empleada en procesos concomitantes de fermentación alcohólica y producción de enzimas pectinasas (endopoligalacturonasas) [4]. Es mantenida en la Colección de Cultivos del Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CCEBI) desde el año 2002 hasta la actualidad, bajo dos métodos de conservación: transferencia periódica y en agua destilada estéril (método de Castellani) [5]. El mantenimiento estable de las propiedades biotecnológicas de *K. marxianus* CCEBI 2011 constituye un requerimiento para la utilización confiable de esta cepa por nuestros investigadores.

En este trabajo se evaluó la eficacia y calidad de los dos métodos de conservación empleados en la CCEBI para el mantenimiento de la *K. marxianus* CCEBI 2011, a través de la determinación de parámetros como viabilidad, pureza e identidad, así como el estudio de las propiedades biotecnológicas de la cepa, después de 10 años.

Materiales y métodos

Microorganismos: Se utilizó la levadura *K. marxianus* CCEBI 2011, aislada en el año 2002 del agua de despulpe del beneficio húmedo del café de la despulpadora “Filé”, Santiago de Cuba, Cuba, depositada de forma personal en la CCEBI con el acrónimo CCEBI 2011 y en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), para su protección legal y uso restringido con fines de patentes, con el acrónimo CECT 11769.

En la CCEBI esta levadura es mantenida desde su depósito, como cepa de trabajo (docente e investigación), bajo dos métodos de conservación: transferencia periódica (CCEBI 2011a) cada 6 meses, en tubos de ensayo con cuñas del medio extracto de levadura-peptona-dextrosa (YPD) agar al 2% y en frascos de cristal con tapa de goma (3 mL de capacidad) con 2 mL de agua destilada estéril (CCEBI 2011b), sellados con parafina líquida. En ambos casos se conservaron 4 copias de cada una de ellas en una nevera comercial a 4 °C.

Como cepa control o de referencia se utilizó una cepa de *K. marxianus* conservada mediante liofilización (técnica de conservación a largo plazo considerada como estándar

de oro), donada por la CECT. A esta última se le identificó como CCEBI 2011c.

Las CCEBI 2011b y CCEBI 2011c fueron revitalizadas asépticamente en 5 mL de caldo YPD a 37 °C y se mantuvieron en cuñas de agar YPD al 2% a 4 °C hasta su utilización. Los inóculos fueron obtenidos por la siembra de una asada de las mismas en frascos Erlenmeyer que contenían 50 mL de medio YD (extracto de levadura-dextrosa; pH 5,0-5,5) y se incubaron a 30 °C, bajo agitación continua a 200 r.p.m, durante 16 h. Para la obtención de los cultivos, las levaduras se sembraron en los diferentes medios de cultivo (específicos para cada ensayo) con los inóculos obtenidos a razón de 1% (v/v).

Ensayo de viabilidad: A partir de los cultivos (CCEBI 2011 a, b y c) con 8 h de incubación en caldo YPD, se realizaron diluciones seriadas decrecientes desde 10^{-1} hasta 10^{-10} en solución salina estéril (NaCl 0,85%). Se utilizó el método de conteo del número de células totales en cámara de Rosenthal. Los resultados se expresaron en células/mL.

Análisis de pureza: A partir de la dilución 10^{-4} se realizó la observación de células y colonias bajo el microscopio de epifluorescencia (Novel, China) y microscopio estereoscópico (Novel, China), respectivamente, con el objetivo de determinar cambios morfológicos y presencia de contaminantes.

Identificación de la cepa *K. marxianus* CCEBI 2011: Al momento de la identificación inicial (año 2002) y depósito de esta cepa en la CCEBI, se realizó una comparación con la cepa *K. marxianus* CBS 712 (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Delft, Holanda), cepa tipo de la especie, en lo referente a caracteres morfofisiológicos, cariotipo electroforético (electroforesis en campo pulsado del ADN cromosómico) y comportamiento sexual. Para la comprobación de la identidad de la levadura después de 10 años, se tuvieron en cuenta los estudios morfológicos, el análisis de la región ITS 1-gen 5,8S ARNr-ITS 2 y la estabilidad de las propiedades biotecnológicas de interés.

Identificación de las levaduras a través del análisis de las secuencias de la región ITS 1-gen 5,8S ARNr-ITS 2:

Extracción del ADN total: Las cepas (CCEBI 2011 a, b y c) se cultivaron en caldo YPD a 150 r.p.m, durante 14-16 h a 30 °C, colectándose la biomasa por centrifugación (12.000 r.p.m, 5 min.). El ADN genómico se extrajo utilizando el kit de purificación MasterPure™ yeast DNA (Epicenter, Madison, WI), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN extraído se sometió a tratamiento con RNasa (BioRad) y posterior purificación por el método de fenol-cloroformo [6]. El ADN purificado se visualizó mediante una electroforesis en gel de agarosa (0,75% m/v) en tampón Tris-Borato-EDTA a pH 8,3. El gel se tiñó con bromuro de etidio y se fotografió bajo luz ultravioleta. Se utilizó el marcador de pares de bases de 1 kb (1 kb DNA Step Ladder, Promega). Las concentraciones de los ácidos nucleicos se

midieron por espectrofotometría a 260 nm en un Nanodrop 1000 Spectrometer (Thermo Scientific).

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR): El ADN genómico de las levaduras se amplificó utilizando los cebadores ITS 1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT TGC GG-3') e ITS 4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA GC-3'), sintetizados por Integrated DNA Technologies [7]. La reacción de PCR se realizó con el juego de reactivos Prime STAR HS DNA Polymerase (TaKaRa Bio, Inc., Japón), en un termociclador Master Cycle Personal, (Eppendorf), y se programó en 20 ciclos de 98 °C durante 10 segundos, 53 °C durante 10 segundos y 72 °C durante 1 minuto. El amplicón se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa 0,75% m/v y su banda fue escindida del gel y purificada mediante el juego de reactivos Wizard SV Gel and Purification Clean-Up System (Promega).

Secuenciación de la región ITS 1-gen 5,8S ARNr-ITS 2: Los productos purificados de la reacción de PCR fueron secuenciados 2 veces en un secuenciador automático HITACHI (Applied Biosystem), utilizando como cebadores para la reacción de secuenciación los cebadores antes descritos ITS 1 e ITS 4.

Análisis de las secuencias: Las secuencias parciales obtenidas fueron comparadas con otras de referencia, correspondientes al gen ARNr, disponibles en el Servicio de Alineamiento Básico Local (BLAST) del Centro Nacional de Información para la Biotecnología (NCBI), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>. Para el alineamiento se utilizó el programa bioinformático Vector NTI Advance 11.0 (Invitrogen).

Criterio para la identificación: La identificación hasta nivel de especie se definió a partir del 99% de similitud entre las secuencias parciales obtenidas y las correspondientes al gen ARNr de cepas tipo de levaduras depositadas en colecciones de referencia.

Verificación de las propiedades biotecnológicas de interés industrial

Ensayo de tolerancia a etanol: El estudio se realizó en tubos Durham en un medio con extracto de levadura 0,5%, dextrosa 1% y etanol 0-11% (v/v). El etanol se adicionó a partir de una solución stock estéril al 50% (v/v). Los tubos fueron inoculados y se incubaron a 30 °C, examinándose la formación de burbujas de gas durante 7 días. La tolerancia a etanol se definió como la máxima concentración de etanol a la cual es observada actividad fermentativa (producción de gas).

Actividad enzimática (pectinolítica): La determinación de la actividad endopoligalacturonasa (endoPG) se realizó según Serrat [8], determinándose en este caso el incremento del producto de hidrólisis (azúcares reductores) según el método del ácido 3,5- dinitrosalicílico [9].

Producción de etanol: La determinación de alcohol (etanol) se realizó mediante el método de microdifusión y colorimetría [10]. Se leyó la absorbancia a 590 nm contra el blanco de lectura.

Análisis estadístico: El tratamiento estadístico de los datos se realizó con ayuda del paquete estadístico Statgraphics Plus 5.1. Los análisis de las muestras se realizaron por triplicado y se expresaron como media \pm desviación estándar. Las diferencias entre los resultados fueron evaluados mediante un ANOVA de clasificación simple para un nivel de confianza del 95%. Se realizó la prueba de rangos múltiples para la comparación de sus medias.

Resultados y discusión

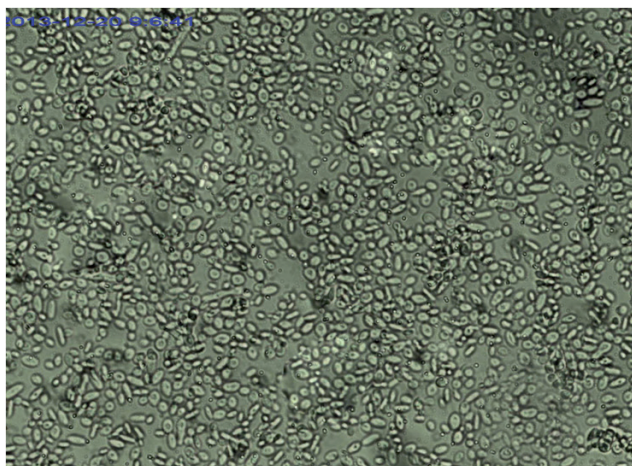
El método de conservación que se elija debe garantizar la supervivencia de al menos el 70% de las células por un período considerable de tiempo, de forma tal que la población sobreviviente se asemeje a la original tanto como sea posible, conserve las propiedades de importancia durante los cultivos y minimice la ocurrencia de eventos genéticos. De igual manera, debe reducir al mínimo el riesgo de contaminación y permitir que la pureza del cultivo permanezca inalterable [1].

La CCEBI mantuvo la preservación de la cepa *K. marxianus* CCEBI 2011 por más de 10 años mediante dos métodos de conservación (transferencia periódica y en agua destilada estéril), dando cumplimiento a lo establecido por la Federación Mundial de Colecciones de Cultivos (WFCC, por sus siglas en inglés) en sus guías generales, donde establece que por seguridad, y para minimizar la probabilidad de pérdida de las cepas, cada una debe ser mantenida por al menos 2 procedimientos diferentes.

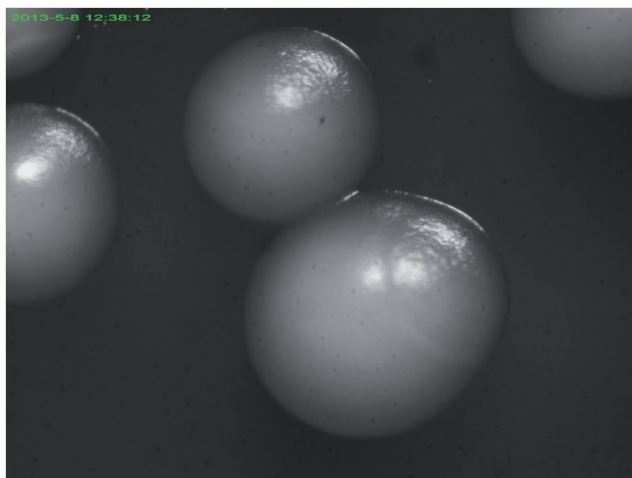
Los resultados obtenidos mostraron que el cultivo de *K. marxianus* CCEBI 2011 se mantuvo con una elevada pureza en los métodos de conservación empleados, no observándose contaminantes. La observación al microscopio óptico mostró células ovoides y cilíndricas con gemación unipolar (Figura 1a) y al microscopio estereoscópico colonias circulares de 2-3 mm de diámetro, blancas, opacas, lisas, abultadas y de borde entero (Figura 1b), características identificadas inicialmente al depositar la cepa en el año 2002 para su conservación.

Muchos autores aluden múltiples desventajas al método de transferencia periódica: incremento del riesgo de contaminación, cambios genéticos a mayor número de transferencias, posible inoculación con el microorganismo equivocado cuando se realiza la transferencia de una serie de cepas, peligro de pérdida del cultivo cuando se trabaja con microorganismos delicados, no realizar las transferencias periódicas oportunas a medios frescos, etc. [1,11]. Contrario a lo planteado anteriormente, en este caso se obtuvo un cultivo axénico de *K. marxianus* CCEBI 2011, lo que se debe a una correcta aplicación de las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL), a la implantación de un Sistema de Seguridad Biológica (SSB) en la CCEBI (CEBI/M/BS/M/01, 2010) [12], y al extremo cuidado del personal calificado al manipular la cepa, aspectos que garantizaron que los riesgos de contaminación hayan sido mínimos.

En la tabla 1 se muestran los valores de viabilidad de la cepa *K. marxianus* CCEBI 2011 conservada bajo los



a) Células ovoides y cilíndricas con gemación unipolar (aumento 60X).



b) Colonias circulares de 2-3 mm de diámetro, blancas, opacas, lisas, abultadas y de borde entero (aumento 400X).

Figura 1. Observación al microscopio óptico y estereoscópico de *K. marxianus* CCEBI 2011.

diferentes métodos. La comparación de las medias de los valores de viabilidad de las cepas estudiadas por los métodos utilizados, con respecto a la cepa conservada por liofilización, no arrojó diferencias estadísticamente significativas ($p=0,3401$).

En la transferencia periódica se mantuvieron excelentes valores de células viables. Algunos autores han planteado que es un método que permite la supervivencia de los cultivos en cortos períodos de tiempo [13], aunque, si se le proporcionan las condiciones óptimas, mediante la transferencia desde un medio seco a uno fresco, la cepa se mantendrá viable por muchos años y la recuperación de los cultivos activos será relativamente fácil.

Con el método de Castellani, el valor de células viables alcanzó $5,31 \times 10^{10}$ células/mL. El método de Castellani o conservación en agua destilada estéril es un método de conservación alternativo a mediano plazo [5]. Es muy utilizado en colecciones de referencia como la CECT. Con esta técnica las levaduras muestran elevados porcentajes de viabilidad en períodos superiores a 5 años [14]. Panizo y col., informaron que de 170 cepas de levaduras conservadas

en agua destilada, el 100 % se mantuvieron puras, viables y estables morfológicamente durante 48 años [15].

Se estudió la influencia de los métodos de conservación en la estabilidad de las propiedades de la cepa. Es significativo el valor de la concentración de etanol tolerada por la cepa mantenida por transferencia periódica, llegando a concentraciones de hasta 11% (v/v), valor similar alcanzado por la cepa de referencia (Tabla 1). La cepa *K. marxianus* en sus inicios (año 2002) toleró hasta un 8% (v/v) de alcohol, concentración que fue mantenida solo en la cepa conservada en agua destilada. Algunos autores han referido que el método de Castellani mantiene a las células en estrés, deteniéndose por tanto la tasa metabólica del microorganismo.

La evaluación de la producción de etanol por la cepa CCEBI 2011, según los métodos de conservación empleados en la CCEBI, reflejó diferencias estadísticamente significativas ($p=0,0064$) (Tabla 1), con respecto a la conservada por liofilización. No obstante, los rendimientos de producción de etanol [Y (p/s)] alcanzados por la levadura conservada por transferencia periódica y por agua destilada oscilaron entre 0,30 y 0,35, respectivamente. *K. marxianus* CCEBI 2011, al ser depositada y conservada en medio YD y en SBM (melaza de remolacha) tuvo un Y (p/s) de 0,39 [8]. Igualmente, Rodríguez obtuvo con esta cepa un rendimiento de producción de etanol de 0,38 a partir de jugo de caña [16]. Si tomamos en cuenta que los últimos rendimientos citados fueron obtenidos bajo otras condiciones, entonces, se podría inferir que, a pesar de las diferencias significativas observadas con respecto a la cepa referencia o control, se mantuvo de forma óptima esta propiedad en la CCEBI 2011a y CCEBI 2011 b.

K. marxianus CCEBI 2011 también tiene la capacidad de producir pectinasas, esencialmente endoPG (EC 3.2.1.15). De acuerdo a los métodos de conservación empleados en la CCEBI, el rendimiento Y (p/s) para la producción de enzimas pectinolíticas fue similar al obtenido por Serrat [8]

Tabla 1. Evaluación de parámetros en la cepa *K. marxianus* CCEBI 2011.

Parámetros evaluados	CCEBI 2011a (pase periódico)	CCEBI 2011b (agua destilada)	CCEBI 2011c (liofilizada)
Pureza*	si	si	si
Viabilidad (cél.mL ⁻¹)	$6,8 \times 10^{10a}$	$5,31 \times 10^{10a}$	$7,4 \times 10^{10a}$
Tolerancia a etanol (%)	11	8	11
Producción de etanol (g.L ⁻¹)	$6,08 \pm 0,11^b$	$5,47 \pm 0,22^c$	$7,00 \pm 0,15^a$
Actividad endoPG** (U.mL ⁻¹)	$15,29 \pm 1,71^a$	$13,53 \pm 0,25^a$	$17,60 \pm 2,95^a$

*La pureza se evaluó en función de la ausencia de contaminantes y de cambios morfológicos en la cepa. ** Actividad endopoligalacturonasa. a: Los resultados se expresaron como media \pm desviación estándar. Letras diferentes en la misma fila indican diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95% (ANOVA de clasificación simple, prueba de contraste de múltiples rangos).

y Rodríguez [16], cuando emplearon esta misma cepa con diferentes sustratos. Las medias de los valores obtenidos para el rendimiento de la producción de enzimas por las cepas en estudio no mostraron diferencias estadísticamente significativas cuando se compararon con la cepa estándar de oro ($p < 0,05$).

Para el depósito inicial de esta cepa la identificación taxonómica fue confirmada mediante cariotipaje electroforético en campo pulsado del ADN cromosómico [8]. El uso de esta técnica ha resultado de gran interés para determinar las relaciones taxonómicas en levaduras y en la identificación de cepas de interés en las fermentaciones vínicas [17].

La secuenciación de las regiones ITS1-gen 5,8S ARNr-ITS2 también ha sido empleada para la identificación de levaduras. Estas regiones son poderosas herramientas para establecer relaciones filogenéticas y para la identificación de especies, a través del análisis de sus secuencias o el análisis de restricción de las mismas. Contienen secuencias conservadas, así como una evolución concertada [17].

Del análisis de estas regiones en la cepa mantenida por los dos métodos de conservación, se obtuvieron secuencias de gran calidad, con más de 600 pares de bases (pb), tamaños muy similares a las secuencias de referencia depositadas en el GenBank, e incluso mayores con respecto a las obtenidas en otros trabajos donde se realizó la secuenciación de

estas regiones para la identificación de levaduras [18]. El porcentaje de homología entre las secuencias fue elevado (~100%) (Tabla 2), por lo que se infiere que los métodos empleados en la CCEBI para la conservación de *K. marxianus* CCEBI 2011 tuvieron escasa participación en las variaciones de la secuencia génica seleccionada.

La comparación de la secuencia de la cepa CCEBI 2011a (transferencia periódica) con secuencias disponibles en el Genbank arrojó un 99% de homología con cepas de *K. marxianus* depositadas en este sitio, entre ellas *K. marxianus* CHY1612 secuencia gi|311221586|gb|HQ39 y *K. marxianus* WM 39 secuencia gi|148535531|gb|EF56, entre otras, con una identidad en 646 de 650 pb analizados. Esta pequeña diferencia, en cuanto a los pares de bases secuenciados, pudo deberse a la inestabilidad de la cepa relacionada con el método de conservación.

Los estudios de estabilidad deben incluir la revisión en el tiempo de la pureza, la viabilidad y la identidad de las cepas. En la CCEBI estos estudios se realizan cuando se transfieren los cultivos a un medio fresco, especialmente los dos parámetros citados. Según los resultados obtenidos, no puede afirmarse categóricamente el mantenimiento de la estabilidad genética de la cepa después de 10 años, aun cuando la misma ha sido capaz de conservar bajo ambos métodos de conservación los parámetros anteriormente mencionados.

Tabla 2. Alineamiento de las secuencias de las regiones ITS1-gen 5,8S ARNr-ITS2 de *K. marxianus* CCEBI 2011 mantenida bajo diferentes métodos de conservación, utilizando el programa bioinformático Vector NTI Advance 11.0 (Invitrogen).

Cepa	Pares de base	Alineamiento de las secuencias
Secuencia consenso		TTACTGGGGGAA CGTCTGAACAAGGCGCTTAATTGCGCGCCAGTCTTGATTCTGCTATCAGTTTTCTATTCTCATCTAAACAATGGA
2011 c	0-100	-----T-----
2011 b		-----A-----
2011 a		-----A-----
gi 311221586 gb HQ39		-----T-----
Secuencia consenso		GTTTTTCTCTATGAACACTTCCCTGGAGAGCTCGTCTCCAGTGGACATAAACACAAACAATATTTGTATTATGAAAACTATTATACTATAAAAT
2011 c	101-200	-----
2011 b		-----
2011 a		-----
gi 311221586 gb HQ39		-----
Secuencia consenso		TTAATATCAAACCTTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGACGCAATTGCGATATGTATTGTGAATTGCAGATTTTCGTGAAT
2011 c	201-300	-----
2011 b		-----
2011 a		-----
gi 311221586 gb HQ39		-----
Secuencia consenso		CATCAAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCCAGGGGCGATGCTGTTGAGCGTCATTCTCTCTCAAACCTTTGGGTTGGTAGTGAGTG
2011 c	301-400	-----
2011 b		-----
2011 a		-----
gi 311221586 gb HQ39		-----
Secuencia consenso		ATACTCGTCTCGGGTTAACTTGAAAGTGGCTAGCCGTTGCCATCTGCGTGAGCAGGGCTGCGGTGCAAGTCTATGGACTGACTCTTGACATCTAC TC
2011 c	401-500	-----G-----
2011 b		-----G-----
2011 a		-----T-----
gi 311221586 gb HQ39		-----G-----
Secuencia consenso		TTAGGTTTGCGCCAATTCGTGGTAAGCTTGGGTCATAGAGACTCATAGGTGTTATAAAGACTCGTGGTGTGTTGTCCTTGGGCATACGGCTTTAACCC
2011 c	501-600	-----
2011 b		-----
2011 a		-----
gi 311221586 gb HQ39		-----
Secuencia consenso		AAAAC TC T CAAAGT TGACCTCAAATCAGGTAGGAGTACCC CT GAA CTT
2011 c	601-650	-----T-----G-----
2011 b		-----T-----G-----
2011 a		-----G-----A-----
gi 311221586 gb HQ39		-----T-----G-----

A: Adenina. T: Timina. G: Guanina. C: Citocina. Cepa 2011a (transferencia periódica). Cepa 2011b (agua destilada estéril). Cepa 2011c (lío-filización). gi|311221586|gb|HQ39: secuencia de referencia.

En este trabajo no fue posible realizar la secuenciación de los genes responsables de caracteres tan importantes como la producción de alcohol y endopoligalacturonasa, principalmente de esta última, la cual se manifiesta de manera semiconstitutiva [8]. La actividad pectinolítica está restringida a pocas levaduras y en ocasiones su producción se ve afectada por la concentración de solutos y oxígeno en el medio. La identificación de los genes que codifican estas propiedades biotecnológicas habría confirmado el mantenimiento de la estabilidad genética de esta cepa según los métodos de conservación utilizados. Según Smith, las propiedades conocidas deben revisarse periódicamente, pero para estimar la estabilidad con precisión, debe seleccionarse una propiedad que no sea estable en la cepa y estudiar su comportamiento en el tiempo [19].

Conclusiones

Los resultados obtenidos en la evaluación de los métodos de conservación (transferencia periódica y método de Castellani) utilizados en la CCEBI para el mantenimiento de *Kluyveromyces marxianus* CCEBI 2011 avalan que los mismos garantizaron la viabilidad y pureza del cultivo por más de 10 años.

Las propiedades biotecnológicas se mantuvieron dentro de los parámetros establecidos, aun cuando se observaron diferencias estadísticamente significativas en la producción de alcohol entre las cepas conservadas por transferencia periódica y agua destilada y la conservada por liofilización.

A pesar de que en el método de transferencia periódica los resultados fueron satisfactorios, este método no es recomendable para la conservación de microorganismos a mediano y largo plazo, principalmente, cuando se necesita mantener en un cultivo caracteres tan importantes como la producción de enzimas y etanol, propiedades que la hacen candidata para la utilización futura a nivel industrial.

En estos momentos en la CCEBI se está implementando la utilización del método de conservación por congelación a -35 °C, lo que propiciará reemplazar la transferencia periódica y otorgará una mayor garantía de calidad a las cepas que se conservan actualmente, y por ende, a la *K. marxianus* CCEBI 2011.

Referencias

- Weng Alemán Z, Díaz OE, Álvarez M. Conservación de microorganismos: ¿qué debemos conocer? Rev Cub Hig Epidemiol. 2005; 43(3): 0-0. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-30032005000300006&lng=es&nrm=iso. Acceso 20 de abril 2011.
- Orberá T, Pérez I, Serrano M. Creación y conservación de colecciones de cultivos microbianos. España: Editorial Académica Española; 2012.
- Sly L. Maintenance and preservation of microbial cultures in a laboratory culture collections. NATA Tech Note. 1992; 14:1-16.
- Serrat MJ, Bermudez RC, Villa T. Polygalacturonase and ethanol production in *Kluyveromyces marxianus*: potential use of polygalacturonase in foodstuffs. Appl Biochem Biotechnol. 2004; 117:49-64.
- Castellani A. Maintenance and cultivation of the common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. J Trop Med Hyg. 1967; 70:181-4.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning. A laboratory manual. CLD Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1987.
- Korabecna M. The variability in the fungal ribosomal DNA (ITS1, ITS2 and 5,8S rRNA gene): its biological meaning and application in medical mycology. In: Mendez-Vils A, editor. Communicating current research and educational topics and trends in applied microbiology. Microbiology book series. Badajoz: Formatex; 2007.
- Serrat MJ. Producción, purificación y caracterización de la poligalacturonasa de una levadura aislada de residuales del beneficio húmedo del café. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Biológicas. Cuba: Universidad de Oriente, Santiago de Cuba; 2003.
- Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal Chem. 1959; 31:426-8.
- Conway J. Microdiffusion analysis volumetric. London: Crosby Lokwood; 1947.
- Smith D, Onions A. The preservation and maintenance of living fungi. In: IMI Technical Handbooks No. 2. 2nd ed. Wallingford, UK: CABI International; 1994. p 122.
- CCEBI/M/BS/M/01. Manual de Seguridad Biológica. Centro de Estudios de Biotecnología Industrial. Cuba: Universidad de Oriente, Santiago de Cuba; 2010.
- Castro G, Hernández JT, Aquino C. Manual sobre conservación de microorganismos. México: Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas; 2000. p 21.
- García MD, Uruburu F. La conservación de cepas microbianas. Actualidad SEM. 2000; 30:12-6.
- Panizo MM, Reviákina V, Montes W, González G. Mantenimiento y preservación de hongos en agua destilada y aceite mineral. Rev Soc Ven Microbiol. 2005; 25:35-40.
- Rodríguez O. Estudio de la coproducción de endopoligalacturonasa y etanol por *Kluyveromyces marxianus* a partir de jugo de caña. Tesis presentada en opción al título académico de Máster en Biotecnología. Cuba: Centro de Estudios de Biotecnología Industrial, Universidad de Oriente, Santiago de Cuba; 2008.
- Llanos R. Estudio comparativo entre aislados clínicos y no clínicos de *Saccharomyces cerevisiae* y su papel como patógeno emergente. Tesis presentada para optar al grado científico de doctor. España: Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC), Departamento de Biotecnología, Universitat de Valencia; 2007.
- López WA, Ramírez M, Mambuscay LA, Osorio E. Diversidad de levaduras asociadas a chichas tradicionales de Colombia. Rev Colomb Biotecnol. 2010; XII:176-86.
- Smith D. Quality systems for management of microbial collections. In: Samson RA, Stalpers JA, van der Mei D, et al., editors. Culture collections to improve the quality of life. The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn; 1996. p 137-143.