

CONTROL DE LA VIABILIDAD DE LEVADURAS EN LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

Erick Daniel Acosta García, Tania Gabriela Olvera Martínez, Cesia Kerit Acosta Cuevas, Jesús Bernardo Páez Lerma, Juan Antonio Rojas Contreras, Nicolás Oscar Soto Cruz.
Departamento de Ingenierías Química y Bioquímica, Instituto Tecnológico de Durango, Felipe Pescador 1830 Ote, 34080 Durango, Dgo., México. 20040540@itdurango.edu.mx

Palabras clave: Kluyveromyces marxianus, Caspasas, Viabilidad

Introducción. La tinción con azul de metileno es un método ampliamente utilizado, sin embargo, es poco preciso y tiende a sobrestimar el conteo de células muertas(1)(2). La citometría de flujo es una alternativa para determinar la viabilidad de las levaduras(3).

El objetivo de este trabajo fue comparar dos métodos para determinar la viabilidad de levaduras durante la fermentación alcohólica.

Metodología. Se realizaron fermentaciones con cuatro cepas de *Kluyveromyces marxianus* (ITD268, ITD02, CBS397 y CBS6556). La concentración inicial de biomasa fue 1×10^6 células/mL. Se incubó a 150 rpm y 28°C. Se tomaron muestras en tres tiempos de la fase estacionaria. Se evaluó la viabilidad con la tinción de azul de metileno(4) y la actividad de caspasas por el kit Muse® Multicaspase(5) (Luminex®) usando el citómetro de flujo Muse® Cell Analyzer, de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

Resultados. La Figura 1 muestra que la tinción con azul de metileno subestima el conteo de células muertas y llevaría a concluir que el cultivo presenta una larga fase estacionaria. En la Figura 2 se aprecia que la cantidad media de caspasa a las 48 h fue de $14.05\% \pm 6.74\%$, a las 96 h fue de $15.04\% \pm 7.11\%$ y de $54.32\% \pm 6.08\%$ a las 192 h, lo que indica que un número creciente de células entran en apoptosis. La determinación mediante citometría de flujo permite diferenciar células vivas, muertas y en proceso de apoptosis, observándose el avance de la fase de muerte del cultivo.

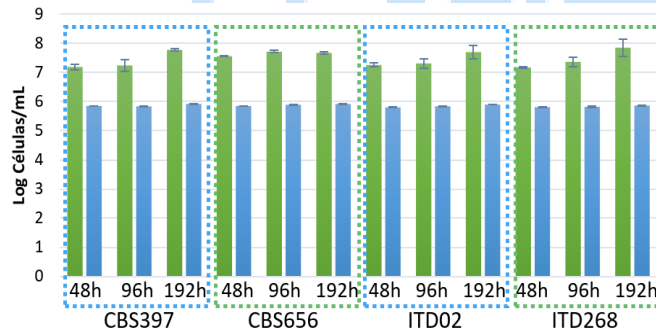


Fig. 1. Comparación de células muertas por citometría de flujo (barra verde) y por tinción de azul de metileno (barra azul).

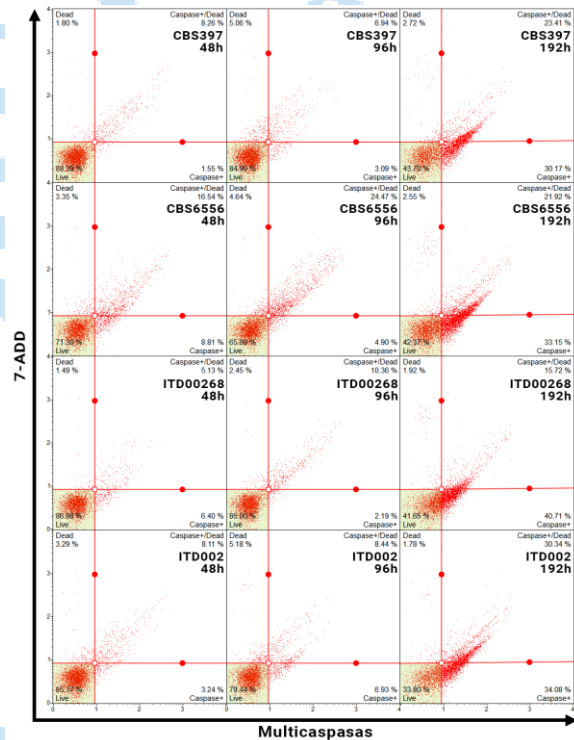


Fig. 2. Evolución de la actividad de caspasas en el tiempo

Conclusiones. La determinación de caspasas junto con el colorante 7-ADD permiten un adecuado monitoreo de la viabilidad de las levaduras durante la fermentación alcohólica.

Agradecimiento. A CONACYT por la beca otorgada al CVU:1037837 con clave de solicitud: 2022-000018-02NACF-17413

Bibliografía.

1. Van Zandycke SM, Simal O, Gualdoni S, Smart KA. (2003). *J Am Soc Brew Chem.* 61(1):15–22.
2. O'Connor-Cox E, Mochaba FM, Lodoio E, Majara M, Axcell B. (1997). *Master Brew Assoc Am Tech Q.* 34:306–12.
3. Eigenfeld E, Wittmann L, Kerpes R, Schwaminger S, Becker T. (2023). *Anal Bioanal Chem.* 1-3
4. Sami M, Ikeda M, Yabuuchi S, (1994). *J ferm bioeng.* 78(3): 212-216
5. Bedner E, Smolewski P, Amastad P, Darzynkiewicz Z. (2000). *Exp. Cell Res.* 259(1): 308-313