

## “Optimización de factores para la co-inoculación de levaduras biocontroladoras”

Ocampo, Erica Yanina<sup>a,b</sup>; Moll, Leandro<sup>b</sup>; Ormeño, Leandro<sup>c</sup>; Pedrozo, Paula<sup>b,d</sup>; Kuchen, Benjamín<sup>b,d</sup>

a Instituto Nacional de Tecnología Industrial

b Instituto de Biotecnología, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de San Juan

c Gabinete de recursos vegetales, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de San Juan

d CONICET

benjaminkuchen@gmail.com

### Resumen

La transformación de uvas en vino implica desarrollo de diversas especies de levaduras, algunas de las cuales son perjudiciales para el vino. El SO<sub>2</sub> ha sido criticado por sus efectos sobre la salud humana y el biocontrol es una alternativa sustentable. *Wickerhamomyces anomalus* “Wa” es una levadura que tiene capacidad de biocontrol y aporta positivamente al *flavorur* del vino. El objetivo es evaluar su influencia sobre la cinética en co-inoculación con la levadura que fermentará el vino: *Saccharomyces cerevisiae* “Sc”. Se evaluaron las cinéticas de co-inoculación variando factores: A: Temperatura (15-20°C), B: SO<sub>2</sub> molecular (0-0,2 ppm) y C: Tiempo de co-inoculación secuencial Wa/Sc (0-2 días). Se realizaron 15 fermentaciones con un diseño experimental Box-Behnken, 3 repeticiones en el punto central. Se tomaron muestras durante 20 días, recuento en WLN. Las cinéticas se ajustaron en modelo logístico (Sigma-Plot). Con  $\mu_{max}$  y capacidad de carga de Wa y Sc, se analizaron los resultados en Design-Expert. Resultados:  $\mu_{wa}$ : R<sup>2</sup> ajustado: 0,56.  $\mu_{wa} = 0,033 + 0,020 * C$ . A mayor tiempo co-inóculo, Wa crece más rápido.  $K_{wa}$ : R<sup>2</sup> ajustado: 0,96.  $K_{wa} = 1,504E+7 - 6,122E+6 * B + 3,317E+7 * C - 1,761E+7 * B * C + 2,119E+7 * C^2$ . La capacidad de carga aumentó cuando el SO<sub>2</sub> disminuyó y cuando el tiempo de co-inoculación fue más tardío. Con respecto a Sc, al  $\mu_{sc}$  no le afectó la presencia/ausencia de Wa. A su capacidad de carga le afectó positivamente cuando se coinoculó tardíamente, con mayor población Wa. Conclusión: La co-inoculación secuencial, a 2 días, influye positivamente desde el biocontrol con el desarrollo de Wa y contribuye a un mayor establecimiento de Sc.

**Palabras clave:** Biocontrol de levaduras, Co-inoculación secuencial, Diseño experimental, Cinéticas.

### INTRODUCCIÓN

La industria del vino tiene un impacto económico significativo en la región y en varias economías alrededor del mundo (Tafel & Szolnoki 2020). Este el resultado de la fermentación, llevada a cabo principalmente por *S. cerevisiae*. Sin embargo, al principio (etapa pre-fermentativa), coexisten diversas especies de levaduras, provenientes de la superficie de la uva y de elementos de la bodega, entre otros (Cieni et al. 2016). Entre ellas, se desarrollan cepas de levaduras que causan deterioro y afectan las características organolépticas del vino; una de ellas es *Zygosaccharomyces rouxii* (Csoma et al. 2021). Para su control, tradicionalmente se ha utilizado SO<sub>2</sub>. Sin embargo, su uso no es deseado por los consumidores que prefieren productos más naturales. Tampoco por organizaciones internacionales como la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV) o la Organización Mundial de la Salud (OMS), que buscan reducirlo

debido a su toxicidad para la salud humana (Ferrer-Gallego et al. 2018).

El biocontrol ha sido citado como una alternativa para reducir el uso de SO<sub>2</sub> (Simonin et al. 2020). El biocontrol ocurre debido a la interacción de microorganismos. La interacción en este caso es amensalismo (killer) por *Wickerhamomyces anomalus*, previamente seleccionada por nuestro grupo como positiva para el vino, y *Z. rouxii* (Kuchen et al. 2019). Este tipo de interacción involucra dos características simultáneas, competencia por el medio y la emisión de la toxina (Boyton et al. 2019). Por lo tanto, a diferencia de la adición de SO<sub>2</sub>, la cinética de la interacción es relevante, ya que la molécula inhibitoria debe ser producida en el medio durante el desarrollo de ambas poblaciones (Kuchen et al. 2022).

El grado de influencia de los factores bióticos y abióticos es difícil de determinar individualmente, ya que el impacto de un factor generalmente se ve

afectado por el de otros (Fleet, 2011). Por lo tanto, la realización de fermentaciones mixtas controladas requiere más conocimiento sobre los factores ambientales y las actividades metabólicas que influyen en las interacciones de las levaduras (Ciani et al. 2016).

La necesidad de métodos eficientes para optimizar entre los factores involucrados en un determinado proceso ha llevado a la adopción de diseños experimentales. La metodología basada en el diseño Box-Behnken (Fisher 1953) proporciona una forma eficiente de reducir los tiempos experimentales. Estos diseños se han utilizado en muchos proyectos de investigación microbiológica y algunos enológicos (Dopico-García et al., 2007; Mazzucco et al., 2019).

## OBJETIVOS

El objetivo es evaluar, con un enfoque de estadística basada en modelos, la influencia de *Wickerhamomyces anomalus* sobre la cinética en co-inoculación mixta secuencial con la levadura que fermentará el vino: *Saccharomyces cerevisiae*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se evaluaron las cinéticas de co-inoculación variando factores: A: Temperatura (15-20°C), B: SO<sub>2</sub> molecular (0-0,2 ppm) y C: Tiempo de co-inoculación secuencial  $W_a/S_c$  (0-2 días). Se realizaron 15 fermentaciones con un diseño experimental Box-Behnken, 3 repeticiones en el punto central. Se tomaron muestras durante 20 días, recuento en WLN. Las cinéticas se ajustaron en modelo logístico (Sigma-Plot). Con  $\mu_{max}$  y capacidad de carga de  $W_a$  y  $S_c$ , se analizaron los resultados en Design-Expert.

## RESULTADOS

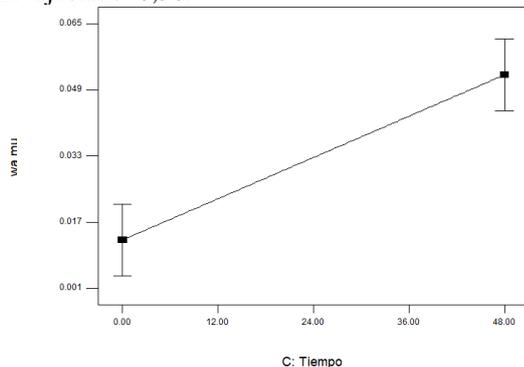
### *Wickerhamomyces anomalus*

Velocidad específica de crecimiento:  $\mu_{wa}$ :

Modelo:

$$\mu_{wa} = 0,033 + 0,020 * C.$$

R<sup>2</sup> ajustado: 0,56.



A mayor tiempo co-inóculo, *W. anomalus* crece más rápido.

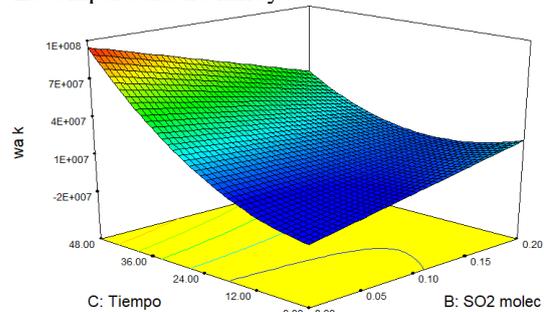
Capacidad de carga de  $W_a$ :  $K_{wa}$ .

Modelo:

$$K_{wa} = 1,504E+7 - 6,122E+6 * B + 3,317E+7 * C - 1,761E+7 * B * C + 2,119E+7 * C^2.$$

R<sup>2</sup> ajustado: 0,96.

La temperatura no influyó.



La capacidad de carga aumentó cuando el SO<sub>2</sub> disminuyó y cuando el tiempo de co-inoculación fue más tardío.

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

*W. anomalus* se vio afectado por el tiempo de co-inoculación. Su velocidad específica cambió disminuyendo a medida que se co-inoculaba más temprano *S. cerevisiae*. Este hecho podría estar relacionado a quórum-sensing, lo cual está relacionado en otras interacciones donde ocurre competencia (Rivero et al., 2015). Por otro lado, su capacidad de carga disminuye drásticamente. Esto podría estar relacionado a la imposibilidad de alcanzar una población máxima. Posiblemente por falta de oxígeno generado por la presencia de *S. cerevisiae* (Ciani et al. 2016). El SO<sub>2</sub>, la afectó negativamente, tal como se observa en trabajos anteriores de nuestro equipo (Kuchen et al. 2019).

*S. cerevisiae*, por su parte, no se vio influenciada por la presencia de la no *-saccharomyces*, en este caso, *W. anomalus*, coincidiendo con otros trabajos previos (Combina et al. 2008). Este modelo será utilizado para relajar optimizaciones dinámicas de la co-inoculación y las condiciones del medio.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Csoma, H., Kállai, Z., Antunovics, Z., Czentye, K., & Sipiczki, M. (2021). Vinification without *saccharomyces*: Interacting osmotolerant and "spoilage" yeast communities in fermenting and ageing botrytised high-sugar wines (tokaj essence). *Microorganisms*, 9(1), 1–27. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010019>
2. Ferrer-Gallego, R., Puxeu, M., Martín, L., Nart, E., Hidalgo, C., & Andorrà, I. (2018). Microbiological, Physical, and Chemical Procedures to Elaborate High-Quality SO<sub>2</sub>-Free Wines. In *Grapes and Wines - Advances in Production, Processing, Analysis and Valorization*. InTech. <https://doi.org/10.5772/intechopen.71627>
3. Károlyi, G., Neufeld, Z., & Scheuring, I. (2005). Rock-scissors-paper game in a chaotic flow: The effect of dispersion on the cyclic competition of microorganisms. *Journal of theoretical biology*, 236(1), 12-20. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2005.02.012>

4. Kuchen, B., Maturano, Y. P., Gil, R. M., Vazquez, F., & Scaglia, G. J. E. (2022). Kinetics and mathematical model of killer/sensitive interaction under different physicochemical conditions of must/wine: a study from a biological point of view. *Letters in Applied Microbiology*, 74(5), 718–728. <https://doi.org/10.1111/lam.13657>
5. Kuchen, B., Maturano, Y. P., Mestre, M. V., Combina, M., Toro, M. E., & Vazquez, F. (2019). Selection of native non-Saccharomyces yeasts with biocontrol activity against spoilage yeasts in order to produce healthy regional wines. *Fermentation*, 5(3). <https://doi.org/10.3390/fermentation5030060>
6. Kuchen, B., Vazquez, F., Maturano, Y. P., Scaglia, G. J. E., Pera, L., & Vallejo, M. D. (2021). Toward application of biocontrol to inhibit wine spoilage yeasts: The use of statistical designs for screening and optimisation. *Oeno One*, 55(2), 75–96. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2021.55.2.4510>
7. Maturano, Y. P., Mestre, M. V., Kuchen, B., Toro, M. E., Mercado, L. A., Vazquez, F., & Combina, M. (2019). Optimization of fermentation-relevant factors: A strategy to reduce ethanol in red wine by sequential culture of native yeasts. *International journal of food microbiology*, 289, 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.08.016>
8. Medina, K., Boido, E., Dellacassa, E., & Carrau, F. (2012). Growth of non-Saccharomyces yeasts affects nutrient availability for Saccharomyces cerevisiae during wine fermentation. *International journal of food microbiology*, 157(2), 245–250.
9. Rivero, D., Berná, L., Stefanini, I., Baruffini, E., Bergerat, A., Csikász-Nagy, A., et al. (2015) Hsp12p and PAU genes are involved in ecological interactions between natural yeast strains. *Environ Microbiol* 17: 3069–3081.
10. Ciani, M., Capece, A., Comitini, F., Canonico, L., Siesto, G., & Romano, P. (2016). Yeast interactions in inoculated wine fermentation. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 7, Issue APR). Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00555>
11. Tafel, M., & Szolnoki, G. (2020). Estimating the economic impact of tourism in German wine regions. *International Journal of Tourism Research*, 22(6), 788–799. <https://doi.org/10.1002/jtr.2380>
12. Simonin, S., Roullier-Gall, C., Ballester, J., Schmitt-Kopplin, P., Quintanilla-Casas, B., Vichi, S., Peyron, D., Alexandre, H., & Tourdot-Maréchal, R. (2020). Bio-Protection as an Alternative to Sulphites: Impact on Chemical and Microbial Characteristics of Red Wines. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01308>
13. Boynton, P. J. (2019). The ecology of killer yeasts: Interference competition in natural habitats. In *Yeast*. 36 (8): 473–485. John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/yea.3398>