

“Modelado de la interacción de co-inoculación secuencial entre *Wickerhamomyces anomalus* y *Saccharomyces cerevisiae*”

Moll, Leandro^a; Ocampo, Erica Yanina^a; Aguilera, Brenda^a; Pedrozo, Paula^{a,b}; Kuchen, Benjamín^{a,b}
a Instituto de Biotecnología, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de San Juan
c CONICET
benjaminkuchen@gmail.com

Resumen

Wickerhamomyces anomalus (Wa) es una levadura positiva para el biocontrol de levaduras contaminantes de vinos. Sin embargo, el biocontrol ocurre en pre-fermentación y resulta relevante su cinética de interacción con *Saccharomyces cerevisiae* (Sc), dónde debe mantener una población viable alta. Se modelará Wa y Sc y la influencia de SO₂, Temperatura y Tiempo de co-inóculo en el comportamiento cinético en función de maximizar la presencia de Wa en pre-fermentación y mejorar el biocontrol en vinos. Se tomaron datos de 15 fermentaciones con un diseño box-Behnken. Donde se hizo variar, SO₂ molecular (entre 0 y 0.2 ppm), temperatura (entre 15 y 20°C) y el tiempo de coinoculación secuencial (0 o 1 en función de tiempo, entre 0 y 2 días). Los datos de 20 días de los 15 experimentos con cinéticas mixtas (WaySc) se analizaron con la toolbox AMIGO2 Matlab. Se ajustó un modelo Lotka-Volterra de competencia para la interacción ($R^2=0.82$), donde se eliminó el parámetro de Wa sobre Sc. ‘ $dSc/dt=tiempoCO*(\mu_{sc}*X_{sc}*(1-X_{sc}/K_{sc})$ ’ y ‘ $dWa/dt=\mu_{wa}*X_{wa}*(1-X_{wa}/K_{wa})-tiempoCO*\alpha_{sc}*(X_{sc}/K_{wa})$ ’. Submodelos: $\mu_{wa}=\mu_{wa1}*(1-tiempoCO)$ y $K_{wa}=K_{wa1}+K_{wa2}*(SO_2)+K_{wa3}*(1-tiempoCO)$. Xsc (cel/mL), Xwa (cel/mL): Población de Sc y Wa. TiempoCO: tiempo de coinoculación. μ_{sc} (h⁻¹) y μ_{wa} (h⁻¹): velocidad de Sc y Wa. Ksc (cel/mL) y Kwa (cel/mL): Capacidad de carga de Sc y Wa. α_{sc} (cel/mL*h): Influencia de Sc sobre Wa. Simulación: cvodes, mínimos cuadrados y optimización: eSS. Tiempo de co-inoculación fue la variable más relevante influyendo sobre, μ_{wa} y Kwa, además SO₂ influyó sobre Kwa. La temperatura no influyó. El modelado posibilitará la optimización del co-inóculo con la manipulación del tiempo de co-inoculación y el SO₂, lo que permitirá un biocontrol y fermentación eficiente.

Palabras clave:

Biocontrol en vinos, Co-inoculación secuencial, Modelado matemático, *Wickerhamomyces anomalus*, *Saccharomyces cerevisiae*

INTRODUCCIÓN

La industria del mosto/vino es una de las principales de la región (INV). En el mosto existen levaduras contaminantes capaces de generar desvíos organolépticos en la producción, generando pérdidas económicas relevantes (Csoma et al. 2020). Tradicionalmente estas levaduras se controlan con SO₂, sin embargo, debido a que éste químico es considerado tóxico para la salud humana, la OMS recomienda la reducción de su uso (Ferrer-Gallego et al. 2017).

Una alternativa sustentable es el biocontrol, el cual implica usar microorganismos positivos para controlar microorganismos indeseables. En este sentido, el grupo de trabajo seleccionó y optimizó procesos de biocontrol de *Wickerhamomyces anomalus* contra diversas levaduras contaminantes (Kuchen et al. 2019, Kuchen et al. 2021, Kuchen et al. 2022).

El biocontrol ocurre en pre-fermentación y debe tener una población viable biocontroladora alta. Sin embargo, estas poblaciones altas podrían interferir en el fitness de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y generar fermentaciones detenidas o lentas indeseables (Medina et al. 2012).

Los modelos matemáticos son relevantes para cuantificar el fitness celular y parámetros que no son cuantificables en línea, muchos de ellos relacionados a las condiciones fisicoquímicas del medio, lo que nos permite hacer predicciones en zonas no exploradas.

OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es modelar la interacción de *W. anomalus* con *S. cerevisiae* bajo distintas condiciones fisicoquímicas de SO₂, Temperatura y Tiempo de co-inóculo de un diseño Box-Behnken, para generar un modelo completo y a futuro poder predecir comportamientos de co-inoculación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se tomaron datos de 15 fermentaciones con un diseño box-Behnken. Donde se hizo variar, SO₂ molecular (entre 0 y 0.2 ppm), temperatura (entre 15 y 20°C) y el tiempo de co-inoculación secuencial (0 o 1 en función de tiempo, entre 0 y 2 días).

Los datos de 20 días de los 15 experimentos con cinéticas mixtas (*W.anomalus* y *S.cerevisiae*) se analizaron con la toolbox AMIGO2 Matlab. Se sometieron ajuste de modelos

primarios de amensalismo y modelos secundarios, tipo Arrhenius, Ratkowsky y Polinomial.

RESULTADOS

Se ajustó un modelo Lotka-Volterra de competencia para la interacción ($R^2=0.82$), donde se eliminó el parámetro de influencia de W_a sobre S_c .

Sistema de ecuaciones:

$$dS_c/dt = \mu_{sc} * X_{sc} * (1 - X_{sc}/K_{sc})'$$

$$dW_a/dt = \mu_{wa} * X_{wa} * (1 - X_{wa}/K_{wa}) - tiempoCO * \alpha_{sc} * (X_{sc}/K_{wa})'$$

Submodelos:

$$\mu_{wa} = \mu_{wa1} * (1 - tiempoCO)$$

$$K_{wa} = K_{wa1} + K_{wa2} * (SO_2) + K_{wa3} * (1 - tiempoCO).$$

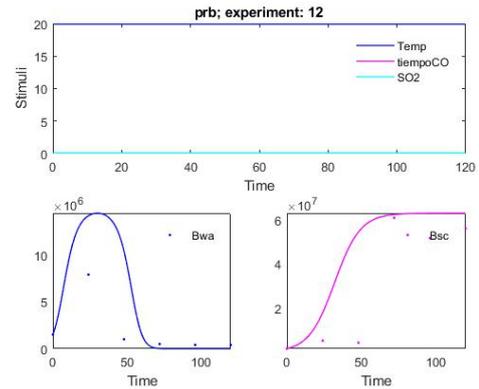
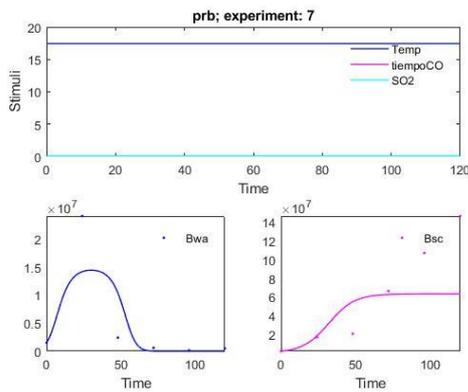
X_{sc} (cel/mL), X_{wa} (cel/mL): Población de S_c y W_a .
TiempoCO: tiempo de coinoculación. μ_{sc} (h⁻¹) y μ_{wa} (h⁻¹): velocidad de S_c y W_a . K_{sc} (cel/mL) y K_{wa} (cel/mL): Capacidad de carga de S_c y W_a . α_{sc} (cel/mL*h): Influencia de S_c sobre W_a .

Simulación: cvodes, mínimos cuadrados y optimización: eSS.

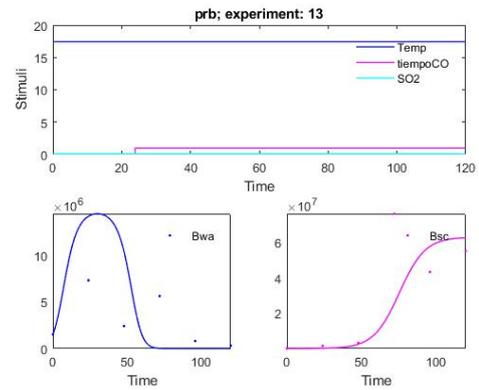
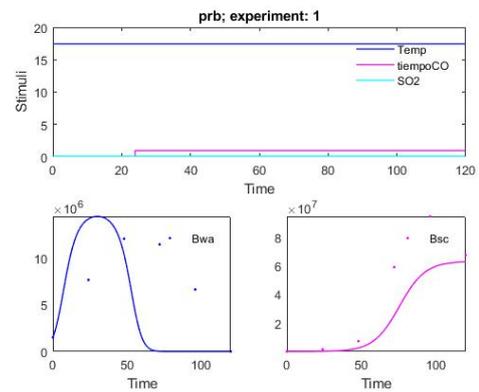
Tiempo de co-inoculación fue la variable más relevante influyendo sobre, μ_{W_a} y K_{wa} , además SO_2 influyó sobre K_{wa} .

La temperatura no influyó.

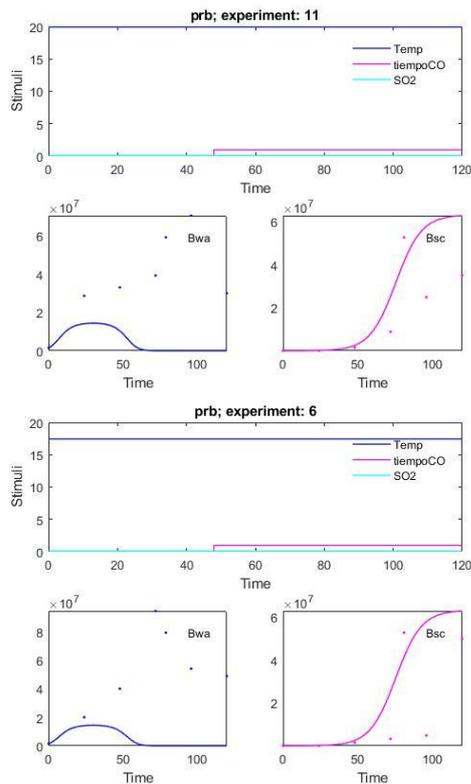
Inoculación simultanea, (mejor y peor ajuste)



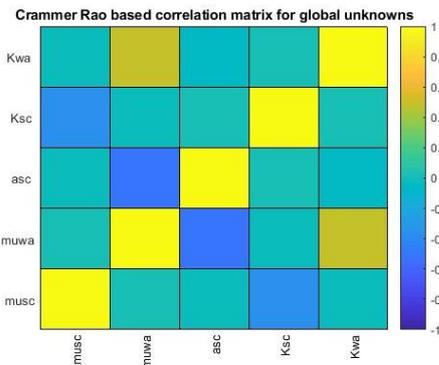
Inoculación mixta secuencial a las 24 horas, (mejor y peor ajuste)



Inoculación mixta secuencial a las 48 horas, (mejor y peor ajuste)



Correlación paramétrica



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). 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).

Por otro lado, *S. cerevisiae* 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 SO₂-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.