

Optimization of Batch Reactors: Application to the Biocontrol of Spoilage Yeasts in Wines

B. Kuchen, S. A. Garay, R. M. Gil, F. Vazquez and G. J. E. Scaglia

Abstract— In the musts of wines there are spoilage yeasts that produce negative effects on the flavor. To try to eliminate it SO_2 is used in wineries. However, this is toxic to human health and the World Health Organization (WHO) promotes an immediate reduction in its consumption. An alternative to the use of SO_2 is the addition of killer yeast to eliminate or reduce the undesirable yeast. In previous works, was found that pH is a relevant variable in controlling the population of killer yeast and, for that reason, for the growth of undesirable yeast. It improves the fitness of the killer yeast and the inhibitor. In addition, it is a manipulable variable through the organic acids allowed in wines. Moreover, a new improvement to the mathematical model is proposed, incorporating the parametric variation with pH. Likewise, the new model was simulated using Matlab for the optimization by Monte Carlo method for the minimization of the spoilage yeasts population and the maximization of the growth of the killer. The optimum value for the objectives was pH 3.98. The results of the simulation were validated experimentally. The improved model is a need for the oenology industry, it allows the spoilage yeasts control.

Index Terms— Mathematical modeling, Process optimization, Nonlinear systems, Monte Carlo method, Biological control.

I. INTRODUCCIÓN

En la elaboración del vino, durante la fermentación, pueden existir desde un comienzo levaduras contaminantes. Una de las más peligrosas es *Zygosaccharomyces rouxii* [1, 2].

Normalmente se usa el SO_2 para controlarlas. Sin embargo, este es tóxico para la salud humana y la organización mundial de la salud (OMS) insta a su inmediata reducción en el consumo [1]. Por otro lado, se han estudiado levaduras que pueden contribuir positivamente al proceso enológico, que a través de un mecanismo llamado “killer”, las cuales generan la muerte de otras levaduras, en este caso de la población de levaduras contaminantes. Un ejemplo destacado de este tipo de levaduras, son las pertenecen a la especie *Wickerhamomyces anomalus* [3, 4]. Sin embargo, el control de la población contaminante por parte de las levaduras killer ocurre durante la cinética de crecimiento y competencia de ambas poblaciones. Entonces, el medio de cultivo donde ocurre esta interacción influye significativamente [2, 5, 6].

Modelar la cinética de competencia entre levaduras permite consolidar el conocimiento del mecanismo de control, conocer los parámetros cinéticos de poblaciones y metabolitos y generar predicciones en condiciones no evaluadas [7, 8]. Los modelos de niveles de población (“population level models” o “PLMs”) son modelos simples y brindan explicaciones generales [9].

En este estudio se usa como base el modelo de Pommier [10] modificado por Kuchen et al. [11]. Se ha encontrado que el éxito del biocontrol depende fuertemente del pH [12]. El pH puede ser manipulado en el mosto y vino por el agregado de ácidos orgánicos como el ácido cítrico y el tartárico [13]. Sin embargo, el modelo de Pommier fue desarrollado para *Saccharomyces* en condiciones aerobias y no explica cómo varía la cinética de la competencia interactuante en función del cambio de pH en el inicio de la fermentación (anaeróbica) del vino [11].

La utilización de modelos previos es una práctica común para introducir mejoras [14-17]. La intención es agregar submodelos que expliquen la variación cinética en función de la variable manipulable pH. Poder controlar con levaduras *Killer* a las levaduras contaminantes disminuye la necesidad del SO_2 y por lo tanto se obtienen vinos más saludables y orgánicos, abriendo nuevos nichos de mercado. El biocontrol tiene gran relevancia en investigación, a nivel internacional, por su interés de aplicación a la industria del vino. Con esta técnica se persigue controlar la población de un organismo utilizando otro organismo y de esta manera reducir o eliminar la utilización de productos químicos nocivos para la salud, obteniendo productos más saludables y ambientalmente sostenibles.

En este trabajo se persiguen dos objetivos, primero incorporar en el modelo mejorado de Kuchen en condiciones anaeróbicas la variación paramétrica con el pH y segundo encontrar el pH

B. Kuchen, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) e Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de San Juan. Av. Lib. San Martín Oeste 1109, San Juan J5400ARL, Argentina. (e-mail: benjaminkuchen@gmail.com).

S. A. Garay, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de San Juan. Av. Lib. San Martín Oeste 1109, San Juan J5400ARL, Argentina. (e-mail: sofialejandragaray@gmail.com).

R. M. Gil, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) e Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de San Juan (UNSJ). Av. Lib. San Martín Oeste 1109, San Juan J5400ARL, Argentina. (e-mail: rocio.mariel.gil@gmail.com).

F. Vazquez, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de San Juan (UNSJ). Av. Lib. San Martín Oeste 1109, San Juan J5400ARL, Argentina. (e-mail: fvazquez@unsj.edu.ar).

G. J. E. Scaglia, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) e Instituto de Ingeniería Química, Universidad Nacional de San Juan (UNSJ). Av. Lib. San Martín Oeste 1109, San Juan J5400ARL, Argentina. (e-mail: gscaglia@unsj.edu.ar).

óptimo que permita disminuir la población de la levadura contaminante y así eliminar o disminuir la utilización de SO₂.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Experimentación de Interacción Levuriana

Se utilizaron 2 cepas, *Wickerhamomyces anomalus* 'BWa156' (Killer) y *Zygosaccharomyces rouxii* 'BZr6' (Contaminante) del cepario del Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de San Juan. Identificadas molecularmente [19]. Medios de cultivo: YPD, YPD-agar. Cultivo: Inóculo: 2*10⁶ cel/mL. Volumen de cada reactor: 250 mL con 200 mL de mosto. Relación de inoculación Killer/Contaminante: 20%/80%. Mosto de uva estéril: 23 °Brix y 3 pH diferentes: 3,2, 3,7 y 4,2 (n=3), el cual fue mantenido constante durante 10 días a 25°C. En el caso de la validación, el pH fue establecido por la optimización.

B. Modelado

El modelo matemático que expresa las características dinámicas del co-cultivo de levaduras Killer/Contaminante fue propuesto por Pommier [10]. En este modelo, la biomasa (cel/mL) está segregada en 2 variables: las viables killer " X_{vk} " (1) y las viables contaminantes " X_{vc} " (2). " X_{dk} " (3) y " X_{dc} " (4) representa la población muerta de *killer* y contaminante respectivamente. " T " (5) es la concentración de toxina *killer* en el medio de cultivo, e " I " (6) es para un inhibidor genérico indefinido para ambas levaduras (ej.: etanol, oxígeno, sustrato limitante, etc.). La evolución dinámica de cada una de las 6 variables del modelo está dada por el sistema (S).

$$\left. \begin{aligned} \frac{dX_{vk}}{dt} &= r_{vk} - r_{dk} & (1) \\ \frac{dX_{vc}}{dt} &= r_{vc} - r_{dc} & (2) \\ \frac{dX_{dk}}{dt} &= r_{dk} & (3) \\ \frac{dX_{dc}}{dt} &= r_{dc} & (4) \\ \frac{dT}{dt} &= r_{pT} - r_{aT} & (5) \\ \frac{dI}{dt} &= r_I & (6) \end{aligned} \right\} \text{Sistema (S)}$$

Las velocidades de crecimiento " r_{vk} " y " r_{vc} " (cel/h*mL) (7) y (8) se relacionan a las velocidades máximas específicas de crecimiento de cada levadura " μ_{maxk} " y " μ_{maxc} ", calculadas experimentalmente [10], y están limitadas por una inhibición general a ambas levaduras y se manifiestan en una expresión logística con parámetros de desaceleración " A_k " y " A_c " (L/g) (*killer* y contaminante, respectivamente).

$$r_{vk} = \mu_{maxk} X_{vk} (1 - A_k I) \quad (7)$$

$$r_{vc} = \mu_{maxc} X_{vc} (1 - A_c I) \quad (8)$$

La velocidad " r_I " (9) de producción del inhibidor " I " (g/L) es proporcional " a " a la velocidad de crecimiento de la biomasa total.

$$r_I = a(r_{vk} + r_{vc}) \quad (9)$$

Las tasas de muerte " r_{dk} " (10) y " r_{dc} " (11) están dadas para cada una de las especies de manera distinta. Los términos " μ_{dk} " y " μ_{dc} " son para la muerte natural de cada una de las levaduras. Además, a la velocidad de muerte de la contaminante (11) se le agrega un término de muerte causada por el efecto *killer* donde se incluye la concentración de la toxina " T " (g/L). La velocidad de muerte está definida por el parámetro " K " (L/gh).

$$r_{dk} = \mu_{dk} X_{vk} \quad (10)$$

$$r_{dc} = \mu_{dc} X_{vc} + K X_{vc} T \quad (11)$$

La velocidad de producción de la toxina " r_{pT} " (12) fue descrita como proporcional " α " (g*mL/L*cel) a la tasa de crecimiento de la levadura *killer* y la tasa de adhesión de toxina " r_{aT} " (13) (a la célula contaminante) es casi instantánea y proporcional a ambas, toxicidad " W " (mL/cel*h) y población viable contaminante.

$$r_{pT} = \alpha r_{vk} \quad (12)$$

$$r_{aT} = W X_{vc} T \quad (13)$$

La concentración de toxina " T " y la concentración de inhibidor " I " no pudieron cuantificarse, por lo que el valor de sus parámetros de producción " α " y " α " se establecieron en 1 [10, 20].

La ecuación (2) del modelo de Pommier [10] se modificó a la ecuación (14) [11]. Esta actualización contempla las velocidades de multiplicación de ambas células y la influencia en el comportamiento en condiciones estáticas del vino " β " y las velocidades de crecimiento de ambas poblaciones donde se crean parches de poblaciones de cierta continuidad fisicoquímica [21].

$$\frac{dX_{vc}}{dt} = r_{vc} - r_{dc} + Heaviside(\rho) * \beta \quad (14)$$

$$\rho = (r_{vk} - r_{vc}) \quad (15)$$

β = valor proporcional de estabilización

C. Cálculo

Todos los cálculos fueron hechos usando Matlab^R2017b (The Mathworks). La integración del Sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias se realizó utilizando el método de Runge-Kutta explícito. La estimación de parámetros se basa en una minimización de función no lineal dada por la suma ponderada de los errores al cuadrado. La que se busca minimizar seleccionando los parámetros del sistema con el método de Monte Carlo [22]. Se utilizó un método de programación cuadrática secuencial (SQP) para minimizar la suma de mínimos cuadrados ponderados. Los intervalos de confianza dados para los parámetros estimados corresponden a una región de casi invariancia del 10% de la suma de mínimos cuadrados.

D. Monte Carlo

Consiste en un algoritmo aleatorio que hace elecciones al azar para producir un resultado. Esto implica que pueda dar un índice mayor o menor sujeto a probabilidad [23]. Este es un algoritmo aleatorio que puede no encontrar el mínimo, pero la probabilidad de tal resultado es limitada. Una forma de reducir dicha probabilidad es simplemente ejecutar el algoritmo repetidamente (N veces) con opciones aleatorias independientes de los parámetros en cada momento (ver Teorema 1 de Tempo y Ishii [24]). El número de simulaciones (N) se obtiene eligiendo una exactitud ϵ y confianza δ apropiada para limitar la posibilidad de una respuesta no deseada, luego se utiliza (16) para calcular el número de iteraciones.

$$N \geq \left[\frac{\log\left(\frac{1}{\delta}\right)}{\log\left(\frac{1}{1-\epsilon}\right)} \right] \quad (16)$$

Los valores de δ y ϵ se eligieron para la precisión deseada: $\delta=0,01$ y $\epsilon=0,005$, lo que resulta en $N=1000$.

E. Mejora del Modelo y Optimización del pH

Los parámetros obtenidos a distintos pH fueron utilizados para ajustar una función polinómica que exprese su variación en el intervalo estudiado. Este fue utilizado como submodelo del modelo primario. La minimización de la población de levaduras contaminantes se planteó como un problema de optimización donde se consideraron dos índices de desempeño diferentes, Primero: Minimizar la población de la contaminante y Segundo: Maximizar la población de levadura *killer* a un tiempo fijo

III. RESULTADOS

A. Cinéticas de Biocontrol

En la Fig. 1 se observa la evolución de la cinética de competencia de la interacción antagonista *Wickerhamomyces anomalus* (*killer*) vs *Zygosaccharomyces rouxii* (contaminante) a tres pH diferentes dentro del rango utilizado en la industria del mosto/vino (3,2, 3,7 y 4,2).

Los modelos ajustaron correctamente a las interacciones ya que siempre la *killer* ajustó con una sigmoidal, R^2 adj. > 0.8 y

la contaminante una curva tipo pico, R^2 adj. > 0.8 (datos no mostrados), valores de R^2 elevados en relación a fermentaciones en condiciones estáticas (sin agitación).

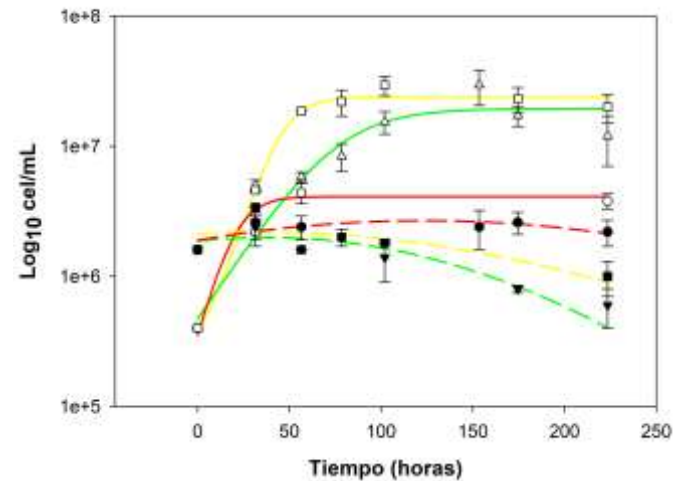
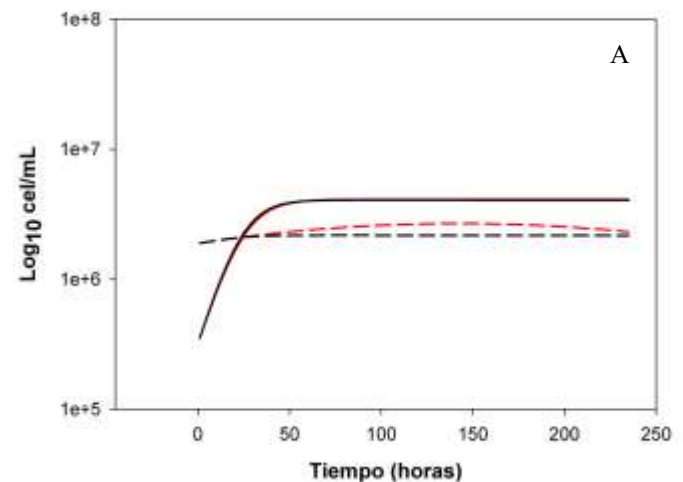


Fig. 1. Datos experimentales y ajustes de curva a cinéticas de interacción antagonista. *W. anomalus* (línea continua) vs *Z. rouxii* (línea de puntos) a tres pH diferentes: 3,2-Rojo 3,7-Verde y 4,2-Amarillo.

Se observa una disminución de la levadura contaminante pH 4,2 (amarillo) e incluso un decaimiento mayor a pH 3,7 (verde). En la interacción evaluada a pH 3,2 (rojo) se observa un aumento de la contaminante respecto de la población inicial. Respecto de la levadura *killer* se observa mayor velocidad de crecimiento (μ_{max}) y mayor población total a pH 4,2.

B. Aplicación del Modelo de Kuchen y Parámetros Obtenidos

A cada interacción obtenida en cada pH evaluado se ajustó el modelo de Pommier [10] modificado Kuchen *et al.* [11] a través del ajuste de parámetros con el método de Monte Carlo ajustados luego de 1000 iteraciones. El modelo ajustó correctamente a todas las condiciones evaluadas (Fig. 2 y Tabla 1).



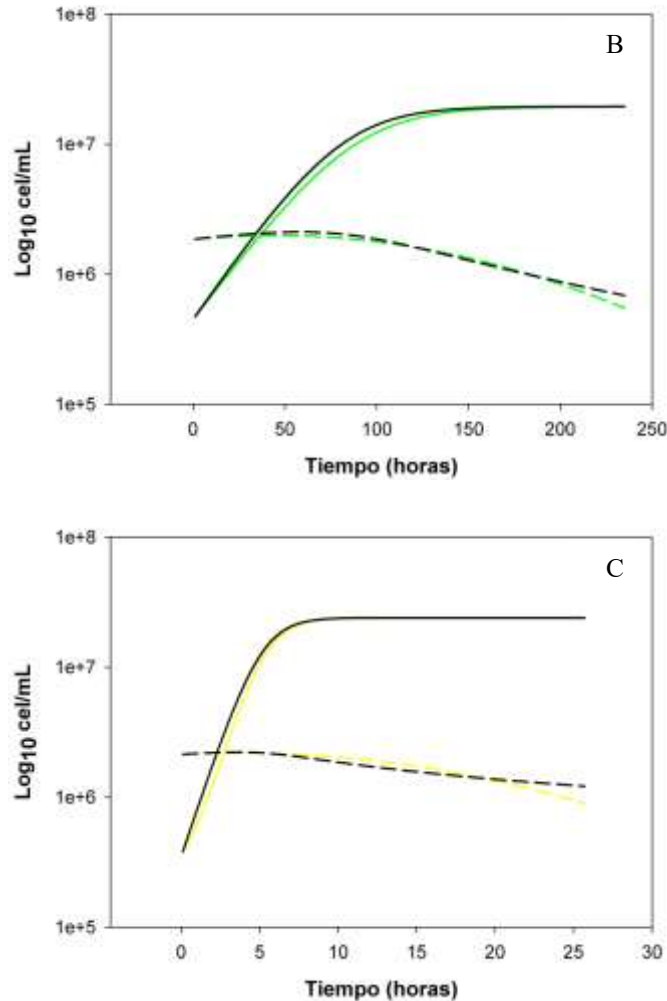


Fig. 2. Modelo de Pommier [10] modificado, ajustado a las cinéticas antagonicas de *W. anomalus* vs *Z. rouxii*. Killer: *W. anomalus*: Línea continua. Contaminante: *Z. rouxii*: Línea Discontinua. A. pH: 3,2 (Rojo), B. pH: 3,7 (Verde) y C. pH: 4,2 (Amarillo). Modelo: Negro.

TABLA I
PARÁMETROS AJUSTADOS LUEGO DE 1000 ITERACIONES DEL MODELO DE POMMIER [10] MODIFICADO A TRAVÉS DEL MÉTODO DE MONTE CARLO

Parámetro	pH		
	3,2	3,7	4,2
μ_{maxk}	0,1021	0,0470	0,0860
μ_{maxc}	0,0056	0,0034	0,0014
μ_{dk}	1,50E-05	1,50E-05	1,50E-05
μ_{dc}	1,50E-05	1,50E-05	1,50E-05
Ak	250	51	42
Ac	250	51	42
a	1,00E-09	1,00E-09	1,00E-09
α	0	0,0008	0,0008
K	0,00E+00	7,72E-07	2,70E-07
W	3,00E-09	3,00E-09	3,00E-09

* μ_{maxk} : Vel. específica de crecimiento *killer* (dato). μ_{maxc} : Vel. específica de crecimiento Contaminante (dato). μ_{dk} : Vel. específica de muerte *killer*. μ_{dc} : Vel. específica de muerte Contaminante. Ak: Proporcional de inhibición a *killer*. Ac: Proporcional de inhibición a Contaminante. a: Inhibidor general de ambas levaduras. α : Producción Toxina. K: Velocidad de asesinato. W: Velocidad de consumo de toxina.

Es relevante la ausencia de velocidad de asesinato “K” y producción de toxina “ α ” a pH 3,2, mientras que en pH 3,7 y 4,2 se observa producción de toxina y velocidad de asesinato, siendo ésta última mayor a pH 3,7.

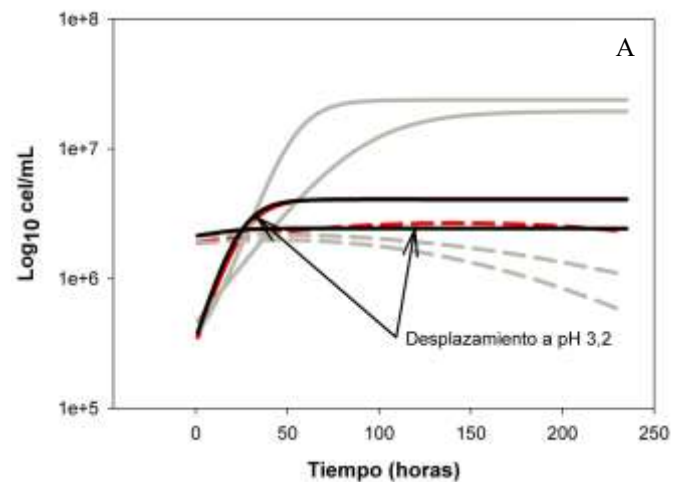
C. Submodelos e Incorporación al Modelo de Pommier

En la tabla 2 se observan los parámetros que se vieron afectados con el pH y siguieron los siguientes modelos polinómicos de variación en función del cambio de pH.

TABLA II
PARÁMETROS AFECTADOS POR LA VARIACIÓN DEL pH Y POLINOMIO DE MODELA EL EFECTO

Parámetro	Polinomio
μ_{maxk}	$f(x) = 0,1885 * pH^2 - 1,4110 * pH + 2,6872$
μ_{maxc}	$f(x) = - 0,0041 * pH + 0,0189$
Ak	$f(x) = 380 * pH^2 - 3020 * pH + 60227999$
Ac	$f(x) = 380 * pH^2 - 3020 * pH + 60227999$
K	$f(x) = - 2,548 * 10^{-6} * pH^2 + 1,912 * 10^{-5} * pH - 3,510 * 10^{-5}$
α	$f(x) = - 0,0016 * pH^2 + 0,0126 * pH + 0,0240$

Los submodelos fueron incorporados a los parámetros en el modelo de primeros principios de Kuchen et al. [11] en Matlab. El modelo modificado se aproxima efectivamente a las curvas experimentales de cada población de levadura (contaminante y *killer*) en cada condición de pH evaluada. En la Fig. 3 se observa en línea negra la predicción del modelo al ir variando el pH. En la Fig. 3-A, el modelo se ajusta a las curvas desarrolladas a pH 3,2, en la Fig. 3-B, a las desarrolladas a pH 3,7 y en la 3-C al pH 4,2.



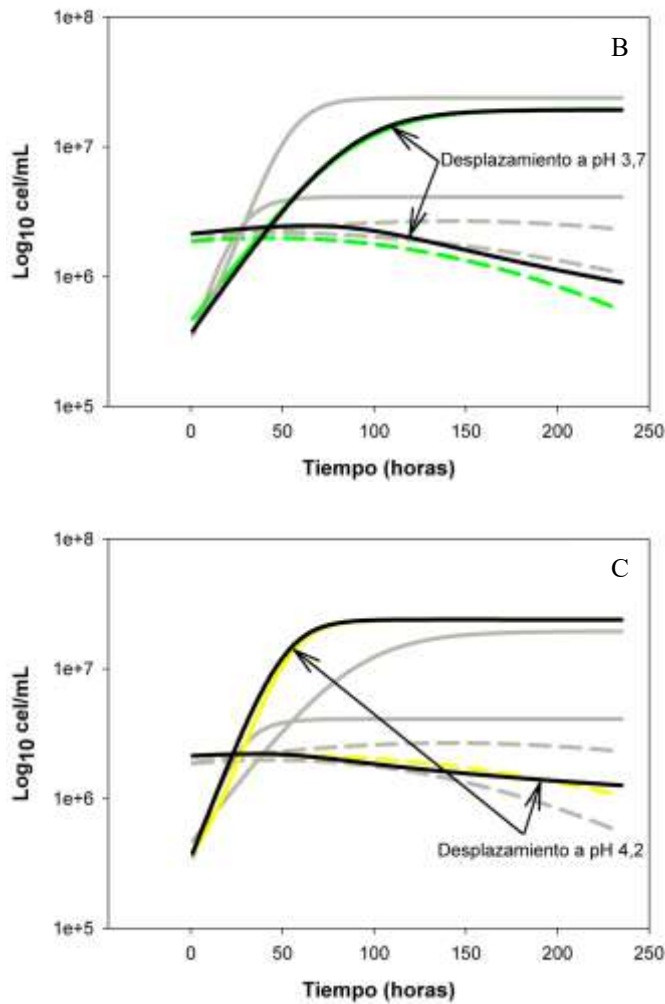


Fig. 3. A- El modelo mejorado se aproxima a la cinética de interacción de ambas levaduras a pH 3,2. B- El modelo se aproxima a la cinética de interacción de ambas levaduras a pH 3,7. C- El modelo se aproxima a la cinética de interacción de ambas levaduras a pH 4,2. Killer: *W. anomalus*: Línea continua. Contaminante: *Z. rouxii*: Línea Discontinua. A. pH: 3,2 (Rojo), B. pH: 3,7 (Verde) y C. pH: 4,2 (Amarillo). Modelo mejorado: Negro.

D. Optimización

Se consideraron dos problemas de optimización que se pueden expresar de la siguiente manera:

Problema 1: Encontrar el pH óptimo que produzca una minimización de la levadura contaminante al tiempo final de reacción, índice de desempeño J1, ecuación (17).

Problema 2: Encontrar el pH óptimo que produzca una maximización de la levadura Killer al tiempo final de reacción, índice de desempeño J2, ecuación (18).

$$J1 = \min[X_{vc}(tf)] \tag{17}$$

$$J2 = \max[X_{vk}(tf)] \tag{18}$$

tf: tiempo final de reacción

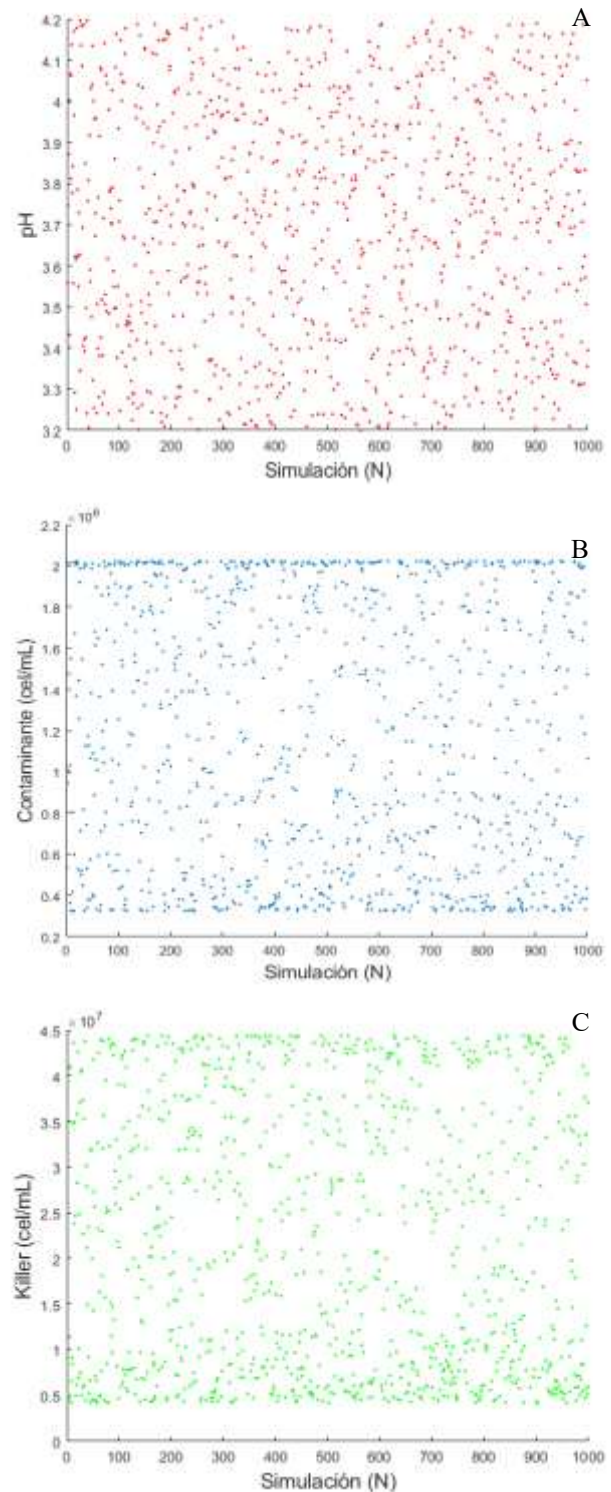


Fig. 4. Iteraciones de la Optimización con Monte Carlo. A: Variación de pH, B: Concentración de levaduras contaminantes “Xvc” *Z.rouxii* (J1) y C: Concentración de levaduras killer “Xvk” *W. anomalus* (J2).

En la Fig. 4-A se observa distribución homogénea y aleatoria de los pH evaluados. Luego, en la Fig. 4-B según la simulación, la población contaminante no superaría $2 \cdot 10^6$ cel/mL y no será menos a $3,5 \cdot 10^5$ cel/mL. Finalmente, en la Fig. 4-C se observa que la población Killer no será mayor a $4,5 \cdot 10^7$ cel/mL y no disminuiría de $0,5 \cdot 10^7$ cel/mL.

Los resultados de la simulación con Monte Carlo (Fig. 4) fueron:

J1: Ecuación (17). Mejor pH para disminuir la contaminante:
pH: 3,9853.

Población contaminante: $3,247 \cdot 10^5$ cel/mL.

J2: Ecuación (18). Mejor pH para aumentar *killer*:

pH: 3,9747.

Población *killer*: $4,443 \cdot 10^7$ cel/mL.

En la Fig. 5 se muestran las cinéticas de ambas levaduras en sus condiciones óptimas.

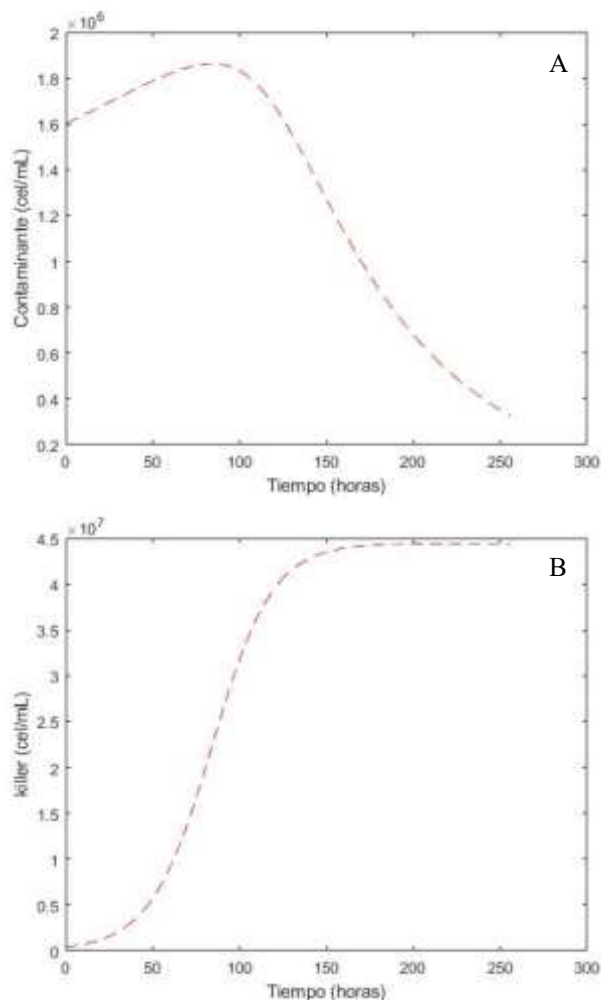


Fig. 5. A- Cinética óptima J1: Minimización final de la levadura contaminante *Z. rouxii* a pH 3.98. B – Cinética óptima J2: Maximización de levadura *killer* *W. anomalus* a pH 3.97.

E. Validación

Se realizó la validación (Tabla 3) del modelo bajo las condiciones donde establece la mejor predicción buscando un objetivo mixto, el pH utilizado fue 3,98 y con las características descriptas en los materiales y métodos.

TABLA III
DATOS VALIDACIÓN

Ensayo	POBLACIÓN <i>KILLER</i> (TF) (CEL/ML)	POBLACIÓN CONTAMINANTE (TF) (CEL/ML)
1	4,43E7	4,05E5
2	4,05E7	3,27E5
3	3,83E7	3,2E5
Promedio	4,103E7	3,506E5

Se observa una disminución de la población contaminante al tiempo final (Tabla 3) respecto de los resultados obtenidos en los valores de pH evaluados previamente (3,2, 3,7 y 4,2), por lo que se valida el resultado obtenido en la optimización del pH. Estos valores son altamente positivos porque son bajos en términos poblacionales. Por otro lado, se observa un aumento de la población *killer*, respecto del pH 4,2, donde se había obtenido la mayor población ($2,385 \cdot 10^7$ cel/mL), validando la optimización.

IV. DISCUSIÓN

A. Cinéticas y Ajustes de Modelos

En función de los antecedentes académicos, la dominancia del medio de cultivo por parte de la levadura *killer* implica el control de la contaminante [10, 14, 20, 25].

El pH, como otros factores fisicoquímicos está involucrado en la competencia de las levaduras y en la interacción entre levaduras *killer* y contaminante, también varía con el pH la eficiencia de la toxina. Tal eficiencia a su vez depende de su producción [10, 26], estabilidad [27] y adherencia de toxinas a receptores y sensibilidad de las levaduras controladas [6, 28]. Se debe tener en cuenta que para *W. anomalus* han sido descriptas tres toxinas *killer* (8, 47 y 67 KDa) [29], lo que podría redundar en diferencias en los óptimos de producción.

En función de los parámetros cinéticos calculados [30, 31], a pH 4,2 se observa un mayor fitness celular de la levadura *killer*, alcanzando altos valores de velocidad específica de crecimiento " μ_{maxk} " y población total " X_{vk} ", pero un decaimiento intermedio de la levadura contaminante. A pH 3,7 el " μ_{maxk} " es menor que la condición anterior pero la población total alcanzada por la *killer* es de orden similar, por otro lado, el decaimiento de la población contaminante es máximo. Por último, a pH 3,2 se registra un alto " μ_{maxk} " pero la población total alcanzada de la levadura *killer* es relativamente baja, además se observa la mayor población de la contaminante. Estas cinéticas de control obtenidas en función del pH son las esperadas en función de su optimización previa [12]. La velocidad máxima de crecimiento de la población *killer* está relacionada al factor pH que afecta a la competitividad entre las especies [2] o al éxito competitivo de la emisión de toxina de la *killer* [6]. En este sentido, la especie *W. anomalus* ha sido citada con óptimos de producción de toxina a pH entre 4,2 y 4,4 [27], mientras que las especies del género *Zygosaccharomyces* tienen óptimos de crecimiento en condiciones acidófilas dentro del vino [32].

El modelo propuesto por Kuchen [11] ajustó a las distintas condiciones con parámetros que son válidos, en todas las

condiciones se ajustó una curva sigmoïdal para la levadura de *killer* y una curva tipo pico para la levadura contaminante.

B. Parámetros Obtenidos y Polinomios Ajustados

Como se nombró anteriormente los $\mu_{\max k}$ y $\mu_{\max c}$ fueron calculados y fijados experimentalmente [30]. Además, los parámetros relacionados a la muerte natural " μ_{dk} ", " μ_{dc} " y el inhibidor común "a" se ajustaron en el mismo valor para todas las condiciones en relación a donde ocurrió un control menor (pH: 3,2). En el caso de " $\mu_{\max k}$ " (levadura *killer*) el polinomio que describe el parámetro en función del cambio de pH es cuadrático. Esto señala que el valor óptimo de este parámetro para la *killer W. anomalus* es cercano al rango que se está usando mientras que la contaminante *Z. rouxii* describe un ajuste lineal para " $\mu_{\max c}$ " (levadura contaminante), lo que indica que su óptimo de funcionamiento es de rango más amplio que la primera.

Por otro lado, los parámetros "Ak" y "Ac" (relacionados al modelo logístico) fueron fijados dentro de cada condición, dado que la producción de un inhibidor común está vinculada al crecimiento de ambas levaduras, alcohol en el caso de *Saccharomyces sp.* [10], pero, en este caso, podría por ejemplo ser el agotamiento del O₂, de ocupación, etc. [2]. Se puede observar que estos parámetros son de un orden mayor en la condición donde no hay interacción por toxina, lo que explica una dominancia de este factor relacionado al modelo logístico y la competencia por un sustrato limitante [33].

El trabajo se centra en los parámetros relacionados al tipo de interacción biológica de las levaduras, en este caso la interacción con toxina. El parámetro de producción de toxina " α " responde a una activación de la producción de toxina y la velocidad de muerte "K" es proporcional al pH, ambos parámetros se anulan a pH 3,2. El parámetro "K" si se toma de referencia el pH 3,7 donde ocurrió el mayor control se observa que a pH 4,2 el valor es un 65% menor. Esto es debido a que las toxinas son eficaces en un rango limitado de condiciones ambientales [34, 35]. Por otro lado, el hecho de que las velocidades de crecimiento son menores cuando se registra la mayor emisión de toxina (pH: 3,7), tiene una explicación en relación con la emisión de toxina, la cual provoca un gasto energético y una disminución del fitness celular [36].

C. Modelo Mejorado

El modelo de Pommier [10] no permitía hacer predicciones biológicamente correctas en distintas condiciones fisicoquímicas del mosto/vino [11]. La incorporación de submodelos con la influencia del pH al modelo primario permitió hacer inferencias del modelo a distintos valores de pH, incluso en condiciones no evaluadas [14], logrando un modelo que puede predecir la evolución de las poblaciones en función del pH mejor que el original y más cerca de la necesidad real de predecir el control en el sector industrial. El análisis de la significación biológica de los parámetros permitiría la adaptabilidad del modelo a distintas condiciones [10, 37], con predicciones dentro de lo biológicamente posible.

D. Optimización

En función del objetivo de la fermentación y sus condiciones de higiene, el pH puede ser manipulado para maximizar el control/reducción de la contaminante (y por ende SO₂) [13]. Por otro lado, también puede maximizar la población de *W. anomalus* y mejorar sus aportes organolépticos al mosto/vino previo a la fermentación alcohólica [4, 31, 38].

Los valores obtenidos en la validación muestran una disminución altamente positiva de la contaminante, alcanzando valores poblacionales levurianos bajos ($3,506 \cdot 10^5$ cel/mL). Estos niveles son menores que los registrados en las otras condiciones evaluadas de pH (3,2, 3,7 y 4,2) y claramente menores de lo que alcanzaría una población de *Zygosaccharomyces rouxii* sin biocontrol [1]. Además del aumento de la población biocontroladora respecto de los valores evaluados en los pH iniciales de experimentación, por lo que el modelo se ha validado correctamente. El aumento de la población biocontroladora posibilita un control prolongado sobre la contaminante y provoca su disminución incluso con influencia de variables positivas para la contaminante. La efectividad del SO₂, es altamente dependiente del pH y es inestable en el tiempo por su combinación con moléculas orgánicas.

V. CONCLUSIÓN

Se incorporó la variación de parámetros con el pH y predijo correctamente los niveles poblacionales del antagonismo *killer*/contaminante en las distintas condiciones evaluadas del mosto/vino. Previamente se probó que el pH es una variable fácilmente manipulable para la implementación del biocontrol en fermentación. Más aún, se estableció el óptimo de trabajo para dos funciones de desempeño y los valores obtenidos fueron validados experimentalmente en la validación experimental. Este trabajo hace un aporte significativo respecto de condiciones más reales del proceso de fermentación enológica empleado en bodegas, en cuanto a la aplicación de levaduras *killer* para biocontrol de contaminantes en el reactor. Además, el modelo sirvió para explicar parámetros que no son cuantificables en línea. La utilización de modelos matemáticos es la base del siguiente paso, la aplicación tecnológica del biocontrol a través de una variable manipulable como el pH, la cual no es una tarea complicada y factible de aplicar en la industria. Por otro lado, más allá del modelado y nuestro trabajo, la implementación de la técnica de biocontrol requiere más investigación sobre diversificación de los microorganismos interactuantes y experimentación en escalas de banco, piloto y producción.

AGRADECIMIENTO

Se contó con el apoyo del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), del Instituto de Biotecnología (IBT) de la UNSJ y del Instituto de Ingeniería Química (IIQ) de la UNSJ. Los autores agradecen a la bodega ENAV.SA, CUIT: 30- 69313567-9, por el suministro de muestras de mosto concentrado.

FINANCIACIÓN

Este trabajo fue apoyado por el Proyecto de Investigación Científica y Tecnológica (2016): PICT-2016-1589, Resolución N° RESOL-2017-285-APN-DANPCYT#MCT y el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de Argentina (CONICET).

REFERENCIAS

- [1] M. C. Rojo, F. N. Arroyo López, M. C. Lerena, L. Mercado, A. Torres & M. Combina, "Evaluation of different chemical preservatives to control *Zygosaccharomyces rouxii* growth in high sugar culture media", *Food Control*, vol. 50, pp. 349–355, April 2015. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.09.014>
- [2] M. Ciani, A. Capece, F. Comitini, L. Canonico, G. Siesto & P. Romano, "Yeast Interactions in Inoculated Wine Fermentation", *Front. in Microb.*, vol. 7, April 2016. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00555>
- [3] M. Fernández de Ullivarri, L. M. Mendoza & R. R. Raya, "Characterization of the killer toxin KTCf20 from *Wickerhamomyces anomalus*, a potential biocontrol agent against wine spoilage yeasts", *Biolog. Control*, vol. 121, pp. 223–228, Jun. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.03.008>
- [4] T. Nardi, "Microbial Resources as a Tool for Enhancing Sustainability in Winemaking", *Microorganisms*, vol. 8, no. 4, p. 507, April 2020. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8040507>
- [5] W. T. Starmer, P. F. Ganter, V. Aberdeen, M. A. Lachance & H. J. Phaff, "The ecological role of killer yeasts in natural communities of yeasts", *Canad. J. of Microb.*, vol. 33, no. 9, pp. 783–796, Sept. 1987. <https://doi.org/10.1139/m87-134>
- [6] P. J. Boynton, "The ecology of killer yeasts: Interference competition in natural habitats", *Yeast*, vol. 36, no. 8, pp. 473–485, Jun. 2019. <https://doi.org/10.1002/yea.3398>
- [7] F. L. Hellweger, R. J. Clegg, J. R. Clark, C. M. Plugge & J.-U. Krefl, "Advancing microbial sciences by individual-based modelling", *Nat. Rev. Microb.*, vol. 14, no. 7, pp. 461–471, Jun. 2016. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.62>
- [8] J. A. Salazar-Torres, J. C. Gonzalez, T. I. Garabullo, M. Ibanez & M. V. Chavez, "Electronic Instrumentation for the Measurement and Monitoring of Parameters Present in Conventional and Nonconventional Yeasts", *IEEE Lat. Am. Trans.*, vol. 16, no. 10, pp. 2642–2648, Oct. 2018. <https://doi.org/10.1109/tla.2018.8795145>
- [9] M. R. Evans et al., "Do simple models lead to generality in ecology?", *Trends in Ecol. & Evol.*, vol. 28, no. 10, pp. 578–583, Oct. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2013.05.022>
- [10] S. Pommier, P. Strehaieno & M. Delia, "Modelling the growth dynamics of interacting mixed cultures: a case of amensalism", *Int. J. of Food Microb.*, vol. 100, no. 1-3, pp. 131–139, April 2005. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.10.010>
- [11] B. Kuchen, Y. P. Maturano, R. M. Gil, F. Vazquez & G. Scaglia, "Kinetics and mathematical model of killer/sensitive interaction under different physicochemical conditions of must/wine: a study from a biological point of view", *Lett. App. Microb.* 2022. <https://doi.org/10.1111/lam.13657>
- [12] B. Kuchen, F. Vazquez, Y. P. Maturano, G. J. E. Scaglia, L. M. Pera & M. D. Vallejo, "Toward application of biocontrol to inhibit wine spoilage yeasts: The use of statistical designs for screening and optimisation", *OENO One*, vol. 55, no. 2, pp. 75–96, April 2021. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2021.55.2.4510>
- [13] P. Ribéreau-Gayon, D. Dubourdieu, B. Doneche & A. Lonvaud. In *Handbook of enology. Second edition*, ed. John Wiley and Sons, Chichester, UK. 2006.
- [14] A. S. Vadasz, P. Vadasz, A. S. Gupthar & M. E. Abashar, "Theoretical and experimental evidence of extinction and coexistence of killer and sensitive strains of yeast grown as a mixed culture in water", *Int. J. of Food Microb.*, vol. 84, no. 2, pp. 157–174, July 2003. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(02\)00417-8](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(02)00417-8)
- [15] G. J. E. Scaglia, M. E. Serrano & P. Albertos, "Control de trayectorias basado en álgebra lineal", *RIAI*, vol. 17, no. 4, p. 344, Sept. 2020. <https://doi.org/10.4995/riai.2020.13584>
- [16] G. Scaglia, M. E. Serrano & P. Albertos, "Linear Algebra-Based Controller – Design and Applications". Publisher: Springer International Publishing, 2020. https://doi.org/10.1007/978-3-030-42818-1_8
- [17] C. Fernandez, N. Pantano, L. Rodríguez & G. Scaglia, "Additive Uncertainty Consideration for Nonlinear and Multivariable Bioprocess Control", *IEEE Lat. Am. Trans.*, vol. 19, no. 5, pp. 798–806, Jun 2021. <https://doi.org/10.1109/tla.2021.9448314>
- [18] M. N. Pantano, M. C. Fernández, L. Rodríguez & G. Scaglia, "Dynamic optimization based on Fourier. Application to the biodiesel process". *RIAI*. 2020. <https://doi.org/10.4995/riai.2020.12920>
- [19] C. Guamán-Burneo & J. Carvajal-Barriga, "Caracterización e identificación de aislados de levaduras carotenogénicas de varias zonas naturales del Ecuador", *Univer. Scient.*, vol. 14, no. 2-3, p. 187, Jun. 2009. <https://doi.org/10.11144/javeriana.sc14-2-3.ceid>
- [20] F. Ramon-Portugal, M. L. Délia-Dupuy, H. Pingaud, G. A. Carrillo-Leroux & J. P. Riba, "Kinetic study and mathematical modelling of killer and sensitive *S. Cerevisiae* strains growing in mixed culture", *Bioprocess. Eng.*, vol. 17, no. 6, pp. 375–381, Nov. 1997. <https://doi.org/10.1007/pl00008970>
- [21] M. X. Hua, Z. Chi, G. L. Liu, M. A. Buzdar & Z. M. Chi, "Production of a novel and cold-active killer toxin by *Mrakia frigida* 2E00797 isolated from sea sediment in Antarctica", *Extremophiles*, vol. 14, no. 6, pp. 515–521, Oct. 2010. <https://doi.org/10.1007/s00792-010-0331-6>
- [22] G. Abramson, "La matemática de los sistemas biológicos", Centro atómico Bariloche, Instituto Balseiro y CONICET. Universidad Nacional de Cuyo- CNEA. 2014.
- [23] L. Chaves de Resende, R. Facion do Nascimento, W. De Sousa Sales, F. Aparecido de Assis & L. Carlos do Nascimento, "Well-Being Analysis Applied to the Study of Composite Systems Flexibility Considering Wind Energy Sources", *IEEE Lat. Am. Tra.*, vol. 19, no. 10, pp. 1640–1647, Oct. 2021. <https://doi.org/10.1109/tla.2021.9477226>
- [24] R. Tempo & H. Ishii, "Monte Carlo and Las Vegas Randomized Algorithms for Systems and Control", *Europ. J. of Control*, vol. 13, no. 2-3, pp. 189–203, Jan. 2007. <https://doi.org/10.3166/ejc.13.189-203>
- [25] R. A. Musmanno, T. Di Maggio & G. Coratza, "Studies on strong and weak killer phenotypes of wine yeasts: production, activity of toxin in must, and its effect in mixed culture fermentation", *J. of App. Microb.*, vol. 87, no. 6, pp. 932–938, Dec. 1999. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00954.x>
- [26] R. M. Sinclair, "Persistence in the shadow of killers", *Front. in Microb.*, vol. 5, July 2014. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00342>
- [27] F. Comitini, J. De Ingeniis, L. Pepe, I. Mannazzu & M. Ciani, "*Pichia anomala* and *Kluyveromyces wickerhamii* killer toxins as new tools against *Dekkera/Brettanomyces* spoilage yeasts", *FEMS Microb. Lett.* 238(1), 235-240, Oct. 2004. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.07.040>
- [28] G. Károlyi, Z. Neufeld & I. Scheuring, "Rock-scissors-paper game in a chaotic flow: The effect of dispersion on the cyclic competition of microorganisms", *J. of Theor. Biol.*, vol. 236, no. 1, pp. 12–20, Sept. 2005. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2005.02.012>
- [29] G. L. Liu, Z. Chi, G.Y. Wang, Z. P. Wang, Y. Li & Z. M. Chi, "Yeast killer toxins, molecular mechanisms of their action and their applications", *Crit. Rev. Biotech.*, vol. 35, no., pp. 222–234, Oct. 2013. <https://doi.org/10.3109/07388551.2013.833582>
- [30] S. J. Pirt, "Parameters of growth and analysis of growth data". In *Principles of Microbe and Cell Cultivation*, ed. Blackwell Scientific Publications: Hoboken, NJ, USA, 1975, pp. 4–14.
- [31] B. Kuchen, Y. P. Maturano, M. V. Mestre, M. Combina, M. E. Toro & F. Vazquez, "Selection of Native Non-*Saccharomyces* Yeasts with Biocontrol Activity against Spoilage Yeasts in Order to Produce Healthy Regional Wines", *Fermentation*, vol. 5, no. 3, p. 60, Jul. 2019. <https://doi.org/10.3390/fermentation5030060>
- [32] P. Martorell, M. Stratford, H. Steels, M. T. Fernández-Espinar & A. Querol, "Physiological characterization of spoilage strains of *Zygosaccharomyces bailii* and *Zygosaccharomyces rouxii* isolated from high sugar environments", *Int. J. of Food Microb.*, vol. 114, no. 2, pp.

234–242, March. 2007.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.09.014>

- [33] P. Dantigny, & A. Bevilacqua, "Fungal starters: An insight into the factors affecting the germination of conidia". In *Starter Cultures in Food Production*, ed. Speranza, B., Bevilacqua, A., Corbo, RM, Sinigaglia, M., John Wiley & Sons 2017, pp. 50-63.
- [34] R. McBride, D. Greig & M. Travisano, "Fungal viral mutualism moderated by ploidy", *Evolution*, vol. 62, no. 9, pp. 2372–2380, Sept. 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2008.00443.x>
- [35] B. M. Deschaine, A. R. Heysel, B. A. Lenhart & H. A. Murphy, "Biofilm formation and toxin production provide a fitness advantage in mixed colonies of environmental yeast isolates", *Ecol. & Evol.*, vol. 8, no. 11, pp. 5541–5550, April 2018. <https://doi.org/10.1002/ece3.4082>
- [36] M. D. Pieczynska, D. Wloch-Salamon, R. Korona & J. A. G. M. de Visser, "Rapid multiple-level coevolution in experimental populations of yeast killer and nonkiller strains", *Evolution*, vol. 70, no. 6, pp. 1342–1353, May. 2016. <https://doi.org/10.1111/evo.12945>
- [37] M. Zavala, R. Díaz Sierra, D. Purves, G. E. Zea & I. R. Urbieto, "Modelos especialmente explícitos". *R. Ecosistemas*, 15 (3) 2006.
- [38] C. Berbegal, M. Fragasso, P. Russo, F. Bimbo, F. Grieco, G. Spano & V. Capozzi, "Climate Changes and Food Quality: The Potential of Microbial Activities as Mitigating Strategies in the Wine Sector", *Fermentation*, vol. 5, no. 4, p. 85, Sept. 2019. <https://doi.org/10.3390/fermentation5040085>



Benjamín Kuchen is Agronomic Engineer (2015) from the Faculty of Engineering of the National University of San Juan and PhD in agronomy (2020) from the Faculty of Agronomic Sciences of the National University of Cuyo. Professor/Researcher of the Bioprocess

Engineering Chair and Research fellow from the National Council of Scientific Research (CONICET), Argentina. At this time is dedicated to research in modelling and optimizing microbial interactions. His main interest is in development of models and process optimization.



Sofía Alejandra Garay is advance student in Agronomic Engineering. Probable date of egress: November 2022. Research fellow (CIN). At this time researching on microbial interactions modelling in the must/wine.



Rocío Mariel Gil is Chemical Engineer (2014) from the Faculty of Engineering of the National University of San Juan and PhD in Chemical Engineering (2022) in the same faculty. Professor/Researcher of the Bioprocess Engineering Cathedra and Research fellow from the National Council of Scientific Research (CONICET),

Argentina. At this time, dedicated to the modelling of biogas generating processes. Her main interests in research is the optimization of process in bench bioreactors with microalgae.



Fabio Vazquez is License in Biology (1987) from the Faculty of Natural Science and Museum from La Plata, National University of La Plata, Buenos Aires. He is PhD in Natural Science (1994-1999) from the same university. He is exclusive lead Professor from the National University of San Juan since 2006. He was director from

numerous doctoral thesis and research in the Biotechnology Institute of the National University of San Juan. His research interests are related to microbial ecology, in particular with microbial interactions and their applications to biotechnological process.



Gustavo Scaglia received the Ing. degree in Electronic Engineering with orientation in Control Systems from the National University of San Juan, Argentina, in 1999. Then, the PhD in Control Systems from the National University of San Juan, Argentina, in 2006. He is a Researcher of the Council for Scientific and

Technological Research (CONICET), Argentina, since 2011. He leads different technological projects and his current scientific research at the Engineering Chemical Institute from National University of San Juan. His main interests include modeling, optimization, and trajectory tracking control of biochemical processes.