



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DE CHILE
ESCUELA DE INGENIERIA

**DISEÑO Y OPTIMIZACIÓN DE UN
MEDIO DE CRECIMIENTO DEFINIDO
PARA *OENOCOCCUS OENI* EN
CONDICIONES ENOLÓGICAS**

GUILLERMO DAVID GUTIÉRREZ HERNÁNDEZ

Tesis para optar al grado de
Magíster en Ciencias de la Ingeniería

Profesor Supervisor:
EDUARDO AGOSIN TRUMPER

Santiago de Chile, noviembre, 2015

© 2015, Guillermo David Gutiérrez Hernández



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DE CHILE
ESCUELA DE INGENIERIA

**DISEÑO Y OPTIMIZACIÓN DE UN
MEDIO DE CRECIMIENTO DEFINIDO
PARA *OENOCOCCUS OENI* EN
CONDICIONES ENOLÓGICAS**

GUILLEMO DAVID GUTIÉRREZ HERNÁNDEZ

Tesis presentada a la Comisión integrada por los profesores:

EDUARDO AGOSIN

DANIEL GARRIDO

EDMUNDO BORDEU

ALFONSO CRUZ

Para completar las exigencias del grado de
Magíster en Ciencias de la Ingeniería

Santiago de Chile, Noviembre, 2015

A Gabriela, mi querida madre

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a mi familia y amigos, sin ellos no hubiera sido posible este trabajo. Especialmente agradecer a Gabriela, mi madre, por su motivación, soporte y enseñanzas.

Agradecer al laboratorio de biotecnología en su totalidad: a Sebastián Mendoza, Pablo Cañón, Martín Cárcamo, Javiera López, Waldo Acevedo, Rodrigo Santibáñez y demás compañeros por su disposición a ayudarme, simpatía y buenos ratos entre arduos periodos de trabajo. Especialmente a Ángela Contreras que me enseñó las maestrías necesarias para trabajar en laboratorio. Y particularmente agradezco al profesor Eduardo Agosin, su paciencia, sus consejos, y su motivación por la biotecnología.

INDICE GENERAL

| | Pág. |
|---|------|
| DEDICATORIA..... | ii |
| AGRADECIMIENTOS..... | iii |
| ÍNDICE DE TABLAS..... | viii |
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | ix |
| RESUMEN..... | xiii |
| ABSTRACT..... | xiv |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 1.1. El vino..... | 1 |
| 1.2. La fermentación maloláctica en la cadena de valor del vino..... | 2 |
| 1.3. Relevancia de <i>O. oeni</i> dentro de las bacterias lácticas..... | 2 |
| 1.4. Fisiología de <i>O. oeni</i> | 3 |
| 1.5. Medios de crecimiento complejos y definidos..... | 6 |
| 1.6. Medios de crecimiento definidos para <i>O. oeni</i> | 7 |
| 1.7. Optimización de medios de crecimiento..... | 8 |
| 1.7.1. Pulsos en cultivos continuos..... | 9 |
| 1.7.2. Balance de flujos metabólicos..... | 9 |
| 1.7.3. Medios basados en la composición de la biomasa..... | 9 |
| 1.7.4. Una variable a la vez o <i>One variable at a time</i> | 9 |
| 1.7.5. Superficies de respuesta o <i>response surface methodology</i> | 10 |

| | | |
|--------|--|----|
| 1.8. | Motivación..... | 10 |
| 1.9. | Hipótesis..... | 11 |
| 2. | Objetivos..... | 12 |
| 2.1. | Objetivo general | 12 |
| 2.2. | Objetivos específicos:..... | 12 |
| 3. | MATERIALES Y MÉTODOS | 13 |
| 3.1. | Microorganismos utilizados | 13 |
| 3.2. | Medios de crecimiento | 13 |
| 3.2.1. | Medio MRS..... | 13 |
| 3.2.2. | Medio Terrade..... | 13 |
| 3.2.3. | Medio Maxo1..... | 14 |
| 3.2.4. | Medio Maxo2..... | 14 |
| 3.2.5. | Medio MaxoR | 15 |
| 3.3. | Inóculo..... | 15 |
| 3.4. | Condiciones experimentales | 16 |
| 3.5. | Protocolo de muestreo | 16 |
| 3.6. | Tratamiento de adaptación al etanol..... | 16 |
| 3.7. | Tratamientos de shock térmico..... | 16 |
| 3.8. | Determinación de masa seca | 16 |
| 3.9. | Determinación de metabolitos extracelulares..... | 17 |
| 3.10. | Modelo del metabolismo central del carbono | 19 |

| | |
|--|----|
| 3.10.1. Cálculo de tasas de formación | 18 |
| 3.10.2. Cálculo de ecuaciones de consumo..... | 21 |
| 3.11. Análisis estadístico | 22 |
| 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 23 |
| 4.1. Optimización del medio de crecimiento..... | 23 |
| 4.1.1. Confección medio Maxo1 | 23 |
| 4.1.2. Identificación de las cantidades de FAN y carbono óptimas para crecer a <i>O. oeni</i> PSU1 a través de método de Superficie de Respuesta. | 24 |
| 4.1.3. Comparación del medio diseñado con medio Terrade..... | 27 |
| 4.2. Evaluación de tratamientos para aumentar viabilidad de <i>O. oeni</i> cultivado en presencia de etanol y bajo pH..... | 29 |
| 4.3. Caracterización del crecimiento de <i>O. oeni</i> a concentraciones crecientes de etanol | 34 |
| 4.3.1. Crecimiento en medio complejo | 34 |
| 4.3.2. Crecimiento en medio definido..... | 39 |
| 5. CONCLUSIONES..... | 51 |
| 6. PERSPECTIVAS | 53 |
| 7. BIBLIOGRAFIA..... | 54 |
| ANEXOS..... | 63 |
| ANEXO A: CONFECCIÓN MEDIO MAXOR..... | 64 |
| ANEXO B: PROTOCOLO DE PREPARACIÓN DE MEDIO | 66 |
| ANEXO C: PARÁMETROS QUE DESCRIBEN EL CRECIMIENTO | |
| MICROBIANO..... | 68 |

| | |
|--|----|
| ANEXO D: BALANCES DE MASA Y PORCENTAJES DE CONSUMO | 72 |
| ANEXO E: ÍNDICES DE ELEMENTOS Y COMPUESTOS | 77 |

INDICE DE TABLAS

Pág.

| | |
|--|----|
| Tabla 1-1: Medios de crecimiento publicados para <i>Oenococcus oeni</i> (elaboración propia) | 8 |
| Tabla 3-1: Matriz estequiométrica del metabolismo central del carbono de <i>O. oeni</i> . En la parte superior de la matriz se indica el compuesto correspondiente a cada columna. Mientras que a la izquierda de la matriz se presenta la reacción de la Figura 1-2 que representa cada fila. La matriz se encuentra dividida en dos submatrices T1 y T2..... | 19 |
| Tabla 3-2: Flujos de carbono, para las reacciones del metabolismo central del carbono de <i>O. oeni</i> | 20 |
| Tabla 4-1: Niveles de los tratamientos para aumentar la viabilidad de <i>O. oeni</i> en condiciones de estrés. | 30 |
| Tabla 4-2: Ecuación estequiométrica del consumo de glucosa a distintos niveles de etanol. Concentración de etanol del medio, especificada a la izquierda. | 48 |
| Tabla 4-3: Ecuación estequiométrica del consumo de fructosa a distintos niveles de etanol. Concentración de etanol del medio, especificada a la izquierda. | 49 |
| Tabla A-1: Rendimientos en biomasa de <i>L. lactis</i> y <i>L. plantarum</i> , rendimiento seleccionado para diseñar el medio y la respectiva concentración para el medio MaxoR (elaboración propia). | 65 |
| Tabla B-1: Orden de adición de soluciones | 65 |
| Tabla E-1: Índices de compuestos y valores alpha correspondientes a los subíndices de cada fórmula (se omite el oxígeno debido a no realizar balances con él) | 77 |

INDICE DE FIGURAS

Pág.

| | |
|---|----|
| Figura 1-1: Composición [p/p] de la fracción de compuestos menores en el vino (Waterhouse, 2012). En esta fracción se esconden los responsables de la mayor cantidad de sensaciones organolépticas del vino..... | 1 |
| Figura 1-2: Red metabólica simplificada, del metabolismo central del carbono de <i>O. oeni</i> . Cada reacción se identifica por una r seguida de un número del 1 al 9.(Bartowsky, 2005; Richter, 2003; Salou, 1994)..... | 4 |
| Figura 4-1: Representación gráfica del experimento factorial 2 ² con un punto central. Los niveles de FAN ensayados fueron 900 [mg /L] y 1230 [g/L]. Los niveles de azúcares fueron 10 [g/L] (5g/L de glucosa + 5g/L de fructosa) y 40 [g/L] (20 [g/L] de glucosa + 20 [g/L] de fructosa). El medio Maxo1 inicial aparece representado por una estrella. | 25 |
| Figura 4-2: Curva de crecimiento de <i>O. oeni</i> PSU1 en Maxo1 suplementado con aminoácidos y/o hexosas. La leyenda indica la cantidad de FAN en mg/L, y la cantidad de hexosas (glucosa:fructosa en razón 1:1) en g/L de cada cultivo. El medio Maxo1 inicial aparece representado por una estrella de color negro. Desviaciones estándar corresponden a dos réplicas biológicas. | 26 |
| Figura 4-3: μ_{max} de <i>O. oeni</i> PSU1 en Maxo1 suplementado con aminoácidos y/o hexosas. El medio Maxo1 inicial aparece representado por una estrella. Desviaciones estándar corresponden a dos réplicas biológicas. | 27 |
| Figura 4-4: Crecimiento de <i>O. oeni</i> a pH 3,5 y niveles de etanol, en los medios Terrade y Maxo2. Desviaciones estándar corresponden a dos réplicas biológicas. | 28 |
| Figura 4-5: μ_{max} de medio Maxo2 y Terrade a distintas concentraciones de etanol y pH 3,5. Desviaciones estándar correspondientes a réplicas biológicas. | 28 |

| | |
|---|----|
| Figura 4-6: Representación gráfica del experimento factorial completo 2^3 . Los puntos experimentales ensayados –correspondientes a los vértices del cubo- se numeran desde E1 hasta E8. Cada eje del cubo está asociado a un tratamiento distinto, donde el nivel 0 corresponde a la ausencia del tratamiento y el nivel 1 a la aplicación del mismo (Tabla 4-1). Como ejemplo de lectura de la gráfica, el punto E8 corresponde al punto experimental donde se aplicaron los tres tratamientos. Mientras, el punto E3 corresponde al experimento donde solo se aplicó el tratamiento de adaptación a etanol. | 29 |
| Figura 4-7: Crecimiento de <i>O. oeni</i> VP41 en MaxoR, y consumo de ácido málico para cada uno de los experimentos realizados..... | 31 |
| Figura 4-8: Curvas de crecimiento para los distintos tratamientos. Desviaciones estándar correspondientes al subconjunto de experimentos donde se aplicó o no, el respectivo tratamiento. Como ejemplo, la curva de tratamiento aplicado del tratamiento shock térmico (primera gráfica a la izquierda) resulta de calcular el promedio y desviación estándar de los experimentos E5, E6, E7 y E8 correspondientes a los cuatro experimentos del diseño 2^3 donde se aplicó el tratamiento shock térmico (Figura 4-6); mientras que la curva tratamiento no aplicado resulta de calcular el promedio y desviación estándar de los experimentos E1, E2, E3 y E4. Los resultados sin agrupar se indican en la Figura 4-7..... | 32 |
| Figura 4-9: Consumo de ácido málico para los distintos tratamientos. Desviaciones estándar correspondientes al subconjunto de experimentos donde se aplicó o no, el respectivo tratamiento. Como ejemplo, la curva de tratamiento aplicado de la shock térmico resulta de calcular el promedio y desviación estándar de los experimentos E5, E6, E7 y E8 correspondientes a los cuatro experimentos del diseño 2^3 donde se aplicó el tratamiento shock térmico (Figura 4-6). Los resultados sin agrupar se indican en la Figura 4-7. | 33 |
| Figura 4-10: μ_{\max} de <i>O. oeni</i> PSU1 a distintas concentraciones de etanol, cultivada en medio MRS a pH 4,8. Desviaciones estándar corresponden a dos réplicas biológicas. | 34 |

| | |
|---|----|
| Figura 4-11: Crecimiento y consumo de sustratos de <i>O. oeni</i> PSU1 a distintas concentraciones de etanol, cultivada en medio MRS a pH 4,8. Desviaciones estándar corresponden a dos réplicas biológicas. | 35 |
| Figura 4-12: Porcentaje de consumo [g/g] de glucosa y ácido cítrico a concentraciones crecientes de etanol. Valores calculados a partir de la Ecuación D-1. Desviaciones estándar de dos réplicas biológicas..... | 36 |
| Figura 4-13: Tasas volumétrica máximas de consumo (q_{max}) [g/(L*h)] de los sustratos glucosa y ácido cítrico a concentraciones crecientes de etanol. Valores calculados a partir de la Ecuación C-4. Desviaciones estándar de dos réplicas biológicas. | 37 |
| Figura 4-14: Formación de productos de <i>O. oeni</i> PSU1, en medio MRS a concentraciones crecientes de etanol (concentraciones de etanol en [v/v]). Desviación estándar corresponde a dos réplicas biológicas..... | 38 |
| Figura 4-15: Rendimiento en ATP de glucosa y rendimiento de ATP en biomasa. Valores calculados a partir de Ecuación 3-1 y Ecuación C-2. Desviaciones estándar corresponden a dos réplicas biológicas. | 39 |
| Figura 4-16: Crecimiento de <i>O. oeni</i> PSU1 en medio definido Maxo2 a distintos niveles de etanol. Desviaciones estándar de dos réplicas biológicas. | 40 |
| Figura 4-17: μ_{max} de <i>O. oeni</i> PSU1 a distintos niveles de etanol, cultivada en Maxo2. Desviaciones estándar de dos réplicas biológicas. | 41 |
| Figura 4-18: Consumo de sustratos en <i>O. oeni</i> PSU1, cultivada en medio Maxo2 y pH 4.8 a concentraciones crecientes de etanol (Porcentajes en [v/v]). Desviaciones estándar correspondientes a dos réplicas biológicas..... | 42 |
| Figura 4-19: Porcentaje de consumo [g/g] de sustratos en <i>O. oeni</i> PSU1, cultivada en medio Maxo2 y pH 4,8 a concentraciones crecientes de etanol. Valores calculados a partir de la Ecuación D-1. Desviaciones estándar de dos réplicas biológicas. | 43 |

| | |
|--|----|
| Figura 4-20: Dinámicas de crecimiento de <i>O. oeni</i> PSU1, en medio Maxo2 pH 4.8 a concentraciones crecientes de etanol (concentraciones de etanol indicadas en los títulos [v/v]). Desviaciones estándar correspondientes a dos réplicas biológicas..... | 44 |
| Figura 4-21: Rendimientos de carbono en biomasa. Valores calculados a partir de la Ecuación C-2. Desviación estándar de dos réplicas biológicas. | 45 |
| Figura 4-22: Rendimientos de biomasa en los productos manitol, ácido láctico, ácido acético y etanol. Valores calculados a partir de la Ecuación C-2. Desviación estándar de dos réplicas biológicas. | 45 |
| Figura 4-23: Razón de consumo entre fructosa y glucosa, y razón de producción entre ácido acético y etanol. Valores calculados a partir de la Ecuación C-2. Desviación estándar de dos réplicas biológicas. | 46 |
| Figura 4-24: Balance de Carbono correspondiente a las fermentaciones en Maxo2 a pH 4,8. Valores calculados a partir de la Ecuación D-2. El CO2 producido producto del metabolismo del microorganismo, fue incluido a través de la Ecuación 3-1. Desviaciones estándar correspondientes a dos réplicas biológicas. | 47 |
| Figura 4-25: Rendimientos de ATP en biomasa. Valores calculados a partir de la Ecuación C-2. Desviación estándar de dos réplicas biológicas. | 47 |
| Figura 4-26: Rendimiento de biomasa en NAD ⁺ (Y _{NAD⁺.X}). Valores calculados a partir de la Ecuación C-2. Los valores negativos de NAD ⁺ , deben considerarse como NADH. Desviación estándar de dos réplicas biológicas. | 48 |
| Figura D-1: Representación del esquema de caja negra. Donde $C_{in,i} \left[\frac{g}{L} \right]$ corresponde a la concentración másica inicial de componente i, y $C_{out,i} \left[\frac{g}{L} \right]$ corresponde a la concentración másica final de componente i..... | 72 |

RESUMEN

La calidad de un vino está determinada en gran medida por su perfil aromático, el cual puede ser mejorado a través de la fermentación maloláctica (FML). Sin embargo, la FML es un proceso difícil de controlar ya que *Oenococcus oeni* - principal microorganismo responsable de este proceso, no ha sido estudiado suficientemente y no existe un medio de crecimiento definido (MCD) que permita caracterizar en forma rigurosa su metabolismo. En consecuencia, el objetivo del presente trabajo fue desarrollar un MCD para *O. oeni* que simule condiciones enológicas, en el que se puedan obtener cantidades importantes de biomasa y velocidades específicas de crecimiento (μ) controladas.

En este trabajo se diseñó un MCD para *O. oeni* basado en literatura. Luego, mediante un diseño de superficie de respuesta, se determinaron las concentraciones óptimas de azúcares y nitrógeno amino libre (FAN) que maximizan el crecimiento de *O. oeni* (25 [g/L] de hexosas y 1060 [mg/L] de FAN respectivamente).

Se caracterizó la respuesta de *O. oeni* en el MCD optimizado a concentraciones crecientes de etanol. La cepa *O. oeni* PSU1 alcanza, en el medio de crecimiento sin etanol y a pH 4,8, un $\mu_{\max} = 0,015$ [h^{-1}] y una concentración de biomasa máxima, $X_{\max} = 1,6$ [g MS/L]. Mientras que en condiciones enológicas (12% [v/v] etanol y pH 3,5), estos parámetros disminuyen significativamente, a $\mu_{\max} = 0,012$ [h^{-1}] y $X_{\max} = 0,65$ [g MS/L]. Adicionalmente, se determinó que a mayor concentración de etanol *O. oeni*: favorecería el consumo de fructosa por sobre el de glucosa y aumentaría la regeneración de NAD^+ a partir de la producción de manitol.

El MCD desarrollado en esta tesis permitirá llevar a cabo estudios cuantitativos sobre el metabolismo de *O. oeni* en condiciones enológicas, permitiendo mejorar la tecnología de elaboración del vino impactando positivamente sobre la calidad de este.

Palabras claves: Medio de crecimiento químicamente definido, fermentación maloláctica, balance de flujos metabólicos, *Oenococcus oeni*

ABSTRACT

Wine quality is largely determined by its aroma profile, which can be improved through malolactic fermentation (MLF). However MLF is a difficult process to control as *Oenococcus oeni*, the main microorganism responsible for this process, has not been studied enough and there is no defined culture medium that allow for rigorously characterize *O. oeni* metabolism. Consequently, the aim of this study was to develop a defined growth medium for *O. oeni* that simulates oenological conditions, which allows significant amounts of biomass, and controlled growth rates.

First of all in this study, a defined culture medium for *O. oeni* was designed based on literature. Then, using a response surface design, the optimum concentrations of carbon and free aminoacid nitrogen (FAN) to maximize the growth of *O. oeni* were determined to be 25 [g / L] of hexoses and 1060 [mg / L] of FAN, respectively.

The response of *O. oeni*, in the defined optimized culture medium, to increasing ethanol concentrations was characterized. In the culture medium without ethanol and pH 4.8, *O. oeni* PSU1 reached a specific growth rate of $\mu_{\max} = 0.015$ [h⁻¹] and a maximum biomass concentration, $X_{\max} = 1.6$ [g MS / L]. While in oenological conditions (12% [v / v] ethanol pH 3.5), these parameters decrease significantly, to $\mu_{\max} = 0.012$ [h⁻¹] and $X_{\max} = 0.65$ [g MS / L]. Additionally, the results show that, at higher ethanol concentrations: fructose consumption is favored over glucose consumption, NAD⁺ regeneration is favored via the production of mannitol.

In conclusion, the defined culture medium developed in this thesis will allow quantitative studies of *O. oeni* metabolism in oenological conditions to be carried out, thereby improving winemaking technology and positively impacting the quality of wine.

Keywords: Chemically defined growth medium, malolactic fermentation, flux balance analysis, *Oenococcus oeni*.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El vino

El vino es el producto de la fermentación alcohólica del mosto de uva. La fermentación alcohólica es llevada a cabo mayoritariamente por la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, la cual, producto de su metabolismo, consume los azúcares presentes en el mosto generando etanol, dióxido de carbono y una serie de otros compuestos responsables de muchas de las propiedades organolépticas del vino (alcoholes, esteres, cetonas, aldehídos, etc). Finalmente, el vino resultante se compone de agua 85% [v/v], etanol 12% [v/v] y otros compuestos en menor cantidad 3% [v/v] (Figura 1-1) (Waterhouse, 2012).

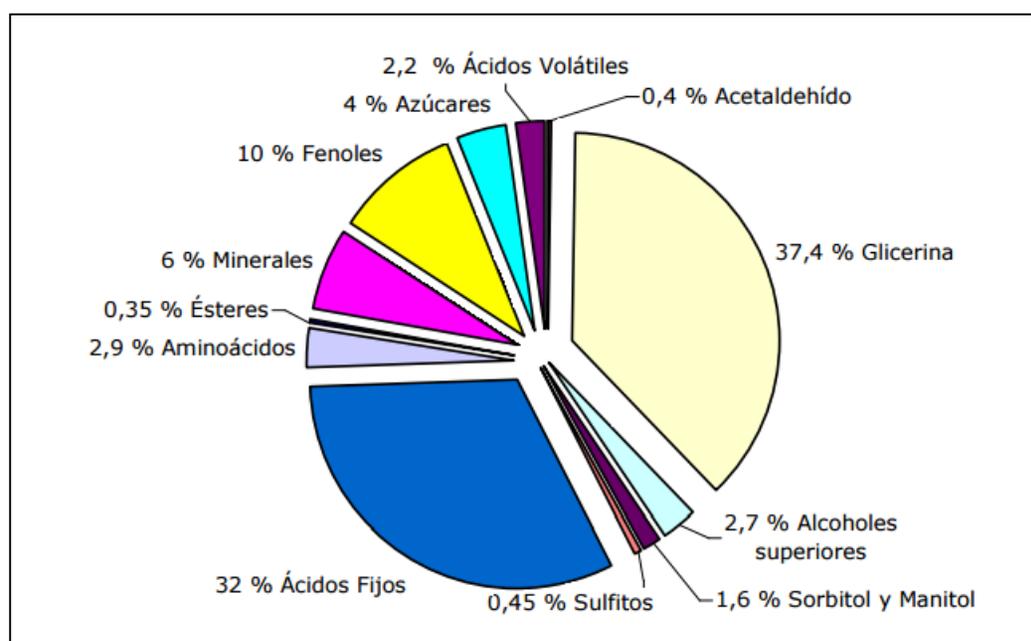


Figura 1-1: Composición [p/p] de la fracción de compuestos menores en el vino (Waterhouse, 2012). En esta fracción se esconden los responsables de la mayor cantidad de sensaciones organolépticas del vino.

1.2. La fermentación maloláctica en la cadena de valor del vino

La fermentación maloláctica (FML) constituye, luego de la fermentación alcohólica, el proceso microbiológico de mayor importancia en la elaboración de la mayoría de los vinos tintos, espumosos y ciertos vinos blancos (Swiegers y col., 2005; Terrade y col., 2009).

Este proceso ocurre como resultado del metabolismo de bacterias lácticas y consiste en la conversión de L-(+)-malato a L-(+)-lactato y CO₂, por la acción de la enzima maloláctica (MLE) (Caspritz y col., 1983).

La fermentación maloláctica (FML) influencia positivamente la calidad del vino, a través de tres fenómenos que se desprenden de la conversión de ácido málico en ácido láctico y el crecimiento de las bacterias lácticas (Bartowsky, 2005; Nadra y col., 2003). La FML disminuye la acidez del vino aumentando el pH en 0,1-0,2 unidades, lo cual se traduce en una mejor sensación en boca. Por otra parte, disminuye aromas herbáceos e incrementa aromas frutales, debido al metabolismo de bacterias lácticas que producen y consumen simultáneamente compuestos aromáticos, mejorando de esta manera las propiedades organolépticas del vino (Styger y col., 2011; Davis y col., 1986). Por último, este proceso contribuye a la estabilidad biológica del vino, debido a que las fuentes de carbono y energía residuales son consumidas por las bacterias lácticas, evitando de esta manera el crecimiento de microorganismos deterioradores del vino (Swiegers y col., 2005).

1.3. Relevancia de *O. oeni* dentro de las bacterias lácticas

Existen numerosas especies de bacterias lácticas presentes en el mosto de uva, entre éstas se destacan *Oenococcus spp.*, *Leuconostoc spp.*, *Lactobacillus spp.* y *Pediococcus spp.* (Nadra y col., 2003; Swiegers y col., 2005). Entre estas especies, *O. oeni* es reconocida por su mayor tolerancia a las condiciones estresantes presentes en el proceso de vinificación, tales como bajo pH, presencia de SO₂ y etanol (Bauer y col., 2004).

Adicionalmente, *O. oeni* es preferida por los enólogos sobre las otras bacterias ácido lácticas debido a su limitada producción de compuestos nocivos o desagradables (Bartowsky, 2005;

Lonvaud-Funel, 1999). De esta manera, debido a su mayor capacidad para adaptarse, y al desarrollo de aromas positivos en el vino, *O. oeni* es el principal microorganismo para realizar FML. Esta capacidad y preferencia se refleja también en el mercado, donde los iniciadores comerciales de FML están basados, en su mayoría, en cepas de *O. oeni* (Lerm y col., 2012).

Sin embargo, a pesar de las altas capacidades metabólicas y adaptativas de *O. oeni*, un problema frecuente en la industria vitivinícola, es la inducción de FML, la cual puede llegar a tardar meses (Bartowsky, 2005; Solieri y col., 2010; Vasserot y col., 2001).

Cabe mencionar a este nivel que *Lactobacillus plantarum*, otra bacteria láctica, ha comenzado recientemente a ser utilizada en la industria vitivinícola como iniciadora de la FML, debido a que desarrolla aromas deseables en el vino (particularmente no produce ácido acético). Sin embargo, no consigue realizar FML en forma sistemática, debido a su menor tolerancia a pH ácidos, por lo cual solo es posible utilizarla en vinos de mayor pH (Lerm y col., 2012).

1.4. Fisiología de *O. oeni*

O. oeni es una bacteria Gram Positivo que forma cadenas de 3 o 4 cocos, perteneciente al grupo de las bacterias de ácido láctico. Ésta es encontrada principalmente en las uvas y el vino (Maicas y col, 2002).

O. oeni obtiene energía desde los azúcares mediante la vía de la fermentación heteroláctica, obteniendo como principales productos metabólicos al ácido láctico, ácido acético, etanol y CO₂ (Figura 1-2).

Las tasas de producción de ácido acético y etanol en la vía heteroláctica tienen estrecha relación con la disponibilidad de NAD⁺ en la célula. Por ejemplo en caso de existir una baja disponibilidad de NAD⁺, se aumentará la producción de etanol (disminuyendo la producción de ácido acético) desde acetil fosfato para regenerar NAD⁺ (disminuyendo de esta manera la producción de ATP)(Maicas y col, 2002).

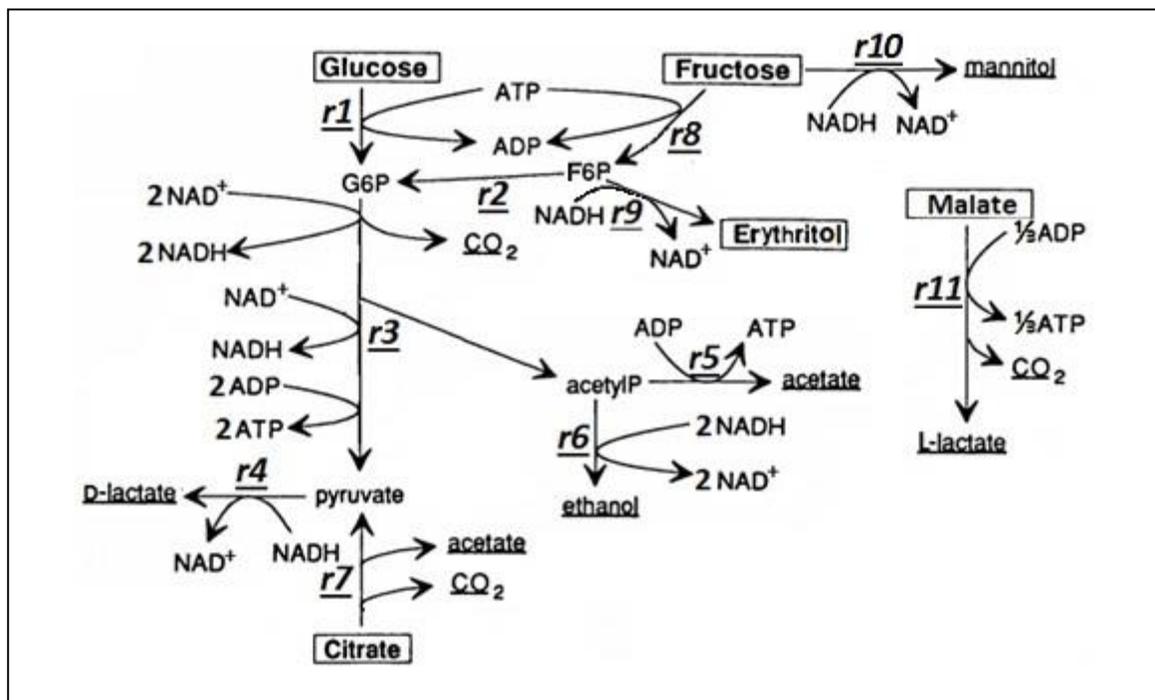


Figura 1-2: Red metabólica simplificada, del metabolismo central del carbono de *O. oeni*. Cada reacción se identifica por una r seguida de un número del 1 al 9. (Bartowsky, 2005; Richter, 2003; Salou, 1994)

O. oeni también es capaz de regenerar NAD^+ a través de la transformación de fructosa en manitol, o mediante la transformación de ácido cítrico en D-lactato. Es importante destacar la importancia de la regeneración de NAD^+ para *O. oeni*, ya que la regeneración de este cofactor se ha identificado como el paso limitante del crecimiento de *O. oeni* (Maicas y col., 2002; Miranda y col., 1997; Richter y col., 2003; Zaunmüller y col., 2006)

Adicionalmente, *O. oeni* suele ocupar como fuente energética al ácido málico. Éste lleva a cabo un importante rol en la mantención del pH interno durante la FML, ya que su consumo conlleva un aumento del pH intracelular, generando un potencial de membrana que puede ser empleado para la formación de ATP (Bartowsky y col., 2005; Olguin y col., 2010; Ramos y col., 1995; Zhang y col., 2013).

En la práctica, ribosa y mezclas glucosa:fructosa, permiten alcanzar mayores concentraciones de biomasa y μ_{\max} en *O. oeni* (Zhang y col., 2005). Sin embargo, la cantidad de ribosa y glucosa en el mosto fermentado suele ser cercana a cero mientras que la fructosa puede encontrarse en concentraciones mayores a 2 [g/L] (Berthels y col., 2004).

Adicionalmente, la presencia de los ácidos málico y cítrico sería de importancia para la viabilidad de *O. oeni* en el vino, ya que estos serían la única fuente energética y redox del microorganismo debido a que, a bajo pH (pHs enológicos), el consumo de azúcares podría estar inhibido (Bartowsky y col., 2005; Olguín y col., 2010; Ramos y col., 1995; Ramos y col., 1994; Zhang y col., 2013). Más aún, la presencia de ácido málico y/o ácido cítrico funciona como sustituto de ciertos aminoácidos pues, en presencia de estos ácidos, los requerimientos en aminoácidos disminuyen, ayudando de esta manera a sobrellevar las importantes deficiencias aminoacídicas del vino (Saguir y Manca de Nadra, 2002; Zhang, 2013). En efecto, Olguín y col. (2009) demostraron que, en presencia de etanol, al menos los genes que participan en la vía metabólica de consumo de citrato están sobreexpresados, lo que hace suponer que el consumo de citrato estaría relacionado con una respuesta de estrés al etanol. El ácido L-málico se encuentra presente en los vinos en concentraciones que varían entre 2 y 5 g/L (Bartowsky, 2005), mientras que el ácido cítrico se encuentra entre 0,1 y 0,7 g/L (Bordeu y Scarpa, 1998).

En general, los vinos – principalmente tintos – a los cuales se les aplica la FML se caracterizan por un alto contenido de etanol (< 15% v/v), bajo pH (> 2.9) y baja disponibilidad de nutrientes. Estos factores actúan de forma sinérgica, disminuyendo la viabilidad de la gran mayoría de los microorganismos presentes en este tipo de medios (Bartowsky, 2005; Saguir y col., 2002).

Más específicamente, el etanol interactúa con la membrana celular, aumentando su permeabilidad y fluidez (Carreté y col., 2002; Chu-Ky y col., 2005), lo cual afecta la posición de las proteínas de membrana (Carreté y col., 2002). Esta desconfiguración de la membrana provoca la pérdida de las propiedades de homeostasis (Chu-Ky y col., 2005) las

que, conjugadas con el bajo pH del medio, acidifican el medio intracelular y disminuyen la actividad de las ATPasas (Carreté y col., 2002).

O. oeni es capaz de adaptarse a estas condiciones adversas mediante la sobreexpresión de ciertas vías (por ejemplo las vías de consumo de ácido málico y ácido cítrico) (Augagneur y col., 2007), la variación de la composición lipídica de la membrana plasmática (aumentando la proporción de ácidos grasos insaturados, por ejemplo) (Garbay y col., 1995), y el incremento de las proteínas de membrana (Bordons y col., 2010).

Por otro lado, un factor de sobrevivencia a altas concentraciones de etanol, corresponde al ácido oleico, el cual al ser incorporado en la membrana permite disminuir la fluidez de esta. Específicamente, el ácido oleico se encuentra presente en los vinos en concentraciones cercanas a 1 [mg/L] (Guerrini y col., 2002; Olguin, 2010; Zhang y col., 2012).

Adicionalmente, cabe notar que algunos tratamientos, como el shock térmico o el cultivo de *O. oeni* en concentraciones crecientes de etanol (usualmente llamado adaptación a etanol), permiten aumentar la viabilidad del microorganismo para su cultivo en el vino. Específicamente, el shock térmico consiste en un estrés provocado por un golpe de calor, el cual induce la producción de proteínas de estrés, que regulan la composición de la membrana plasmática (Guzzo y col., 1994; Maitre y col., 2014). De forma similar, el cultivo en concentraciones crecientes de etanol induciría los mecanismos de adaptación a etanol de *O. oeni*, aumentando su viabilidad al ser inoculada en el vino (Bauer y col., 2004; Bravo y col., 2013; Olguin, 2010).

1.5. Medios de crecimiento complejos y definidos

Los medios de crecimiento complejos se caracterizan por contener nutrientes complejos, de origen biológico, tales como suero de leche, extracto de levadura o extracto de carne, entre otros, cuyas composiciones químicas no son perfectamente conocidas. Los medios definidos, por el contrario, se diseñan de forma que la concentración exacta de cada uno de sus componentes (vitaminas, minerales y demás nutrientes) es perfectamente conocida.

Normalmente, los medios definidos permiten alcanzar menores μ_{\max} que los medios complejos, al ser medios menos nutritivos. Sin embargo, para el estudio acabado y cuantitativo del metabolismo de un microorganismo es preferible el uso de un medio definido, debido a que éste permite cuantificar el metabolismo, determinando consumo, producción de metabolitos y formación de estructuras, lo cual en medio complejo resulta muy difícil (Saguir y col., 2002; Terrade y col., 2009).

En consecuencia, para poder estudiar en forma rigurosa y cuantitativa el metabolismo de un microorganismo en particular, es condición necesaria el empleo de un medio definido y optimizado que permita cuantificar el crecimiento del microorganismo de manera reproducible. Esto permite generar la cantidad de biomasa deseada para análisis posteriores y respuestas que superen significativamente el ruido inherente a los instrumentos de medición (Yee y Blanch, 1993).

1.6. Medios de crecimiento definidos para *O. oeni*

Las bacterias lácticas (BAL), en particular *O. oeni*, cuentan con exigentes requerimientos nutricionales o auxotrofías, por lo cual han sido mayoritariamente cultivadas en medios complejos (Nadra y col., 2003; Saguir y col., 2002; Terrade y col., 2009a, 2009b; Zhang, 2013).

A pesar que se han desarrollado algunos medios de crecimiento definidos para *O. oeni*, éstos no permiten el estudio del microorganismo, debido a que las μ_{\max} alcanzadas son muy bajas (Tabla 1-1) (Costello y col., 1996; Fourcassie y col., 1992; Liu y col., 1995; Remize y col., 2006; Saguir, 1996). Por otra parte, los medios definidos existentes en donde se observa crecimiento, no poseen características enológicas, como es el caso de los medios definidos de Terrade y col. (2009) y Saguir y col. (1996; 2002).

Todos los medios presentados en la Tabla 1-1 corresponden a medios definidos, con excepción del medio complejo AMRS. Como puede apreciarse, los medios con

características enológicas poseen menor concentración de biomasa máxima y μ_{\max} que los otros medios.

Tabla 1-1: Medios de crecimiento publicados para *Oenococcus oeni* (elaboración propia)

| Referencia | pH | % Etanol [v/v] | μ_{\max} [1/h] | Biomasa máxima [OD ₆₀₀] |
|--|-----|----------------|--------------------|-------------------------------------|
| (Zhang y col., 2012)* | 3,5 | 10 | 0,007 | 0,14 |
| (Terrade y col., 2009) | 4,8 | 0 | 0,120 | 1,25 |
| (Remize y col., 2006) | 5,3 | 0 | ND | 0,30 |
| (Saguir y col., 2002) | 4,8 | 0 | 0,090 | 1,24 |
| (Liu y col., 1995)* | 4,0 | 10 | 0,014 | 0,02 |
| (Liu y col., 1995)* | 3,2 | 10 | 0,007 | 0,01 |
| (Fourcassie y col., 1992) | 5,0 | 0 | ND | 0,70 |
| AMRS* (MRS suplementado con 20% [v/v] de jugo de manzana) (Terrade y col., 2009) | 4,8 | 0 | 0,092 | 1,70 |

(*)Medios que poseen características enológicas (pH 3,5 y 12% [v/v] de etanol).

1.7. Optimización de medios de crecimiento

Existen diferentes técnicas para optimizar la composición nutricional de un medio de crecimiento. Entre éstas destacan: pulsos en cultivos continuos, balances de flujos metabólicos, modelos estequiométricos, *one variable at a time* y superficies de respuesta, las cuales se describen a continuación:

1.7.1. Pulsos en cultivos continuos

Mediante quimiostato (cultivo de alimentación continua, mantenidos en un estado estacionario donde el microorganismo se encuentra creciendo a una tasa de crecimiento específica constante), se cuantifica el cambio en la tasa máxima específica de crecimiento de un microorganismo al adicionar un pulso de un nutriente. Así, si la tasa máxima específica de crecimiento del microorganismo aumenta ante la inyección de un sustrato específico, se establece que el sustrato suplementado corresponde a un sustrato limitante (Mateles y Battat, 1974; Yee y Blanch, 1993).

1.7.2. Balance de flujos metabólicos

El uso de modelos metabólicos (conjunto de ecuaciones que representan la red metabólica de un organismo) permite calcular la composición nutricional óptima del medio de crecimiento, mediante el cálculo de las tasas máximas de consumo de los nutrientes, que maximizan la tasa específica de crecimiento (Varma y col., 1994).

1.7.3. Medios basados en la composición de la biomasa

Los medios basados en la composición de la biomasa pretenden entregarle al microorganismo un medio donde la concentración de nutrientes sea proporcional a los componentes que éste necesita para crecer. Se basan en una sola ecuación (de producción de biomasa, cuyos coeficientes estequiométricos, se calculan a partir del conocimiento del metabolismo del microorganismo y su composición macromolecular. De esta manera, los coeficientes estequiométricos de cada nutriente se utilizan para diseñar el medio de crecimiento (Chiouy col., 2000; Wang y col., 2001; Zhu y col, 1996).

1.7.4. Una variable a la vez o *One variable at a time*

Este método genera comparaciones de distintos medios de crecimiento respecto a un medio de crecimiento control. Además del medio control, se realizan tantos otros medios como condiciones se quieran estudiar, variando solo un factor a la vez. Esta técnica es bastante

ineficiente en términos de tiempo y recursos, además de solo enfocarse en efectos primarios dejando de lado las interacciones entre factores que pudiesen influenciar el resultado (Mateles y Battat, 1974; Yee y Blanch, 1993).

1.7.5. Superficies de respuesta o *response surface methodology*

Se constituye del diseño factorial y análisis de regresión (Delaney y col., 2013; Lim y col., 2007; Polak y col., 2010). Usualmente, este método comienza con un *screening* que utiliza un diseño estadístico del tipo factorial fraccionado, tales como los diseños Plackett Burman o Una variable a la vez. Este proceso se realiza con el fin de determinar los factores significantes. Posteriormente, se realiza un experimento más elaborado que analiza la combinación entre factores, que permite encontrar la combinación óptima de los factores seleccionados.

1.8. Motivación

Chile es el cuarto país exportador de vinos en el mundo, alcanzando cerca del 8% del volumen del mercado mundial, siendo superado solamente por Francia, Italia y España (OIV, 2014). Sin embargo, en el mercado internacional los precios promedio de los vinos chilenos son sustancialmente más bajos que los vinos de sus competidores (Merino, 2010). De esta manera existe una necesidad por incrementar los precios de nuestros vinos a través de elevar el posicionamiento del vino chileno en el segmento premium (Soto, 2013).

En la cadena de elaboración de un vino, la fermentación maloláctica es un proceso esencial, en particular en vinos tintos. A través de este proceso es posible modular el componente aromático, disminuir la acidez del vino y evitar el deterioro del mismo, mejorando significativamente sus propiedades organolépticas (Styger y col., 2011; Davis y col., 1986; Swiegers y col., 2005).

Sin embargo, se reconoce que la fermentación maloláctica es un proceso difícil de manejar (Bartowsky, 2005; Solieri y col., 2010). El estudio sistemático de este proceso biológico, que actualmente guarda mucha incertidumbre, pretende mejorar a largo plazo el control de

la fermentación maloláctica y con ello la generación de vinos de mayor calidad y mayor valor agregado.

Oenococcus oeni es la principal bacteria láctica presente en el vino, debido a su mayor capacidad de adaptación al ambiente enológico. Esta bacteria persiste en este ambiente estresante logrando llevar a cabo la fermentación maloláctica. Por otra parte, esta bacteria desarrolla un mejor perfil aromático durante este proceso en comparación a otras bacterias lácticas, por lo que también es apreciada en la industria vitivinícola (Bartowsky, 2005).

Para llevar a cabo un estudio minucioso de un microorganismo es necesario contar con un medio de crecimiento químicamente definido, que permita alcanzar cantidades de biomasa y crecimiento significativos. Actualmente, los medios de crecimiento químicamente definidos utilizados en *O. oeni* no permiten que el microorganismo se desarrolle, alcanzando bajos niveles de biomasa, o bien, se encuentran muy alejados de las condiciones enológicas.

El siguiente estudio pretende obtener un medio de crecimiento químicamente definido que simule las condiciones enológicas, en el cual *O. oeni* sea capaz de crecer en forma consistente.

1.9. Hipótesis

La identificación de los compuestos limitantes y/o inhibitorios del crecimiento de *O. oeni* y posterior control de su presencia permitiría el diseño de un medio de crecimiento definido, que simule las condiciones enológicas, y que permita el crecimiento reproducible de *O. oeni*, facilitando así el estudio cuantitativo de su metabolismo

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

El objetivo general de este trabajo es diseñar un medio de crecimiento definido que permita optimizar el crecimiento de *O. oeni* en condiciones enológicas.

2.2. Objetivos específicos

Los objetivos específicos de esta tesis son los siguientes:

Diseñar un medio de crecimiento que permita el crecimiento de la bacteria *Oenococcus oeni* en condiciones enológicas.

Definir un protocolo de cultivo para crecer el microorganismo en condiciones enológicas.

Caracterizar el crecimiento del microorganismo en medio definido y complejo a distintas concentraciones de etanol y determinar los rendimientos en biomasa.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Microorganismos utilizados

Se utilizaron las cepas bacterianas *Oenococcus oeni* PSU-1 (Lallemand) y *O. oeni* VP41 (Lallemand), mantenidas a -80°C en medio MRS suplementado en cisteína (0,5 g/L) y 15% v/v de glicerol.

3.2. Medios de crecimiento

Los medios se prepararon acorde al protocolo de preparación de medios definido en el estudio (Anexo: Protocolo de preparación de medio) y luego se esterizaron por filtración (excepto si se especifica lo contrario). El pH del medio fue ajustado con una solución concentrada de HCl o NaOH, según corresponda. El pH inicial del medio se indica en cada experimento específico. Los compuestos químicos utilizados fueron de grado analítico y adquiridos por medio de Sigma-Aldrich (St Louis, EEUU) o Winkler (Santiago, Chile).

3.2.1. Medio MRS

El medio complejo desarrollado por De Man y col. (1960) para el cultivo de bacterias lácticas, se utilizó con la siguiente composición en g/L: extracto de carne- 10; extracto de levadura- 5; proteosa peptona- 10; glucosa anhidra- 20; MgSO₄*7 H₂O- 0,2; MnSO₄*4 H₂O- 0,05 ; Tween 80*- 1(ml/L); acetato de sodio- 5; citrato de amonio- 2. Adicionalmente, el medio MRS se suplementó con 0,5 g/L de L-cisteína. El medio se ajustó a pH 4,8 con HCl y luego se esterilizó por autoclavado.

Cabe decir, que Tween 80, es un derivado del sorbitano con ácido oleico, el cual en medios de crecimiento se utiliza como fuente de ácidos grasos, como un equivalente del ácido oleico.

3.2.2. Medio Terrade

El medio desarrollado por (Terrade y col., 2009) se preparó como lo describen sus autores. Su composición se lista a continuación en g/L: ribosa- 10; alanina- 0,2; arginina- 0,75; ácido

aspártico- 0,35; asparagina- 0,15; cisteína- 0,2; ácido glutámico- 0,5; glutamina- 0,2; glicina- 0,5; histidina- 0,5; isoleucina- 0,2; leucina- 0,2; lisina- 0,25; metionina- 0,15; fenilalanina- 0,2; prolina- 0,5; serina- 0,4; treonina- 0,35; triptófano- 0,2; tirosina- 0,2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ - 0,1; valina- 0,2; $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ - 0,1; CaCl_2 - 0,44; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ - 0,000135; $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ - 0,02; $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ - 0,000015; K_2HPO_4 - 1; ácido fólico- 0,002; ácido nicotínico- 0,002; colina- 0,002; tiamina- 0,001; piridoxina- 0,02; biotina- 0,002; riboflavina- 0,002; Ca-D- pantotenato- 0,002; ácido aminobenzoico- 0,0001; cianocobalamina- 0,0001; xantina- 0,005; adenina- 0,01; uracilo- 0,01; citosina- 0,002; timina- 0,01; guanina- 0,01.

3.2.3. Medio Maxo1

La confección de este medio, se detalla más adelante, en Resultados y discusión. Su composición se lista a continuación en g/L: ácido málico- 5; ácido cítrico- 1,46; fructosa- 5; glucosa- 5; alanina- 0,17; arginina- 0,34; ácido aspártico- 0,26; asparagina- 0,25; cisteína- 0,46; ácido glutámico- 0,28; glutamina- 0,42; glicina- 0,23; histidina- 0,45; isoleucina- 0,25; leucina- 0,25; lisina- 0,28; metionina- 0,29; fenilalanina- 0,32; prolina- 0,57; serina- 0,2; treonina- 0,23; triptófano- 0,39; tirosina- 0,35; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ - 0,3; valina- 0,23; $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ - 0,3; CaCl_2 - 0,44; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ - 0,000675; $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ - 0,06; $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ - 0,000075; K_2HPO_4 - 2; ácido fólico- 0,01; ácido nicotínico- 0,01; colina- 0,01; tiamina- 0,005; piridoxina- 0,01; biotina- 0,01; riboflavina- 0,01; Ca-D- pantotenato- 0,01; ácido aminobenzoico- 0,0005; cianocobalamina- 0,0005; xantina- 0,025; adenina- 0,05; uracilo- 0,05; citosina- 0,01; timina- 0,05; guanina- 0,05; Tween 80- 0,001.

3.2.4. Medio Maxo2

Este medio fue diseñado en base a un experimento de superficie de respuesta, a partir del medio Maxo1. Su diseño se detalla más adelante, en Resultados y discusión.

El medio Maxo2 se diferencia de Maxo1 en la concentración de aminoácidos y los azúcares glucosa y fructosa. Su composición se lista a continuación en g/L: ácido málico- 5; ácido cítrico- 1,46; fructosa- 12,5; glucosa- 12,5; alanina- 0,2; arginina- 0,4; ácido aspártico- 0,3;

asparagina- 0,3; cisteína- 0,54; ácido glutámico- 0,33; glutamina- 0,5; glicina- 0,27; histidina- 0,53; isoleucina- 0,3; leucina- 0,3; lisina- 0,33; metionina- 0,34; fenilalanina- 0,37; prolina- 0,67; serina- 0,24; treonina- 0,27; triptófano- 0,46; tirosina- 0,41; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ - 0,3; valina- 0,27; $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ - 0,3; CaCl_2 - 0,44; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ - 0,000675; $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ - 0,06; $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ - 0,000075; K_2HPO_4 - 2; ácido fólico- 0,01; ácido nicotínico- 0,01; colina- 0,01; tiamina- 0,005; piridoxina- 0,01; biotina- 0,01; riboflavina- 0,01; Ca-D-pantotenato- 0,01; ácido aminobenzoico- 0,0005; cianocobalamina- 0,0005; xantina- 0,025; adenina- 0,05; uracilo- 0,05; citosina- 0,01; timina- 0,05; guanina- 0,05; Tween 80- 0,001.

3.2.5. Medio MaxoR

Este medio fue diseñado en base a rendimientos obtenidos desde literatura (Anexo: Confección medio MaxoR).

La composición del medio MaxoR se lista a continuación en g/L: ácido málico- 5; ácido cítrico- 1,46; fructosa- 15; alanina- 0,1; arginina- 0,5; ácido aspártico- 0,38; asparagina- 0,35; cisteína- 0,5; ácido glutámico- 0,7; glutamina- 0,2; glicina- 0,11; histidina- 0,5; isoleucina- 1,02; leucina- 2,36; lisina- 0,14; metionina- 0,26; fenilalanina- 0,19; prolina- 0,12; serina- 2,68; treonina- 0,48; triptófano- 0,01; tirosina- 0,24; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ - 0,3; valina- 0,98; $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ - 0,3; CaCl_2 - 0,44; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ - 0,000405; $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ - 0,06; $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ - 0,000045; K_2HPO_4 - 2; ácido fólico- 0,01; ácido nicotínico- 0,01; colina- 0,01; tiamina- 0,005; piridoxina- 0,01; biotina- 0,01; riboflavina- 0,01; Ca-D-pantotenato- 0,01; ácido aminobenzoico- 0,0005; cianocobalamina- 0,0005; xantina- 0,025; adenina- 0,05; uracilo- 0,05; citosina- 0,01; timina- 0,05; guanina- 0,05.

3.3. Inóculo

Los preinóculos se prepararon en medio MRS, suplementados en cisteína (0,5 g/L), pH 4,8, en matraces de 250 mL y un volumen de trabajo de 150 mL. La temperatura de incubación y la agitación correspondieron a 30°C y 200 rpm, respectivamente. Antes de inocular el medio en estudio, se realizaron dos lavados del preinóculo con agua estéril (centrifugando 3

minutos a 4.000 rpm para coleccionar las células) para luego inocular un volumen de preinóculo suficiente para alcanzar una biomasa inicial, expresada en unidades de densidad óptica medida a 600 nm, de $OD_{600} = 0,2$.

3.4. Condiciones experimentales

Los experimentos se llevaron a cabo con un volumen de trabajo de 75 mL en matraces Erlenmeyer de 150 mL), sin agitación y a 25°C, todos ellos realizados por duplicado.

3.5. Protocolo de muestreo

Los experimentos se muestrearon diariamente, coleccionando dos mL de muestra para medir OD_{600} . Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 10.000 rpm por 2 minutos, guardando el sobrenadante a -20°C hasta su análisis.

3.6. Tratamiento de adaptación al etanol

El tratamiento de adaptación a etanol consistió en cultivos secuenciales en medio MRS (suplementado con cisteína 0,5 g/L) con concentraciones crecientes de etanol (0, 1, 4 y 8% v/v respectivamente). El traspaso de un cultivo al siguiente se realizó al duplicarse la OD_{600} en el cultivo respectivo, partiendo de un inóculo inicial de $OD_{600} = 0,1$. El proceso de adaptación a etanol dura aproximadamente dos semanas en total.

3.7. Tratamientos de shock térmico

El tratamiento de shock térmico consistió en incubar *O. oeni* en el preinóculo durante una hora a 42°C, de forma previa al proceso de inoculación, como se especifica en el trabajo realizado por Guzzo y col. (1994).

3.8. Determinación de masa seca

La densidad celular fue determinada mediante mediciones de OD_{600} con un espectrofotómetro Shimadzu UV-160 (Kyoto, Japón). Las muestras celulares fueron diluidas

con agua, tal que se obtuviera una OD₆₀₀ entre 0,1 y 0,6. Posteriormente, se utilizó una curva de calibrado estándar para convertir la medición de OD₆₀₀ a gramos de masa seca por litro (g MS/L).

La curva de calibrado estándar se confeccionó a partir de 6 puntos (OD₆₀₀, g MS/L), obteniendo la relación: (g MS/L) = 0,8105*(OD₆₀₀) + 0,0104.

Filtros de éster de acetato de 0,22 [µm] (Whatman), previamente hidratados con una gota de agua y secados hasta peso constante, fueron utilizados para filtrar 30 mL de muestra de cultivos de *O. oeni*. Luego de filtrar la muestra, el filtro fue lavado con 30 mL de agua miliQ para luego ser secado hasta peso constante en una balanza equipada con luz infrarroja para secado (Precisa, Switzerland), obteniendo de esta manera los [g MS/L].

Los gramos de biomasa seca por litro (g MS/L) se estimaron a partir de una curva de calibración de masa seca en función del OD₆₀₀, confeccionada con al menos 6 puntos (OD₆₀₀, g MS/L).

3.9. Determinación de metabolitos extracelulares

Inmediatamente antes del análisis, las muestras se filtraron a través de filtros de 0,22 [µm]. De cada sobrenadante, se inyectaron 20 µL en el sistema HPLC LaChrom L-7000 (Hitachi, Japón). Ácidos orgánicos, alcoholes y azúcares fueron separados en una columna de intercambio iónico Aminex HPX-87p (Bio-Rad, EEUU), a un flujo de 0,45 [ml/min] de H₂SO₄ 5 [mM] como fase móvil. Los ácidos orgánicos (cítrico, málico y ácido acético) fueron cuantificados utilizando un detector de arreglo de diodos (DAD) modelo LaChrom L-7450 (Hitachi, Japón) a una longitud de onda de 210nm. Los azúcares (glucosa y fructosa) y alcoholes (glicerol, etanol y eritritol) fueron analizados en un detector de índice de refracción LaChrom L-7490 (Hitachi, Japón). Las concentraciones de los compuestos fueron determinadas de forma automática por el software del sistema de HPLC, utilizando una curva de calibración realizada con concentraciones conocidas.

Adicionalmente, para la medición de aminoácidos, de cada muestra, se inyectaron 20 uL en el sistema UHPLC–MS Ultimate 3000 (ThermoScientific, EEUU). Los compuestos fueron separados a través de la columna de intercambio iónico RP-18 (LiChrospher®, Germany) a flujo 0,35 [ml/min] con las fases móviles A (0,1% [v/v] ácido fórmico en agua) y B (metanol 100% [v/v]), donde en una corrida de 20 minutos, los primeros 15 minutos el flujo es 90% fase móvil A y 10% fase móvil B, luego, los 5 minutos restantes de la corrida, el flujo es 100% fase B. Los compuestos fueron analizados utilizando un detector de masa Exactive plus Orbitrap (Thermoscientific, EEUU).

Particularmente, las concentraciones de ácido L-láctico y ácido L-málico correspondientes al apartado Evaluación de tratamientos para aumentar viabilidad de *O. oeni* cultivado en presencia de etanol y bajo pH (ver Resultados y Discusión), fueron determinadas mediante los kit enzimáticos k-late y k-limar (Magazine, Irlanda), respectivamente.

Adicionalmente, las concentraciones de D-fructosa, correspondientes a los apartados Evaluación de tratamientos para aumentar viabilidad de *O. oeni* cultivado en presencia de etanol y bajo pH y Caracterización del crecimiento de *O. oeni* a concentraciones crecientes de etanol (ver Resultados y Discusión), fueron determinadas mediante el kit enzimático k-frugal (Magazine, Irlanda).

3.10. Modelo del metabolismo central del carbono y balance de flujos metabólicos.

3.10.1. Cálculo de tasas de formación

Para calcular la producción y balance de cofactores se desarrolló un modelo del metabolismo central del carbono. El modelo se basó en la red metabólica simplificada representada en la Figura 1-2. La matriz estequiométrica (Tabla 3-1) derivada del modelo posee un número de condición de 6.9 (<100), indicando que los valores de los flujos estimados son precisos, incluso ante altas variaciones de los valores de entrada.

Tabla 3-1: Matriz estequiométrica del metabolismo central del carbono de *O. oeni*. En la parte superior de la matriz se indica el compuesto correspondiente a cada columna. Mientras que a la izquierda de la matriz se presenta la reacción de la Figura 1-2 que representa cada fila. La matriz se encuentra dividida en dos submatrices T1 y T2.

| | ácido | fructosa | glucosa | citrato | etanol | Acetato | manitol | D-lactato | eritritol | F6P | G6P | acetil P | piruvato | CO2 | NAD+ | ATP | I -lactato |
|-----|-------|----------|---------|---------|--------|---------|---------|-----------|-----------|-----|-----|----------|----------|-----|------|-----|------------|
| r1 | 0 | 0 | -1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | -1 | 0 |
| r2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | -1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| r3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | -1 | 1 | 1 | 1 | -3 | 2 | 0 |
| r4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | -1 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| r5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | -1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| r6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | -1 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 |
| r7 | 0 | 0 | 0 | -1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| r8 | 0 | -1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | -1 | 0 |
| r9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | -1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| r10 | 0 | -1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| r11 | -1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0,3 | 1 |

Las tasas de formación y consumo de compuestos se calculan a partir de la Ecuación 3-1

$$T^t * v = r$$

Ecuación 3-1

Donde,

T^t Matriz estequiométrica transpuesta

$v \left[\frac{mol}{L} \right]$ Vector de flujos de las diferentes reacciones

$r \left[\frac{mol}{L} \right]$ Vector de tasas de formación y consumo de los productos y sustratos

El vector de flujos de las diferentes reacciones v se calcula a partir la expresión Ecuación 3-2.

$$T_1^t * v = r_1 \quad \leftrightarrow \quad v = T_1^{t^{-1}} * r_1 \quad \text{Ecuación 3-2}$$

Donde,

T_1 Submatriz de T, correspondiente a los compuestos cuyas tasa de formación son conocidas.

$v \left[\frac{mol}{L} \right]$ Vector de flujos de las diferentes reacciones

$r_1 \left[\frac{mol}{L} \right]$ Tasas de formación conocidas.

El vector v (Tabla 3-2), se determina a través de la matriz T1(Tabla 3-1) y la Ecuación 3-2.

Tabla 3-2: Flujos de carbono, para las reacciones del metabolismo central del carbono de

O. oeni

$$v \left[\frac{mol}{L} \right] = \begin{bmatrix} v_1 \\ v_2 \\ v_3 \\ v_4 \\ v_5 \\ v_6 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \text{Consumo de glucosa} \\ \text{Consumo de fructosa menos la producción de manitol y eritritol} \\ \text{Consumo de glucosa más fructosa menos la producción de eritritol y manitol} \\ \text{Producción de D-lactato} \\ \text{Producción de acetato, menos el consumo de ácido cítrico} \\ \text{Producción de etanol} \end{bmatrix}$$

| | |
|----------|--|
| v_7 | Consumo de ácido cítrico |
| v_8 | Consumo de fructosa menos la producción de manitol |
| v_9 | Producción de eritritol |
| v_{10} | Producción de manitol |
| v_{11} | Consumo de ácido málico |

Finalmente, conociendo v , a partir de la Ecuación 3-2 es posible calcular el consumo y producción de otros compuestos de interés como las coenzimas NAD^+ , ATP o el dióxido de carbono. Por lo que luego será posible calcular rendimientos de ATP o NAD^+ en biomasa o glucosa, a partir de la Ecuación C-2 y Ecuación C-3

3.10.2. Cálculo de ecuaciones de consumo

Para calcular las ecuaciones estequiométricas del consumo de glucosa y fructosa, se supuso que el consumo de estos sustratos obedecería a la red metabólica simplificada presentada en la Figura 1-2.

De esta manera el cálculo del coeficiente estequiométrico de cada compuesto para la ecuación (de consumo de glucosa o fructosa, se calculó mediante la Ecuación 3-3.

$$\text{Coeficiente estequiométrico del compuesto } i = - \frac{\sum_{j=J} ((v_j - v_z) * T_{ij}^t)}{\sum_{j=J} ((v_j - v_z) * T_{hj}^t)} \quad \text{Ecuación 3-3}$$

Donde,

$v_j \left[\frac{\text{mol}}{\text{L}} \right]$ Flujo de la reacción j

$v_z \left[\frac{\text{mol}}{\text{L}} \right]$ Flujo de la reacción z. Si $z=0$, por definición $v_z=0$. El índice z es igual a cero a menos que se explicite lo contrario.

T_{ij}^t Coeficiente ubicado en la fila i, y columna j de la matriz estequiométrica transpuesta

- J* Valores de los índices de las reacciones que son alcanzables desde glucosa o fructosa, tomando en consideración la direccionalidad de la red.
- z* Valor del índice de la reacción que introduce flujo desde otra vía, a la reacción *j*
- h* Índice del compuesto por el cual se quiere normalizar la ecuación

Específicamente, para glucosa $J=1,3,4,5,6$; $h=3$ y $z=7$ (si $J=4$), $z=2$ (si $J=3$).
Mientras que para fructosa $J=2,3,4,5,6,8,9,10$; $h=2$ y $z=7$ (si $J=4$), $z=1$ (si $J=3$).

3.11. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo usando el programa XLSTAT versión 2015.1 (Addinsoft, EEUU). El test estadístico utilizado correspondió al test no paramétrico de las medianas de Mood. Las diferencias significativas fueron determinadas bajo un nivel de significancia de 5% ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Optimización del medio de crecimiento

Las técnicas clásicas de optimización para la generación de medios de crecimiento – ver más arriba - no son aplicables a *O. oeni*. Por ejemplo, no existe aún un modelo metabólico de *O. oeni* que permita optimizar el medio a través del balance de flujos metabólicos; por otro lado, no se ha descrito la composición de biomasa de *O. oeni* o un microorganismo cercano como para optimizar el medio a partir de su composición; y finalmente, el empleo de cultivos continuos es poco realista, ya que para alcanzar el estado estacionario en este tipo de cultivo se requieren al menos cinco tiempos de residencia en el reactor ($1/\mu$) y, considerando el bajo μ_{\max} de *O. oeni* en condiciones enológicas ($\mu_{\max} = 0.0072$ [1/h], (Zhang y col., 2012)), el tiempo necesario para alcanzar el estado estacionario en cultivo continuo sería de 694 horas, es decir aproximadamente 29 días. De esta forma, en el presente trabajo, no fue factible implementar el método de pulsos en cultivo continuo.

En consecuencia se realizó un experimento de superficie de respuesta variando los niveles de carbono y nitrógeno, ocupando como punto inicial, el medio Maxo1, una versión modificada del medio diseñado por Terrade y col (2009).

4.1.1. Confección medio Maxo1

La concentración de vitaminas y minerales presentes en el medio de crecimiento Maxo1, corresponde a tres veces la concentración del medio diseñado por Terrade y col. (2009), con el fin de evitar limitaciones del crecimiento debido a éstas. Se utilizaron datos de literatura para verificar que las concentraciones de zinc y cobre no inhibieran el crecimiento del microorganismo (Mesas, y col., 2004).

Las fuentes de carbono y energía fueron seleccionadas en función de los compuestos presentes en mayor concentración en el vino, y de la contribución de éstos al incremento de la viabilidad del microorganismo en condiciones enológicas (alto nivel de etanol y bajo pH). De esta manera, las fuentes de carbono presentes en Maxo1 fueron fructosa, glucosa, ácido

málico y ácido cítrico. Pese a que las concentraciones de glucosa en el vino son cercanas a cero, se incluyó fructosa y glucosa en razón 1:1 debido a que esta mezcla produciría mayor biomasa y mayores μ en *O. oeni*. Los ácidos orgánicos fueron seleccionados debido a la importancia de estos compuestos en la respuesta al estrés de etanol en *O. oeni*, y además, por encontrarse en cantidades importantes en el vino. Las concentraciones elegidas para glucosa, fructosa, ácido málico y ácido cítrico fueron 5, 5, 5 y 1,5 [g/L], respectivamente. A partir de datos de la literatura, se verificó que estas concentraciones no inhibieran el crecimiento del microorganismo (Augagneur y col., 2007; Ferrer y col., 2001; Mesas y col., 2004; Olguin, 2010; Saguir y col., 1996; Salou y col., 1991).

Los aminoácidos se añadieron todos a una misma concentración molar, cuidando de obtener un FAN -nitrógeno contenido en aminoácidos libres- de 900 [mg N/L] (Ecuación D-6), valor presente en el medio MRS donde *O. oeni* exhibe mayores μ y biomasa.

4.1.2. Identificación de las cantidades de FAN y carbono óptimas para crecer a *O. oeni* PSU1 a través de método de Superficie de Respuesta

Considerando los bajos rendimientos de carbono en biomasa y la gran cantidad de auxotrofías para aminoácidos de *O. oeni*, se realizó un diseño experimental factorial 2^2 con un punto central, con el medio Maxo1 como punto inicial de la optimización (Figura 4-1), para determinar las concentraciones de FAN y carbono que maximizan la biomasa y μ_{\max} de *O. oeni*. Cabe decir que como fuentes de carbono, solo se variaron las concentraciones de glucosa y fructosa, ya que ácido cítrico y málico serían inhibitorios a mayores concentraciones.

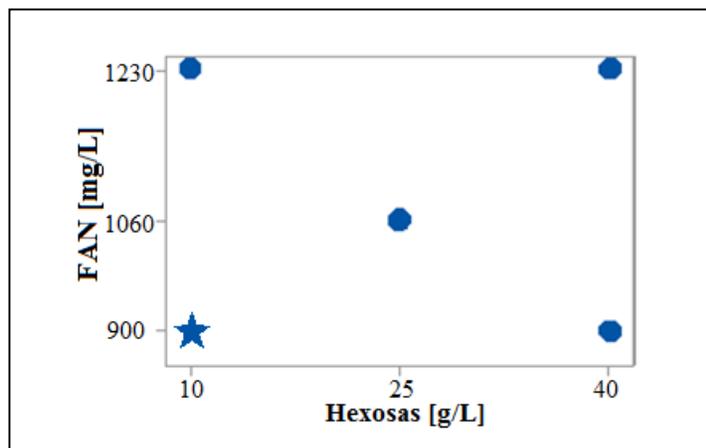


Figura 4-1: Representación gráfica del experimento factorial 2^2 con un punto central. Los niveles de FAN ensayados fueron 900 [mg /L] y 1230 [g/L]. Los niveles de azúcares fueron 10 [g/L] (5g/L de glucosa + 5g/L de fructosa) y 40 [g/L] (20 [g/L] de glucosa + 20 [g/L] de fructosa). El medio Maxo1 inicial aparece representado por una estrella.

Los medios correspondientes al punto central y a Maxo1 con la más alta concentración de azúcares y FAN, alcanzan mayor crecimiento (Figura 4-2, Figura 4-3).

El punto central del diseño experimental, alcanza un valor óptimo de μ_{max} ; desde el cual, al aumentar el contenido de nitrógeno y azúcares se observa un leve enlentecimiento (aunque no estadísticamente significativo, $p > 0,05$) del crecimiento del microorganismo (Figura 4-3).

Debido a esto, el punto central del experimento realizado se establece como el punto óptimo de la superficie de respuesta; y como el nuevo medio definido optimizado para el crecimiento de *O. oeni*, medio Maxo2.

El enlentecimiento de *O. oeni* al aumentar las concentraciones de FAN y azúcares, podría estar relacionado a inhibiciones por sustrato o producto. De acuerdo a esto, se ha reportado la inhibición de *O. oeni* a altas concentraciones de aminoácidos específicos como el ácido aspártico, ácido glutámico y cisteína (Vasserot y col., 2001; Zhang y col, 2013). Similarmente el ácido láctico disminuiría la biomasa máxima en un 50% cuando la concentración de ácido láctico es cercana a 19,5 [g/L] a pH 4,8, mientras que a pH 3,5, solo

3 [g/L] de ácido láctico inhibirían completamente el crecimiento de *O.oeni* (Bauer y col., 2004; Bouguettoucha y col., 2011; Jung y col., 2010). Similarmente la presencia de ácido acético a 1,8 [g/L] y pH 4,5 disminuiría μ_{max} a un 67% (Augagneur y col., 2007).

En efecto, en el punto óptimo de crecimiento, las concentraciones de ácido glutámico y aspártico, son superiores a las concentraciones inhibitorias reportadas en literatura. Y por otro lado, análisis posteriores, indican que *O.oeni* PSU1 cultivada a pH 4.8 en el medio diseñado produce ácido acético hasta una concentración de 3 [g/L] y ácido láctico hasta 10 [g/L] (Figura 4-20).

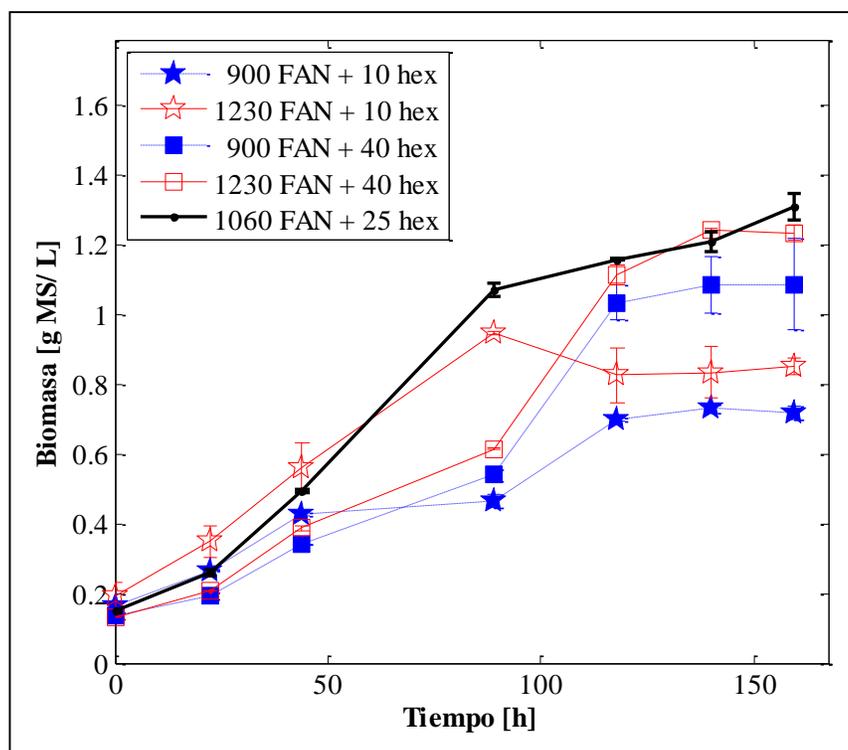


Figura 4-2: Curva de crecimiento de *O. oeni* PSU1 en Maxo1 suplementado con aminoácidos y/o hexosas. La leyenda indica la cantidad de FAN en mg/L, y la cantidad de hexosas (glucosa:fructosa en razón 1:1) en g/L de cada cultivo. El medio Maxo1 inicial aparece representado por una estrella de color negro. Desviaciones estándar corresponden a dos réplicas biológicas.

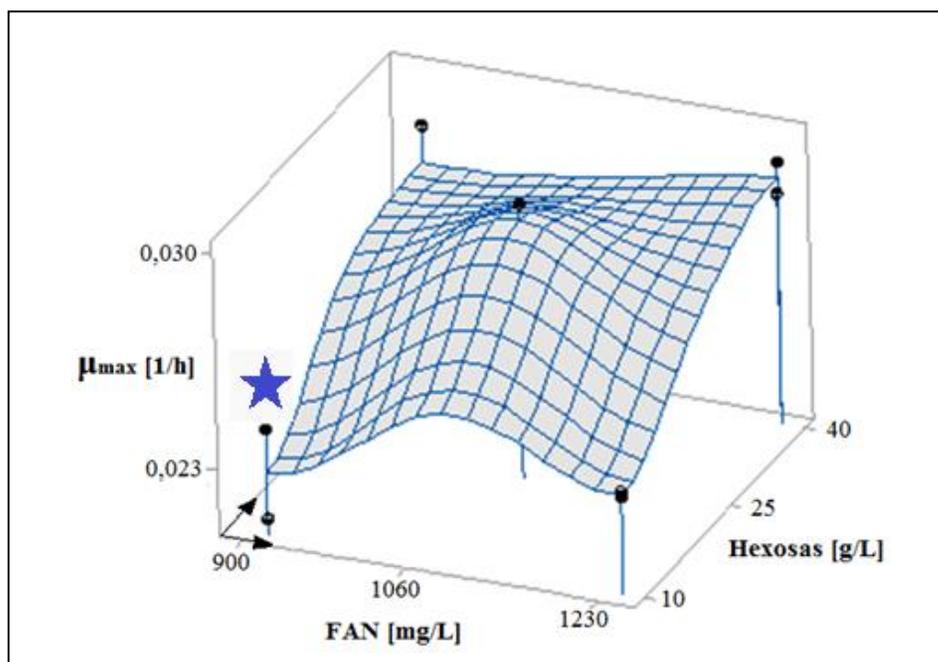


Figura 4-3: μ_{\max} de *O. oeni* PSU1 en Maxo1 suplementado con aminoácidos y/o hexosas. El medio Maxo1 inicial aparece representado por una estrella. Desviaciones estándar corresponden a dos réplicas biológicas.

4.1.3. Comparación del medio diseñado con medio Terrade

Con el objetivo de evaluar el desempeño del medio Maxo2 diseñado, se evaluó el crecimiento de éste comparado al medio diseñado por Terrade y col. (2009) a pH 3,5 y tanto a 0 como a 12% [v/v] EtOH. Las curvas OD respectivas se aprecian en la Figura 23, y las μ_{\max} en la figura 24.

El medio Maxo2 consigue mayores μ_{\max} y biomasa en ambos casos, obteniendo un mucho mejor desempeño a pH 3,5 y 12% [v/v] de etanol (condiciones enológicas) donde obtiene una biomasa de 0,6 y una μ_{\max} de 0,012 [1/h], comparados a la biomasa máxima y tasa de crecimiento, de 0,2 y 0,0044[1/h] respectivamente alcanzados por el medio diseñado por Terrade y col. (2009). Esta diferencia es atribuible principalmente a la mezcla de ácidos orgánicos que le otorgan mayor viabilidad al microorganismo en condiciones enológicas.

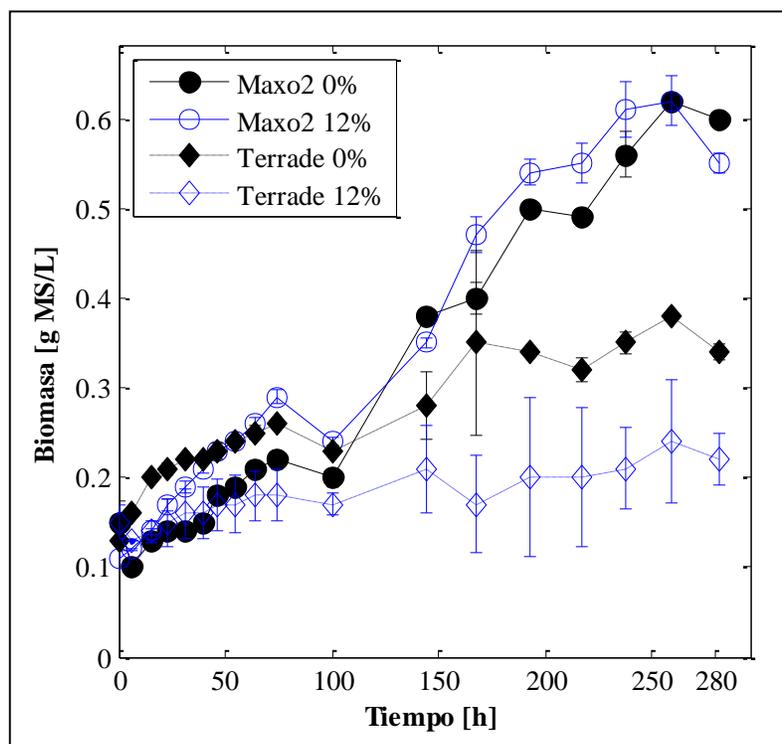


Figura 4-4: Crecimiento de *O. oeni* a pH 3,5 y niveles de etanol, en los medios Terrade y Maxo2. Desviaciones estándar corresponden a dos réplicas biológicas.

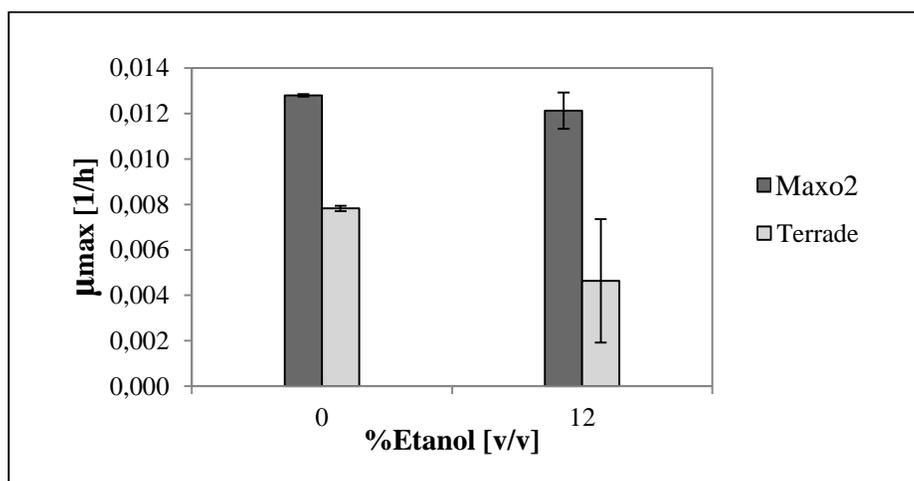


Figura 4-5: μ_{\max} de medio Maxo2 y Terrade a distintas concentraciones de etanol y pH 3,5. Desviaciones estándar correspondientes a réplicas biológicas.

4.2. Evaluación de tratamientos para aumentar viabilidad de *O. oeni* cultivado en presencia de etanol y bajo pH

En forma paralela a la optimización del medio, para aumentar la viabilidad de *O. oeni* en condiciones vínicas, se evaluaron tres tratamientos que buscaban aumentar la estabilidad a la membrana plasmática. Para esto, *O. oeni* fue cultivado en el medio de crecimiento MaxoR (Anexo: Confección medio) con 12% [v/v] de etanol y pH 3,5. El microorganismo fue sometido a tres tratamientos diferentes: *shock* térmico, adaptación a etanol y/o adición de ácido oleico al medio de crecimiento. Tales tratamientos han sido señalados por diversos autores como estabilizadores de membrana plasmática en condiciones de estrés por presencia a de etanol y bajo pH -ver más arriba Fisiología de *O. oeni*. Para analizar el efecto de cada tratamiento y las interacciones de éstos sobre el crecimiento de *O. oeni* se utilizó un diseño experimental 2^3 (Figura 4-6, Tabla 4-1). El siguiente experimento se realizó con la cepa *O. oeni* VP41.

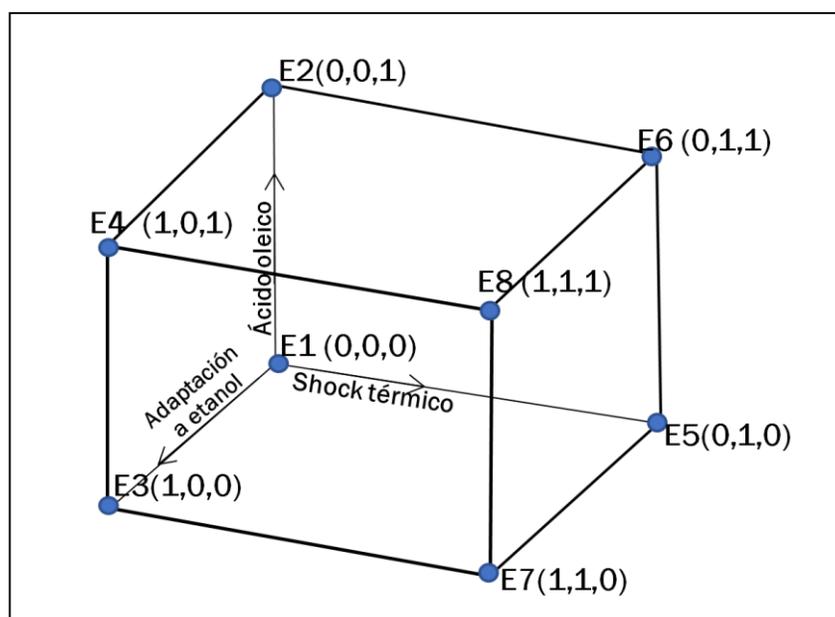


Figura 4-6: Representación gráfica del experimento factorial completo 2^3 . Los puntos experimentales ensayados –correspondientes a los vértices del cubo- se numeran desde E1 hasta E8. Cada eje del cubo está asociado a un tratamiento distinto, donde el nivel 0

corresponde a la ausencia del tratamiento y el nivel 1 a la aplicación del mismo (Tabla 4-1). Como ejemplo de lectura de la gráfica, el punto E8 corresponde al punto experimental donde se aplicaron los tres tratamientos. Mientras, el punto E3 corresponde al experimento donde solo se aplicó el tratamiento de adaptación a etanol.

Tabla 4-1: Niveles de los tratamientos para aumentar la viabilidad de *O. oeni* en condiciones de estrés.

| Tratamiento | 0 | 1 |
|---------------------|-------------|----------|
| Shock Térmico | no aplicado | aplicado |
| Adaptación a etanol | no aplicado | aplicado |
| Ácido oleico | 0 g/L | 0,1 g/L |

El tratamiento con ácido oleico consiste en añadir al medio una dotación de 0,1 g/L de este ácido. Las especificaciones de los tratamientos shock térmico y adaptación a etanol pueden revisarse en la sección de materiales y métodos.

Las curvas de biomasa y consumo de ácido málico para cada uno de los tratamientos evaluados se ilustran en la Figura 4-7. Por otra parte, para ayudar a visualizar el efecto de la aplicación de cada uno de los tratamientos individualmente sobre el crecimiento de *O. oeni*, las curvas de crecimiento y de consumo de ácido málico se reagruparon en las Figura 4-8 y Figura 4-9, respectivamente, donde, para cada tratamiento, se tienen dos curvas: una donde se promedian los experimentos cuyo tratamiento les fue aplicado, y una segunda curva donde se promedian los experimentos cuyo tratamiento no les fue aplicado.

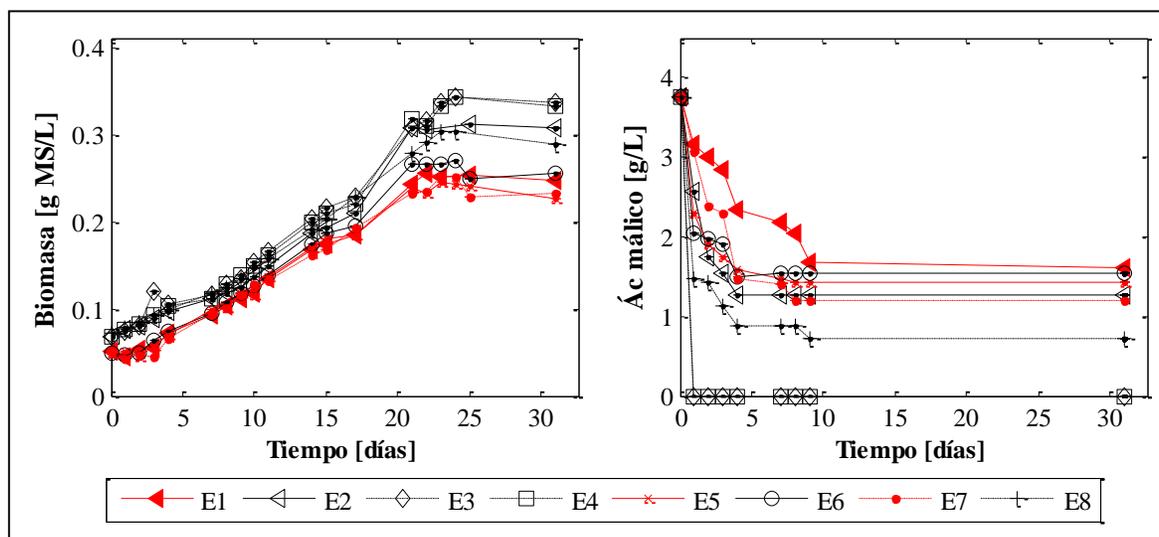


Figura 4-7: Crecimiento de *O. oeni* VP41 en MaxoR, y consumo de ácido málico para cada uno de los experimentos realizados..

La biomasa máxima no mostró diferencias significativas en los tratamientos de shock térmico y ácido oleico. Mientras, el tratamiento de adaptación a etanol sí mostró una biomasa final significativamente mayor del cultivo ($p < 0,05$), específicamente $0,33 \pm 0,02$ [g MS/L] al ser aplicado, y $0,26 \pm 0,01$ [g MS/L] al no ser aplicado, (Figura 4-8).

Más aún, la fase de latencia es casi inexistente en los cultivos con adaptación a etanol, mientras que requiere 3 días cuando no es aplicada (Figura 4-8). Sin embargo, los resultados obtenidos no muestran diferencias significativas en la μ_{\max} de *O. oeni* VP41, la cual promedia $0,0026 \pm 0,0001$ [h^{-1}] para el conjunto de los ocho experimentos.

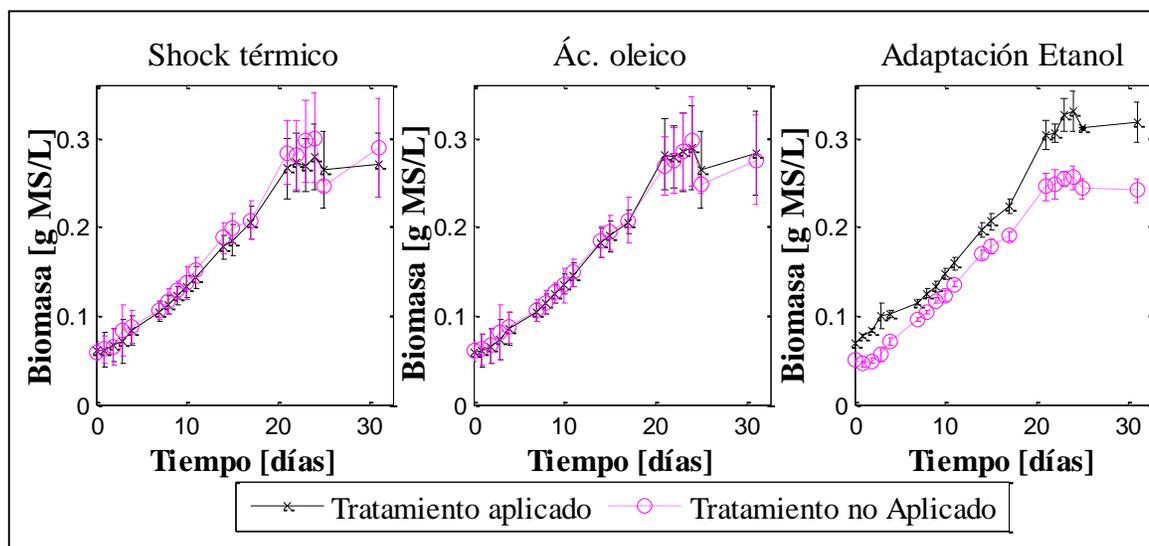


Figura 4-8: Curvas de crecimiento para los distintos tratamientos. Desviaciones estándar correspondientes al subconjunto de experimentos donde se aplicó o no, el respectivo tratamiento. Como ejemplo, la curva de tratamiento aplicado del tratamiento shock térmico (primera gráfica a la izquierda) resulta de calcular el promedio y desviación estándar de los experimentos E5, E6, E7 y E8 correspondientes a los cuatro experimentos del diseño 2^3 donde se aplicó el tratamiento shock térmico (Figura 4-6); mientras que la curva tratamiento no aplicado resulta de calcular el promedio y desviación estándar de los experimentos E1, E2, E3 y E4. Los resultados sin agrupar se indican en la Figura 4-7.

Por otro lado, el cultivo de *O. oeni* con adaptación a etanol, presentó una concentración residual de ácido málico significativamente menor ($p < 0,05$). Mientras que se observaron mayores concentraciones residuales de ácido málico (aunque no estadísticamente significativas) en los casos donde el tratamiento *shock* térmico fue aplicado (Figura 4-9).

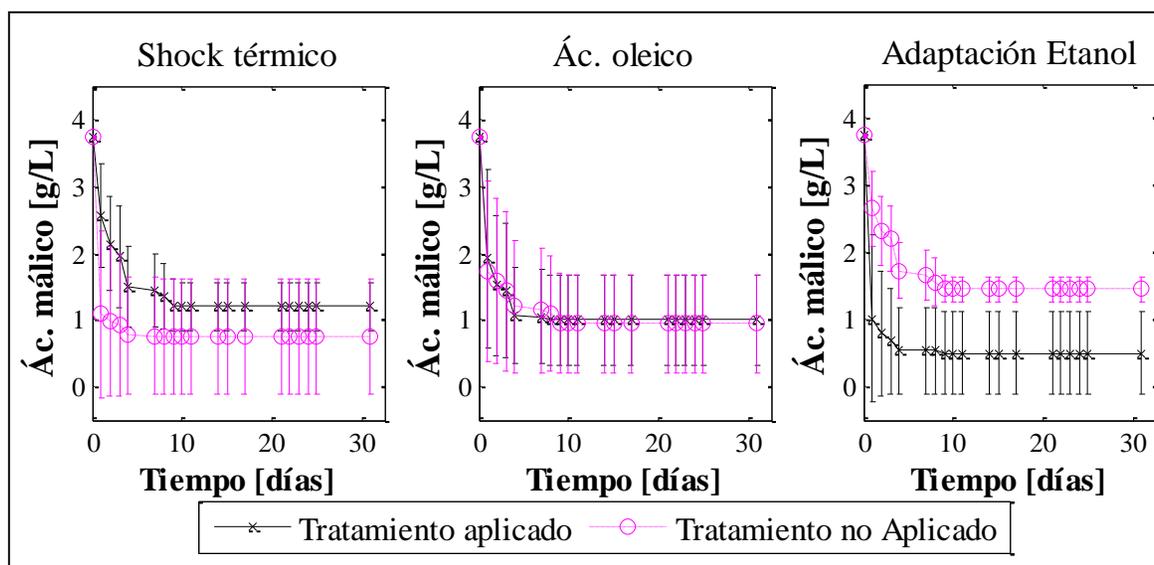


Figura 4-9: Consumo de ácido málico para los distintos tratamientos. Desviaciones estándar correspondientes al subconjunto de experimentos donde se aplicó o no, el respectivo tratamiento. Como ejemplo, la curva de tratamiento aplicado de la shock térmico resulta de calcular el promedio y desviación estándar de los experimentos E5, E6, E7 y E8 correspondientes a los cuatro experimentos del diseño 2^3 donde se aplicó el tratamiento shock térmico (Figura 4-6). Los resultados sin agrupar se indican en la Figura 4-7.

Particularmente, en los cultivos de *O. oeni* donde se adicionó ácido oleico, no se observaron efectos en la concentración de biomasa máxima, ni en la capacidad para consumir ácido málico del medio de crecimiento (Figura 4-8, Figura 4-9). Lo anterior se debería a la dificultad del microorganismo para asimilar el ácido oleico presente en el medio de crecimiento, ya que se ha descrito que algunas cepas de *O. oeni* poseen una menor capacidad para transportar ácido oleico desde el medio de crecimiento al interior de la célula (Guerrini y col., 2002).

Por otro lado, la mayor cantidad de biomasa alcanzada por el microorganismo cuando fue sometido al tratamiento de adaptación a etanol podría estar relacionada con el mayor consumo de ácido málico. Esto se debería a que el proceso de adaptación a etanol permitiría a *O. oeni* inducir las vías de consumo de este sustrato, teniendo mayor capacidad para su consumo al ser inoculado en el medio MaxoR. Luego, el mayor consumo de ácido málico le otorgaría a *O. oeni* energía adicional para incrementar su biomasa (Augagneur y col., 2007; Passos y col, 2003).

Acorde a lo anterior, los cultivos a los que se les aplicó shock térmico presentaron menor crecimiento, y menor consumo de ácido málico (Figura 4-8, Figura 4-9).

4.3. Caracterización del crecimiento de *O. oeni* a concentraciones crecientes de etanol

4.3.1. Crecimiento en medio complejo

Para determinar la influencia de la concentración de etanol en el crecimiento de *O. oeni* en medio complejo, se ensayaron cinco niveles de etanol (0, 3, 6, 9 y 12% [v/v]) en medio MRS a pH 4,8.

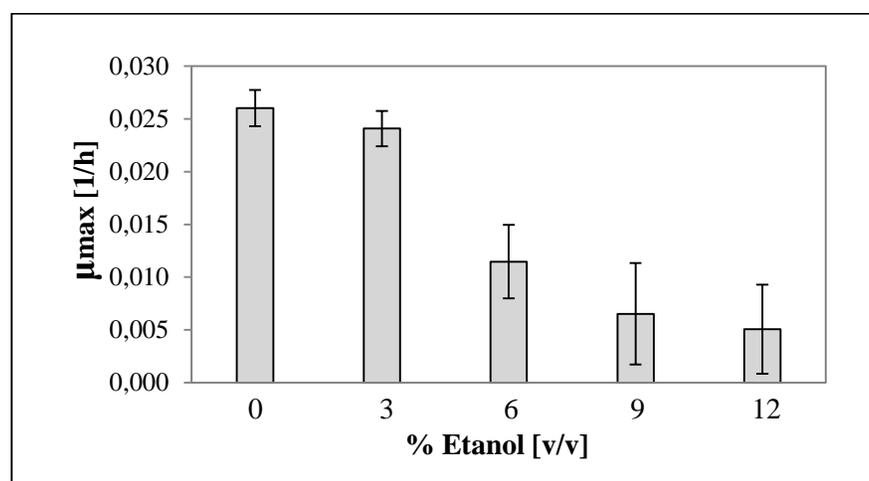


Figura 4-10: μ_{\max} de *O. oeni* PSU1 a distintas concentraciones de etanol, cultivada en medio MRS a pH 4,8. Desviaciones estándar corresponden a dos réplicas biológicas.

Al aumentar la concentración de etanol, biomasa y μ_{\max} disminuyen de forma significativa ($p < 0,05$), mostrando respuestas similares entre las concentraciones de etanol 0 y 3%, como a 9 y 12% [v/v] de etanol (Figura 4-10, Figura 4-11).

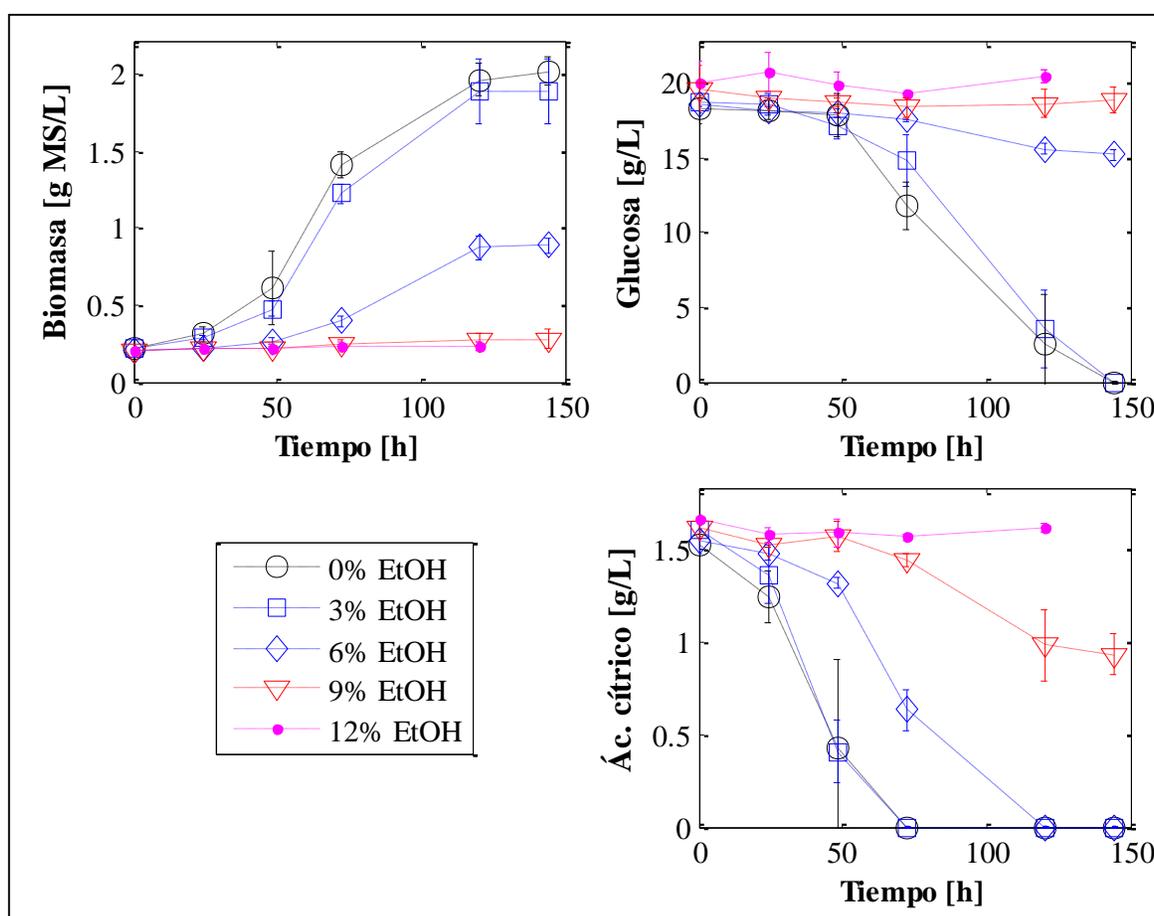


Figura 4-11: Crecimiento y consumo de sustratos de *O. oeni* PSU1 a distintas concentraciones de etanol, cultivada en medio MRS a pH 4,8. Desviaciones estándar corresponden a dos réplicas biológicas.

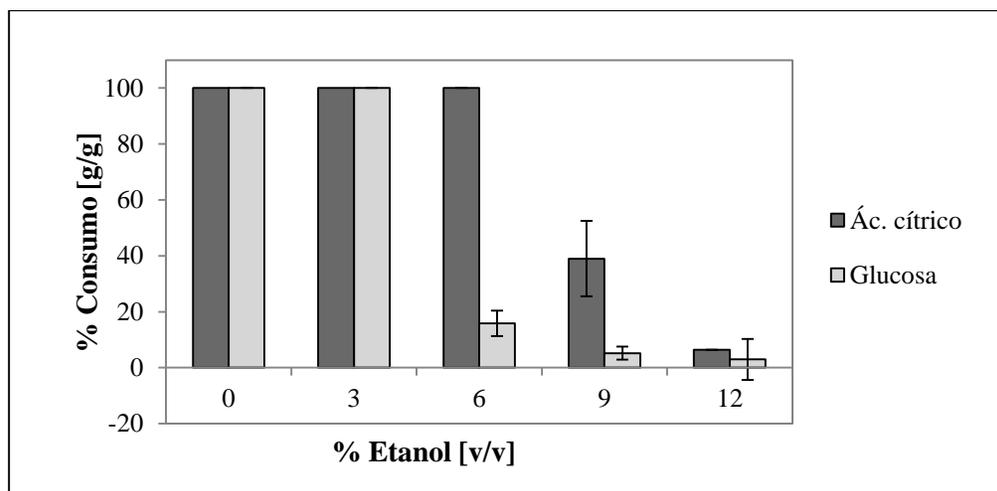


Figura 4-12: Porcentaje de consumo [g/g] de glucosa y ácido cítrico a concentraciones crecientes de etanol. Valores calculados a partir de la Ecuación D-1. Desviaciones estándar de dos réplicas biológicas.

A mayor concentración de etanol, *O. oeni* mostró menores consumos porcentuales de glucosa y ácido cítrico hacia el final de la fermentación. Siendo el efecto negativo del etanol más pronunciado sobre el consumo de glucosa que sobre el consumo de ácido cítrico. Por ejemplo a 6% [v/v] de etanol el porcentaje de consumo de glucosa disminuye de un 100% [g/g] a un 20% [g/g], mientras el consumo de ácido cítrico continúa siendo del 100% [g/g] (Figura 4-12).

Este fenómeno comprobaría que a bajo pH interno (acidificado debido a la disminución de la homeostasis), la fermentación heteroláctica estaría inhibida, por lo que el ácido cítrico podría ser (junto al ácido málico) la única fuente energética del microorganismo (Bartowsky y col., 2005; Olguín y col., 2010; Ramos y col., 1995; Ramos y col., 1994; Zhang y col., 2013).

A diferencia de algunos trabajos donde se menciona que a bajo pH se incrementaría la expresión de los genes de la vía del citrato, (Olguín y col., 2009), nuestros resultados indican que al aumentar la concentración de etanol, la tasa máxima de consumo disminuiría de todas formas (Figura 4-13). Este fenómeno, aparentemente contradictorio, podría indicar que a

bajo pH, *O. oeni* sobreexpresa la vía de consumo del citrato, con el objetivo de hacer frente a la menor afinidad de éste por las enzimas de la vía. Y es a través de esta sobreexpresión de la vía del citrato, que su consumo se ve afectado en menor medida ante la presencia de condiciones de estrés.

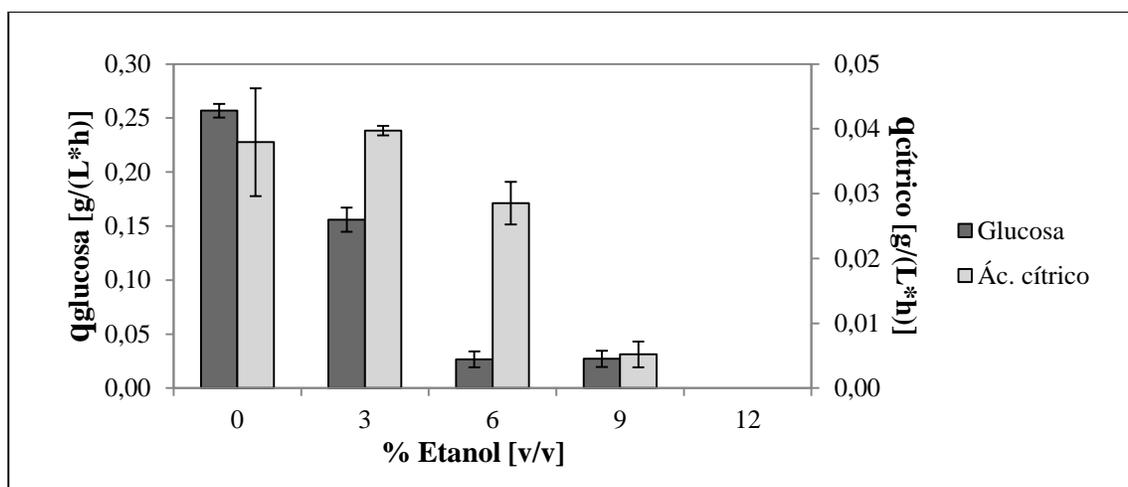


Figura 4-13: Tasas volumétrica máximas de consumo (q_{max}) [g/(L*h)] de los sustratos glucosa y ácido cítrico a concentraciones crecientes de etanol. Valores calculados a partir de la Ecuación C-4. Desviaciones estándar de dos réplicas biológicas.

Por otro lado, los principales productos de fermentación *O. oeni*, serían el ácido láctico y etanol, los cuales presentan concentraciones finales cercanas a los 9 y 5 [g/L] respectivamente (para el medio MRS 0% Etanol), mientras el ácido acético y eritritol presentan producciones mucho menores -hasta 1 y 0,4 [g/L] respectivamente (Figura 4-14).

Dado que las fuentes de carbono corresponden a ácido cítrico y glucosa a 1,4 y 20 [g/L], la producción de estos compuestos de fermentación (ácido láctico y etanol) constituye aproximadamente el 75% del carbono utilizado del sustrato (Ecuación C-3) para las distintas concentraciones de etanol. De esta manera, se explica el particularmente bajo rendimiento del carbono en biomasa para *O. oeni*. ($Y_{xc}=0.095$ para MRS 0%), ya que una gran cantidad del carbono consumido se emplearía en la formación de los productos de fermentación.

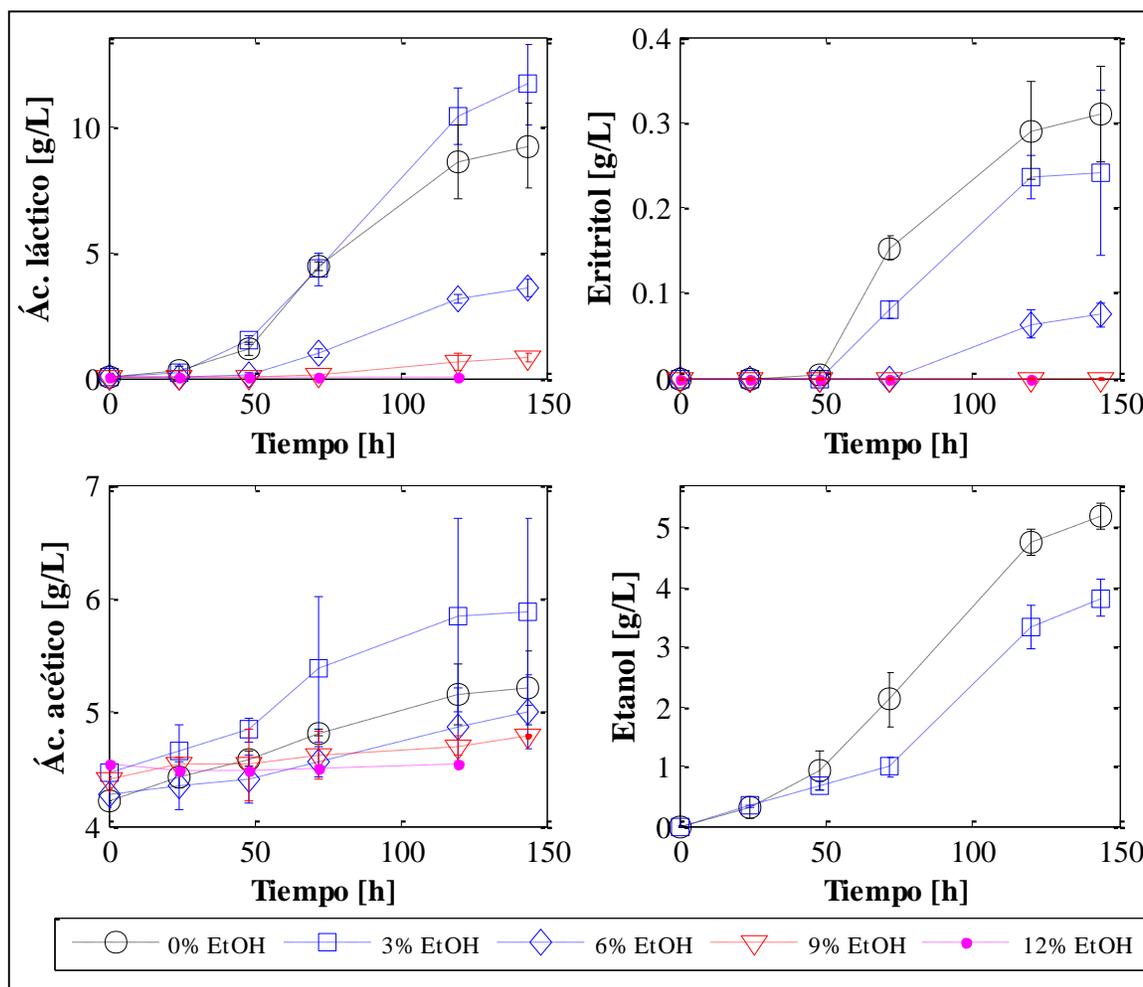


Figura 4-14: Formación de productos de *O. oeni* PSU1, en medio MRS a concentraciones crecientes de etanol (concentraciones de etanol en [v/v]). Desviación estándar corresponde a dos réplicas biológicas.

Finalmente, el rendimiento de glucosa en ATP ($Y_{ATP.glucosa}$) fue estimado en $Y_{ATP.glucosa} = 1,2 \pm 0,21$ [g MS/mol], y este no varía significativamente al aumentar la concentración de etanol del medio MRS (Figura 4-15). Este valor es similar al rendimiento calculado por Salou y col. (1994) ($Y_{X.ATP} = 1,04 \pm 0,21$ [g MS/mol]).

Por otro lado, el rendimiento de ATP en biomasa ($Y_{X.ATP}$) fue estimado en $Y_{X.ATP} = 18,7 \pm 0,8$ [mol/mol] para la condición MRS 0% Etanol. Este valor es similar a $Y_{X.ATP} = 18,9$ [g

MS/mol], rendimiento calculado por Salou y col. (1994). $Y_{X,ATP}$ sí muestra una variación al aumentar la concentración de etanol, presentando su máximo valor a 6% [v/v] de etanol, siendo consistente con el rendimiento de glucosa en biomasa ($Y_{x,glucosa}$) mostrado en la Figura 4-15.

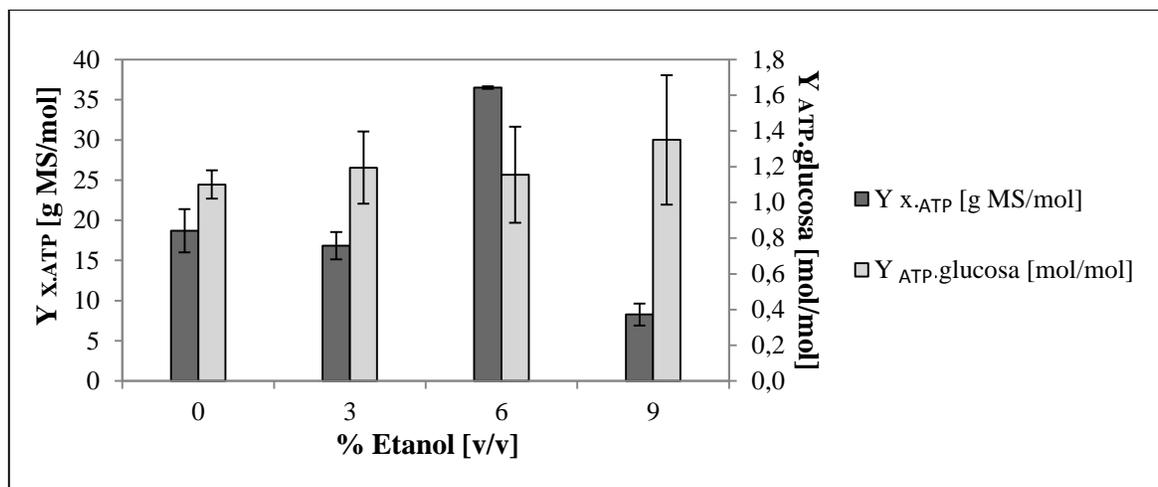


Figura 4-15: Rendimiento en ATP de glucosa y rendimiento de ATP en biomasa. Valores calculados a partir de Ecuación 3-1 y Ecuación C-2. Desviaciones estándar corresponden a dos réplicas biológicas.

4.3.2. Crecimiento en medio definido

Para determinar la influencia de la concentración de etanol en el crecimiento de *O. oeni* en medio definido, se ensayaron cuatro niveles de etanol (0, 3, 9 y 12% [v/v]) sobre el medio Maxo2 a pH 4,8. Adicionalmente se ensayaron los niveles 0, 6 y 12 % [v/v] de etanol sobre el medio Maxo2 a pH 3,5. Cabe mencionar que, previo a la inoculación, se realizó un tratamiento de adaptación a etanol para cada uno de ellos (ver Materiales y Métodos).

Al aumentar la concentración de etanol a pH 4,8, biomasa y μ_{max} disminuyen de forma significativa ($p < 0,05$), mostrando respuestas similares entre las concentraciones de etanol 0 y 3%, como a 9 y 12% [v/v] de etanol. Sin embargo, a pH 3,5, no hay una tendencia clara

respecto a la biomasa y μ_{max} , al aumentar la concentración de etanol (Figura 4-16, Figura 4-17).

Estos resultados, se asemejan a las respuestas de *O. oeni* en el medio MRS, donde igualmente que en Maxo2, los cultivos se asemejan entre las concentraciones 0 y 3%, como entre 9 y 12% [v/v].

Por otro lado, la disminución del pH del medio (desde pH 4,8 a pH 3,5) disminuye la biomasa y μ_{max} , siendo el efecto del pH mucho más dramático a 0% que a 12% [v/v] de etanol (Figura 4-16, Figura 4-17). Específicamente al disminuir el pH a 0% etanol, la biomasa disminuye en un 50% mientras que a 12% la biomasa solo disminuye en un 25%.

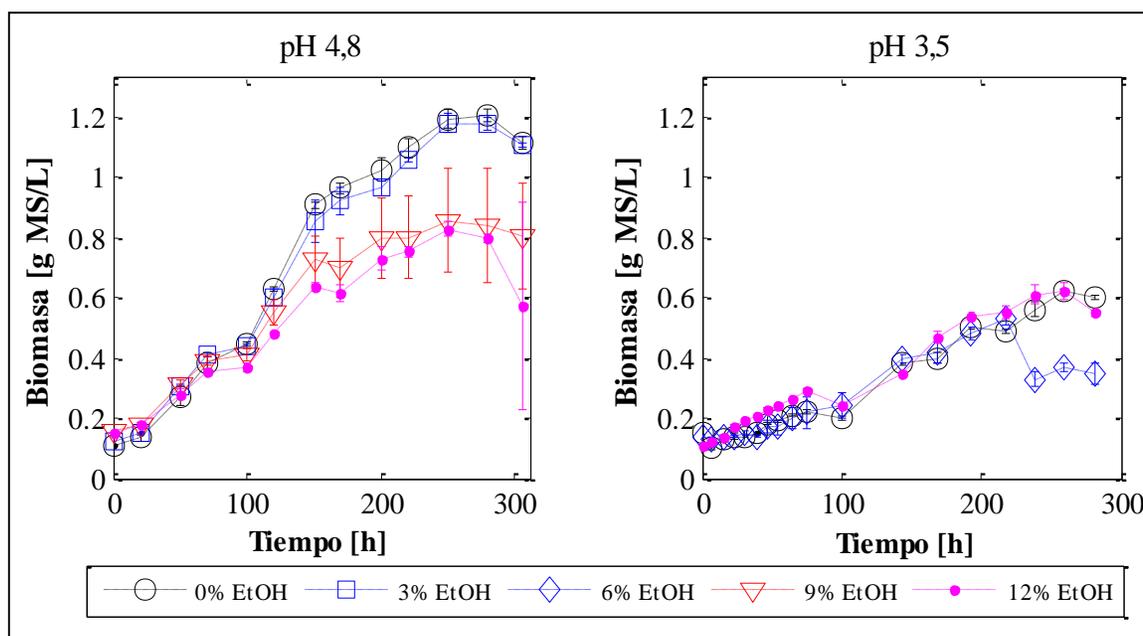


Figura 4-16: Crecimiento de *O. oeni* PSU1 en medio definido Maxo2 a distintos niveles de etanol. Desviaciones estándar de dos réplicas biológicas.

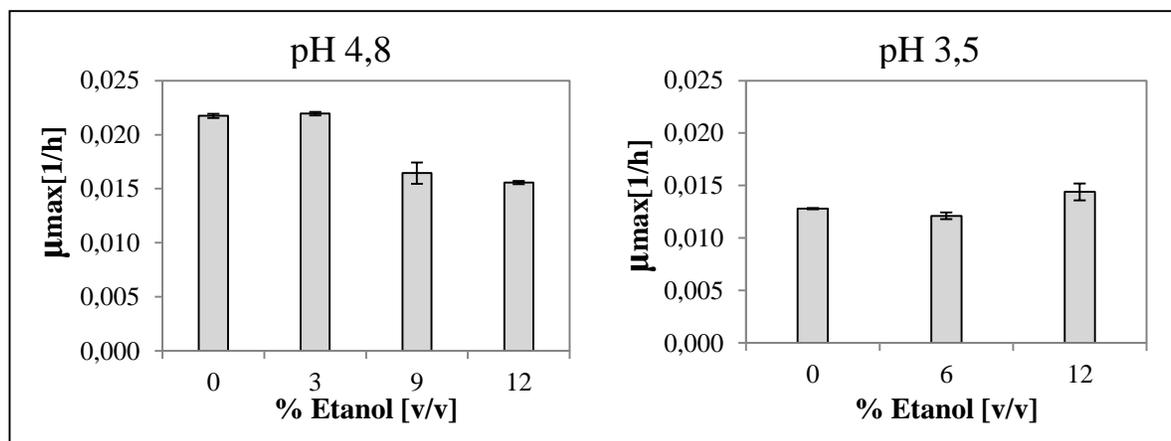


Figura 4-17: μ_{\max} de *O. oeni* PSU1 a distintos niveles de etanol, cultivada en Maxo2. Desviaciones estándar de dos réplicas biológicas.

A mayor concentración de etanol, *O. oeni* mostró menores consumos porcentuales de glucosa y fructosa hacia el final de la fermentación. Sin embargo este patrón no se repitió en el consumo de ácido cítrico o ácido málico, donde su consumo porcentual fue similar a las distintas condiciones de etanol (Figura 4-18, Figura 4-19).

Estos resultados, tal como los obtenidos para el medio MRS, comprobarían una inhibición del consumo de los azúcares (glucosa y fructosa) a mayores niveles de etanol. Por lo que acorde a la literatura, el ácido cítrico y málico serían las fuentes más disponibles de carbono y energía para el microorganismo en condiciones de etanol (Bartowsky y col., 2005; Olguin y col., 2010; Ramos y col., 1995; Zhang y col., 2013).

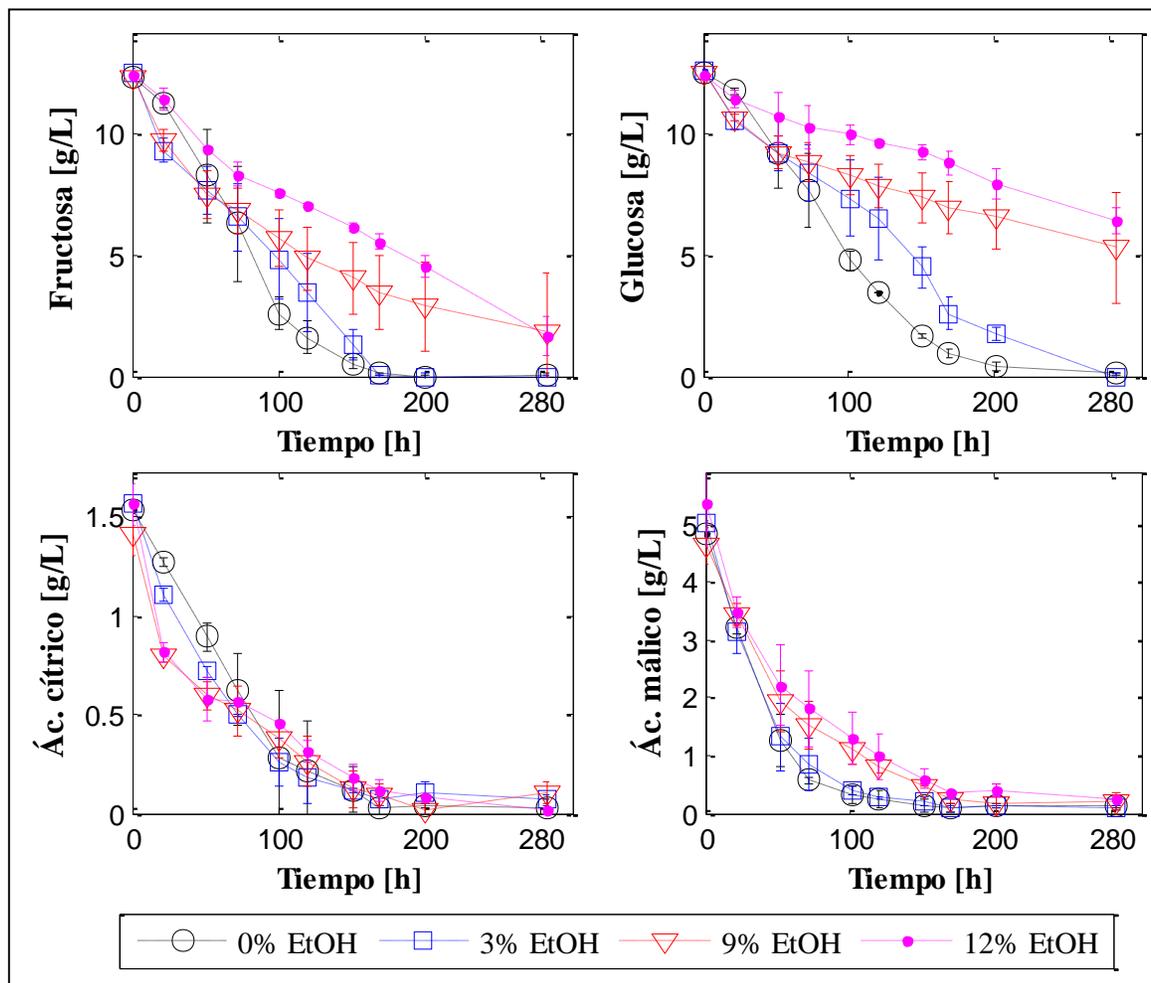


Figura 4-18: Consumo de sustratos en *O. oeni* PSU1, cultivada en medio Maxo2 y pH 4.8 a concentraciones crecientes de etanol (Porcentajes en [v/v]). Desviaciones estándar correspondientes a dos réplicas biológicas.

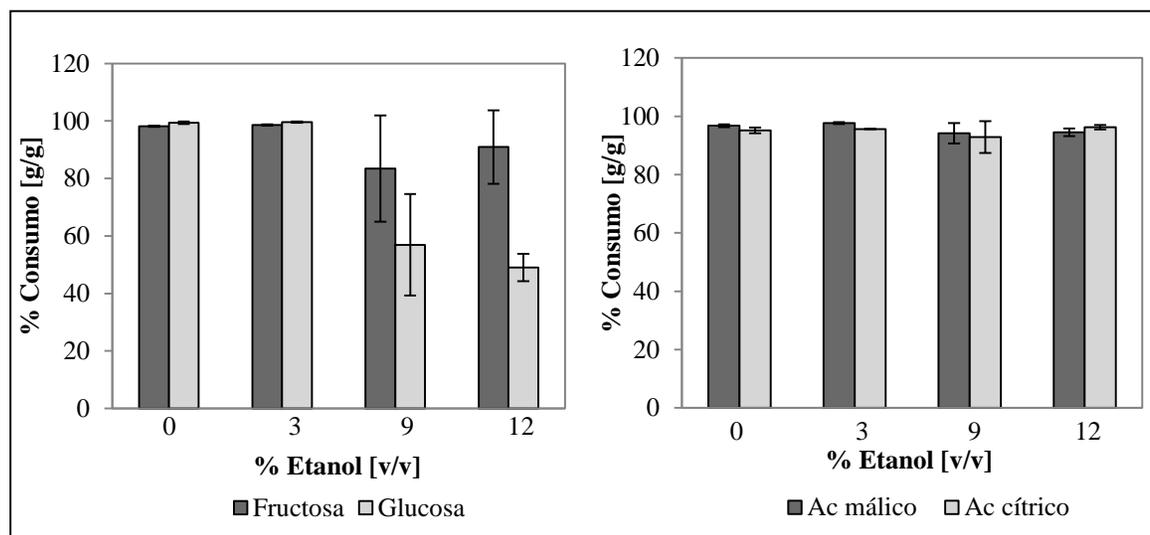


Figura 4-19: Porcentaje de consumo [g/g] de sustratos en *O. oeni* PSU1, cultivada en medio Maxo2 y pH 4,8 a concentraciones crecientes de etanol. Valores calculados a partir de la Ecuación D-1. Desviaciones estándar de dos réplicas biológicas.

Los principales productos de fermentación de *O. oeni* fueron manitol y ácido láctico, los cuales presentan concentraciones finales cercanas a los 10 [g/L] a 0% etanol. Ácido acético, etanol y eritritol presentaron concentraciones finales menores (hasta 3; 1,6 y 0,6 [g/L] respectivamente) (Figura 4-20). La generación de estos compuestos de fermentación (ácido láctico, manitol, etanol y acetato) constituye aproximadamente el 90% del carbono utilizado del sustrato (Ecuación C-3).

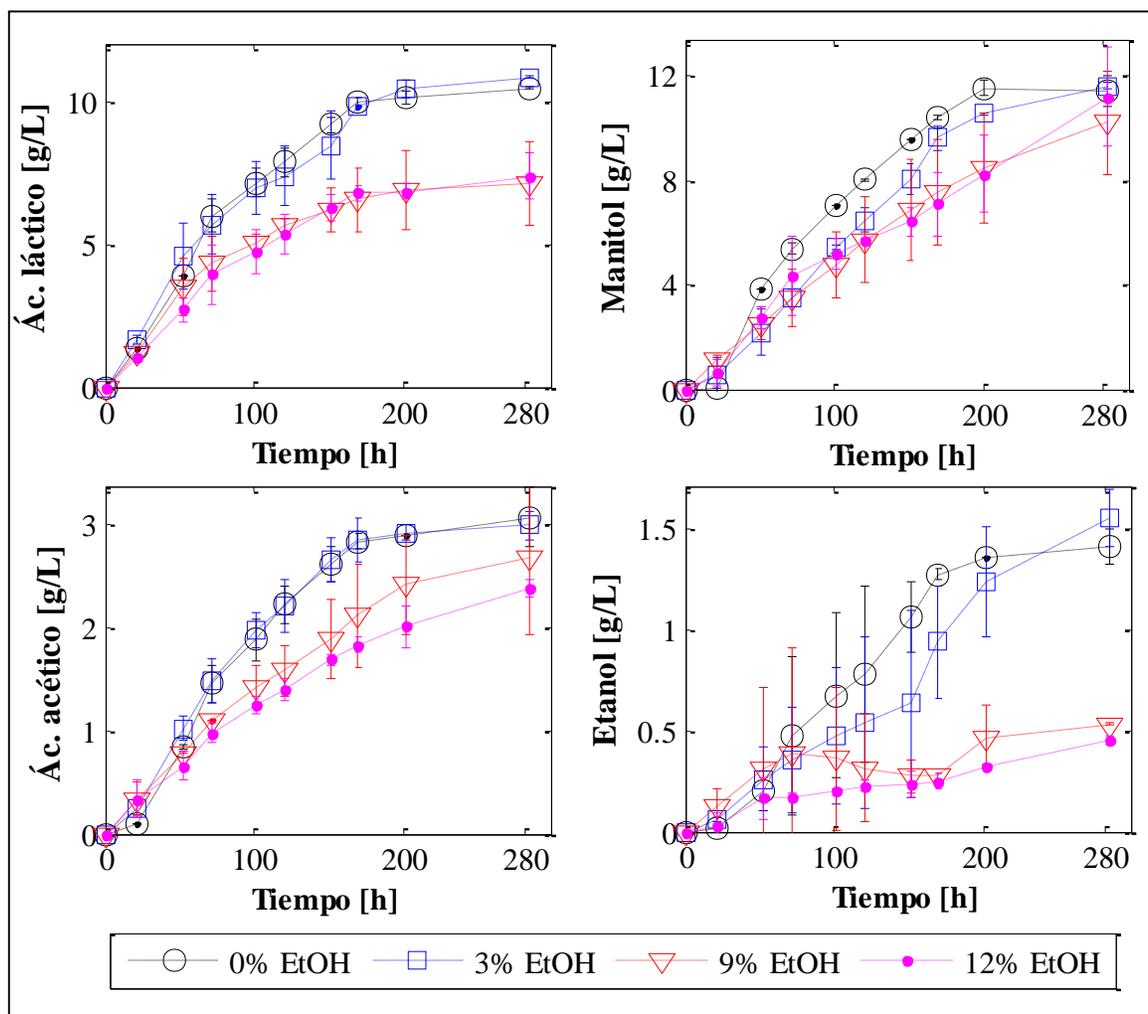


Figura 4-20: Dinámicas de crecimiento de *O. oeni* PSU1, en medio Maxo2 pH 4.8 a concentraciones crecientes de etanol (concentraciones de etanol indicadas en los títulos [v/v]). Desviaciones estándar correspondientes a dos réplicas biológicas.

Por otro lado, mientras el rendimiento de carbono en biomasa ($Y_{x.c}$) disminuye de forma significativa ($p < 0,05$) al aumentar la concentración de etanol del cultivo, el rendimiento de biomasa en los diferentes productos ($Y_{p_i.x}$) también cambia de forma significativa ($p < 0,05$). Particularmente, el rendimiento de biomasa en manitol aumenta aproximadamente en un 50%, y el rendimiento de biomasa en etanol disminuye un 50% en los medios a alta

concentración de etanol (9% y 12% [v/v]) respecto de los medios a baja concentración de etanol (0 y 3% [v/v]) (Figura 4-22).

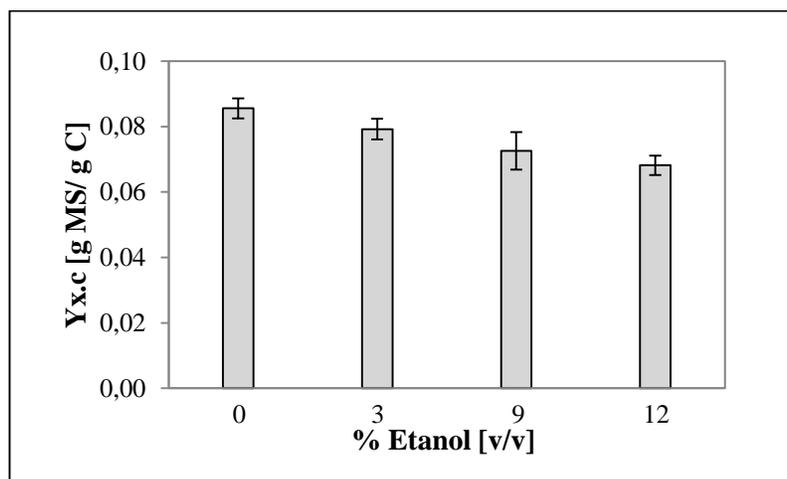


Figura 4-21: Rendimientos de carbono en biomasa. Valores calculados a partir de la Ecuación C-2. Desviación estándar de dos réplicas biológicas.

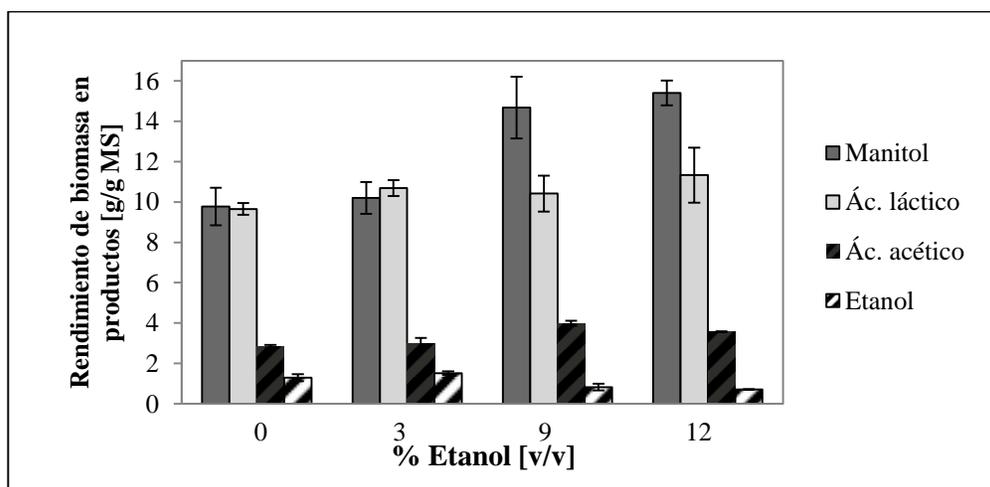


Figura 4-22: Rendimientos de biomasa en los productos manitol, ácido láctico, ácido acético y etanol. Valores calculados a partir de la Ecuación C-2. Desviación estándar de dos réplicas biológicas.

Adicionalmente, al aumentar la concentración de etanol, la razón de producción entre los compuestos etanol y ácido acético cambia, favoreciendo la producción de ácido acético por sobre la producción de etanol. De forma similar, al aumentar la concentración de etanol, la razón de consumo entre los azúcares cambia significativamente ($p < 0,05$), favoreciendo el consumo de fructosa por sobre el de glucosa (Figura 4-23).

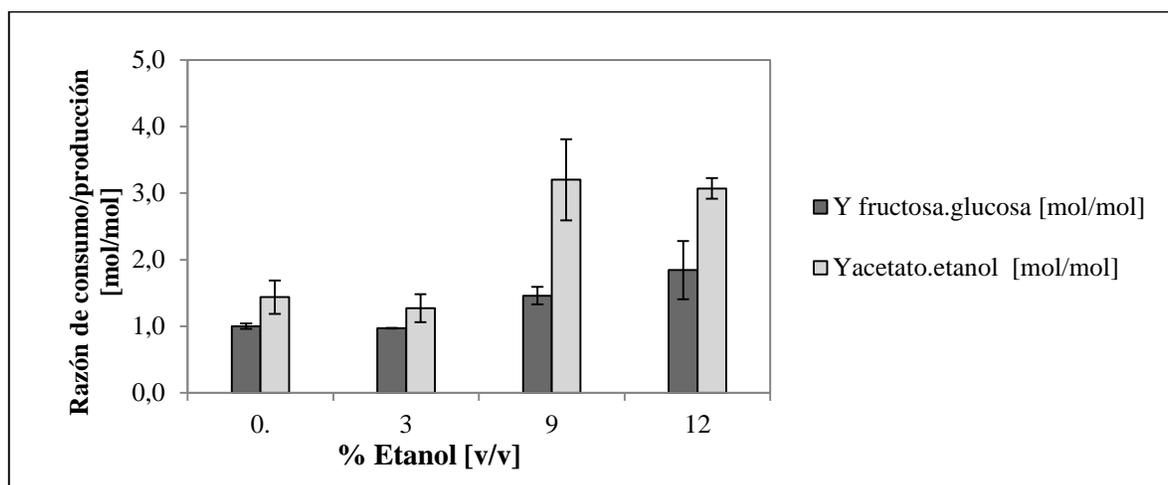


Figura 4-23: Razón de consumo entre fructosa y glucosa, y razón de producción entre ácido acético y etanol. Valores calculados a partir de la Ecuación C-2. Desviación estándar de dos réplicas biológicas.

Los siguientes análisis se realizarán sobre los resultados entregados a pH 4.8, debido a que en estos experimentos el balance de carbono cierra en valores superiores a 94% permitiendo realizar análisis de flujos metabólicos aceptables (Figura 4-24).

El rendimiento de ATP en biomasa ($Y_{X,ATP}$) presenta un valor significativamente mayor a 0% [v/v] de etanol ($p < 0,05$), mientras a 3, 6 y 9% etanol [v/v] se mantiene constante -no muestran diferencias significativas, $p > 0,05$ (Figura 4-25). Por otro lado aumentar la concentración de etanol, el rendimiento de biomasa en NAD^+ ($Y_{NAD^+,X}$) aumenta significativamente ($p < 0,05$), donde a bajos niveles de etanol (0 y 3% [v/v] etanol) se presenta un equilibrio redox más reductor en el medio, mientras a altos niveles de etanol (9 y 12% [v/v] etanol) se presenta un equilibrio más oxidativo.

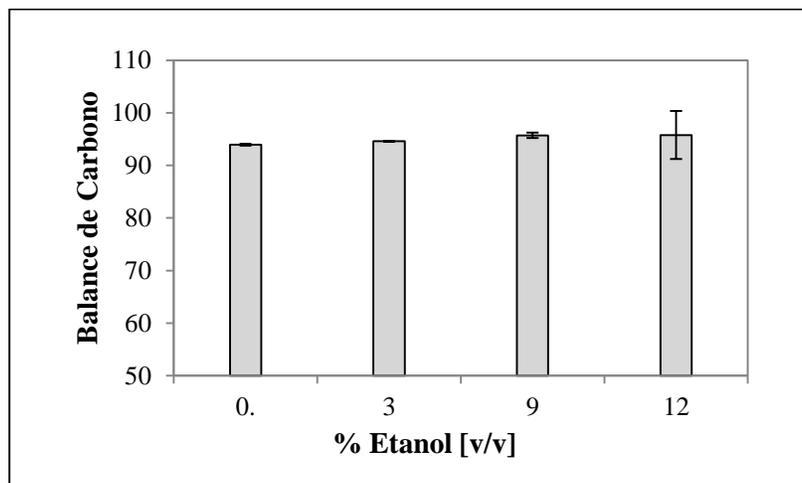


Figura 4-24: Balance de Carbono correspondiente a las fermentaciones en Maxo2 a pH 4,8. Valores calculados a partir de la Ecuación D-2. El CO₂ producido producto del metabolismo del microorganismo, fue incluido a través de la Ecuación 3-1. Desviaciones estándar correspondientes a dos réplicas biológicas.

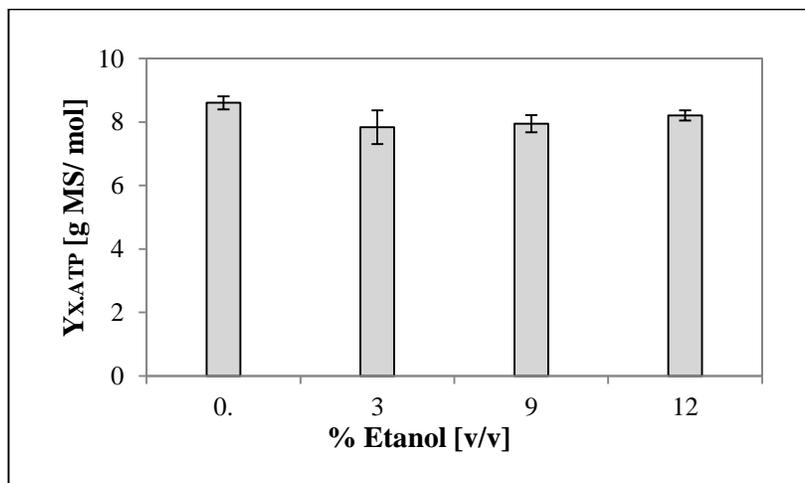


Figura 4-25: Rendimientos de ATP en biomasa. Valores calculados a partir de la Ecuación C-2. Desviación estándar de dos réplicas biológicas.

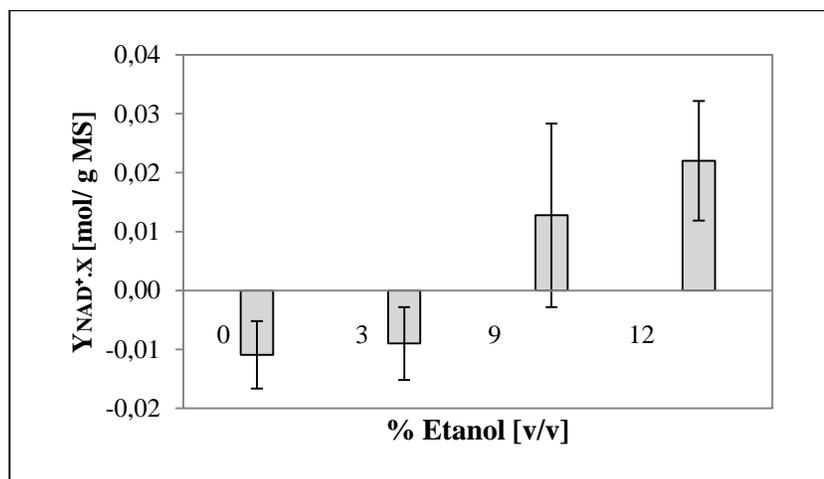


Figura 4-26: Rendimiento de biomasa en NAD^+ ($Y_{\text{NAD}^+.X}$). Valores calculados a partir de la Ecuación C-2. Los valores negativos de NAD^+ , deben considerarse como NADH.

Desviación estándar de dos réplicas biológicas.

Producto del análisis de flujos metabólicos, se estimaron las ecuaciones estequiométricas del consumo de glucosa y fructosa a las distintas concentraciones de etanol (Ecuación 3-3). En las ecuaciones se observa que el consumo de glucosa es utilizado para generar energía en forma de ATP, consumiendo NAD^+ . Mientras la fructosa, se utilizaría exclusivamente para regenerar NAD^+ (Tabla 4-2, Tabla 4-3).

Tabla 4-2: Ecuación estequiométrica del consumo de glucosa a distintos niveles de etanol.

Concentración de etanol del medio, especificada a la izquierda.

| | |
|-------------|---|
| 0% Etanol: | $1 \text{ glucosa} + 1,3 \text{ NAD}^+ \rightarrow 0,4 \text{ etanol} + 0,6 \text{ Acetato} + 1,1 \text{ D-lactato} + 1,1 \text{ CO}_2 + 1,8 \text{ ATP}$ |
| 3% Etanol: | $1 \text{ glucosa} + 1,2 \text{ NAD}^+ \rightarrow 0,5 \text{ etanol} + 0,6 \text{ Acetato} + 1,1 \text{ D-lactato} + 1,1 \text{ CO}_2 + 1,8 \text{ ATP}$ |
| 9% Etanol: | $1 \text{ glucosa} + 1,4 \text{ NAD}^+ \rightarrow 0,3 \text{ etanol} + 1,0 \text{ Acetato} + 1,0 \text{ D-lactato} + 1,0 \text{ CO}_2 + 2,0 \text{ ATP}$ |
| 12% Etanol: | $1 \text{ glucosa} + 1,6 \text{ NAD}^+ \rightarrow 0,3 \text{ etanol} + 0,9 \text{ Acetato} + 1,1 \text{ D-lactato} + 1,1 \text{ CO}_2 + 2,2 \text{ ATP}$ |

Tabla 4-3: Ecuación estequiométrica del consumo de fructosa a distintos niveles de etanol.
Concentración de etanol del medio, especificada a la izquierda.

| | |
|-------------|---|
| 0% Etanol: | 1 fructosa --> 0,9 D-lactato + 1 CO ₂ + 1,4 NAD ⁺ |
| 3% Etanol: | 1 fructosa --> 0,9 D-lactato + 1 CO ₂ + 1,4 NAD ⁺ |
| 9% Etanol: | 1 fructosa --> 1,0 D-lactato + 1 CO ₂ + 1,4 NAD ⁺ |
| 12% Etanol: | 1 fructosa --> 1,0 D-lactato + 1 CO ₂ + 1,4 NAD ⁺ |

O. oeni, se caracteriza por sus bajos rendimientos de sustratos en biomasa (Figura 4-21), estos bajos rendimientos se justifican debido a la gran cantidad de flujo de carbono que se dirige hacia la síntesis de los productos de fermentación (ácido láctico y manitol principalmente) (Figura 4-22).

Por otro lado, los coeficientes de la ecuación (estequiométrica del consumo de glucosa, cambian al aumentar las concentraciones de etanol, resultando en un mayor rendimiento de ATP, por glucosa consumida, a mayores concentraciones de etanol (Tabla 4-2). Específicamente por glucosa consumida, se producirían 1,8 moléculas de ATP en promedio, mientras a altas concentraciones, se producirían 2,1 moléculas de ATP en promedio. Esto sucede ya que en la vía del consumo de la glucosa, su derivado acetilfosfato, se encuentra en un nodo donde es posible seguir dos vías distintas -la reacción 5 que conlleva la síntesis de ATP más ácido acético, o la reacción 6 que conlleva la regeneración de NAD⁺ y etanol (Figura 1-2). Debido a que a altas concentraciones de etanol (9 y 12% [v/v]) *O. oeni* favorece la producción de acetato por sobre la de etanol (Figura 4-23), el rendimiento de glucosa en ATP aumenta.

Por otro lado, al aumentar la concentración de etanol, *O. oeni* favorece el consumo de fructosa por sobre el de glucosa (Figura 4-23). Relacionado a esto, como la fructosa se utilizaría en su mayoría para la reoxidación de los cofactores redox (Tabla 4-3), esta mayor razón de consumo de fructosa por sobre glucosa tiene un severo impacto sobre el equilibrio

redox de *O. oeni* (Figura 4-26). Esto sugiere que el balance redox juega un importante rol en la adaptación a etanol. Estos resultados concuerdan con estudios anteriores donde se menciona que las células de *O. oeni* adaptadas a etanol poseen bajos niveles de NADH (Silveira, 2004).

Cabe decir que en promedio, el rendimiento de biomasa en NAD^+ calculado para la condición 0% [v/v] etanol ($Y_{\text{NAD}^+ \cdot X} = -0,010$), se encuentra dentro del rango calculado para bacterias ($Y_{\text{NAD}^+ \cdot X} = 0,055$ y $Y_{\text{NAD}^+ \cdot X} = 0,018$ para *O. oeni* y *E. coli* respectivamente (Salou y col., 1994)).

Por otro lado, la disminución del rendimiento de carbono en biomasa ($Y_{x \cdot c}$) al aumentar la concentración de etanol, sería consecuencia del aumento en la síntesis de manitol a partir de fructosa con el objetivo de regenerar NAD^+ . Por lo que esta disminución del rendimiento, no estaría relacionada a mayores requerimientos energéticos debido a la necesidad de recuperar el pH interno producto de la pérdida de homeostasis, como se menciona en literatura (Carreté y col., 2002; Chu-Ky y col., 2005). Ya que adicionalmente, se calculó que el rendimiento de ATP en biomasa ($Y_{x \cdot \text{ATP}}$) sería relativamente constante al aumentar la concentración de etanol (Figura 4-25).

5. CONCLUSIONES

Se diseñó un medio de crecimiento definido para *O. oeni*, el cual cuenta con compuestos de importancia para la resistencia a etanol del microorganismo (ácido málico y ácido cítrico), y con cantidades de azúcar y nitrógeno amino optimizadas mediante el método superficie de respuesta (25 [g/L] de glucosa:fructosa y 1058 [mg/L] de nitrógeno amino). Este medio de crecimiento fue ocupado para cultivar *O. oeni* PSU1 a distintas concentraciones de etanol y pH, pudiendo determinar la tendencia de *O. oeni* a cambiar ciertos parámetros de interés como el rendimiento en ATP, NAD⁺, o las razones de producción y consumo de diferentes compuestos.

En los medios MRS y Maxo2, biomasa, μ_{\max} y tasas volumétricas de consumo de *O. oeni* PSU1 disminuyen al aumentar la concentración de etanol. Estas cinéticas son muy similares entre las concentraciones bajas de etanol (0 y 3% [v/v] de etanol), como a las concentraciones altas de etanol (9 y 12%). Por lo que luego de la concentración 3% [v/v] de etanol existiría un cambio brusco en el metabolismo del microorganismo.

El efecto del etanol sobre el crecimiento de *O. oeni* PSU1 es menos nocivo en Maxo2 que en MRS, alcanzando un μ_{\max} cercano a 0,015 [1/h] a pH 3,5 y 12% [v/v] de etanol en Maxo2, mientras que en MRS a 9% [v/v] de etanol, *O. oeni* no es capaz de crecer en forma clara. Siendo la mayor viabilidad de *O. oeni* en Maxo2 atribuible a la presencia conjunta de los ácidos cítrico y málico.

Por medio de cultivos a diferentes concentraciones de etanol en el medio definido Maxo2, y a través del análisis de flujos metabólicos, fue posible calcular las ecuaciones de consumo de glucosa y fructosa. Determinando que la generación de ATP provendría en su mayoría de la metabolización de glucosa, mientras que la regeneración del NAD⁺ estaría a cargo principalmente de la fructosa. Adicionalmente se determinó que a mayores concentraciones de etanol, los flujos metabólicos cambian favoreciendo el consumo de fructosa por sobre glucosa, y favoreciendo la producción de acetato por sobre etanol. Esto trae como principales

consecuencias que el equilibrio redox interno del microorganismo cambia a un estado más oxidativo y que se produce una mayor cantidad de ATP por glucosa consumida.

El rendimiento de ATP en biomasa en medio definido, es ligeramente inferior a altas concentraciones de etanol, por lo que el menor crecimiento de *O. oeni* PSU1 a altas concentraciones de etanol, no se debería a un mayor gasto energético del microorganismo (como normalmente se explica en literatura). Sin embargo, el menor crecimiento del microorganismo estaría relacionado al equilibrio redox interno más oxidativo a altas concentraciones de etanol, siendo la regeneración de NAD⁺, el paso limitante para su crecimiento.

Se evaluó la efectividad de tres tratamientos, presentes en literatura, que aumentarían la viabilidad de *O. oeni* VP41 en condiciones enológicas, determinando que los tratamientos consistentes en shock térmico, y adición de ácido oleico, no aumentan de forma significativa biomasa ni consumo de ácido málico en el cultivo. En cambio, el tratamiento de adaptación a etanol - cultivos sucesivos en medio complejo con concentraciones ascendentes de etanol – sí permite aumentar la biomasa, reducir en un 30% el ácido málico residual y minimizar la fase lag del cultivo.

Finalmente, el medio optimizado en este estudio permite crecer a *O. oeni* PSU1 en condiciones enológicas a parámetros mucho más favorables ($\mu_{\max}=0,014$ [1/h] y biomasa= 0,6 [gMS/L]) que los medios definidos presentes en literatura (e. g. medio enológico de Zhang y col (2012) el cual obtiene un $\mu_{\max}=0,007$ [1/h] y biomasa= 0,014 [gMS/L]). La existencia de este medio definido permitirá llevar a cabo una mayor cantidad de estudios cuantitativos sobre el metabolismo de *O. oeni* en condiciones enológicas, permitiendo mejoras en la tecnología de producción del vino que impacten positivamente la calidad de éste.

6. PERSPECTIVAS

Para continuar optimizando el crecimiento de *O. oeni* en medio definido, se deben determinar los compuestos que inhiben el crecimiento de *O. oeni* al amplificar las concentraciones del medio Maxo2, con el objetivo de diseñar estrategias que maximicen el crecimiento.

Dada la gran cantidad de metabolitos secundarios producidos en *O. oeni* con el objetivo de restablecer el cofactor NAD⁺ en su forma oxidada; podría evaluarse la suplementación de un compuesto que permita la reoxidación de estos factores de forma más expedita (e. g. piruvato), para redirigir el carbono consumido hacia la producción de biomasa y generación de ATP.

El cultivo de *O. oeni* en bioreactores, permitirá determinar la concentración de oxígeno disuelto óptima para alcanzar mayor cantidad de biomasa. Por otro lado, la medición de nuevas variables como el potencial redox o la concentración de dióxido de carbono a la salida, caracterizarán más detalladamente el comportamiento del microorganismo.

El cultivo de *O. oeni* PSU1 en medio definido, con fructosa como única fuente de carbono, permitirá discriminar si acaso la fructosa puede consumirse por la vía de la fermentación heteroláctica, o solamente puede metabolizarse hacia manitol.

El medio desarrollado tomó en cuenta como principales características enológicas el bajo pH y las altas concentraciones de etanol. Sin embargo, con el objetivo de continuar asemejando el medio Maxo2 a un medio enológico, se puede evaluar la adición de otros compuestos característicos del vino tales como polifenoles, antocianinas, sulfitos y otros.

Se aconseja repetir el experimento de niveles de etanol a pH 3,5, con el objeto de verificar que la presencia de etanol no afecta a *O. oeni* en medio Maxo2 a pH 3,5.

BIBLIOGRAFIA

Augagneur, Y., Ritt, J.-F., Linares, D. M., Remize, F., Tourdot-Maréchal, R., Garmyn, D. y Guzzo, J. (2007). Dual effect of organic acids as a function of external pH in *Oenococcus oeni*. *Archives of Microbiology*, 188(2), 147–57.

Bartowsky, E. J. (2005). *Oenococcus oeni* and malolactic fermentation – moving into the molecular arena. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(2), 174–187.

Bauer, R. y Dicks, L. (2004). Control of Malolactic Fermentation in Wine . A Review. *South African Journal of Enology Y Viticultura*, 25(2).

Berthels, N. J., Cordero Otero, R. R., Bauer, F. F., Thevelein, J. M. y Pretorius, I. S. (2004). Discrepancy in glucose and fructose utilisation during fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains. *FEMS Yeast Research*, 4(7), 683–9.

Bordeu S, E. y Scarpa B, J. (1998). *Análisis Químico del Vino*. (E. U. C. de Chile, Ed.) (Segunda Ed.).

Bordons, A., Reguant, C., Araque, I., Alegret, O. y Bordas, M. (2010). Mecanismos de adaptación de *Oenococcus oeni* al mayor grado alcohólico y otras condiciones del cambio climático, 1–10.

Bouguettoucha, A. y Amrane, A. (2011). Unstructured Models for Lactic Acid Fermentation – A Review. *Food Technol. Biotechnol*, 49(1), 3–12.

Bravo-Ferrada, B. M., Tymczyszyn, E. E., Gómez-Zavaglia, ay Semorile, L. (2013). Effect of acclimation medium on cell viability, membrane integrity and ability to consume malic acid in synthetic wine by oenological *Lactobacillus plantarum* strains. *Journal of Applied Microbiology*.

Carreté, R., Vidal, M. T., Bordons, A. y Constantí, M. (2002). Inhibitory effect of sulfur dioxide and other stress compounds in wine on the ATPase activity of *Oenococcus oeni*. *FEMS Microbiology Letters*, 211(2), 155–9.

Caspritz, G. y Radlert, F. (1983). Malolactic enzyme of *Lactobacillus plantarum*. Purification, properties, and distribution among bacteria. *The Journal of Biological Chemistry*, 258(8), 4907–4910.

Chiou, T.-W., Hsieh, Y.-C. y Ho, C. S. (2000). High density culture of insect cells using rational medium design and feeding strategy. *Bioprocess Engineering*, 22(6), 483–491.

Chu-Ky, S., Tourdot-Marechal, R., Marechal, P.-A. y Guzzo, J. (2005). Combined cold, acid, ethanol shocks in *Oenococcus oeni*: effects on membrane fluidity and cell viability. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1717(2), 118–24.

Costello, P. J., Henschke, P. A. y Markides, A. J. (2003). Standardised methodology for testing malolactic bacteria and wine yeast compatibility. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, (9), 127–137.

Davis, C. R., Wibowo, D. J., Lee, T. H. y Fleet, G. H. (1986). Growth and Metabolism of Lactic Acid Bacteria during and after Malolactic Fermentation of Wines at Different pH. *Applied and Environmental Microbiology*, 51(3), 539–45.

De Man, J., Rogosa, M. y Sharpe, M. E. (1960). a Medium for the Cultivation of Lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, 23(1), 130–135.

Delaney, N. F., Kaczmarek, M. E., Ward, L. M., Swanson, P. K., Lee, M.-C. & Marx, C. J. (2013). Development of an optimized medium, strain and high-throughput culturing methods for *Methylobacterium extorquens*. *PLoS One*, 8(4).

Ferrer, S., Pardo, I. & Maicas, S. (2001). Malolactic fermentation in wine with high densities of non-proliferating *Oenococcus oeni*, 805–810.

Fourcassie, P., Belarbi, A. & Maujean, A. (1992). Growth, D-glucose utilization and malolactic fermentation by *Leuconostoc oenos* strains in 18 media deficient in one amino acid. *Journal of Applied Bacteriology*, (73), 489–496.

Garbay, S., Rozes, N. & Lonvaud-Funel, A. (1995). Fatty acid composition of *Leuconostoc oenos*, incidence of growth conditions and relationship with malolactic efficiency. *Food Microbiology*, 12, 387–395.

Guerrini, S., Bastianini, A., Granchi, L. & Vincenzini, M. (2002). Effect of Oleic Acid on *Oenococcus oeni* Strains and Malolactic Fermentation in Wine. *Current Microbiology*, 44(1), 5–9.

Guzzo, J. & Cavin, J. (1994). Induction of stress proteins in *leuconostoc oenos* to perform direct inoculation of wine. *Biotechnology Letters*, 16(11), 1189–1194.

Jung, I. & Lovitt, R. W. (2010). A comparative study of the growth of lactic acid bacteria in a pilot scale membrane bioreactor. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 85(9), 1250–1259.

Lerm, E., Pellerin, P. & du Toit, M. (2012). Mixed bacterial starter culture launched. *Australian & New Zealand Grapegrower & Winemaker*, (577), 52–56.

Lim, C. ., Rahim, R. A., Ho, Y. W.y Arbakariya, B. A. (2007). Optimization of Growth medium for Efficient Cultivation of *Lactobacillus salivarius* i 24 using Response Surface Method responses. *Malaysian Journal of Microbiology*, 3(2), 41–47.

Liu, S. Q., Davis, C. R.y Brooks, J. D. (1995). Growth and Metabolism of Selected Lactic Acid Bacteria in Synthetic Wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, (2), 166–174.

Lonvaud-Funel, A. (1999). Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *International Journal of General and Molecular Biology*, 76(1-4), 317-331.

Maicas, S., Ferrer, S.y Pardo, I. (2002). NAD(P)H regeneration is the key for heterolactic fermentation of hexoses in *Oenococcus oeni*. *Microbiology (Reading, England)*, 148(Pt 1), 325–32.

Maitre, M., Weidmann, S., Dubois-Brissonnet, F., David, V., Covès, J.y Guzzo, J. (2014). Adaptation of the Wine Bacterium *Oenococcus oeni* to Ethanol Stress: Role of the Small Heat Shock Protein Lo18 in Membrane Integrity. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(10), 2973–80.

Manca de Nadra, M. C., Arena, M.y Saguir, F. (2003). Nutritional requirements and amino acids utilization by lactic acid bacteria from wine -A short review. *Food, Agriculture & Environment*, 1(December), 76–79.

Mateles, R. I.y Battat, E. (1974). Continuous culture used for media optimization. *Applied Microbiology*, 28(6), 901–5.

Merino, R. (2010). Strategic Plan 2020.

Mesas, J. M., Rodríguez, M. C. y Alegre, M. T. (2004). Tolerancia de *Oenococcus oeni* RS1 a las condiciones de estrés del vino. *Ciencia Y Tecnología Alimentaria*, 4, 278–282.

Miranda, M., Ramos, A., Veiga-da-Cunha, M., Loureiro-Dias, M. C. y Santos, H. (1997). Biochemical basis for glucose-induced inhibition of malolactic fermentation in *Leuconostoc oenos*. *Journal of Bacteriology*, 179(17), 5347–54.

Novak, L., Lindley, N. D. y Loubiere, P. (1997). Metabolism and Energetics of *Lactococcus lactis* during Growth in Complex or Synthetic Media. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(7), 2665–2670.

Olguín, N., Bordons, A. y Reguant, C. (2009). Influence of ethanol and pH on the gene expression of the citrate pathway in *Oenococcus oeni*. *Food Microbiology*, 26(2), 197–203.

Olguin, N. T. (2010). Molecular study of the mechanisms of *Oenococcus oeni* involved in its adaptation to wine conditions and in the development of malolactic fermentation. Universitat Rovira I Virgili, Tarragona, Spain. Retrieved from <http://www.tesisenred.net/bitstream/handle/10803/8682/TESIS.pdf?sequence=1>

Passos, F. V., Fleming, H. P., Hassan, H. M. y McFeeters, R. F. (2003). Effect of malic acid on the growth kinetics of *Lactobacillus plantarum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63(2), 207–11.

Polak Berecka, M., Waśko, A., Kordowska Wiater, M., Podleśny, M., Targoński, Z. y Kubik Komar, A. (2010). Optimization of medium composition for enhancing growth of *Lactobacillus rhamnosus* PEN using response surface methodology. *Polish Journal of Microbiology / Polskie Towarzystwo Mikrobiologów = The Polish Society of Microbiologists*, 59(2), 113–8.

Ramos, A., Lolkema, J. S., Konings, W. N., Santos, H., Ramos, A. N. A., Lolkema, J. S. y Konings, W. I. L. N. (1995). Enzyme Basis for pH Regulation of Citrate and Pyruvate Metabolism by *Leuconostoc oenos*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(4).

Ramos, A., Poolman, B., Santos, H., Lolkema, J. S. y Konings, W. N. (1994). Uniport of anionic citrate and proton consumption in citrate metabolism generates a proton motive force in *Leuconostoc oenos*. *Journal of Bacteriology*, 176(16), 4899–905.

Remize, F., Gaudin, A., Kong, Y., Guzzo, J., Alexandre, H., Krieger, S. y Guilloux-Benatier, M. (2006). *Oenococcus oeni* preference for peptides: qualitative and quantitative analysis of nitrogen assimilation. *Archives of Microbiology*, 185(6), 459–69.

Richter, H., Hamann, I. y Uden, G. (2003). Use of the mannitol pathway in fructose fermentation of *Oenococcus oeni* due to limiting redox regeneration capacity of the ethanol pathway. *Archives of Microbiology*, 179(4), 227–33.

Saguir, F. M. y Manca de Nadra, M. C. (2002). Effect of L-malic and citric acids metabolism on the essential amino acid requirements for *Oenococcus oeni* growth. *Journal of Applied Microbiology*, 93(2), 295–301.

Saguir, F. y Manca de Nadra, M. C. (1996). Organic acid metabolism under different glucose concentrations of *Leuconostoc oenos* from wine. *Journal of Applied Bacteriology*, 393–397.

Salou, P., Leroy, M. J., Goma, G. y Pareilleux, A. (1991). Influence of pH and malate-glucose ratio on the growth kinetics of *Leuconostoc oenos*, 87–91.

Salou, P., Loubiere, P. y Pareilleux, A. (1994). Growth and Energetics of *Leuconostoc oenos* during Cometabolism of Glucose with Citrate or Fructose, 60(5).

Silveira, M. G., Baumgärtner, M., Rombouts, F. M. y Grac, M. (2004). Effect of Adaptation to Ethanol on Cytoplasmic and Membrane Protein Profiles of *Oenococcus oeni*.

Solieri, L. y Giudici, P. (2010). Development of a sequence-characterized amplified region marker-targeted quantitative PCR assay for strain-specific detection of *Oenococcus oeni* during wine malolactic fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(23), 7765–74.

Soto, M. (2013). La copa medio vacía ¿o medio llena? Retrieved June 27, 2015, from <http://www.capital.cl/negocios/2013/07/15/070752-la-copa-medio-vacia-o-medio-llena>

Styger, G., Prior, B. y Bauer, F. F. (2011). Wine flavor and aroma. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 38(9), 1145–59.

Swiegers, J. H., Bartowsky, E. J., Henschke, P. a. y Pretorius, I. S. (2005). Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(2), 139–173.

Terrade, N. y Mira de Orduña, R. (2009a). Arginine and citrulline do not stimulate growth of two *Oenococcus oeni* strains in wine. *FEMS Microbiology Letters*, 290(1), 98–104.

Terrade, N. y Mira de Orduña, R. (2009b). Determination of the essential nutrient requirements of wine-related bacteria from the genera *Oenococcus* and *Lactobacillus*. *International Journal of Food Microbiology*, 133(1-2), 8–13.

Terrade, N., Noël, R., Couillaud, R. y de Orduña, R. M. (2009). A new chemically defined medium for wine lactic acid bacteria. *Food Research International*, 42(3), 363–367.

Teusink, B., Wiersma, A., Molenaar, D. y Francke, C. (2006). Analysis of Growth of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 on a Complex Medium Using a Genome-scale Metabolic Model. Supplementary material I : Biomass composition, 1–6.

Teusink, B., Wiersma, A., Molenaar, D., Francke, C., de Vos, W. M., Siezen, R. J. y Smid, E. J. (2006). Analysis of growth of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 on a complex medium using a genome-scale metabolic model. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(52), 40041–8.

Varma, A. y Palsson, B. (1994). Metabolic Flux Balancing: Basic Concepts, Scientific and Practical Use. *Nature Publishing Group*.

Vasserot, Y., Dion, C., Bonnet, E., Maujean, A. y Jeandet, P. (2001). A study into the role of L-aspartic acid on the metabolism of L-malic acid and D-glucose by *Oenococcus oeni*. *Journal of Applied Microbiology*, 90(3), 380–7.

Wang, Z., Le, G., Shi, Y. y Węgrzyn, G. (2001). Medium design for plasmid DNA production based on stoichiometric model. *Process Biochemistry*, 36(11), 1085–1093.

Waterhouse. (2012). Red Wine Composition — Waterhouse Lab. Retrieved October 16, 2014, from <http://waterhouse.ucdavis.edu/whats-in-wine/red-wine-composition>

Yee, L. y Blanch, H. W. (1993). Defined media optimization for growth of recombinant *Escherichia coli* X90. *Biotechnology and Bioengineering*, 41(2), 221–30.

Zaunmüller, T., Eichert, M., Richter, H. y Uden, G. (2006). Variations in the energy metabolism of biotechnologically relevant heterofermentative lactic acid bacteria during growth on sugars and organic acids. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72(3), 421–9.

Zhang, G. (2013). The essential amino acids requirements for *Oenococcus Oeni* growth and organic acids metabolism. *African Journal of Microbiology Research*, 7(16), 1591–1597.

Zhang, G., Fan, M., Lv, Q., Li, Y., Liu, Y., Zhang, S.y Zhang, H. (2012). The effect of cold, acid and ethanol shocks on synthesis of membrane fatty acid, freeze-drying survival and malolactic activity of *Oenococcus oeni*. *Annals of Microbiology*, 63(2), 477–485.

Zhangy Lovitt, R. W. (2005). Studies on growth and metabolism of *Oenococcus oeni* on sugars and sugar mixtures. *Journal of Applied Microbiology*, 99(3), 565–72.

Zhu, Y., Rinzema, a, Tramper, J.y Bol, J. (1996). Medium design based on stoichiometric analysis of microbial transglutaminase production by *Streptoverticillium mobaraense*. *Biotechnology and Bioengineering*, 50(3), 291–8.

ANEXOS

ANEXO A: CONFECCIÓN MEDIO MAXOR

El medio MaxoR, desarrollado en forma paralelo con Maxo2, posee la particularidad que la fructosa es el único azúcar añadido (15 [g/L]), además de contar con un diferente perfil de aminoácidos. La concentración de vitaminas, minerales, bases nitrogenadas y ácidos orgánicos es idéntica a la presente en medio Maxo1.

La concentración de los aminoácidos se calculó en función de rendimientos de aminoácidos en biomasa. Al no encontrarse en literatura experimentos que utilicen medios definidos para cultivar *O. oeni*, para calcular sus rendimientos se refirió a datos de microorganismos filogenéticamente cercanos, como *L. plantarum* y *L. lactis* (Novak y col., 1997; Teusink y col., 2006).

Los rendimientos $Y_{xs} \left[\frac{g \text{ MS}}{g} \right]$, se calcularon a partir de datos de *Lactococcus lactis* (Novak y col., 1997; Teusink y col., 2006)) (Ecuación C-2, Tabla A-1). Para calcular la concentración de aminoácidos en el medio se utilizó la Ecuación C-5, considerando alcanzar una concentración de biomasa de 2 [g MS/L], a partir de un inóculo de 0,078 [g MS/L]. Con este fin, utilizamos el menor valor de los rendimientos calculados en la Tabla A-1.

La composición detallada del medio MaxoR se muestra en la sección de materiales y métodos.

Tabla A-1: Rendimientos en biomasa de *L. lactis* y *L. plantarum*, rendimiento seleccionado para diseñar el medio y la respectiva concentración para el medio MaxoR (elaboración propia).

| | $Y_{xs} \left[\frac{g \text{ MS}}{g} \right],$ <i>L. lactis</i> ^(a) | $Y_{xs} \left[\frac{g \text{ MS}}{g} \right],$ <i>L. plantarum</i> ^(a) | Rendimiento seleccionado | g/L medio MaxoR ^(b) |
|---------------------------|--|---|-----------------------------|--------------------------------|
| Alanina | | 56,12 | 56,12 | 0,10 |
| Arginina | | 47,84 | 47,84 | 0,50 |
| Ácido Aspártico | | 15,33 | 15,33 | 0,38 |
| Asparagina ^(c) | | | - | 0,35 |
| Cisteína | | 117,91 | 117,91 | 0,50 |
| Ácido Glutámico | 8,27 | 21,24 | 8,27 | 0,7 |
| Glutamina ^(c) | | | - | 0,2 |
| Glicina | | 51,23 | 51,23 | 0,11 |
| Histidina | | 666,05 | 666,05 | 0,50 |
| Isoleucina | 5,67 | 38,12 | 5,67 | 1,02 |
| Leucina | 2,45 | 25,41 | 2,45 | 2,36 |
| Lisina | | 40,24 | 40,24 | 0,14 |
| Metionina | 22,42 | 68,40 | 22,42 | 0,26 |
| Fenilalanina | | 30,27 | 30,27 | 0,19 |
| Prolina | | 48,25 | 48,25 | 0,12 |
| Serina | 2,15 | 6,02 | 2,15 | 2,68 |
| Treonina | | 11,99 | 11,99 | 0,48 |
| Triptófano | | 839,49 | 839,49 | 0,01 |
| Tirosina | | 24,00 | 24,00 | 0,24 |
| Valina | 5,91 | 26,23 | 5,91 | 0,98 |

(a): Los rendimientos fueron calculados mediante la Ecuación C-2.

(b): Las concentraciones de aminoácidos en el medio se calcularon a partir de la Ecuación C-5.

(c): Aminoácidos cuya concentración se fijó en función de literatura, debido a que no se encontraron datos para calcular sus rendimientos.

ANEXO B: PROTOCOLO DE PREPARACIÓN DE MEDIO

El protocolo desarrollado se basó en el protocolo de preparación utilizado por el Instituto de Investigación del Vino de Australia (A. Contreras, comunicación personal, 2015, febrero). Y tiene por objetivo evitar la precipitación de los nutrientes en el medio de crecimiento.

El siguiente protocolo contempla la preparación previa de once soluciones stock, las cuales deberán añadirse en el orden especificado en la Tabla B-1.

Tabla B-1: Orden de adición de soluciones

| Orden de adición | Solución | Concentración stock [g/L] |
|------------------|--|---------------------------|
| 1 | Ác. málico ^a | 125 |
| 2 | Ác. cítrico ^a | 35 |
| 3 | Fructosa ^a | 200 |
| 4 | Glucosa ^a | 200 |
| 5 | Mix bases nitrogenadas | |
| 6 | Mix sales | |
| 7 | CaCl ₂ ^a | 88 |
| 8 | K ₂ HPO ₄ ^a | 400 |
| 9 | Tween ^a | 1 |
| 10 | Mix aminoácidos ^a | |
| 11 | Mix vitaminas | |

a: Para preparar estas soluciones, disolver en agua miliQ, en agitación, el compuesto correspondiente hasta la concentración indicada en la tabla.

El mix de bases nitrogenadas se preparará disolviendo lentamente todas las bases nitrogenadas en una solución de agua miliQ en agitación, agregando cada base a una concentración igual a 10 veces la concentración final en el medio, la base nitrogenada guanina debe ser la última en ser añadida. La solución se guardará a -21°C.

El mix de sales se preparará disolviendo las sales $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, a una concentración igual a 200 veces la concentración final en el medio. La solución se guardará a -21°C .

El mix de aminoácidos se preparará disolviendo todos los aminoácidos en una solución de agua miliQ en agitación, agregando lentamente cada aminoácido a una concentración igual al doble de la concentración final en el medio. Al terminar de agregar los aminoácidos, la solución se ajustará a pH 2,5 y se continuará agitando durante 30 minutos. La solución se guardará a -4°C .

El mix de vitaminas se preparará disolviendo todas las vitaminas en una solución de agua miliQ en agitación, agregando cada vitamina a una concentración igual a 100 veces la concentración final en el medio. Al terminar de agregar las vitaminas, la solución se ajustará a pH 10, luego de 5 minutos se volverá a ajustar el pH a 7. Se debe cuidar no sobreexponer la solución a la luz, ni al oxígeno (agitar a velocidad media) durante su preparación. La solución se guardará envuelta en papel aluminio a -21°C .

ANEXO C: PARÁMETROS QUE DESCRIBEN EL CRECIMIENTO MICROBIANO.

a) Velocidad específica de crecimiento (μ)

μ es una medida de la rapidez con que el microorganismo crece.

$$\mu = \frac{\ln(\text{Biomasa}_f) - \ln(\text{Biomasa}_o)}{\text{tiempo [h]}} \quad \text{Ecuación C-1}$$

Donde,

$\mu [h^{-1}]$ Tasa específica de crecimiento del microorganismo

$\text{Biomasa}_f \left[\frac{g \text{ MS}}{L} \right]$ Biomasa final del intervalo de tiempo en evaluación.

$\text{Biomasa}_o \left[\frac{g \text{ MS}}{L} \right]$ Biomasa inicial del intervalo de tiempo en evaluación.

tiempo [h] Intervalo de tiempo durante el cual μ es evaluado.

La determinación del μ en la fase exponencial de crecimiento, corresponde a μ_{\max} .

b) Rendimientos (Y_{ps_i})

El rendimiento de un sustrato en producto (Y_{ps_i}) corresponde a la cantidad de producto [g/L] generada por gramo de sustrato (S_i) consumido.

$$Y_{ps_i} \left[\frac{g}{g} \right] = \frac{\Delta \text{Producto}_p}{\Delta \text{Sustrato}_i} \quad \text{Ecuación C-2}$$

Donde,

$Y_{ps_i} \left[\frac{g}{g} \right]$ Rendimiento de sustrato S_i en producto P_p .

$\Delta \text{Producto}_p \left[\frac{g}{L} \right]$ Producto P_p generado durante un determinado intervalo de tiempo

$\Delta S_{\text{Sustrato}_i} \left[\frac{g}{L} \right]$ Sustrato S_i consumido durante un determinado intervalo de tiempo.

Alternativamente, es posible calcular el rendimiento en términos de moles de carbono por litro (en reemplazo a gramos por litro):

$$Y_{PpS_i} \left[\frac{Cmol}{Cmol} \right] = \frac{\Delta Producto_p}{\Delta S_{\text{Sustrato}_i}} \quad \text{Ecuación C-3}$$

Donde,

$Y_{XS_i} \left[\frac{Cmol}{Cmol} \right]$ Rendimiento de S_i en biomasa

$\Delta Producto_p \left[\frac{Cmol}{L} \right]$ Moles de carbono correspondientes a producto p, generada durante un determinado intervalo de tiempo

$\Delta S_{\text{Sustrato}_{i+j}} \left[\frac{Cmol}{L} \right]$ Moles de carbono de compuesto i, consumido durante un determinado intervalo de tiempo.

Cuando el producto p analizado corresponda a biomasa, hablaremos de rendimiento

$Y_{XS_i} \left[\frac{g \text{ MS}}{g} \right]$

Por último, cabe decir, que el rendimiento entre dos productos o dos sustratos, puede entenderse como la razón de producción o consumo entre dos compuestos respectivamente.

c) Tasa volumétrica de consumo

La tasa volumétrica de consumo corresponde a la cantidad de sustrato que se consume en determinado tiempo.

$$q_{Si} = \frac{\Delta S_{Sustrato_i}}{\Delta Tiempo} \quad \text{Ecuación C-4}$$

$q_{Si} \left[\frac{g}{L \cdot h} \right]$ Tasa volumétrica de consumo del sustrato i

$\Delta S_{Sustrato_i} \left[\frac{g}{L} \right]$ Sustrato i consumido durante un determinado intervalo de tiempo.

$\Delta Tiempo [h]$ Delta de tiempo específico expresado en horas

d) Diseño de medio en base a rendimientos.

Dada una cantidad de biomasa inicial, una cantidad de biomasa final y los rendimientos, la siguiente ecuación permite calcular la concentración de sustrato S_i^* consumida por el microorganismo durante un cultivo.

$$S_i^* = \frac{Biomasa_f - Biomasa_0}{Y_{xS_i}} \quad \text{Ecuación C-5}$$

Donde,

$S_i^* \left[\frac{g}{L} \right]$ Concentración de sustrato S_i consumida por el microorganismo durante el cultivo.

$Biomasa_f \left[\frac{g}{L} \right]$ Concentración de biomasa final del cultivo.

$Biomasa_0 \left[\frac{g}{L} \right]$ Concentración de biomasa inicial del cultivo.

$Y_{xS_i} \left[\frac{g}{g} \right]$ Rendimiento de S_i en biomasa

Para el diseño de un medio en base a rendimientos, la concentración de los sustratos (S_i) no limitantes consumidos por el microorganismo durante el cultivo, se amplificaron por un factor de 3, con el objetivo de evitar limitaciones de éstos en el medio:

$$S_i = 3 * S_i^*$$

Ecuación C-6

 $S_i \left[\frac{g}{L} \right]$ Concentración del sustrato S_i no limitante en el medio de diseño. $S_i^* \left[\frac{g}{L} \right]$ Concentración de sustrato S_i efectivamente consumido por el microorganismo durante el cultivo.

ANEXO D: BALANCES DE MASA Y PORCENTAJES DE CONSUMO

Para calcular los porcentajes de consumo y balances de masa se desarrolló un modelo de caja negra, donde los compuestos a analizar corresponden principalmente a las fuentes de carbono y nitrógeno, además de minerales. Las vitaminas no se analizan debido a la imposibilidad para calcular consumos.

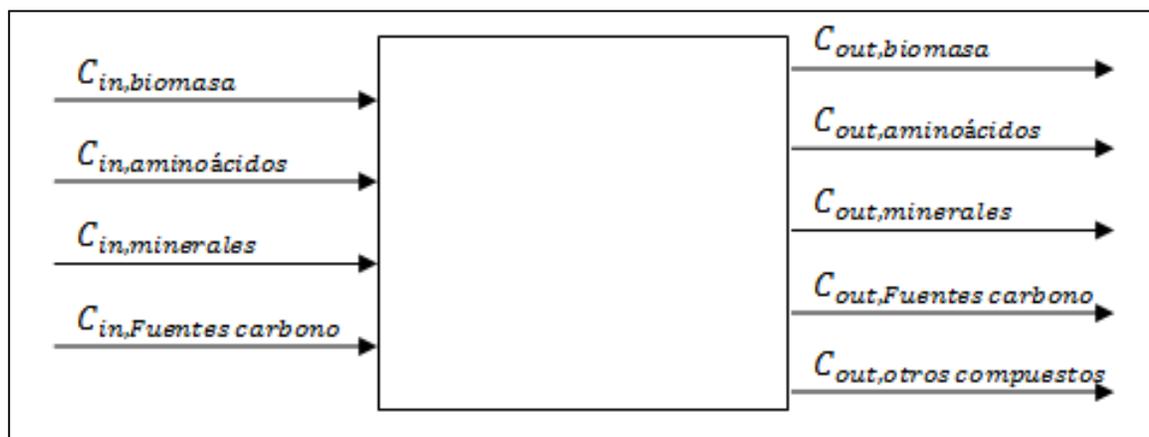


Figura D-1: Representación del esquema de caja negra. Donde $C_{in,i} \left[\frac{g}{L} \right]$ corresponde a la concentración másica inicial de componente i , y $C_{out,i} \left[\frac{g}{L} \right]$ corresponde a la concentración másica final de componente i .

e) Consumo de sustratos

Con el objetivo de dimensionar la utilización de un sustrato se calcula su porcentaje de consumo. Este se calcula como la cantidad consumida del sustrato i , dividida por la cantidad inicialmente disponible.

$$\% \text{ Consumo }_{i=j} = \frac{N_{in,i=j} - N_{out,i=j}}{N_{in,i=j}} \quad \text{Ecuación D-1}$$

Donde,

$\%Consumo_{i=j}$ Porcentaje de consumo del sustrato $i=j$

$N_{in,i=j} \left[\frac{mol}{L} \right]$ Concentración molar inicial del sustrato $i=j$

$N_{out,i=j} \left[\frac{mol}{L} \right]$ Concentración molar final del sustrato $i=j$

f) Balances elementales

Se calcularon balances elementales para los elementos carbono y nitrógeno. No fue posible realizar balances para azufre o fósforo debido a la imposibilidad de medir la concentración final de estos elementos.

Los balances elementales representan el porcentaje de recuperación, en el producto, del elemento E consumido en los sustratos. Estos pueden señalar la presencia de compuestos que no han sido identificados en el análisis. Específicamente, si el balance resulta mayor a cien, existirían compuestos a la entrada que no se están identificando, mientras que si el balance resulta menor a cien, existirían compuestos a la salida que no se están identificando.

Los balances elementales se calculan como concentración molar del elemento E contenida en los productos producidos, dividido por la concentración molar del elemento E, contenida en los sustratos consumidos multiplicado por 100.

$$\% Balance_e = \frac{E_{out,e,i=1..25} - E_{in,e,i=1..25}}{E_{in,1,i=26..31} - E_{out,e,i=1..25}} * 100 \quad \text{Ecuación D-2}$$

Donde,

$E_{in,e,i=1..25} \left[\frac{mol}{L} \right]$ Concentración molar inicial del elemento E, contenida en los compuestos identificados como sustratos (compuestos de índice 1 hasta 25 (Tabla E-1)).

$E_{out,e,i=1..25} \left[\frac{mol}{L} \right]$ Concentración molar final del elemento E, contenida en los compuestos identificados como sustratos

$E_{in,e,i=26..31} \left[\frac{mol}{L} \right]$ Concentración molar inicial del elemento E, contenida en los compuestos identificados como productos (compuestos de índice 26 hasta 31 (Tabla E-1).

$E_{out,e,i=26..31} \left[\frac{mol}{L} \right]$ Concentración molar final del elemento E, contenida en los compuestos identificados como productos

g) Concentración molar inicial del elemento e, proveniente de los compuestos $i = j..h$

Para realizar los balances y porcentajes de consumos se debe conocer el flujo de entrada y de salida de cada elemento de interés.

$$E_{in,e,i=h..j} = \sum_{i=h..j} N_{in,i} * \alpha_{e,i} \quad \text{Ecuación D-3}$$

Donde,

$E_{in,e,i=h..j} \left[\frac{mol}{L} \right]$ Concentración molar inicial del elemento e, contenida en los compuestos i

$\alpha_{e,i}$ Moles del elemento e, por mol de compuesto i

$N_{in,i} \left[\frac{mol}{L} \right]$ Concentración molar inicial del compuesto i

La concentración molar de un compuesto ($N_{in,i}$) se calcula a partir de su concentración másica, a través de la siguiente expresión:

$$N_{in,i} = \frac{C_{in,i}}{PM_i} \quad \text{Ecuación D-4}$$

La ecuación (opuesta (concentración másica a partir de concentración molar) es la siguiente.

$$C_{in,i} = N_{in,i} * PM_i \quad \text{Ecuación D-5}$$

Donde,

$N_{in,i} \left[\frac{mol}{L} \right]$ Concentración molar inicial del compuesto i

$C_{in,i} \left[\frac{g}{L} \right]$ Concentración másica inicial del compuesto i

$PM_i \left[\frac{g}{mol} \right]$ Peso molecular compuesto i

Para calcular los flujos de entrada calculados en $\left[\frac{mol}{L} \right]$ (Ecuación D-3) a $\left[\frac{g}{L} \right]$ debe aplicarse la Ecuación D- obteniendo la siguiente expresión:

$$C_{in,e,i=h..j} = E_{in,e,i=h..j} * PM_e \quad \text{Ecuación D-6}$$

Donde,

$C_{in,e,i=h..j} \left[\frac{g}{L} \right]$ Concentración másica inicial del elemento e, contenida en los compuestos i

$E_{in,e,i=h..j} \left[\frac{mol}{L} \right]$ Concentración molar inicial del elemento e, contenida en los compuestos i

$PM_e \left[\frac{g}{mol} \right]$ Peso molecular elemento e

Por ejemplo para calcular el FAN en [g/L], debe aplicarse la Ecuación D-6, con i=aminoácidos y e= nitrógeno (Anexo: Tabla E-1).

ANEXO E: ÍNDICES DE ELEMENTOS Y COMPUESTOS

Tabla E-1: Índices de compuestos y valores alpha correspondientes a los subíndices de cada fórmula (se omite el oxígeno debido a no realizar balances con él)

| Índice | Grupo | Compuesto | PM [g/mol] | Formula (Valores alpha) | | | |
|--------|--|---------------------|------------|-------------------------|------|------|------|
| | | | | C | N | S | P |
| 1 | Aminoácidos (Fuentes de Nitrógeno) i=1..21 | Arginina (R) | 174,2 | 6 | 4 | 0 | 0 |
| 2 | | Ácido Aspártico (D) | 133,1 | 4 | 1 | 0 | 0 |
| 3 | | Cisteína (C) | 121,16 | 3 | 1 | 1 | 0 |
| 4 | | Histidina (H) | 155,15 | 6 | 3 | 0 | 0 |
| 5 | | Isoleucina (I) | 131,17 | 6 | 1 | 0 | 0 |
| 6 | | Leucina (L) | 131,17 | 6 | 1 | 0 | 0 |
| 7 | | Metionina (M) | 149,21 | 5 | 1 | 1 | 0 |
| 8 | | Fenilalanina (F) | 165,19 | 9 | 1 | 0 | 0 |
| 9 | | Prolina (P) | 115,13 | 5 | 1 | 0 | 0 |
| 10 | | Treonina (T) | 119,12 | 4 | 1 | 0 | 0 |
| 11 | | Triptófano (W) | 204,23 | 11 | 2 | 0 | 0 |
| 12 | | Tirosina (Y) | 181,19 | 9 | 1 | 0 | 0 |
| 13 | | Valina (V) | 119,15 | 5 | 1 | 0 | 0 |
| 14 | | Aspargina (N) | 132,12 | 4 | 2 | 0 | 0 |
| 15 | | Ácido Glutámico (E) | 147,13 | 5 | 1 | 0 | 0 |
| 16 | | Glutamina (Q) | 146,14 | 5 | 2 | 0 | 0 |
| 17 | | Serina (S) | 105,09 | 3 | 1 | 0 | 0 |
| 18 | | Alanina (A) | 89,09 | 3 | 1 | 0 | 0 |
| 19 | | Glicina (G) | 75,07 | 2 | 1 | 0 | 0 |
| 20 | | Lisina (K) | 146,19 | 6 | 2 | 0 | 0 |
| 21 | | Amonio NH4+ | 18,04 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 22 | Fuentes de carbono y/o energía i=22..25 | Fructosa | 180,00 | 6 | 0 | 0 | 0 |
| 23 | | glucosa | 180,00 | 6 | 0 | 0 | 0 |
| 24 | | Ac málico | 134,09 | 4 | 0 | 0 | 0 |
| 25 | | Ac cítrico | 192,13 | 6 | 0 | 0 | 0 |
| 26 | | Acetato | 60,05 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| 27 | Productos i=26..31 | Manitol | 182,17 | 6 | 0 | 0 | 0 |
| 28 | | Ac láctico | 90,08 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| 29 | | Eritritol | 122,12 | 4 | 0 | 0 | 0,00 |
| 30 | | Glicerol | 92,09 | 3 | 0 | 0 | 0,00 |
| 31 | | Etanol | 46,07 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| 33 | Minerales i=22..27 | MnSO4* 1 H2O | 169 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 34 | | MgSO4* 7 H2O | 246,36 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 35 | | FeSO4* 7 H2O | 277,9076 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 36 | | CuSO4* 5 H2O | 249,6086 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 37 | | ZnSO4* 7 H2O | 287,44 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 38 | | K2HPO4 0 H2O | 174,18 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 32 | | Biomasa | 28,07 | 1,00 | 0,22 | 0,01 | 0,02 |