

Universidad Nacional del Comahue

Centro Regional Universitario Bariloche

Tesis para optar al título de Doctora en Biología



**CARACTERIZACIÓN DE  
TOXINAS KILLER CON  
POTENCIAL APLICACIÓN EN  
BIOCONTROL DE LEVADURAS  
CONTAMINANTES DE VINOS.**

Lic. María Leticia Villalba



**Lic. María Leticia Villalba**



**Directora: Dra. Marcela Paula Sangorrín**



**Co-Director: Dr. Christian Ariel Lopes**

**Este trabajo fue llevado a cabo en el**  
**Laboratorio de Microbiología y Biotecnología**

**Grupo de Biodiversidad y Biotecnología de Levaduras**

**Instituto de Investigación y Desarrollo en Ingeniería de Procesos,  
Biotecnología y Energías Alternativas (PROBIEN)**



**CONICET - Universidad Nacional del Comahue**

**Facultad de Ingeniería**

**Buenos Aires 1400 (8300) Neuquén, Argentina**

Con el apoyo financiero de:

CONICET

Universidad Nacional del Comahue

Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva

(MINCyT)

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi Directora Marcela Sangorrín y a mi co-Director Christian Lopes por permitirme llevar adelante este proyecto, por abrirme las puertas del laboratorio y darme la posibilidad de compartir mi trabajo con personas que hoy son parte importante de mi vida.

A las personas de otros laboratorios que me permitieron el uso de equipos e instalaciones para que pueda llevar adelante algunos ensayos, que me ayudaron y enseñaron de forma desinteresada.

A mi familia que siempre supo entender y respetar mis tiempos y responsabilidades.

<b>ÍNDICE GENERAL.....</b>	<b>5</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>9</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS.....</b>	<b>11</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>13</b>
<b>PALABRAS CLAVE.....</b>	<b>15</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>16</b>
<b>KEYWORDS.....</b>	<b>18</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>19</b>
I.1 Toxinas <i>killer</i> .....	19
I.1.1 Carácter <i>killer</i> .....	19
I.1.2 Mecanismo de acción de las toxinas <i>killer</i> .....	20
I.2 Industria vitivinícola.....	24
I.2.1 Vitivinicultura.....	24
I.2.2 Vitivinicultura en Argentina.....	25
I.2.3 Microbiología del vino.....	27
I.2.4 Factores de estrés físico-químicos asociados al proceso fermentativo.....	31
I.3 Deterioro del vino.....	33
I.3.1 Microorganismos que deterioran el vino.....	33
I.3.2 Métodos de control de microorganismos contaminantes.....	37
I.4 Aplicación de las toxinas <i>killer</i> en la industria vitivinícola.....	39
I.4.1 Toxinas <i>killer</i> como agentes de biocontrol.....	39
I.4.2 Producción de toxinas <i>killer</i> .....	42
<b>II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>44</b>
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>45</b>

III.1.1 Microorganismos.....	45
III.1.2 Mantenimiento de microorganismos.....	47
III.2 Medios de cultivo.....	47
III.3 Soluciones y soluciones buffer.....	49
III.4 Cultivo de levaduras.....	49
III.4.1 Preparación de inóculos de levaduras.....	49
III.4.2 Cultivos líquidos para producción de toxinas.....	50
III.5 Determinaciones y procesos analíticos.....	50
III.5.1 Determinación cualitativa del fenotipo <i>killer</i> por el método de la estría.....	50
III.5.2 Determinación semicuantitativa del fenotipo <i>killer</i> por el método del well (WTM).....	50
III.5.3 Determinación cuantitativa del fenotipo <i>killer</i> por el método multiwell (MWM) y cálculo de unidades de actividad <i>killer</i> .....	50
III.5.4 Determinación de proteínas por el método de Lowry.....	51
III.5.5 Determinación de actividad $\beta$ -glucanasa.....	51
III.5.6 Actividad quitinolítica.....	52
III.6 Métodos de obtención de extractos proteicos.....	52
III.6.1 Precipitación de proteínas con sulfato de amonio.....	53
III.6.2 Precipitación de proteínas con etanol.....	53
III.6.3 Concentración con membrana.....	53
III.7 Ensayos de caracterización preliminar.....	53
III.7.1 Determinación de actividad en condiciones de estrés fisicoquímico.....	53
III.7.2 Determinación de actividad remanente luego de incubación en mosto y vino.....	54
III.7.3 Determinación de la interacción con la pared de la cepa sensible.....	55
III.8 Métodos estadísticos.....	55
III.8.1 Diseño central compuesto.....	55
III.8.2 Diseño experimental.....	57
III.8.3 Modelado del crecimiento.....	57
III.8.4 Metodología de superficie de respuesta.....	58
III.8.5 Validación de los resultados.....	58
III.9 Cromatografía de afinidad.....	58
III.10 Caracterización bioquímica de las toxinas purificadas.....	59
III.10.1 Determinación por microscopía de fluorescencia de muerte celular con yoduro de propidio (IP).....	59

III.10.2. Determinación del daño en la pared celular con Calcofluor White® .....	59
III.10.3 Determinación de la acumulación de especies reactivas del oxígeno (ROS) por estrés oxidativo.....	60
III.10.4 Determinación de la externalización de la fosfatidilserina.....	60
III.10.5 Determinación de la morfología nuclear .....	61
III.11 Análisis de la inhibición de la producción de fenoles volátiles.....	61
III.11.1 Aclimatación de cepas al crecimiento en vino sintético.....	61
III.11.2 Determinación de producción de fenoles volátiles por HPLC.....	61
<b>IV. RESULTADOS.....</b>	<b>63</b>
IV.1 CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR DE TOXINAS <i>KILLER</i> .....	63
IV.1.1 Determinación de capacidad antagónica frente a la biota de levaduras del proceso de producción vínica.....	63
IV.1.2 Cinética de producción de las toxinas <i>killer</i> .....	65
IV.1.3 Obtención de extracto crudo.....	67
IV.1.4 Producción en diversos medios de cultivo.....	68
IV.1.5 Cuantificación de la inhibición de las cepas contaminantes de vinos.....	69
IV.1.6 Estabilidad de las toxinas en condiciones de estrés fisicoquímico.....	70
IV.1.7 Actividad remanente en mosto de uva y vino.....	71
IV.1.8 Determinación de la interacción de las toxinas con los constituyentes de la pared celular.....	71
IV.1.9 Purificación por cromatografía de afinidad.....	73
IV.2 DESARROLLO DE MEDIO DE CULTIVO Y PURIFICACIÓN DE LAS TOXINAS <i>KILLER</i> .....	76
IV.2.1 Optimización de la producción .....	76
IV.3 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LAS TOXINAS PURIFICADAS.....	88
IV.3.1 Inhibición de las cepas contaminantes.....	88
IV.3.2 Confirmación de la interacción con la pared de las cepas sensibles.....	89
IV.3.3 Determinación del mecanismo de acción en la célula sensible.....	91
IV.3.3.1 Actividad enzimática.....	91

IV.3.3.2 Determinación del daño en la pared celular .....	93
IV.3.3.3 Determinación de la acumulación de especies reactivas del oxígeno (ROS) por estrés oxidativo.....	95
IV.3.3.4 Determinación de la translocación de fosfatidilserina hacia la cara externa de la membrana plasmática.....	96
IV.3.3.5 Determinación de integridad nuclear.....	97
IV.4 APLICACIÓN EN LA INDUSTRIA VITIVINÍCOLA.....	100
IV.4.1 Análisis de la inhibición de la producción de fenoles volátiles.....	100
<b>V. DISCUSIÓN.....</b>	<b>105</b>
<b>VI. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>116</b>
<b>VII. ARTÍCULOS PUBLICADOS.....</b>	<b>129</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura I.1:</b> Estructura de la pared celular de levaduras.....	21
<b>Figura I.2:</b> Mecanismos de acción de las toxinas <i>killer</i> .....	23
<b>Figura I.3:</b> Regiones vitivinícolas argentinas.....	26
<b>Figura I.4:</b> Impacto de levaduras y bacterias durante la fermentación vínica.....	29
<b>Figura I.5:</b> Descarboxilación del ácido $\rho$ -cumárico y del ácido ferúlico y reducción del 4-vinilfenol y 4-vinilguayacol hacia sus respectivos etil derivados.....	36
<b>Figura IV.1:</b> Determinación de la cinética de producción de toxinas <i>killer</i> a lo largo de la curva de crecimiento de las levaduras seleccionadas.....	66
<b>Figura IV.2:</b> Actividad <i>killer</i> de SeKT, TdKT y WaKT frente a diferentes levaduras contaminantes de vinos.....	69
<b>Figura IV.3:</b> Actividad remanente de SeKT, TdKT y WaKT frente a <i>C. glabrata</i> al inicio y luego de 5 y 48 horas de incubación a 4°C en agua, mosto de uva o vino.....	71
<b>Figura IV.4:</b> Perfil de elusión de SeKT, TdKT y WaKT en cromatografía de afinidad en columna de sefarosa-pustulano y su actividad <i>killer</i> frente a <i>C. glabrata</i> .....	74
<b>Figura IV.5:</b> Influencia de la temperatura y el contenido de tritón en la actividad $\beta$ -glucanasa de producciones de SeKT.....	81
<b>Figura IV.6:</b> Influencia de la temperatura y el contenido de tritón en la actividad <i>killer</i> de TdKT.....	83
<b>Figura IV.7:</b> Influencia de la temperatura, la agitación, el contenido de tritón y glicerol en la actividad $\beta$ -glucanasa de TdKT.....	84
<b>Figura IV.8:</b> Influencia de la velocidad de agitación, el contenido de glicerol y tritón en el contenido de proteínas de WaKT.....	85
<b>Figura IV.9:</b> Influencia de la velocidad de agitación, la temperatura, el contenido de glicerol y tritón en la actividad $\beta$ -glucanasa de WaKT.....	86
<b>Figura IV.10:</b> Actividad <i>killer</i> para condiciones de producción sin optimizar y optimizadas de SeKT, TdKT y WaKT.....	88
<b>Figura IV.11:</b> UA <i>killer</i> , quitinasa y glucanasa para diferentes volúmenes de SeKT TdKT y WaKT purificadas por cromatografía de afinidad.....	92

<b>Figura IV.12:</b> Evaluación del posible daño a la pared celular por tinción doble con Calcofluor White/ioduro de propidio.....	94
<b>Figura IV.13:</b> Proporción de muerte y daño en la pared celular de células de <i>C. glabrata</i> , luego de 24 horas de incubación con 4 UA de SeKT, TdKT y WaKT.....	95
<b>Figura IV.14:</b> Proporción de células de <i>C. glabrata</i> según tinción selectiva DHE con microscopía de fluorescencia, luego de incubación con SeKT, TdKT y WaKT.....	96
<b>Figura IV.15:</b> Evaluación de la translocación de la fosfatidilserina por tinción dual con Anexina V/ ioduro de propidio.....	97
<b>Figura IV.16:</b> Determinación del avance de fenotipo apoptótico en <i>C. glabrata</i> incubada con agua (control), 1 y 2 UA de SeKT.....	98
<b>Figura IV.17:</b> Evaluación de la morfología nuclear con tinción de Hoeschst .....	99
<b>Figura IV.18:</b> Curvas de crecimiento modeladas según Gompertz de <i>Meyerozima guilliermondii</i> , <i>Pichia membranifaciens</i> , <i>Pichia manshurica</i> y <i>Dekkera bruxellensis</i> en vino sintético con 0, 2 y 4 UA de SeKT.....	102
<b>Figura IV.19:</b> Curvas de crecimiento modeladas según Gompertz de <i>Meyerozima guilliermondii</i> , <i>Pichia membranifaciens</i> , <i>Pichia manshurica</i> y <i>Dekkera bruxellensis</i> en vino sintético con 0, 2 y 4 UA de TdKT.....	103

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla I.1:</b> Componentes mayoritarios del mosto de uva y vino.....	41
<b>Tabla III.1:</b> Levaduras productoras de toxinas <i>killer</i> caracterizadas en este estudio.....	45
<b>Tabla III.2:</b> Levaduras utilizadas como controles en el análisis del fenotipo <i>killer</i> .....	45
<b>Tabla III.3:</b> Levaduras comerciales utilizadas como antagonistas en el análisis del fenotipo <i>killer</i> .....	46
<b>Tabla III.4:</b> Levaduras contaminantes utilizadas como antagonistas en el análisis <i>killer</i> .....	46
<b>Tabla III.5:</b> Ensayos experimentales realizados para obtener la superficie en respuesta según DCC para cuatro factores.....	56
<b>Tabla III.6:</b> Codificación de las variables y determinación de los valores mínimo, central y máximo de cada una.....	57
<b>Tabla IV.1:</b> Sensibilidad de cepas comerciales de <i>S. cerevisiae</i> frente a las levaduras productoras de toxinas <i>killer</i> seleccionadas.....	64
<b>Tabla IV.2:</b> Inhibición del crecimiento de las cepas contaminantes del vino frente a las fracciones que presentaron actividad <i>killer</i> .....	65
<b>Tabla IV.3:</b> Comparación de métodos de obtención de extractos crudos de las diferentes toxinas.....	67
<b>Tabla IV.4:</b> Determinación de actividad específica de cada toxina en diferentes medios de cultivo.....	68
<b>Tabla IV.5:</b> Actividad residual de SeKT, TdKT y WaKT bajo condiciones enológicas.....	70
<b>Tabla IV.6:</b> Ensayos de competición llevados a cabo con polisacáridos de la pared celular de levaduras para detectar posibles sitios de unión de las toxinas.....	72
<b>Tabla IV.7:</b> Tablas de purificación SeKT, TdKT y WaKT.....	75
<b>Tabla IV.8:</b> Determinaciones experimentales de actividad <i>killer</i> , actividad $\beta$ -glucanasa y proteínas totales para SeKT.....	77
<b>Tabla IV.9:</b> Determinaciones experimentales de actividad <i>killer</i> , actividad $\beta$ -glucanasa y proteínas totales para TdKT.....	78
<b>Tabla IV.10:</b> Determinaciones experimentales de actividad <i>killer</i> , actividad $\beta$ -glucanasa y proteínas totales para WaKT.....	79

<b>Tabla IV.11:</b> Parámetros de crecimiento según el modelado de Gompertz para cada cepa, en las 18 condiciones ensayadas.....	80
<b>Tabla IV.12:</b> Efectos estimados a partir del diseño central compuesto para las variables de respuesta en el caso de SeKT.....	82
<b>Tabla IV.13:</b> Efectos estimados a partir del diseño central compuesto para las variables de respuesta en el caso de TdKT.....	82
<b>Tabla IV.14:</b> Efectos estimados a partir del diseño central compuesto para las variables de respuesta en el caso de WaKT.....	87
<b>Tabla IV.15:</b> Condiciones óptimas de cultivo para la obtención de SeKT, TdKT y WaKT obtenidas a partir del diseño estadístico de experimentos.....	88
<b>Tabla IV.16:</b> Inhibición del crecimiento de levaduras contaminantes de vinos por parte de las toxinas purificadas.....	89
<b>Tabla IV.17:</b> Ensayos de competencia con componentes purificados de la pared de levaduras para corroborar posibles sitios de unión de SeKT, TdKT y WaKT.....	90
<b>Tabla IV.18:</b> Actividad antagónica de SeKT sobre a la producción de fenoles volátiles de cepas contaminantes a 30 y 100 días de incubación.....	101
<b>Tabla IV.19:</b> Actividad antagónica de TdKT sobre a la producción de fenoles volátiles de cepas contaminantes a 30 y 100 días de incubación.....	101
<b>Tabla IV.20:</b> Parámetros de crecimiento según el modelado de Gompertz para cada cepa en ausencia o presencia de 2 y 4 UA de SeKT y TdKT.....	104

## RESUMEN

El deterioro microbiológico es una preocupación importante en toda la industria del vino y las herramientas de control son limitadas. El uso de las tecnologías emergentes incluye, entre otras, la utilización de toxinas *killer* como antagonistas biológicos que permitirán reducir la aplicación de dióxido de azufre para inhibir el crecimiento de levaduras contaminantes. Este trabajo aborda la identificación y caracterización de toxinas *killer* producidas por *Torulaspota delbrueckii* (NPCC 1033), *Wickerhamomyces anomalus* (NPCC 1027) y *Saccharomyces eubayanus* (NPCC 1302) con potencial actividad de biocontrol en cepas contaminantes de vinos. Las tres cepas de levaduras son capaces de inhibir selectivamente el crecimiento de *Dekkera bruxellensis*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Pichia manshurica* y *Pichia membranifaciens* sin afectar el desarrollo de la mayoría de las cepas de *S. cerevisiae* que se utilizan como cultivos iniciadores del proceso de obtención del vino. Se analizaron estrategias de producción, se optimizaron los medios de cultivo y purificaron las diferentes toxinas. Las tres levaduras presentan un pico máximo de producción de toxina al inicio de la fase estacionaria de los cultivos. Las toxinas obtenidas se purificaron por filtración tangencial, luego por cromatografía de afinidad y se concentraron por membranas de corte molecular. Se obtuvieron extractos con 21,3 UA *killer*/mg de SeKT, 8,6 UA *killer*/mg de TdKT y 7,2 UA *killer*/mg de WaKT. La actividad *killer* de las tres toxinas se mantiene estable entre pH 3 y 4,5 y son sensibles a temperaturas superiores a los 26 °C. La actividad *killer* de las tres toxinas no es afectada por concentraciones de hasta 16% v/v de etanol, de hasta 300 g/L de glucosa y de hasta 100 ppm de dióxido de azufre. Solamente SeKT muestra una pérdida de 30 % de actividad en presencia de 160 ppm de dióxido de azufre. Se analizó la estabilidad de las toxinas en vino y en mosto. SeKT muestra mayor estabilidad en vino que en mosto, con una disminución del 20 % de su actividad a las 48 h de incubación en mosto. TdKT presenta un comportamiento similar en mosto y vino, con un 70 y 80 % de descenso a las 48 h de incubación. En el caso de WaKT, la estabilidad en mosto es muy elevada (conservando el 80 % de actividad a las 48 h) pero es mucho más sensible a la incubación en vino, con una pérdida del 80 % de actividad a las 48 h.

Con el objetivo de avanzar en la caracterización bioquímica se realizó la optimización de la producción de las tres toxinas en escala de laboratorio. Se aplicaron herramientas estadísticas y de diseño experimental para llevar a cabo la optimización del medio de cultivo para la producción de SeKT, TdKT y WaKT. Se analizó la influencia en la producción de las toxinas *killer* de la temperatura, velocidad de agitación, agregado de tritón y glicerol al medio de cultivo GPY. Con el objetivo de maximizar la producción de las toxinas se determinaron los niveles óptimos de estos cuatro factores, se utilizó un diseño central compuesto (DCC) y se seleccionaron las

condiciones óptimas utilizando la metodología de superficie de respuesta. Para la producción de SeKT la condición óptima fue: 5 % v/v de glicerol, 0,1 % v/v de tritón, 120 rpm y 13 °C; para TdKT: 12,5 v/v de glicerol, 0,1 % v/v de tritón, 120 rpm y 13 °C; y para WaKT: 12,5 % v/v de glicerol, 0,1 % v/v de tritón, 120 rpm, 20 °C. La producción en condiciones optimizadas aumenta 18 veces la producción de SeKT, 1,6 veces la producción de TdKT y 2,3 veces para WaKT, con respecto a las condiciones sin optimizar.

Se avanzó en la caracterización de los mecanismos de acción de las toxinas. Con el objetivo de determinar el receptor primario de la pared de la célula sensible, se analizó la interferencia en la actividad *killer* con la incubación junto a diferentes componentes de la pared celular. Las toxinas WaKT y TdKT son capaces de interactuar con los  $\beta$ -1,6 glucanos de la pared. Por otra parte, SeKT utiliza como receptor primario los  $\beta$ -1,6 glucanos y los  $\beta$ -1,3 glucanos. SeKT y TdKT se unen a la quitina de las células sensibles. Ninguna de las toxinas se une a las mananoproteínas. Para determinar si el mecanismo de acción de las toxinas involucra la inducción del daño a la pared celular, se determinó la actividad enzimática de las toxinas. WaKT y TdKT presentan actividad quitinasa con aumento proporcional a la actividad *killer*. Las tres toxinas presentan actividad  $\beta$ -glucanasa, con aumento proporcional a la actividad *killer*. Los cambios en la morfología de la pared celular de las levaduras sensibles se evidenciaron por la tinción de quitina con Calcofluor White. TdKT y WaKT inducen cambios en la morfología de la pared, mientras que SeKT no altera la integridad de la pared celular.

También se estudiaron mecanismos de acción que involucran eventos relacionados con la detención del ciclo celular, inducción de muerte celular programada (apoptosis) y necrosis. Se analizó la acumulación de especies reactivas del oxígeno, la translocación de la fosfatidilserina y la morfología nuclear por microscopía de fluorescencia, como indicadores de apoptosis. SeKT provoca la acumulación de especies reactivas del oxígeno, la translocación de la fosfatidilserina y la condensación de la cromatina en los núcleos de las células sensibles. Este efecto no se observó al aumentar la cantidad de SeKT agregada y se detectó muerte celular inmediata (necrosis), con evidencia de fragmentación de la cromatina y pérdida de la integridad de la pared celular. Las células tratadas con TdKT y WaKT no presentan ninguna de las características relacionadas con la inducción de apoptosis.

Para definir la posibilidad de la utilización de las toxinas como biocontroladores y evaluar su capacidad de evitar la producción de fenoles volátiles por levaduras contaminantes en vino, se analizó la producción de 4-etilfenol, 4-vinilfenol, 4-etilguayacol y 4-vinilguayacol por *Dekkera bruxellensis*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Pichia manshurica* y *Pichia membranifaciens* incubadas con SeKT y TdKT. La adición de 4 UA de SeKT en los cultivos mostró una disminución

de la producción de fenoles volátiles en porcentajes mayores al 94 % después de 100 días para las cuatro especies contaminantes evaluadas. El agregado de 4 UA de TdKT mostró una disminución de la producción de fenoles volátiles en proporciones que van desde el 30 % en *P. membranifaciens* hasta el 100 % en *P. manshurica*.

Estos resultados permiten proponer a estas toxinas *killer* como potenciales agentes antimicrobianos naturales para controlar las levaduras contaminantes presentes durante el envejecimiento y almacenamiento del vino.

#### **PALABRAS CLAVES**

Toxinas *killer* – Biocontrol – *Saccharomyces eubayanus* – *Torulaspota delbrueckii* – *Wickerhamomyces anomalus* – Levaduras contaminantes del vino – Fenoles volátiles – Mecanismos de acción.

## SUMMARY

Microbiological spoilage is a major worry throughout the wine industry and control tools are limited. The use of emerging technologies for the control of spoilage microorganisms includes, among others, biological control strategies based on the use of killer toxins. These antagonist compounds could be useful to reduce the application of sulfur dioxide, a chemical compound normally used in winemaking to inhibit the growth of spoilage microorganisms, also avoiding oxidations in the final product. This work approaches the identification and characterization of killer toxins produced by *Torulasporea delbrueckii* (NPCC 1033), *Wickerhamomyces anomalus* (NPCC 1027) and *Saccharomyces eubayanus* (NPCC 1302) with potential antagonist activity against wine spoilage yeasts. The three yeast strains were able of selectively inhibiting the growth of *Dekkera bruxellensis*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Pichia manshurica* and *Pichia membranifaciens* without affecting the growth of most of the *S. cerevisiae* strains that are generally used as starter cultures in regional winemaking processes. In this work, production strategies were analyzed, culture media were optimized and toxins were purified. All three yeasts showed a maximum peak of toxin production at the beginning of the stationary phase of the cultures. The toxins obtained were purified by tangential filtration and affinity chromatography and concentrated by molecular cut membranes. Extracts were obtained with 21,3 AU killer/mg of SeKT, 8,6 AU killer/mg of TdKT and 7,2 AU killer/mg of WaKT. The killer activity of the three toxins was stable between pH 3 and 4,5 and they were all sensitive to temperatures above 26 °C. The killer activity of the three toxins was not affected by concentrations of up to 16 % v/v of ethanol, up to 300 g/L of glucose and up to 100 ppm of sulfur dioxide. Only SeKT showed a 30 % loss of activity in the presence of 160 ppm sulfur dioxide. The stability of toxins in wine and must evidence that SeKT showed greater stability in wine than in must, with a 20 % decrease in its activity at 48 h incubation in must. TdKT presented a similar behavior in must and wine, with a 70 and 80 % decrease at 48 h incubation. In the case of WaKT, the stability in must was high (conserving 80 % of activity at 48 h). However, it was much more sensitive to incubation in wine, with a loss of 80 % of activity after 48 h incubation.

In order to advance in the biochemical characterization, the production of the three toxins was optimized on a laboratory scale. Statistical and experimental design tools were applied to carry out an optimization of the culture medium for the production of SeKT, TdKT and WaKT. The influence of temperature, stirring speed, addition of triton and glycerol to the GPY culture medium on the production of killer toxins was analyzed. In order to maximize toxin production, the optimal levels of these four factors were determined, a composite central design (CCD) was used and the optimal conditions were selected using the response surface methodology. For the

production of SeKT the optimal conditions were: 5 % v/v of glycerol, 0,1 % v/v of triton, 120 rpm and 13 °C; for TdKT: 12,5 v/v glycerol, 0,1 % v/v triton, 120 rpm and 13 °C; and for WaKT: 12,5 % v/v glycerol, 0,1 % v/v triton, 120 rpm, 20 °C. Production under optimized conditions increases SeKT production 18 times, 1,6 times production of TdKT and 2,3 times for WaKT, with respect to the non-optimized conditions.

Progress was made in the characterization of the mechanisms of action of toxins. In order to determine the primary receptor of the toxins on the sensitive cell wall, the interference in the killer activity was analyzed by the incubation with different components of the cell wall. Both WaKT and TdKT toxins were capable of interacting with the  $\beta$ -1,6 glucans. On the other hand, SeKT used as a primary receptor both  $\beta$ -1,6 glucans and  $\beta$ -1,3 glucans. SeKT and TdKT bond to the chitin of sensitive cells. None of the toxins bond to mannoproteins. To determine if the mechanism of action of the toxins involved the induction of damage to the cell wall, the enzymatic activity of the toxins was determined. WaKT and TdKT showed a proportional association between chitinase and killer activities, while the three toxins showed a proportional association between  $\beta$ -glucanase and killer activities. Changes in cell wall morphology of sensitive yeasts were evidenced by Calcofluor White staining for chitin. TdKT and WaKT induced changes in the morphology of the wall, whereas SeKT did not alter the integrity of the cell wall.

Cell death mechanisms of action involving events related to cell cycle arrest, programmed cell induction (apoptosis) and necrosis were also studied. Reactive oxygen species accumulation, phosphatidylserine translocation, and nuclear morphology were analyzed by fluorescence microscopy as indicators of apoptosis. SeKT causes accumulation of reactive oxygen species, translocation of phosphatidylserine, and condensation of chromatin in the nuclei of sensitive cells. This effect does not produce death when increasing the amount of SeTK added and immediate cellular (necrosis) was detected, with evidence of chromatin fragmentation and loss of cell wall integrity. Cells treated with TdKT and WaKT did not show any of the characteristics related to the induction of apoptosis.

To define the possibility of using toxins as biocontrol agents and to evaluate their ability to avoid the production of volatile phenols by spoilage wine yeasts, the production of 4-ethylphenol, 4-vinylphenol, 4-ethylguayacol and 4-vinylguayacol was analyzed. *Dekkera bruxellensis*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Pichia manshurica* and *Pichia membranifaciens* were incubated with SeKT and TdKT. The addition of 4 UA of SeKT in the cultures showed a decrease in the production of volatile phenols in percentages higher than 94% after 100 days for the four spoilage species evaluated. The addition of 4 UA from TdKT showed a decrease in the production of volatile phenols in proportions ranging from 30 % in *P. membranifaciens* to 100% in *P. manshurica*.

These results make it possible to propose these killer toxins as potential natural antimicrobial agents to control the spoilage yeasts present during the aging and storage of wine.

**KEYWORDS**

Killer toxins - Biocontrol - *Saccharomyces eubayanus* - *Torulaspota delbrueckii* - *Wickerhamomyces anomalus* - Spoilage wine yeasts - Volatile phenols - Mechanisms of action.

## I. INTRODUCCIÓN

### I.1 Toxinas *killer*.

#### I.1.1 Carácter *killer*

El fenómeno *killer* en levaduras fue observado por primera vez en cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (Bevan y Markower, 1963) y fue entonces que se estableció la denominación de micocinas para describir las toxinas secretadas, por su analogía con el fenómeno de inhibición bacteriana mediado por bacteriocinas. Las levaduras *killer* son capaces de secretar toxinas letales para las levaduras sensibles, pero ellas son inmunes a sus propias toxinas. Como resultado de las primeras investigaciones, se definió un sistema de tres fenotipos distintos para agrupar las cepas en función del nuevo carácter encontrado: *killer* (cepas de levadura capaces de inhibir el crecimiento de ciertas cepas pertenecientes al fenotipo sensible), sensible (cepas inhibidas por la acción de ciertas cepas *killer*), y neutro (cepas que no pertenecen ni al fenotipo *killer* ni al fenotipo sensible).

Investigaciones posteriores han determinado que la actividad *killer* no es exclusiva de *S. cerevisiae*, sino que está presente en otras especies de levaduras pertenecientes a géneros como *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Torulopsis*, *Ustilago*, *Sporidiobolus*, *Williopsis*, *Zygosaccharomyces*, *Schwanniomyces*, *Hansenula*, *Metschnikowia*, *Aureobasidium*, *Zygowilliopsis* y *Mrakia*, variando su incidencia significativamente dentro de ellos. (Schmitt y Breinig, 2006; Moura *et al.* 2020; Liu *et al.* 2013; Allen *et al.* 2013; Bajaj *et al.* 2012; Kulakovskaya *et al.* 2019).

Se ha podido observar que el fenotipo *killer* es debido a la existencia de una toxina extracelular, sensible al calor y a la acción de diferentes proteasas, y es razonablemente activa a pH ácidos (Bevan y Woods, 1968). Las toxinas *killer* son proteínas o glicoproteínas, monoméricas o multiméricas, que se liberan al medio extracelular donde ejercen su actividad antagónica (Manazzu *et al.* 2019). Algunas toxinas multipéptidicas son complejos que se mantienen unidos por enlaces disulfuro y otros por enlaces no covalentes. Algunas, se componen de más de un polipéptido que actúa de forma independiente (Bruen, 2005).

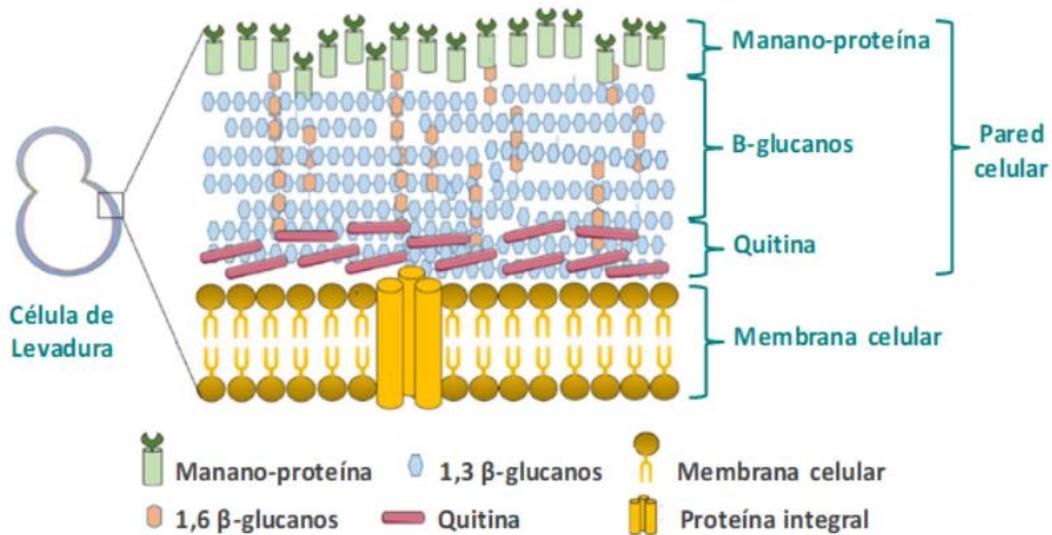
Una vez liberada al medio extracelular, la cantidad total de toxina secretada sufre una reducción significativa debido fundamentalmente a dos procesos diferentes: la proteólisis directa de la toxina por la acción de ciertas proteasas producidas por las levaduras y la unión de la toxina a receptores específicos localizados en la pared celular de la cepa productora (Hutchins y Bussey, 1983; Schmitt y Radler, 1988). La toxina restante interaccionará con la levadura sensible a través del modo de acción de dos pasos y sin contacto célula-célula (Liu *et al.* 2013; Schaffrath *et al.*

2018). Esta interacción es mediada por receptores específicos de la pared celular de una célula diana que se unen a toxinas excretadas por otras especies de levaduras y no así a toxinas secretadas por la propia célula (Schmitt y Breinig, 2006).

### **I.1.2 Mecanismo de acción de las toxinas *killer***

La interacción con la pared de la célula sensible es el primer paso del mecanismo de acción. La pared celular de una levadura es, de forma general, el 20-30 % del peso seco de la misma. Los polisacáridos presentes (glucanos, mananos y quitina) representan del 8 % (p/p) de la pared de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Los glucanos con enlaces de tipo  $\beta$ -1,3 son los mayoritarios, siendo el 50 % p/p de la pared de *S. cerevisiae*. Los glucanos con enlaces  $\beta$ -1,6 son minoritarios, tan sólo un 5 % p/p en dicha levadura (Fleet, 1991). El manano es uno de los componentes mayoritarios de la pared de muchas levaduras, representa un 40 % de la pared de *S. cerevisiae*. La quitina es un polisacárido lineal compuesto por residuos de N-acetilglucosamina unidos por enlaces  $\beta$ -1,4. Existen levaduras que carecen de este componente (*Schizosaccharomyces*) y otras que presentan elevados niveles de este (*Rhodotorula*, *Sporobolomyces* y *Cryptococcus*). En el caso de *S. cerevisiae*, representa el 2% de la pared celular. La pared celular puede variar considerablemente en estructura y composición en respuesta al estrés, condiciones de cultivo, edad y a modificaciones genéticas (Aguilar Uscanga *et al.* 2005).

La pared celular está compuesta por dos capas de polisacáridos, una capa interna transparente y amorfa constituida principalmente de  $\beta$ -1,3 y  $\beta$ -1,6 glucanos, responsables de mantener la forma y dar rigidez a la célula, que favorecen la resistencia a los cambios osmóticos y mecánicos. Las mananoproteínas se encuentran ubicadas en la capa externa ancladas a la capa interna de  $\beta$ -glucanos o bien la atraviesan completamente. Son las responsables de la porosidad de la pared, juegan un rol de filtro selectivo y protección contra los ataques químicos y enzimáticos de tipo glucanasa. No existe separación neta entre las dos capas de polisacáridos. Por otro lado, la capa interna está constituida de varios espacios, formados por la quitina unida a  $\beta$ -glucanos. La quitina juega un rol importante en la división celular, formando la cicatriz durante la separación de la célula madre e hija. A nivel molecular, la arquitectura de la pared parece estar constituida por bloques de construcción flexibles que reagrupan a los componentes a través de uniones covalentes como una estructura ordenada (Aguilar Uscanga *et al.* 2005; Anwar *et al.* 2017).



**Figura I.1:** Estructura de la pared celular de levaduras. Extraído de Anwar *et al.* (2017).

De igual modo que para los otros componentes de la pared celular, las condiciones de cultivo influyen de manera importante en la cantidad de proteínas presentes en la pared. Por ello, el contenido en proteína varía mucho según los diferentes autores para una misma especie de levadura. Las funciones de estas son muy variadas, desde una función meramente estructural a las diferentes actividades enzimáticas, receptores o factores de aglutinación (Phaff, 1963; Rogers *et al.* 1980; Fleet, 1991).

Los receptores de la pared celular son esenciales para la mayor parte de la actividad de las toxinas *killer*. Están separados en dos clases: primarios (en la pared celular) y secundarios (en la membrana plasmática). Los receptores primarios son 1,3-β-D-glucano, 1,6-β-D-glucano, mananoproteína y quitina. Los receptores secundarios son menos conocidos. Diferentes levaduras o sus toxinas tienen diferentes receptores secundarios (Liu *et al.* 2013; Belda *et al.* 2017). En *S. cerevisiae*, el β-1,6-D-glucano de la pared celular de la célula sensible actúa como receptor principal para las toxinas K1 y K2. Igualmente, para algunas otras levaduras (*K. phaffii*, *W. saturnus var. mrakii*, *H. uvarum* y *P. membranifaciens*) los β-glucanos actúan como componentes de unión (Liu *et al.* 2013). Las mananoproteínas son receptores para K28 de *S. cerevisiae* y también para la toxina *killer* de *Zygosaccharomyces bailii* y, finalmente, la quitina es el receptor de la toxina *killer* de *Kluyveromyces lactis* (Belda *et al.* 2017).

Las toxinas *killer* presentan diversos mecanismos de acción (Figura I.2). Las toxinas virales K1 y K2, encontradas por primera vez en *S. cerevisiae*, inician su acción a través de la unión al receptor de pared β-1,6-D-glucano, proceso que es dependiente de pH e independiente de energía (Santos *et al.* 2000; Santos *et al.* 2002). Posteriormente, la toxina interactúa con un receptor en membrana plasmática resultando en el aumento de permeabilidad de ésta y provocando la

muerte celular debido a la fuga descontrolada de potasio, protones, ATP y otras pequeñas moléculas de la célula blanco, a través de canales que se forman de manera endógena en la membrana, tratándose en este caso de un efecto ionofórico (Ahmed *et al.* 1999).

La toxina K28 (también producida por *S. cerevisiae*) difiere de las toxinas K1 y K2 en que inicialmente ésta se une a la fracción mananoproteica ( $\alpha$ -1,3 y  $\alpha$ -1,2- mananotriosa) de la pared celular, sin provocar después un efecto ionofórico sino que es introducida en el núcleo para inhibir la síntesis del ADN. K28 ingresa a la célula sensible por endocitosis mediada por receptores para alcanzar su objetivo intracelular (Becker y Schmitt, 2017). Se conoce también la interacción con un receptor secundario en la membrana plasmática (Erd2p) responsable de la unión e internalización de K28. La subunidad citotóxica  $\alpha$  entra en el núcleo por difusión pasiva, debido a su bajo peso molecular y detiene la proliferación celular previo a la gemación, lo que sugiere que bloquea la fase G1 del ciclo celular (Reiter *et al.* 2005).

A pesar de tener mecanismos de acción distintos, coinciden en ser procesos de dos pasos mediados por receptores, el primero independiente de energía y el segundo involucrando el ingreso a la célula por interacción con un segundo receptor de la membrana plasmática. La absorción en el segundo paso ocurre con alta afinidad y baja velocidad y la interacción entre la toxina y el receptor de la membrana plasmática depende de la energía (Hutchins y Bussey, 1983; Schmitt y Radler, 1988). Al igual que *S. cerevisiae*, otras especies exhiben diferentes toxinas *killer* entre sus cepas.

La *zimocina*, toxina secretada por *K. lactis*, consta de subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . La subunidad  $\alpha$  es responsable de la unión a quitina, la subunidad  $\beta$  de la captación de la subunidad  $\gamma$  por la célula blanco y la subunidad  $\gamma$  afecta la transcripción dependiente de la ARN-polimerasa II. La toxina producida por *K. lactis* detiene la proliferación celular interfiriendo con el ciclo celular bloqueando la finalización de la fase G1 y la síntesis de ADN (Liu *et al.* 2013). Butler *et al.* demostraron que si bien la subunidad  $\alpha$  presenta actividad quitinasa, este no es el mecanismo de acción responsable de la inhibición del crecimiento de la célula sensible (Butler *et al.* 1991).

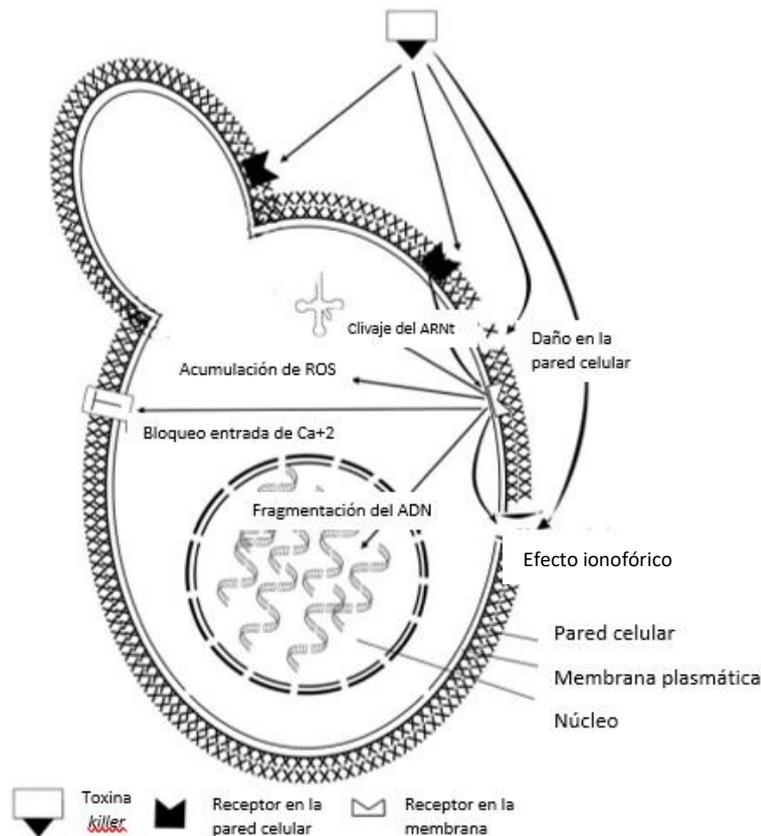
Otras toxinas *killer* presentan actividad ARNasa. La toxina *killer* producida por *Pichia acaciae* (PaKT) tiene como blanco de acción el ARNt portador del anticodón UUG, a través de la actividad específica de anticodón nucleasa (ACNasa), mientras que la toxina PiKT producida por *Pichia inositovora* tiene como blanco de acción el ARNr, produciendo la fragmentación del ARN ribosómico (Kast *et al.* 2014).

La descripción del mecanismo de acción de una de las toxinas producidas por *Ustilago maydis*, KP4, indica que bloquea los canales de transporte de calcio de la membrana de la célula sensible,

provocando la inhibición reversible del crecimiento. Esto se debe a que el calcio es importante en la regulación del crecimiento y el apareamiento de *S. cerevisiae*, ya que la entrada de calcio es necesaria para la progresión del ciclo celular (Bruen, 2005).

En algunos casos, la toxina *killer* puede interferir con la síntesis de la pared celular al inhibir la  $\beta$ -1,3-glucano sintasa o hidrolizando los principales componentes de la pared celular,  $\beta$ -1,3 glucanos y  $\beta$ -1,6 glucanos. Este es el caso de la toxina KpKT producida por *Kluyveromyces phaffii* que muestra actividad  $\beta$ -glucanasa *in vitro* al igual que la toxina *killer* NCYC 434 de *Pichia anomala* (Comitini *et al.* 2009; Izgü *et al.* 2005). Se encontró que la toxina *killer* producida por *Hansenula mrakii* inhibe selectivamente la actividad  $\beta$ -1,3-glucano sintetasa de *S. cerevisiae* (Marquina *et al.* 2002).

Blättel *et al* reportaron la actividad  $\beta$ -1,3-glucanasa de *Delftia tsuruhatensis* que logra inhibir el crecimiento de varias especies contaminantes de vinos (Blättel *et al.* 2011).



**Figura 1.2:** Mecanismos de acción de las toxinas *killer*. Extraído de Liu *et al.* (2013) con modificaciones.

Otros estudios han demostrado que algunas toxinas presentan un mecanismo dual, dependiente de las concentraciones de las mismas. Este es el caso de PmKT1 y PmKT2, que son proteínas de bajo peso molecular producidas por *Pichia membranifaciens*. Santos y Marquina (2004)

demonstraron que cuando se incubaba *S. cerevisiae* con dosis bajas de PmKT1 y PmKT2 se induce un proceso de apoptosis que finaliza con la muerte celular. Sin embargo, cuando se aplican altas dosis de estas toxinas, las células mueren debido a la detención del ciclo celular o pérdida de la permeabilidad de la membrana. Usualmente, las toxinas que generan disrupción de la membrana plasmática o arresto del ciclo celular en fase G<sub>1</sub>/S, en concentraciones bajas inducen la muerte celular acompañada de acumulación de especies reactivas del oxígeno, fragmentación del ADN, cambios fenotípicos específicos (condensación de la cromatina alrededor del margen de la envoltura nuclear) y translocación de la fosfatidilserina desde el interior al exterior de la membrana plasmática, siendo estas, las características que definen un fenotipo apoptótico (Reiter *et al.* 2005; Carmona-Gutierrez *et al.* 2010).

Con respecto al mecanismo de acción de K28, también se han identificado dos fenotipos diferentes dependiendo de la dosis. Bajas concentraciones de K28 inducen una respuesta de muerte celular apoptótica en células tratadas con toxina, con marcadores típicos, como fragmentación del ADN, condensación de cromatina y exposición de fosfatidilserina en la membrana plasmática externa. Además, se demostró que la muerte celular apoptótica por K28 depende de la presencia de la caspasa de levaduras (Yca1p) y la generación de especies reactivas de oxígeno. Este escenario de muerte celular refleja la situación natural de bajas concentraciones de toxinas en un hábitat normal de levaduras. Por lo tanto, la apoptosis inducida por toxinas parece ser un mecanismo crucial por el cual las cepas *killer* que secretan K28 compiten y matan a las levaduras sensibles. En condiciones de laboratorio, con altas concentraciones de toxinas, la muerte celular se produce por necrosis, durante la cual las células se detienen en el límite entre la fase G<sub>1</sub>/S del ciclo celular con una yema de tamaño mediano y una sola célula madre con ADN pre-replicado (1n) (Becker y Schmitt, 2017).

## **I.2 Aplicación en la industria vitivinícola**

### **I.2.1 Vitivinicultura**

El Código Alimentario Argentino define como mosto virgen de uva al jugo obtenido por expresión o molienda de la uva fresca, sin hollejos pepitas ni escobajos, en tanto no haya comenzado a fermentar (Código Alimentario Argentino, 2018). Por su parte, la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV) define al vino (del latín *vinum*) como “bebida resultante de la fermentación alcohólica, completa o parcial de la uva fresca, estrujada o no, o del mosto de uva” (Organización Internacional de la Viña y el Vino, 2020). Las prácticas agrícolas del cultivo de la uva y de la obtención de vino por fermentación de su jugo, estuvieron siempre ligadas a la

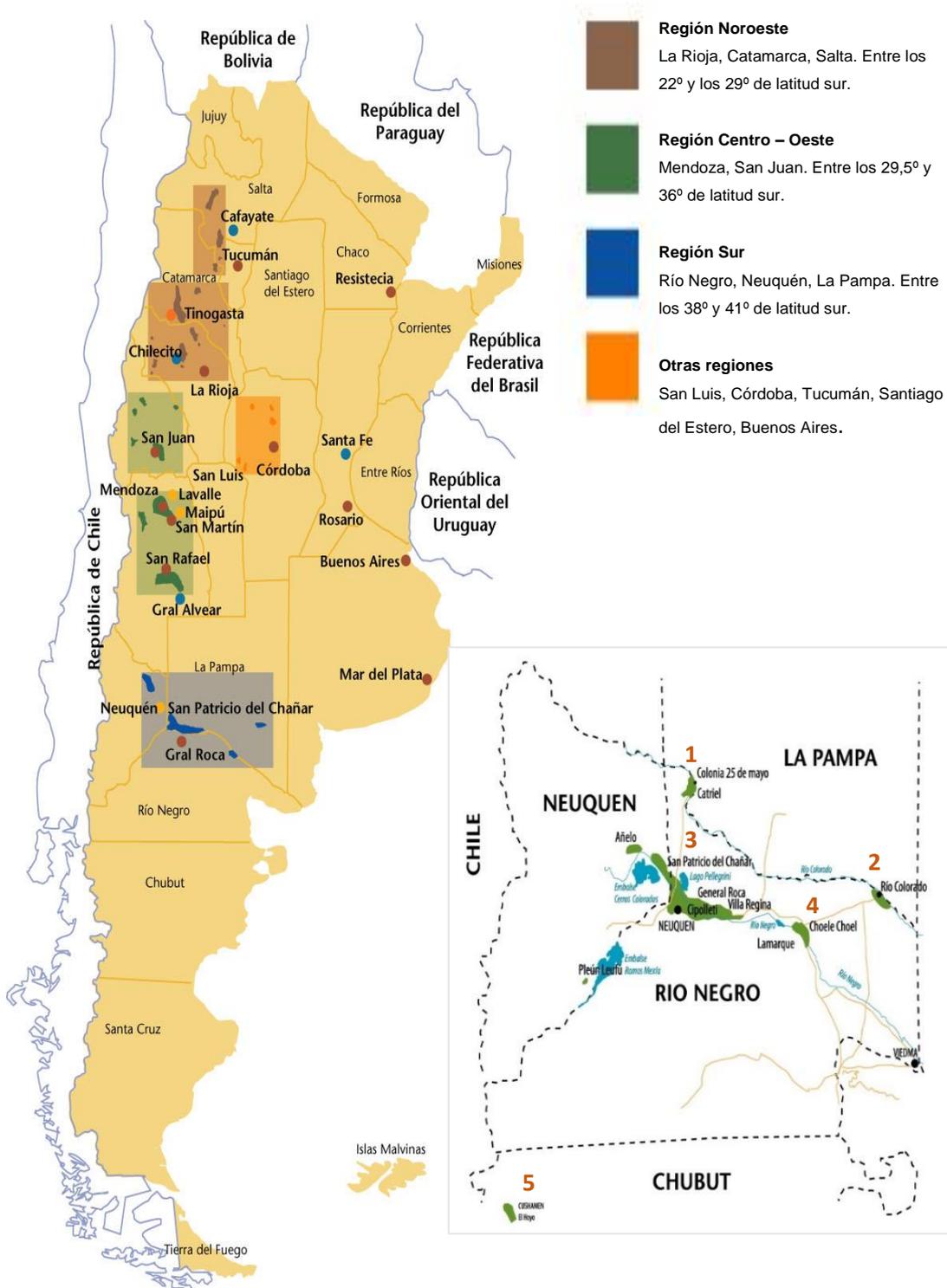
historia del hombre, lo que convirtió al vino en una parte integral de la civilización. Desde que los egipcios y babilonios cultivaron vides e hicieron vinos por primera vez, la industria enológica y sus productos tuvieron, y tienen hasta hoy, gran importancia social, económica y cultural. En la actualidad, la producción enológica no solo deleita el paladar de millones de personas, sino que los viñedos y bodegas se han convertido en un atractivo turístico mundial.

En sus comienzos, los hombres recolectaban uva para su consumo y, al almacenarla, se formaba espontáneamente esta bebida espirituosa. En aquellas épocas no se conocían las transformaciones biológicas detrás de la producción del vino. Hoy se sabe que el proceso principal por el cual se transforma el mosto de la uva en vino es la fermentación alcohólica, que consiste en la transformación de los azúcares contenidos en la uva, en alcohol etílico y dióxido de carbono. Las responsables de esta transformación son las levaduras, hongos microscópicos adheridos al hollejo de la uva y presentes en las vasijas (Ribéreau-Gayon, 2006). El uso de seres vivos para la obtención de un producto útil es lo que define a un proceso como biotecnológico. Estas prácticas, encuadradas dentro de la biotecnología tradicional, se han desarrollado gracias a los avances científicos en el conocimiento del proceso y a los aportes de la tecnología de producción. Actualmente, la biotecnología moderna aporta novedades que mejoran la producción enológica y la calidad del producto final.

### **1.2.2 Vitivinicultura en Argentina**

En la Argentina, la vitivinicultura orientada a la producción de vinos finos se desarrolla principalmente en la zona de montaña de la Cordillera de Los Andes desde los 22° hasta los 42° de latitud Sur. Esta zona apta para la elaboración de vinos finos (valles de Mendoza, San Juan, Catamarca, La Rioja, Salta, Río Negro y Neuquén) posee casi exclusivamente clima árido desértico. Existen excepciones como algunas zonas ubicadas en el centro del país (principalmente en la provincia de Córdoba) las cuales, según dicha clasificación, pertenecen a clima templado húmedo con estación invernal seca (Catania *et al.* 2007). La zona vitivinícola argentina puede ser dividida en tres regiones: Noroeste, Centro Oeste y Sur, de las cuales la más importante económicamente es la región Centro Oeste (Figura 1.3). La región Sur es la región vitivinícola más austral de Argentina (38-41° latitud sur) y está ubicada a menor altitud (220-410 msnm), constituyéndose en una de las regiones vitivinícolas más australes del mundo. Comprende áreas bien determinadas de las provincias de La Pampa, Neuquén, Río Negro y Chubut (Figura 1.3). Las zonas vitivinícolas se asientan principalmente en las márgenes de los ríos Colorado y Río Negro, pudiéndose delimitar distintas subregiones: Alto Valle del río Colorado, Valle Medio del río Colorado, Alto Valle del río Negro, Valle Medio del río Negro y El Hoyo de

Epuyén (Instituto Nacional de Vitivinicultura, 2015). Dentro de la región Sur, las zonas del Alto Valle del río Negro y del río Colorado concentran más del 80% de la superficie vitícola regional.



**Figura I.3:** Regiones vitivinícolas argentinas. Ampliación: áreas vitivinícolas de la Región Sur (1, Alto Valle del río Colorado; 2, Valle Medio del río Colorado; 3, Alto Valle del río Negro y Neuquén; 4, Valle Medio del río Negro; 5, El hoyo de Epuyén). Extraído de Instituto Nacional de Vitivinicultura, (2015).

En los últimos años, emprendimientos vitivinícolas para la elaboración de vinos de calidad han tomado impulso en la región Sur especialmente en San Patricio del Chañar, Departamento Añelo, en la provincia de Neuquén. También en el Hoyo de Epuyén en Chubut y en la zona de 25 de Mayo de La Pampa. En Río Negro, la principal provincia vitivinícola de la región, el proceso fue orientado hacia la reconversión varietal.

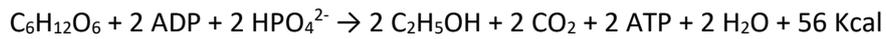
El desarrollo de estas nuevas zonas fue el resultado del esfuerzo de los productores, gobiernos provinciales, entidades financieras y grupos inversores que visualizaron la oportunidad de iniciar este proyecto en áreas que no tenían antecedentes vitivinícolas. Fueron determinantes en este proceso las condiciones ecológicas de estas zonas como aptas para la vitivinicultura de calidad, su influencia en las características distintivas de los vinos y mostos y, el conocimiento de las cualidades de los vinos de este terruño por parte de los consumidores nacionales y extranjeros. La reconversión e implantación de nuevos viñedos y desarrollo de nuevas bodegas también han tenido como factor determinante el auge alcanzado en los últimos años por el comercio internacional de vinos del país y el creciente interés de los países importadores por los vinos del Nuevo Mundo Vitivinícola. Estos escenarios motivaron transformaciones cualitativas a través de inversiones para la innovación de tecnología de punta y cambios de las variedades para la adaptación de la oferta a las nuevas exigencias del mercado.

### **1.2.3 Aspectos microbiológicos del proceso de vinificación**

La vinificación se puede definir como el conjunto de operaciones y prácticas que se llevan a cabo con el fin de transformar la uva en vino, respetando al máximo las cualidades intrínsecas que posee dicha uva para obtener el mejor resultado posible (Suárez-Lepe e Iñigo-Leal, 2004). Este proceso es el resultado de numerosas reacciones bioquímicas, que implican la interacción de muchas especies microbianas, representadas por levaduras, bacterias y hongos filamentosos (Fleet, 2007; Fugelsang y Edwards, 2007)

La elaboración del vino incluye dos transformaciones principales, fermentación alcohólica y fermentación maloláctica, que contribuyen esencialmente a la calidad final del producto y se llevan a cabo por una sucesión de microorganismos fundamentalmente levaduras y bacterias lácticas (Swiegers y Pretorius, 2005).

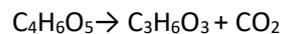
La fermentación alcohólica es el proceso bioquímico por el cual los azúcares del mosto se transforman principalmente en etanol y dióxido de carbono, mediante una sucesión de reacciones en cadena que tienen lugar en el citoplasma de las levaduras y que puede expresarse mediante la siguiente ecuación global simplificada:



Paralelamente y de forma asociada a la degradación de los azúcares, las levaduras utilizan otros compuestos presentes en el mosto, que son necesarios para su desarrollo y multiplicación, dando lugar a gran cantidad de metabolitos secundarios:

- Alcoholes superiores procedentes del metabolismo nitrogenado de las levaduras que participan en el equilibrio aromático del vino.
- Ésteres formados a partir de alcoholes superiores, la mayoría de los cuales contribuyen de forma muy positiva al aroma de los vinos.
- Sustancias azufradas que pueden influir en el equilibrio organoléptico del vino y que se forman a partir de los compuestos derivados del azufre y presentes en el mosto.

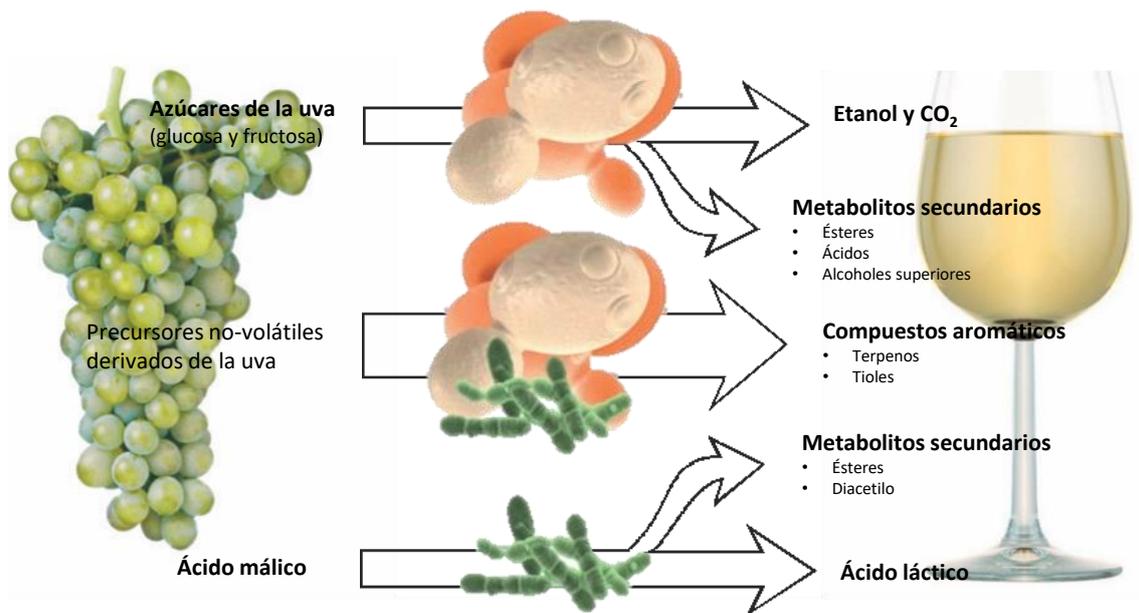
La fermentación maloláctica consiste en la desacidificación biológica del vino que resulta de la transformación del ácido L (-) málico (dicarboxílico) en ácido L (+) láctico (monocarboxílico) y dióxido de carbono por acción de las bacterias lácticas. Bioquímicamente es el resultado de la actividad de la enzima maloláctica característica de las bacterias lácticas que precisa de los cofactores  $\text{NAD}^+$  y  $\text{Mn}^{2+}$ , según la siguiente reacción:



Esta transformación tiene un doble efecto: por un lado, desacidifica el vino, es decir eleva el pH, tanto más cuanto más alto es el contenido inicial de ácido málico, y por otra parte lo suaviza, al hacer desaparecer el sabor ácido y duro del ácido málico y sustituirlo por el sabor más suave del ácido láctico. Por lo tanto, la fermentación maloláctica modifica las características organolépticas del vino a la vez que contribuye a su estabilidad microbiológica, por lo que se considera indispensable para la estabilidad del vino, constituyendo el primer paso hacia la fase de envejecimiento. Al igual que las levaduras en la fermentación alcohólica, las bacterias lácticas son capaces de metabolizar un número importante de sustancias que contiene el vino, produciendo numerosos metabolitos secundarios:

- Los azúcares residuales de la fermentación alcohólica suministran la energía suficiente a las bacterias lácticas para su crecimiento y permiten la formación de biomasa que llevará a cabo la fermentación maloláctica. Sin embargo, la fermentación de estos azúcares también conduce a la formación de ácido acético lo que produce un aumento en la acidez volátil.

- El ácido cítrico es también un sustrato importante para las bacterias lácticas, a partir del cual no sólo se genera ácido acético, sino también otros productos como diacetilo que contribuye al aroma del vino y su complejidad.
- Los aminoácidos del vino son utilizados por las bacterias lácticas para la síntesis de proteínas, pero esto también puede producir aminas biógenas y carbamato de etilo, que pueden resultar perjudiciales para la salud humana.



**Figura 1.4:** Impacto de levaduras y bacterias durante la fermentación vínica. Extraído de (Borneman *et al.* 2013) con modificaciones.

La ecología microbiana de la uva es muy compleja, incluye levaduras, bacterias y hongos filamentosos, que tienen diversas características y efectos fisiológicos en la elaboración del vino (Fleet *et al.* 2002; Ocon *et al.* 2013; Cordero-Bueso *et al.* 2017; Sangorrín *et al.* 2004). Algunas especies se encuentran solamente en las uvas como son los hongos parásitos o ciertas bacterias ambientales, mientras que otras tienen la capacidad de sobrevivir y crecer en el vino, constituyendo el ecosistema microbiano del mismo. Este ecosistema comprende levaduras, bacterias lácticas y bacterias acéticas. La proporción de estos microorganismos en la uva depende de la etapa de maduración en que se encuentre el fruto y de la disponibilidad de nutrientes, así como también del estado sanitario de las mismas, de tal modo que en uvas dañadas se encuentran mayor número de microorganismos y mayor diversidad de especies (Garijo-Jimenez, 2013).

Tradicionalmente la producción del vino se ha llevado a cabo mediante fermentación espontánea, es decir que se produce por la acción de cepas de levaduras procedentes de la

superficie de las uvas y del ambiente de las bodegas (prensas, tanques, fermentadores, bombas, etc.). Se ha demostrado también que viven en asociación con la vid, hallándose usualmente sobre la corteza, las hojas, las flores y en la pruina de la baya. Las levaduras alcanzan las uvas por el efecto de la diseminación del viento y de los insectos, y están presentes en las viñas desde el inicio de la maduración del fruto (Escalante-Minakata e Ibarra-Junquera, 2007). Las especies predominantes (en un 50-75 %) en la superficie de la uva corresponden a los géneros *Kloeckera*, *Candida* y *Hanseniaspora*. En menor proporción es posible encontrar otras especies de levadura estrictamente oxidativas o débilmente fermentativas y poco tolerantes a etanol, pertenecientes a *Metschnikowia*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Pichia*, *Kluyveromyces* y *Hansenula*. Estas especies predominan en los estadios iniciales de la fermentación vínica mientras la concentración de alcohol se incrementa hasta un 4 % (Fleet y Heard, 1993; Pretorius, 2000). Las especies fermentativas de *Saccharomyces* se han aislado en muy baja población sobre uvas sanas y han sido escasamente aisladas de granos de uva intactos y de suelos de viñedos. Antes de la maduración, las uvas poseen una muy baja población de *S. cerevisiae* (~ 0,05 %), que asciende al 25 % cuando las uvas maduran. A su vez se ha comprobado que estas especies fermentativas están asociadas con el área de la bodega y que son incorporadas dentro del mosto durante el tratamiento mecánico de la uva y el proceso de fermentación (Berradre *et al.* 2012). Las levaduras encontradas en el mosto durante las primeras horas de llenado de los tanques corresponden a los mismos géneros identificados en la uva, con un predominio de *Hanseniaspora* y *Kloeckera*. Inicialmente, coexisten estas especies con las del género *Saccharomyces*. Los estadios posteriores de la fermentación, con concentraciones de alcohol superiores al 6 %, son invariablemente dominados por cepas de *Saccharomyces* principalmente *S. cerevisiae* tolerantes al etanol. Este cambio poblacional está relacionado fundamentalmente con la presencia creciente de etanol, así como con las condiciones de anaerobiosis, el sulfitado durante la vendimia y en el mosto, la cantidad de azúcar y la mayor tolerancia a temperaturas más altas que presenta *S. cerevisiae* frente a otras levaduras (Fleet and Heard, 1993). La mayor o menor persistencia de las levaduras salvajes depende también de la temperatura a la que se lleve a cabo la fermentación, de la disponibilidad de nutrientes, y de la calidad, cantidad e identidad de los organismos presentes inicialmente (Pretorius, 2000).

La estrategia habitual para llevar a cabo la producción del vino incluye la inoculación en el mosto de levaduras seleccionadas en forma de levadura seca activa, práctica que empezó a desarrollarse en los años setenta. Este método de inoculación permite una disminución en la fase de latencia, asegura una rápida y completa fermentación en el mosto y conducir a un grado importante de reproducibilidad en el producto final año tras año (Fleet y Heard, 1993; Pretorius,

2000; Hidalgo Togores, 2003). Al momento de seleccionar una levadura para ser utilizada como inóculo, es deseable que presente algunas de las siguientes características: conducir fermentaciones vigorosas con cortas fases de latencia y sin dejar azúcares residuales (o dejando cantidades muy pequeñas), tener características fermentativas reproducibles, ser tolerantes a presiones osmóticas elevadas, etanol y temperaturas no óptimas, y producir glicerol y  $\beta$ -glucosidasa en cantidades adecuadas para conseguir un buen aroma. También se han planteado otros aspectos de interés entre los que podemos destacar: capacidad de fermentar a temperaturas bajas, producir baja formación de espuma, poseer factor *killer*, ser cepas floculantes o ser fácilmente separables del medio (Degré, 1993), presentar determinados niveles de ciertas actividades enzimáticas y mostrar resistencia a las condiciones adversas de crecimiento (condiciones de estrés) que tienen lugar durante la producción de vino (Zuzuarregui *et al.* 2004).

#### **1.2.4. Factores de estrés físico-químicos asociados al proceso fermentativo**

A medida que el proceso de fermentación transcurre las levaduras son afectadas por una sucesión de factores extracelulares que influyen de manera directa sobre su viabilidad e indirectamente en la fermentación. Estas condiciones ambientales son consideradas como situaciones de estrés dado que comprometen la supervivencia o el óptimo desarrollo de las células (Hohmann y Mager, 2003). Durante el proceso de vinificación, las diferentes condiciones determinan la actividad metabólica, el crecimiento y la supervivencia de las levaduras y su consecuente influencia en el vino (Belloch *et al.* 2008).

Los factores de estrés presentes durante la fermentación alcohólica se pueden clasificar en: físicos, químicos y biológicos. Entre los factores de estrés físicos y químicos se encuentran: la disponibilidad de ciertos nutrientes (azúcares fermentables, nitrógeno asimilable, oxígeno, vitaminas, etc.), la presencia de sustancias inhibitorias (etanol, ácido acético, ácidos grasos, sulfito, etc.), la temperatura, el pH, la presión osmótica y la agitación (Bauer y Pretorius, 2000; Carrasco *et al.* 2001). Por otro lado, el estrés biológico se manifiesta en la interacción entre los diferentes microorganismos que aparecen durante el proceso. Una de ellas son las interacciones de toxinas *killer* que producen las levaduras extracelularmente.

Uno de los factores físicos más importantes que influye en la vida de las levaduras es la temperatura. El proceso de vinificación puede llevarse a cabo a distintas temperaturas de acuerdo con las características que se desea imprimir al producto final. La fermentación de vino blanco se desarrolla en un rango de temperatura de 10 a 15 °C con el objetivo de minimizar la pérdida de compuestos volátiles aromáticos, mientras que la fermentación de vino tinto se

desarrolla a temperaturas altas, en el rango de 18 a 30 °C, para extraer los pigmentos antociánicos y taninos. Asimismo, algunas etapas específicas del proceso pueden realizarse a una temperatura distinta a la de fermentación, como por ejemplo suelen utilizarse temperaturas en el rango de 8 a 15 °C en las prácticas de maceración previa a la fermentación y tienen como objetivo mejorar la complejidad aromática del vino (Ribéreau-Gayon *et al.* 2006; Fugelsang y Edwards, 2007).

Las diferentes temperaturas adoptadas en la producción del vino, afectan la tasa de crecimiento de las levaduras y consecuentemente la velocidad de fermentación, por lo tanto, a baja temperatura se prolonga el tiempo del proceso de fermentación.

El anhídrido sulfuroso se aplica al mosto generalmente bajo la forma de metabisulfito de sodio o potasio con el objetivo de prevenir el desarrollo de las levaduras no-*Saccharomyces*. También se aplica al vino para brindarle mayor estabilidad microbiológica, evitando la proliferación de microorganismos indeseables. Una vez que el anhídrido sulfuroso es agregado al vino o a cualquier solución acuosa, en cualquiera de las formas comúnmente usadas, se disocia en tres especies moleculares llamadas SO<sub>2</sub> molecular (SO<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O), bisulfito (HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>) y sulfito (SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>). El equilibrio químico entre cada especie es dependiente del pH del vino. El SO<sub>2</sub> molecular prevalece mayoritariamente a valores de pH entre 0 y 2 (pK<sub>1</sub> = 1,81), el anión bisulfito entre pH 2 y 7 (pK<sub>2</sub> = 6,91) y el anión sulfito entre pH 7 y 10. En general, el pH de los vinos varía entre 3 y 4, y por lo tanto, la especie predominante en vino es el anión bisulfito HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>, aunque los bajos niveles de SO<sub>2</sub> son los que causan el efecto antimicrobiano (Divol *et al.* 2012). La concentración de SO<sub>2</sub> molecular efectivo varía con el pH del mosto, la temperatura, la densidad y diversidad de microorganismos, el nivel de etanol, y otros factores. Algunas especies presentan una alta resistencia al SO<sub>2</sub>, por ejemplo, para controlar el desarrollo de *P. membranifaciens* se requieren niveles de SO<sub>2</sub> molecular superiores a 3 mg/L (Stratford, 2006).

El estrés causado por el etanol se produce gradualmente a lo largo de la vinificación a medida que aumenta la concentración de este compuesto producido por las levaduras. El etanol es altamente tóxico para el metabolismo de las levaduras, siendo la membrana celular el principal blanco de acción (Carrasco *et al.* 2001). La cantidad de etanol necesaria para ocasionar la inhibición de las levaduras, depende de las cepas y el estado fisiológico de las mismas, de la aireación y de la temperatura. La tolerancia de las levaduras al etanol disminuye cuando la temperatura aumenta (Fugelsang y Edwards, 2007). El efecto inhibitorio del etanol en el crecimiento de algunas especies de levaduras ocurre incluso a bajas concentraciones de este compuesto, es decir, desde el inicio de la fermentación, momento en el cual el etanol influye en

las levaduras más sensibles como aquellas pertenecientes a los géneros *Candida*, *Dekkera*, *Kloeckera/Hanseniaspora*, *Kluyveromyces* y *Pichia* (Du Toit y Pretorius, 2000).

El estrés debido a la disminución en la disponibilidad de glucosa y fructosa ocurre hacia el final de la fermentación (Charoenchai *et al.* 1998). Durante la fermentación alcohólica la concentración de azúcares reductores totales disminuye de 220 g/L a 2 g/L aproximadamente. Debido a que el movimiento de solutos es dependiente del gradiente de concentración, el transporte de las hexosas a través de la membrana disminuye durante el proceso. Como consecuencia también disminuye gradualmente la concentración de azúcar intracelular, llevando al agotamiento de la principal fuente de energía y carbono de la célula, ocasionando también una disminución en la actividad de sus sistemas enzimáticos. Finalmente, la limitación de nutrientes y la acumulación de productos finales en el medio inducirán la transición a la etapa estacionaria del crecimiento o de decaimiento celular, seguida de la muerte y autólisis celular.

Las levaduras son capaces de crecer a valores de pH entre 3 y 10. Sin embargo, el pH óptimo es entre 4,5 y 5,5. En la producción de vino están presentes distintos ácidos orgánicos, como los ácidos acético y láctico producidos durante la fermentación, y los ácidos cítrico y tartárico presentes en la uva y adicionados para ajustar la acidez del vino. El efecto inhibitorio de estos ácidos depende directamente del pH intra y extra celular. Así, un bajo pH en el medio incrementa la toxicidad de los ácidos orgánicos debido a que incrementa la concentración de ácidos no disociados, formas que son permeables a la membrana celular. Estos ácidos difunden pasivamente al interior de la célula incrementando su concentración intracelular y aumentando más aun la concentración de ácidos no disociados (Ribéreau-Gayon *et al.* 1998).

### **I.3 Deterioro del vino**

#### **I.3.1 Microorganismos que deterioran el vino**

El proceso de vinificación incluye múltiples etapas en las que puede ocurrir deterioro microbiano, alterando la calidad y las características organolépticas del vino haciéndolo inaceptable. Los principales organismos causantes de deterioro incluyen, por ejemplo, especies de levaduras de los géneros *Dekkera*, *Candida*, *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Zygosaccharomyces*, etc., bacterias ácido lácticas de los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, etc. y bacterias ácido acéticas del género *Acetobacter* y *Gluconobacter*. Hay tres instancias en donde los microorganismos pueden ingresar al proceso de elaboración de vino y afectar la calidad del producto final. La primera tiene que ver con la materia prima. Las uvas están en contacto directo con el equipamiento de bodega (prensas, tanques, tuberías, bombas, unidades de filtración,

etc.) y cuando el equipamiento no está adecuadamente sanitizado puede servir como inóculo del mosto de uva. Las uvas que se utilizan no siempre están en buen estado sanitario, y esto puede afectar la biodiversidad natural de microorganismos presentes en el mosto. La microbiota natural es afectada indirectamente por condiciones externas como variedad de uva, estado de uva en la cosecha, sanidad de la uva, temperatura, lluvia, suelo, uso de insecticidas y fungicidas, y otras prácticas vitícolas (Fleet y Heard, 1993).

La segunda instancia de deterioro puede ocurrir durante la fermentación. En el momento de iniciar esta etapa el mosto contiene la microbiota natural de la uva junto con la albergada en la bodega y su equipamiento. La composición del mosto (azúcar, acidez y bajo pH) y la adición de SO<sub>2</sub> al mismo ejercen presión selectiva en el desarrollo de levaduras y bacterias durante la fermentación alcohólica.

El tercer momento en el cual el producto puede ser susceptible a deterioro es después de la fermentación. El mismo puede ocurrir en la botella o durante la conservación en barricas de roble. Durante esta etapa los factores críticos son buena sanitización de la bodega, exclusión de oxígeno y correcta dosificación de agentes antimicrobianos para asegurar un producto estable que pueda resistir al ataque de levaduras y bacterias contaminantes (Sponholz, 1993).

Las levaduras del género *Kloeckera/Hanseniaspora* están presentes generalmente en la superficie de la uva y en el mosto después de la molienda de uva (Fleet y Heard, 2002). Son responsables de la producción de cantidades indeseables de metabolitos como etil acetato (provocando olor a vinagre) en mostos blancos con largo tiempo de contacto con la piel y en largas maceraciones prefermentativas durante la elaboración de vino tinto. Esta actividad deteriorante se debe a su rápido crecimiento, pero no es habitualmente una gran preocupación para los enólogos porque se pueden implementar medidas preventivas. Estas especies son fácilmente controladas con manejo adecuado durante la elaboración de vino (baja temperatura, dióxido de azufre, higiene) y son inhibidas durante la fermentación (Loureiro y Malfeito-Ferreira, 2003).

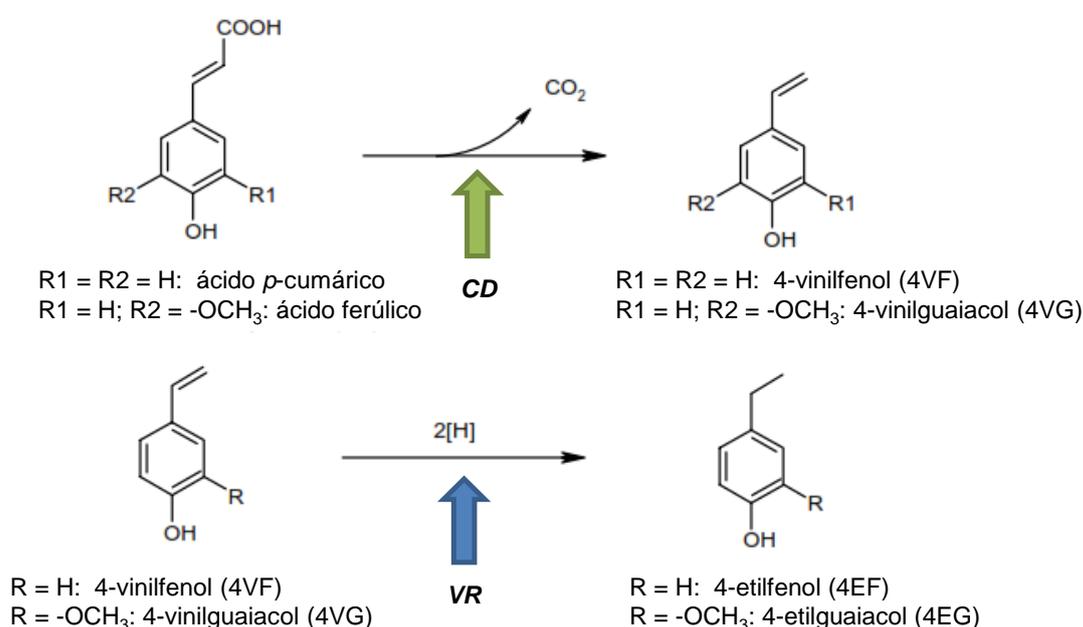
Especies del género *Candida* y *Pichia* son conocidas como típicas levaduras formadoras de film o películas, además algunas cepas de *S. cerevisiae*, *D. bruxellensis* o *Z. bailii* que también pueden ser recuperadas de películas de vino (Farris *et al.* 2002). En el caso de *S. cerevisiae* la producción de películas es siempre una característica deseable para la producción de vino jerez (Suárez-Lepe y Leal, 2004). En vinos a granel, *Pichia* y *Candida* pueden cubrir rápidamente la superficie del vino cuando el aire no ha sido removido de la parte superior de los recipientes de almacenamiento, y producir acetaldehído, que imparte aroma oxidado. Aunque esto no es

frecuente, puede afectar a vinos tintos jóvenes antes de la fermentación maloláctica cuando los niveles de sulfito son bajos y los tanques no están llenos. El control de estas especies se logra aprovechando su poca tolerancia a tensiones de oxígeno bajo, junto con el efecto inhibitorio del etanol y el uso de conservantes. En vinos embotellados, estas levaduras pueden causar sedimentos si la carga de contaminación inicial es alta, por lo tanto, estas especies son consideradas como indicadores de malas prácticas de manufactura (Loureiro y Malfeito-Ferreira, 2003). También pueden producir una película o un anillo de células adherentes al vidrio durante el embotellamiento si el cierre no previene la difusión de oxígeno, el nivel de anhídrido sulfuroso libre es muy bajo y el nivel de contaminación inicial es alto.

El mayor problema de contaminación para la industria vitivinícola lo constituyen las levaduras del género *Dekkera* o de su género anamorfo *Brettanomyces* (sin fase sexual descripta) y en particular la especie *Dekkera bruxellensis*. Esta especie transforma los ácidos cinámicos  $\rho$ -cumárico y ferúlico, aportados por las uvas o la madera, en fenoles volátiles (etilfenoles) que producen aromas a sudor, cuero, establo, animal o medicinal (Loureiro y Malfeito-Ferreira, 2003). Estos aromas son colectivamente llamados “carácter Brett” y son una característica no deseada en los vinos.

*D. bruxellensis* es una levadura contaminante común en la elaboración del vino que se caracteriza por producir malos olores y sabores extraños que provienen de fenoles volátiles y tetrahidropiridinas (Mehlomakulu *et al.* 2014; Mehlomakulu *et al.* 2016). Puede desarrollarse al final de la fermentación alcohólica en vino o durante la etapa de añejamiento en barriles de madera. Sin embargo, no están presentes de forma natural en las uvas. Producen sabores y olores no deseados que se revelan en el vino final y, por lo tanto, causan importantes pérdidas económicas (Santos *et al.* 2004). En las primeras etapas de la vinificación crecen lentamente y, por lo tanto, están presentes en cantidades reducidas. El crecimiento lento continúa también durante el período de fermentación, sin embargo, durante la etapa de añejamiento comienzan a crecer, incluso en presencia de SO<sub>2</sub> y etanol. El “carácter Brett” se describe como la mezcla de una serie de fenoles volátiles: el 4-etilfenol (4-EF), 4-etilguayacol (4-EG), 4-vinilfenol (4-VF) y 4-vinilguayacol (4-VG). Si bien existen algunas discrepancias en la bibliografía respecto a los valores establecidos como umbrales de percepción para cada uno de estos compuestos, se acepta que cuando el vino alcanza una concentración mayor a 425 µg/L de una mezcla 1:10 de 4-EG/4-EF se detecta aroma fenólico, animal, a sudor de caballo o a establo, mientras que una concentración superior a 770 µg/L de una mezcla de 1:1 de 4-VG/4-VF produce fuerte aroma farmacéutico o medicinal (Chatonnet *et al.* 1995). Por debajo de los 400 µg/L estos compuestos contribuyen favorablemente a la complejidad aromática del vino (Dias *et al.* 2003; Abbot *et al.*

2005). Los precursores de los fenoles volátiles son los ácidos hidroxicinámicos *p*-cumárico y ferúlico, constituyentes naturales del mosto y del vino (Chatonnet *et al.* 1995). La síntesis de los fenoles volátiles involucra dos reacciones enzimáticas secuenciales (Figura I.5). La primera reacción, corresponde a una descarboxilación del ácido hidroxicinámico (mayormente *p*-cumárico o ferúlico) con la producción del vinil derivado, 4-vinilfenol (4-VF) o 4-vinilguayacol (4-VG), respectivamente. En la segunda reacción una reductasa convierte los vinilfenoles en los correspondientes etilfenoles, 4-etilfenol (4-EF) o 4-etilguayacol (4-EG) respectivamente (Heresztyn, 1986).



**Figura I.5:** Descarboxilación del ácido *p*-cumárico y del ácido ferúlico y reducción del 4-vinilfenol y 4-vinilguayacol hacia sus respectivos etil derivados. CD: enzima cinnamato descarboxilasa; VR: enzima vinilfenol reductasa. Extraído de Vanbeneden *et al.* (2008) con modificaciones.

Se ha demostrado que aislamientos de *Meyerozyma guilliermondii* son capaces de producir niveles de fenoles volátiles similares a los producidos por cepas de *D. bruxellensis* (Barata *et al.* 2006). Particularmente en la región Patagónica se han reportado distintos aislamientos de la especie *M. guilliermondii*, provenientes de uvas (Rodríguez *et al.* 2004), de ambiente de bodegas (Sangorrín *et al.* 2008a) y de etapas iniciales de fermentaciones espontáneas (Lopes *et al.* 2007), que fueron capaces de producir fenoles volátiles (Sangorrín *et al.* 2008b). A diferencia de lo que ocurre con *D. bruxellensis* la producción de estos compuestos por parte de *M. guilliermondii* podría darse casi exclusivamente en las etapas iniciales de la fermentación, debido a la sensibilidad al etanol que presenta esta especie (Barata, 2006; Lopes y Sangorrín, 2009).

### **I.3.2 Métodos de control de microorganismos contaminantes**

Para un correcto manejo de las levaduras contaminantes los métodos de control más comúnmente utilizados son: la higiene de equipos, cubas y barricas (uso de ozono), las filtraciones y el uso de compuestos químicos tales como ácido sórbico, ácido benzoico y dióxido de azufre (SO<sub>2</sub>).

La adición de anhídrido sulfuroso durante la elaboración de vinos es en la actualidad la práctica más difundida. Tradicionalmente el anhídrido sulfuroso se ha utilizado para proteger el vino mediante el control de microorganismos no deseados y para evitar oxidaciones. Hay una creciente preocupación por parte de la sociedad por el consumo de alimentos que contienen "sulfitos", entre ellos el vino, debido a los efectos alérgicos que puedan darse en personas sensibles. Esta preocupación se ha traducido en nuevas normativas que restringen su uso y que van encaminadas hacia su disminución e incluso su prohibición. En nuestro país el INV establece un límite de SO<sub>2</sub> total de 130 mg/L para vino tinto seco, 180 mg/L en vino blanco y rosado seco, 180 mg/L en vino tinto abocado dulce y 210 mg/L en vino blanco y rosado abocado dulce, todos valores para libre circulación con una tolerancia de 35 mg/L por encima o debajo de los valores límites establecidos (Resolución INV N° C-143/94) (Instituto Nacional de Vitivinicultura, 2015). No es fácil calcular las cantidades precisas de adición de anhídrido sulfuroso debido al complejo equilibrio químico de esta molécula en el vino. A pesar de que normalmente se expresa como SO<sub>2</sub>, existen diferentes formas del mismo en el vino. La concentración de las distintas formas en las que el anhídrido sulfuroso puede encontrarse en el vino depende del pH del vino y en menor medida de la temperatura. En el rango de pH de los vinos (3-4), el anhídrido sulfuroso se encuentra en un gran porcentaje como la forma bisulfito y en bajo porcentaje como la forma sulfito. Ninguna de estas dos formas tiene la capacidad protectora del anhídrido sulfuroso. La forma molecular SO<sub>2</sub>, que es la forma que posee las propiedades antioxidantes y antisépticas, también se encuentra en bajas concentraciones. Cuanto menor sea el pH del vino, mayor será la concentración de la forma activa SO<sub>2</sub> (Fleet, 1993).

El uso excesivo de anhídrido sulfuroso puede producir sabores y aromas desagradables e incluso turbidez durante su almacenamiento. A dosis altas, se neutralizan los aromas, y en cantidades excesivas produce un defecto característico en el aroma de los vinos. Se produce un olor a "lana húmeda" que se convierte rápidamente en sofocante e irritante y que además da lugar a una sensación de ardor-amargor en el retrogusto.

En la elaboración del vino tinto, el sulfitado favorece la disolución de minerales, ácidos orgánicos y compuestos fenólicos (sobre todo antocianos y taninos) que constituyen las sustancias

responsables del color de los vinos tintos. Sin embargo, cuando las vinificaciones se llevan a cabo en uvas sanas, no se produce una mejora significativa del color. El sulfitado, a menudo mejora el aroma del vino en el caso de uvas con estado sanitario deficiente o variedades neutras. También protege ciertos aromas de los vinos jóvenes. Por el contrario, en ciertas vinificaciones, tales como las fermentaciones sin presencia de oxígeno o el envejecimiento especialmente prolongado sobre lías, pueden conducir a la formación de sulfuro de hidrógeno y mercaptanos, que producen aromas a huevos podridos y putrefacto. El anhídrido sulfuroso también es importante para minimizar la velocidad de polimerización de los compuestos polifenólicos y, por tanto, de la pérdida de color durante el envejecimiento del vino. El anhídrido sulfuroso reacciona con ciertos componentes del vino, evitando la reacción de los compuestos polifenólicos con ellos, ralentizando los procesos de polimerización, y por tanto la pérdida de color. Se ha publicado que la presencia de anhídrido sulfuroso en el vino promueve el consumo de aminoácidos por parte de la levadura durante la fermentación alcohólica, dando aromas más complejos y mejor estabilidad (Guerrero Hidalgo *et al.* 2015).

La utilización del anhídrido sulfuroso como conservante alimentario se ha asociado con algunos riesgos para la salud. Se ha relacionado a los sulfitos resultantes de la adición de anhídrido sulfuroso en el vino con reacciones alérgicas en algunos consumidores. Los individuos sensibles a los sulfitos reaccionan negativamente a su ingestión a partir de 10 mg de ingesta. Es por ello que en el caso de vinos con concentraciones de anhídrido sulfuroso mayores a ésta, se debe indicar la presencia de sulfitos en la etiqueta. Los individuos sensibles pueden experimentar una variedad de síntomas que incluyen dolores de cabeza, náuseas, dermatitis, urticaria, angioedema, dolor abdominal, diarrea, broncoconstricción y anafilaxia. Los asmáticos que son dependientes de los esteroides o que tienen un mayor grado de hipersensibilidad de las vías respiratorias están en mayor riesgo de sufrir una reacción a los alimentos que contienen sulfitos (Guerrero Hidalgo *et al.* 2015).

Así, se ha visto la necesidad de reducir la cantidad de sulfuroso, ya que este compuesto no sólo se encuentra en el vino, sino que además se encuentra en muchos productos alimenticios como aditivo y la cantidad consumida es acumulativa en el organismo.

Se suele añadir a los mostos una concentración aproximada de 80 mg/L de anhídrido sulfuroso para vinos blancos y 50 mg/L para vinos tintos. Más del 50 % de la cantidad añadida inicialmente termina como formas combinadas, que no tienen actividades antisépticas ni antioxidantes, pero si tienen contraindicaciones relacionadas con la salud (Guerrero Hidalgo *et al.* 2015).

## I.4 Aplicación de toxinas *killer* en la industria vitivinícola

### I.4.1 Toxinas *killer* como agentes de biocontrol

En la industria vitivinícola, el empleo de los patrones de susceptibilidad generados a través de los ensayos con levaduras *killer* ha sido reportado de forma abundante como una medida para reconocer y/o discriminar la diversidad de levaduras asociadas a las fermentaciones o a las contaminantes de las mismas (Pérez *et al.* 2011; Sangorrín *et al.* 2002; Lopes *et al.* 2006). En la misma rama, las levaduras *killer* han sido evaluadas por su potencial preservador de los procesos de fermentación. Sangorrín *et al.* estudiaron la posibilidad de emplear levaduras *killer* como una medida de biocontrol en bodegas de producción vinícola en la Patagonia Argentina en base a sus perfiles de interacción *killer*, obteniendo cepas indígenas con una amplia actividad antagónica hacia cepas que ocasionan el deterioro de vinos y alimentos (Sangorrín *et al.* 2008b). Las aplicaciones de levaduras productoras de toxinas *killer* como agentes de biocontrol, también fueron reportadas en áreas ajenas a los vinos, para combatir levaduras patógenas de productos marinos, para inhibir fitopatógenos como *Geotrichum candidum*, *Botrytis cinerea*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus niger*, *Penicillium expansum* y *Colletotrichum sublineolum* (Robledo-Leal *et al.* 2016; Santos *et al.* 2004; Blevé *et al.* 2006; Taczman-Brückner *et al.* 2005).

Las toxinas *killer* de levaduras se aplican principalmente en las fermentaciones del vino para prevenir el desarrollo de levaduras contaminantes. Se demostró que el ambiente del vino puede ser favorable para la estabilidad de las toxinas, su actividad y producción. Las condiciones óptimas para la mayoría de las toxinas son pH ácido y temperaturas alrededor de 20 °C (Schaffrath *et al.* 2018).

El concepto de levadura contaminante en alimentos y bebidas fermentadas es bastante complejo. Hay una delgada línea entre los sabores y aromas deseados causados por los metabolitos producidos por ciertos microorganismos y la sobreacumulación de estos metabolitos que se percibe como deterioro. Un ejemplo de ello es la producción de 4-etilfenol por *Dekkera* spp. Es deseable en cantidades por debajo de un cierto nivel cuando todavía contribuye a la complejidad del aroma del vino. El deterioro se puede dar durante el añejamiento o el almacenamiento del vino, pero también las levaduras pueden tener un efecto perjudicial durante y antes de la fermentación y, por lo tanto, el control de las levaduras contaminantes debe realizarse a lo largo de todo el proceso de elaboración del vino.

Las levaduras contaminantes son responsables de la formación de películas en los vinos almacenados, turbidez, sedimentos y producción de gas en botellas, olores y sabores desagradables. Tales especies son *P. membranifaciens*, *W. anomalus*, *Candida* spp. con

metabolismo aeróbico o débilmente fermentativo que pueden crecer bien en el entorno vitivinícola. Si el vino tiene cantidades insuficientes de sulfito para impedir su crecimiento, pueden provocar la formación de películas en la superficie del vino. Además, *W. anomalus*, *M. pulcherrima* y *H. uvarum* (*Kloeckera apiculata*) pueden traer problemas durante la fase inicial de la fermentación, produciendo altos niveles de acetato de etilo que conduce al deterioro del vino (Loureiro y Malfeito-Ferreira, 2003).

Además de SO<sub>2</sub>, el ácido sórbico, ácido benzoico, dicarbonato de dimetilo y el quitosano también se utilizan como conservantes. Aunque, se demostró que el dicarbonato de dimetilo es relativamente tóxico y es difícil de manipular, mientras que el quitosano es eficaz solo contra ciertas cepas de *D. bruxellensis* (Mehlomakulu *et al.* 2016).

El uso de tecnologías emergentes incluye tres categorías principales. Los métodos físicos que proponen la aplicación de alta presión hidrostática, ultrasonidos, campos eléctricos pulsados, radiación ultravioleta y microondas. Los métodos químicos, como ozono, quitosano y agua electrolizada; y los enfoques biotecnológicos que proponen la utilización de cultivos iniciadores seleccionados, péptidos antimicrobianos y toxinas *killer*, y modulación de la disponibilidad de nutrientes (Pinto *et al.* 2020; Peña *et al.* 2020). La aplicación de las tecnologías emergentes permitirá la reducción del uso del dióxido de azufre.

Las toxinas *killer* pueden representar un conservante alternativo a los agentes antimicrobianos sintéticos tradicionalmente utilizados en la industria del vino (Oro *et al.* 2016; Mehlomakulu *et al.* 2016; Cordero-Bueso *et al.* 2017). Investigaciones recientes demostraron que las toxinas *killer* secretadas por *T. delbrueckii*, *Candida pyralidae*, *Kluyveromyces wickerhamii* pueden inhibir levaduras contaminantes de vinos, como *D. bruxellensis*, *P. membranifaciens*, *M. guilliermondii* y *Peronospora manshurica*. Además, ha sido descrito que un entorno similar al del vino favorece la estabilidad y la actividad de estas toxinas (Liu *et al.* 2013; Mehlomakulu *et al.* 2014). Una de las investigaciones más innovadoras relacionadas con el uso de toxinas *killer* describe la producción heteróloga de KpKT (producida naturalmente por *Tetrapisispora phaffii*), en *Komagataella phaffii*. Esta toxina fue liofilizada y cuando se aplicó al mosto de uva, ejerció una significativa actividad antagónica contra levaduras silvestres relacionadas con el vino, al tiempo que demostró ser compatible con la actividad fermentativa de cepas iniciadoras de *Saccharomyces cerevisiae* en crecimiento activo (Carboni *et al.* 2020).

La composición química del mosto de uva y del vino, debe ser compatible con la actividad de las toxinas *killer*. El Código Internacional de Prácticas Enológicas (2013), publicado por la OIV, establece que el mosto es el producto líquido (jugo) obtenido de la uva fresca (fruto maduro de

la vid), ya sea de forma espontánea o mediante procedimientos físicos tales como molienda, presionando, entre otros. Los mostos de uva son líquidos de carácter ácido (pH entre 2,8 y 3,5), espesos, algo viscosos, más densos que el agua, que presentan una composición química extremadamente compleja. Los componentes mayoritarios que lo constituyen se muestran en la Tabla I.1.

**Tabla I.1:** Componentes mayoritarios del mosto de uva y del vino

Componente	Mostos	Vinos
Agua	700 a 850	750 a 900
Hexosas	140 a 250	0,1 a 2
Polisacáridos	3 a 5	2 a 4
Alcoholes	-	69 a 121
Polioles	-	5 a 20
Ácidos orgánicos	9 a 27	3 a 20
Polifenoles	0,5	2 a 6
Compuestos nitrogenados	4 a 7	3 a 6
Minerales	0,8 a 2,8	0,6 a 2,5
Vitaminas	0,25 a 0,8	0,2 a 0,7

Concentración expresada en g/L. Fuente: Flanzy, 2003.

Según lo establecido por la OIV (2020), el vino se define como la bebida resultante de la fermentación alcohólica completa o parcial de la uva fresca, estrujada o no, o del mosto de uva. Su graduación alcohólica no puede ser inferior a 8,5 % v/v. Desde el punto de vista químico, el vino es una solución hidroalcohólica en la cual se hallan cientos de compuestos minoritarios (Tabla I.1), tales como alcoholes superiores, ésteres, glicerol, diacetilo, acetoina, 2,3-butanodiol, entre otros.

Gran parte de estos compuestos son producidos por las levaduras durante la fermentación alcohólica, mientras que algunos otros son compuestos provenientes de la uva pero transformados por el metabolismo celular de estos u otros microorganismos. Muchos de estos constituyentes son de gran relevancia sensorial. El glicerol, junto al etanol y a otros polialcoholes de mayor peso molecular, afectan la viscosidad, otorgando “el cuerpo” a un vino y hacen, además, una pequeña pero fundamental contribución al *flavour* o aroma de dicho producto.

Las condiciones ambientales de fermentación y crianza del vino (pH bajo y temperaturas bajas) son favorables para la mayoría de las toxinas *killer* de levaduras. Un ejemplo de ello es la toxina

KpKT de *T. phaffii* (antes *K. phaffii*) que puede inhibir a *Hanseniaspora uvarum* presente en uvas y jugos de uva. Su actividad es incluso comparable a la actividad antifúngica del SO<sub>2</sub>. Además, inhibe otras especies de levadura como *Kloeckera* / *Hanseniaspora* y *Zygosaccharomyces* y *D. bruxellensis* (Schaffrath *et al.* 2018).

La influencia del pH en la actividad tóxica de las levaduras *killer* es un factor importante al considerar su uso como agentes de biocontrol en el proceso de vinificación. Por ejemplo, K2 producida por *S. cerevisiae* demostró ser más eficaz que K1 en el valor de pH que se encuentra en el vino (3,5) y, por lo tanto, la hace más adecuada para su uso como agente antimicrobiano. Además, K2 también es activa en un rango de pH más amplio (2,8 – 4,8) que K1 (Schaffrath *et al.* 2018). K28 tiene un pH óptimo bajo y por lo tanto, es adecuada para agregar al mosto de uva que tiene un pH en el rango de 2,8 – 3,8. Las toxinas de *Pichia* exhiben una mayor actividad a valores de pH bajos y temperaturas bajas (Belda *et al.* 2017). La mayor producción de toxinas y estabilidad de PMKT1 y PMKT2 se observó a pH 4,5 y a 20 °C. La toxina KpKT producida por *T. phaffii* es activa en condiciones de vinificación (pH alrededor de 3,5 y bajas temperaturas) contra ciertas especies de levadura, incluida *H. uvarum*, que se encuentra con mayor frecuencia en las uvas y el jugo de uva (Ciani y Fatichenti, 2001). Las toxinas KwKT secretada por *K. wickerhamii* y PiKT secretada por *W. anomalus* mostraron su actividad óptima a pH 4,4 y fueron capaces de inhibir el crecimiento de *D. bruxellensis* (Oro *et al.* 2016).

#### **1.4.2 Producción de las toxinas *killer***

Para usarlas como antimicrobianos, las levaduras *killer* se pueden incluir como iniciadores de fermentación o directamente agregar las toxinas *killer* purificadas. Las estrategias de obtención y purificación de toxinas se centran en la definición de la composición del medio de producción y condiciones de cultivo adecuadas, así como también la definición de métodos de recuperación que no afecten la actividad *killer*.

En general, las condiciones de cultivo son tradicionalmente optimizadas por la estrategia de una variable a la vez, es decir, cambiando un factor mientras se mantienen constantes los otros. Aunque esta estrategia es sencilla y no exige aplicar un análisis estadístico, requiere un gran número de experimentos y la interacción entre los factores es ignorada. En contraste, los diseños experimentales basados en la estadística (DEE) son aproximaciones más eficientes que pueden llevarse a cabo con un gran número de variables simultáneamente; además, se puede estimar la interacción entre las variables. Actualmente, esta técnica ha sido ampliamente usada por diferentes investigadores para optimizar los componentes de un medio de cultivo, ya que en una herramienta eficiente que permite el desarrollo de modelos matemáticos empíricos. Tal

es el caso de Nickel *et al.* que optimizan estadísticamente el medio de cultivo a base de suero de leche, para la producción heteróloga de poli (3-hydroxybutirato) en *Escherichia coli* (Nickel *et al.* 2005); y la optimización de la producción de *Pichia onychis* a partir de melaza, hidrolizado de soja, maíz y levadura (Díaz *et al.* 2005).

El método tradicional de experimentación, el que quizás surge de forma más intuitiva para estudiar un sistema, consiste en variar un factor cada vez: a partir de unas condiciones iniciales, se realizan experimentos en los cuales todos los factores se mantienen constantes excepto el que se está estudiando. De este modo, la variación de la respuesta se puede atribuir a la variación del factor, por lo tanto, revela el efecto de ese factor.

La estrategia experimental tradicional presenta inconvenientes importantes cuando existe interacción entre factores. No informa cómo un factor interactúa con los otros factores o cómo estas interacciones afectan a la respuesta, con lo cual sólo se obtiene una comprensión limitada de los efectos de los factores. No proporciona la posición del óptimo. El experimentador percibe que se ha llegado al óptimo porque cambiando un factor cada vez la respuesta no mejora, pero se puede encontrar lejos del óptimo posible. Aunque se puede reiniciar la experimentación partiendo del “óptimo” encontrado, esta solución es extremadamente ineficiente cuando se deben estudiar muchos factores a muchos valores distintos, puesto que el método tradicional requeriría demasiados experimentos y demasiado tiempo.

El diseño estadístico de experimentos (DEE) proporciona el marco matemático para cambiar todos los factores simultáneamente y obtener la información buscada con un número reducido de experimentos, es decir con la máxima eficiencia. El DEE conduce a una planificación con menos experimentos que el método tradicional para obtener un conocimiento equivalente (Singh *et al.* 2009).

Dadas las aplicaciones potenciales del fenómeno *killer* de las levaduras en vinificación, la investigación sobre su producción, purificación, mecanismos de acción e interacción con las especies contaminantes en entornos vínicos, se presenta como una oportunidad de generación de conocimientos cuya utilidad se encuentra ya definida, esperando a ser explotada.

## II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### HIPÓTESIS

**Toxinas *killer* producidas por levaduras, seleccionadas por su acción frente a levaduras contaminantes y caracterizadas en sus mecanismos de acción, permitirán lograr vinos sin defectos y sin riesgos para la salud.**

### OBJETIVO GENERAL

**CARACTERIZAR LAS PROPIEDADES BIOQUÍMICAS, LOS MODOS DE ACCIÓN Y LA CAPACIDAD BIOCONTROLADORA DE TOXINAS *KILLER* CON EL PROPÓSITO DE DESARROLLAR UN SISTEMA EFICIENTE DE BIOCONTROL DE LEVADURAS CONTAMINANTES DE VINOS.**

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar los efectos de las toxinas sobre la población de levaduras naturalmente presente en mostos de vinificación, con particular interés en las levaduras contaminantes.
- Optimizar las condiciones de producción de cada toxina a partir de las levaduras productoras.
- Evaluar la estabilidad de las toxinas en las condiciones de vinificación.
- Purificar y caracterizar bioquímicamente las toxinas.
- Analizar el modo de acción de las toxinas *killer* sobre células sensibles.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### III.1.1 Microorganismos

Los microorganismos utilizados en este estudio, como cepas productoras de toxinas *killer* se describen en la Tabla III.1. Las levaduras sensibles utilizadas como control en el análisis del fenotipo *killer* se describen en la tabla III.2. Las levaduras comerciales o *starters* usadas como antagonistas en el análisis del fenotipo *killer* se describen en la tabla III.3. Las levaduras contaminantes usadas como antagonistas en el análisis del fenotipo *killer* se describen en la tabla III.4.

**Tabla III.1:** Levaduras productoras de toxinas *killer* caracterizadas en este estudio.

Cepa	Denominación	Origen
NPCC 1033	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Mosto Merlot Fermentado Bodega Domaine Vistalba
NPCC 1027	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Mosto Malbec Fermentado Bodega Domaine Vistalba
NPCC 1302	<i>Saccharomyces eubayanus</i>	Piñón fruto de Araucaria Araucana Lago Tromen

**Tabla III.2:** Levaduras utilizadas como controles en el análisis del fenotipo *killer*.

Cepa	Denominación	Origen
NPCC 106	<i>Candida glabrata</i>	Colección NCYC
NPCC P351	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	PROIMI
NPCC 1178	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Mosto Malbec Fermentado Bodega Viñateros Unidos

**Tabla III.3:** Levaduras comerciales utilizadas como antagonistas en el análisis del fenotipo *killer*.

Denominación	Origen
Enoferm M2	Comercial
Zimasil bayanus	Comercial
Laffort F10	Comercial
Uvaferm BC	Comercial
Actiflore bayanus BO-213	Comercial
Canadivin Sauvignon L3	Comercial
Actiflore laffort F5	Comercial
Fermol PB-2033	Comercial
Zymaflore VLBC	Comercial
Maurivin B	Comercial
ALG 804 DSM	Comercial
UL3	Comercial
IOC- 18 2007	Comercial
Lev. Excellence XR	Comercial

**Tabla III.4:** Levaduras contaminantes utilizadas como antagonistas en el análisis *killer*.

Cepa	Denominación	Origen
NPCC 1055	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	Mosto Fresco Bodega Viñateros Unidos
NPCC 1099	<i>Pichia membranifaciens</i>	Vino contaminado Bodega Eduardo Podlesh
NPCC 1038	<i>Pichia manshurica</i>	Vino contaminado Bodega Eduardo Podlesh
NPCC 130	<i>Dekkera bruxellensis</i>	Colección LAMAP Chile

### III.1.2 Mantenimiento de microorganismos

Las levaduras empleadas se preservaron en la colección NPCC (Colección de Cultivos de la Patagonia Norte, *North Patagonian Culture Collection*) en ultrafreezer a -80 °C, utilizando glicerol al 20 %v/v como crioprotector. Para su uso cotidiano se conservaron en placas con medio GPY a 4 °C.

### III.2. Medios de cultivo

Se detalla a continuación, la composición de los medios de cultivo. Todos ellos fueron esterilizados en autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

#### GPY (sólido/líquido)

---

Extracto de levadura	0,5 %p/v
Peptona	0,5 %p/v
Glucosa	4 %p/v
Solución A	27,8 %v/v
Solución B	22,2 %v/v
Agua	Cantidad necesaria para completar el volumen
Agar (en caso de ser sólido)	2 %p/v

---

#### YEPD – MB modificado con NaCl.

---

Extracto de levadura	0,3 %p/v
Peptona	0,5 %p/v
Extracto de malta	0,3 %p/v
Glucosa	1 %p/v
Cloruro de sodio	1 %p/v
Solución A	27,8 %v/v
Solución B	22,2 %v/v

---

Agua	Cantidad necesaria para completar el volumen
Agar	2% p/v
Azul de metileno	0,0065 %p/v

### **MEDIO KILLER**

Extracto de levadura	0,3 %p/v
Peptona	0,5 %p/v
Extracto de malta	0,3 %p/v
Glucosa	1 %p/v
Cloruro de sodio	1 %p/v
Solución A	27,8 %v/v
Solución B	22,2 %v/v
Agua	Cantidad necesaria para completar el volumen

### **GPY-ACÉTICO**

Glucosa	2 %v/v
Peptona	0,5 % v/v
Extracto de levadura	0,5 %v/v

Se ajustó a pH 4 con ácido acético glacial.

### **VINO SINTÉTICO**

Glucosa	0,6 g/L
Fructosa	1,2 g/L
Trehalosa	0,3 g/L
Extracto de levadura	2 g/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> anhidro	1 g/L

MgSO <sub>4</sub> anhidro	0,4 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> anhidro	2 g/L
Biotina	0,25 mg/L
Tiamina	0,0045 mg/L

---

Se ajustó a pH 3,8 con ácido clorhídrico. Se preparó independientemente la solución de biotina y tiamina suplementada con 10 %v/v de etanol y se filtró.

### **III.3. Soluciones y soluciones buffer**

#### **III.3.1 Buffer citrato/fosfato:**

Según pH deseado, se mezclaron diferentes cantidades de Solución A, Solución B y agua.

Solución A: Ácido cítrico 0,1 M.

Solución B: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> anhidro 0,2 M.

#### **III.3.2 Buffer fosfato salino (PBS):**

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> anhidro 2 g/L

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> anhidro 6.1 g/L

NaCl 80 g/L

KCl 2 g/L

pH 7.6

### **III.4. Cultivo de levaduras**

#### **II.4.1. Preparación de inóculos de levaduras**

Los inóculos de levaduras se realizaron partiendo de las levaduras conservadas a -80 °C en glicerol al 20 %v/v. Tras reactivar las cepas en GPY sólido durante 48 h a 26 °C, se realizaron cultivos seriados en GPY líquido en agitación. El escalonamiento del cultivo se realizó agregando alícuotas de cultivo para alcanzar 1.10<sup>5</sup> cel/mL finales, representando el 10 % del volumen final del volumen a producir.

### **III.4.2 Cultivos líquidos para producción de toxinas**

Los cultivos de las diferentes levaduras se realizaron en batch, se incubaron a temperatura y agitación constante y se cuantificó el avance del crecimiento microbiano por densidad óptica (DO) a 640 nm a intervalos regulares de tiempo, hasta inicio de la fase estacionaria de crecimiento, determinada por dos valores iguales consecutivos de DO.

Los sobrenadantes de cultivo se obtuvieron por centrifugación a 4 °C a 5000 rpm durante 10 min.

### **III.5. Determinaciones y procesos analíticos**

#### **III.5.1 Determinación cualitativa del fenotipo *killer* por el método de la estría.**

Se utilizó el método cualitativo de detección de actividad *killer* (Lopes y Sangorrín, 2010). Cada cepa de levadura sensible se resuspendió en agua estéril de manera de obtener una suspensión de  $10^6$  cel/mL y 1 mL de esta suspensión se sembró como césped en placas conteniendo 10 mL de medio sólido YEPD-MB modificado con NaCl. Las cepas a las que se determinó fenotipo *killer* se inocularon en la superficie de estas placas realizando una línea con un ansa cargada de levaduras. Se incubaron a 20 °C durante 48-72 h. El fenotipo *killer* sensible se indicó en el caso en que se presentó un halo de inhibición de crecimiento del césped de levaduras alrededor de la línea de levaduras sembradas en la superficie.

#### **III.5.2. Determinación semicuantitativa del fenotipo *killer* por el Metodo del Well (WTM)**

Se utilizó una adaptación del método descrito previamente (De Ingeniis *et al.* 2009) sembrando 20 – 200  $\mu$ L de cultivo líquido de levadura, o extracto crudo de toxina en wells de 7 mm de diámetro en placas con 10 mL de agar YEPD-MB modificado con NaCl, inoculadas con 1 mL de suspensión de  $10^6$  cel/mL de la cepa sensible. La presencia del fenotipo *killer* sensible se manifestó con la presencia de un halo de inhibición de crecimiento alrededor del well al cabo de 48-72 h de incubación a 20 °C.

La determinación semicuantitativa de la actividad *killer* se expresó en función del diámetro del halo de inhibición (en mm) alrededor del well.

#### **III.5.3 Determinación cuantitativa del fenotipo *killer* por el método multiwell (MWM) y cálculo de unidades de actividad *killer*.**

Se utilizó una adaptación del método descrito previamente (Guyard *et al.* 2002), utilizando microplacas de 96 pocillos de fondo plano de uso único con un volumen final de 250  $\mu$ L por

pocillo. En cada pocillo de la microplaca se evaluó la actividad *killer* colocando alícuotas de los extractos de toxinas *killer* con 124  $\mu\text{L}$  de medio *killer* líquido concentrado y 20  $\mu\text{L}$  de una suspensión  $10^4$  cel/mL de la levadura sensible *C. glabrata* o las cepas contaminantes de vinos.

Las placas se incubaron a 20 °C durante 48 h manteniendo una agitación de 120 rpm. Se cuantificó el crecimiento de la levadura sensible por lectura de la DO a 630 nm usando un lector de placas ELISA automático. La actividad de las toxinas *killer* fue evaluada comparando las curvas de crecimiento de la cepa sensible, con y sin extracto de toxina *killer*, así como también con el extracto inactivado por calor durante 10 min a 100 °C. Los valores de absorbancia se transformaron en porcentaje de inhibición del crecimiento utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición del crecimiento de } C. \textit{glabrata} = 100 - \left( \left( \frac{\text{Media de Abs para una alícuota}}{\text{Media de Abs de la alícuota en } T_0} \right) \times 100 \right)$$

Los ensayos se realizaron por cuadruplicado.

Se definió una **Unidad Arbitraria (UA)** de actividad de las toxinas *killer* como el volumen de extracto de toxina necesario para inhibir el 50 % del crecimiento de la cepa sensible de referencia después de la incubación durante 48 h a 20 °C y con agitación de 120 rpm.

#### III.5.4 Determinación de proteínas por el método de Lowry

Para la determinación de proteínas se empleó el método colorimétrico de Lowry (Lowry *et al.* 1951). A 100  $\mu\text{L}$  de muestra a analizar se añadió un volumen igual de NaOH 2 % y 2 mL de solución C (1 mL de tartrato de sodio 1 %p/v, 1 mL de sulfato de cobre 0,5 %p/v y 100 mL de carbonato de sodio 2 %p/v). Se incubó durante 20 min a temperatura ambiente y luego se añadió el reactivo Folin diluido 1:2, agitando vigorosamente en vortex. Se incubó durante 30 min en oscuridad. Finalmente se determinó absorbancia a 750 nm en espectrofotómetro.

Para la realización de una curva de calibración, fueron utilizados diferentes diluciones a partir de una solución patrón de albúmina de suero bovina 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , llevando a un volumen final de 100  $\mu\text{L}$  con agua. En el caso de las muestras a analizar, se utilizaron diferentes volúmenes completando un volumen final de 100  $\mu\text{L}$  con agua. Todas las determinaciones fueron realizadas por duplicado.

#### III.5.5 Determinación de actividad $\beta$ -glucanasa

La actividad  $\beta$ -glucanasa se determinó cuantificando la cantidad de  $p$ -nitrofenol ( $p$ NP) liberado a partir del  $p$ -nitrofenol -  $\beta$  - D - glucósido ( $p$ NPG) usado como sustrato (Guyard *et al.* 2002). Alícuotas de extractos de las diferentes toxinas *killer* se mezclaron con  $p$ NPG 0,5 mM diluido en buffer citrato-fosfato pH 5 en un volumen final de 500  $\mu\text{L}$ . La mezcla de reacción se incubó a 20 °C durante 30 min y se agregaron 250  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  250 mM para detener la reacción. La

liberación de pNP fue determinada por lectura espectrofotométrica de absorbancia a 405 nm. El coeficiente molar de extinción del pNP usado fue  $\epsilon=18.300 \text{ M cm}^{-1}$ . Una unidad de actividad glucanasa (UG) fue definida como la cantidad de enzima capaz de liberar 1 nmol de pNP por minuto bajo las condiciones experimentales arriba mencionadas. Los experimentos fueron realizados por duplicado.

### **III.5.6 Actividad quitinolítica**

La actividad quitinasa se analizó mediante el método DNS (Miller, 1959) utilizando quitina coloidal 1 %p/v como sustrato. Alícuotas de 125  $\mu\text{L}$  de toxina se incubaron con 125  $\mu\text{L}$  de quitina coloidal durante 20 h y luego se agregó 250  $\mu\text{L}$  de ácido 3,5- dinitrosalicílico (DNS) y se incubaron a 92 °C durante 10 minutos. Al observarse cambio en la coloración se detuvo la reacción en agua a 4 °C durante 10 minutos. Se agregaron 2,5 mL de agua destilada. La reducción del DNS se leyó a través de un espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm. La concentración de azúcar presente en la muestra problema fue determinada mediante una curva de calibración de glucosa. Una unidad de actividad quitinasa (UQ) se definió como la cantidad de enzima que libera 1  $\mu\text{mol}$  de n-acetilglucosamina (GlcNAc) en la reacción. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

Para la preparación de quitina coloidal, a 1 g de quitina coloidal se añadieron 10 mL de HCl concentrado y se incubó durante 6 h. Se añadieron 250 mL de etanol frío al 70 % a la mezcla en agitación continua, que se mantuvo de 10 a 20 min aproximadamente. Una vez estabilizada la mezcla, se ajustó el pH a 7. Se centrifugó a 8000 rpm durante 30 min a 4 °C. El sedimento se lavó con agua destilada estéril mediante centrifugación a 3000 rpm durante 5 min a 4 °C las veces necesarias hasta que el olor a alcohol se eliminó completamente. La quitina coloidal obtenida se almacenó a 4 °C hasta su uso posterior (Agrawal y Kotasthane, 2012).

### **III.6 Métodos de obtención de extractos proteicos**

Para retirar las células, los cultivos celulares fueron centrifugados a 5000 rpm durante 10 min a 4 °C, inmediatamente después de detectado el inicio de la fase estacionaria de crecimiento. El sobrenadante obtenido fue posteriormente sometido a diferentes métodos de precipitación/concentración de proteínas de acuerdo a lo descrito en **III.6.1**, **III.6.2** y **III.6.3**.

Los extractos proteicos obtenidos se esterilizaron por filtración en filtros de membrana (Millipore) de tamaño de poro de 0,22  $\mu\text{m}$ , independientemente del método de obtención utilizado. Se calculó actividad específica (AE) de cada uno de los extractos, mediante

determinación de las UA *killer* según el apartado **III.5.3** y contenido de proteínas según el apartado **III.5.4**.

### **III.6.1 Precipitación de proteínas con sulfato de amonio**

Al sobrenadante de cultivo de la levadura productora de toxina *killer* se agregó de manera fraccionada sulfato de amonio hasta 80 %p/v, en agitación constante a 4 °C. Se incubó una hora en agitación a 4 °C y se centrifugó a 7000 rpm y 4 °C durante 30 minutos. El precipitado colectado se resuspendió en buffer citrato/ fosfato pH 4, 5.

Las muestras se dializaron con membranas de 30.000 Da de tamaño de poro en buffer citrato/fosfato pH 4,5 a 4 °C durante toda la noche en agitación. Luego se concentraron en incubación con sacarosa durante 8 h a 4 °C.

### **III.6.2 Precipitación de proteínas con etanol**

Al sobrenadante de cultivo de la levadura productora de toxina *killer* se agregó de manera fraccionada etanol hasta 30 %v/v en agitación constante a 4°C. Se incubó una hora en agitación a 4°C y se centrifugó a 7000 rpm y 4 °C durante 30 minutos. El precipitado colectado se resuspendió en buffer citrato/ fosfato pH 4,5.

### **III.6.3. Concentración con membrana**

El sobrenadante de cultivo de la levadura productora de toxina *killer* se concentró y purificó por el paso a través de una membrana de nitrocelulosa con punto de corte en 30.000 Da, impulsando el líquido con bomba peristáltica. La fracción colectada se recirculó hasta llegar al volumen final deseado. Todo el proceso se realizó a 4°C en heladera o baño de hielo.

## **III.7 Ensayos de caracterización preliminar**

### **III.7.1 Determinación de actividad en condiciones de estrés fisicoquímico**

Se determinó el efecto de diferentes condiciones de estrés fisicoquímico en la actividad *killer* utilizando el método multiwell (WTM). Cada ensayo se realizó por cuadruplicado en microplacas. Para ello se colocaron 20 µL de una suspensión 10<sup>6</sup> cel/mL de la cepa sensible *C. glabrata*, 56 µL de cada toxina *killer* o agua en el control, y 124 µL de medio *killer* a las siguientes condiciones:

- a) pH: 3 – 3,2 – 3,4 – 3,6 – 4 – 4,5 – 4,8 – 5 – 6
- b) Temperatura: 4 – 13 – 26 – 37 – 50°C
- c) Etanol: 3 – 6 – 9 – 12 – 14 – 16 %v/v

d) Concentración de SO<sub>2</sub> libre: 25 – 50 – 75 – 100 – 160 ppm

e) Concentración de glucosa: 0 – 20 – 210 – 240 – 300 g/L

Para establecer las diferentes condiciones de a) el medio *killer* utilizado en las placas multiwell fue preparado utilizando las diferentes proporciones de Solución A y Solución B que componen el buffer citrato /fosfato detalladas en el apartado III.3.1 de manera de obtener los valores de pH especificados.

Para establecer las condiciones especificadas en b) las placas multiwell fueron incubadas en agitación a 120 rpm a las diferentes temperaturas especificadas en cada condición.

Para establecer las condiciones especificadas en c) el medio *Killer* fue preparado con menor contenido de agua y se agregó luego de ser autoclavado la cantidad correspondiente de etanol para obtener las concentraciones deseadas.

Para establecer las condiciones especificadas en d) el medio *killer* fue preparado con menor contenido de agua y se agregó luego de ser autoclavado la cantidad correspondiente de una solución madre de SO<sub>2</sub> esterilizada por filtración para obtener las concentraciones deseadas. El cálculo de las cantidades se realizó utilizando el software Sulphite calculator®.

Para establecer las condiciones especificadas en e) el medio *killer* fue preparado con el agregado de la cantidad de glucosa correspondientes a cada condición.

Luego de la inoculación se realizaron mediciones de DO<sub>640nm</sub> en un lector de microplacas y se tomó como condición de determinación de actividad *killer* el momento en que la DO<sub>640nm</sub> de los controles fue cercana a 1.

Para determinar la relación de las diferentes variables con la actividad *killer* se realizó ANOVA de un factor utilizando el software Statística® 7.

### **III.7.2 Determinación de actividad remanente luego de incubación en mosto y vino.**

Se determinó actividad *killer* remanente luego de 5 y 24 h de incubación en vino y mosto de uva. Para ello, alícuotas de cada una de las toxinas se mezclaron en proporción 1:1 con agua, mosto de uva o vino blanco comercial esterilizados por filtración. Se incubaron a 4°C durante 48 h. Se determinaron cuantitativamente las UA por el método multiwell (MWM) a alícuotas de 56 µl de cada condición obtenidas a los diferentes tiempos de incubación. Los ensayos se realizaron por cuadruplicado.

Para determinar la influencia del tiempo de incubación en estos sustratos, se realizó ANOVA de un factor y Test de Tukey para analizar la significancia del tipo de sustrato.

### III.7.3 Determinación de la interacción con la pared de la cepa sensible

Para estimar si las toxinas *killer* se unen selectivamente a alguno de los componentes de la pared de las levaduras sensibles, se determinó la actividad *killer* en presencia de los siguientes polisacáridos: laminarina, pustulano, curdulano, manano, quitina (Sigma, St. Louis, MO, EE. UU.) y pululano (Elicityl, Crolles, Francia). Además, se incluyó concanavalina A (Sigma, St. Louis, MO, EE. UU.), una lectina que se une a glicoproteínas que contienen residuos  $\alpha$ -D-manosa y  $\alpha$ -D-glucosa.

Extractos de las diferentes toxinas con 15 UA cada uno fueron incubados con suspensiones de 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de cada uno de los diferentes componentes de la pared de las levaduras sensibles durante 4 h a 20°C (la quitina fue usada en forma coloidal de acuerdo a lo descrito en el apartado III.5.5). La actividad residual de los extractos fue analizada por el método WTM (III.5.1) en el caso de extractos crudos y por el método WMW (III.5.2) en el caso de extractos purificados frente a la cepa sensible *C. glabrata*. La actividad residual se calculó usando como control la levadura sensible incubada con los componentes de pared. Para todos los ensayos se utilizaron 60  $\mu\text{l}$  de la mezcla y se realizaron por cuadruplicado.

## III.8 Métodos estadísticos

### III.8.1 Diseño central compuesto

Para realizar la optimización por metodología de superficie de respuesta de las variables de cultivo para la producción de toxinas *killer*, se utilizó un diseño central compuesto (DCC) de cuatro niveles. El diseño y los análisis estadísticos de los resultados fueron realizados usando el paquete Statistica® 7.

Teniendo en cuenta ensayos previos se seleccionaron cuatro variables influyentes en la producción de toxinas *killer*: temperatura de crecimiento, velocidad de agitación del cultivo, adición de glicerol y tritón al medio de cultivo.

Se realizó un total de 18 ensayos para cada toxina con puntos estrella centrados en las caras con dos repeticiones en el centro (Tabla III.5).

Para realizar los cálculos estadísticos, las variables fueron codificadas de la siguiente manera:

$$x_i = \frac{x_i - x_0}{\Delta x_i} \quad i = 1, \dots, N$$

Donde  $X_i$  corresponde a la variable codificada,  $x_i$  corresponde al valor real de la variable independiente,  $x_0$  es el valor real de la variable independiente en el punto central y corresponde al paso o diferencia entre los extremos y el punto central. La codificación de las variables y los valores de cada una se muestran en la Tabla III.6.

**Tabla III.5:** Ensayos experimentales realizados para obtener la superficie en respuesta según DCC para cuatro factores.

Ensayo	Tritón (%v/v)	Glicerol (%v/v)	Temperatura (°C)	Agitación (rpm)
1	0,2	20	27	90
2	0,2	20	13	90
3	0,2	5	27	150
4	0	20	13	150
5	0,2	5	13	150
6	0	5	27	90
7	0	20	27	150
8	0	5	13	90
9	0	12,5	20	120
10	0,2	12,5	20	120
11	0,1	5	13	120
12	0,1	20	20	120
13	0,1	12,5	13	120
14	0,1	12,5	27	120
15	0,1	12,5	20	90
16	0,1	12,5	20	150
17(C)	0,1	12,5	20	120
18(C)	0,1	12,5	20	120

Se incluyen dos repeticiones para validar el ensayo (C)

**Tabla III.6:** Codificación de las variables y determinación de los valores mínimo, central y máximo de cada una.

FACTOR	VARIABLE	VALORES CODIFICADOS				
		Estrella	Mínimo	Centro	Máximo	Estrella
		-1	-1	0	1	1
Temperatura						
(°C)	X <sub>1</sub>	13	13	20	27	27
Agitación						
(rpm)	X <sub>2</sub>	90	90	120	150	150
Glicerol						
(%v/v)	X <sub>3</sub>	5	5	12,5	20	20
Tritón (%v/v)	X <sub>4</sub>	0	0	0,1	0,2	0,2

### III.8.2 Diseño experimental

Las experiencias se realizaron en Erlenmeyer de 50 mL conteniendo 25 mL de medio de cultivo GPY líquido (con la adición de glicerol y tritón determinada por el diseño experimental detallada en la tabla III.5) y se inocularon con 10<sup>5</sup> cel/mL. Se incubaron en las condiciones de temperatura y agitación determinadas por el diseño experimental (Tabla III.5) siguiendo la curva de crecimiento por determinación de DO a 640 nm a intervalos regulares de tiempo. Cuando los cultivos llegaron a fase estacionaria se separaron los sobrenadantes por centrifugación y se concentraron 10 veces por filtración tangencial. Los extractos se esterilizaron por filtración y se determinó cuantitativamente actividad *killer* por el método MWM (III.5.2), contenido de proteínas por el método de Lowry (III.5.3) y actividad β-glucanasa espectrofotométricamente usando p-nitrofenol glucósido como sustrato (III.5.4).

### III.8.3 Modelado del crecimiento

Para cada experiencia se determinaron los parámetros de crecimiento: máximo valor alcanzado (A), velocidad específica de crecimiento (μ) y duración de la fase de latencia (I), ajustando los datos experimentales al modelo de Gompertz modificado (Zwieterin *et al.* 1990) cuya ecuación se detalla:

$$Y = A. \left( \exp \left( -\exp \left( \left( \frac{\mu. 2,71882}{A} \right) \cdot (l - t) + 1 \right) \right) \right)$$

#### III.8.4 Metodología de superficie de respuesta

Para analizar los resultados del diseño experimental se utilizó la metodología de superficie de respuesta. Los factores significativos fueron ajustados a una superficie de respuesta para los tres parámetros o variables determinados: actividad *killer*, contenido de proteínas y actividad  $\beta$ -glucanasa.

#### III.8.5 Validación de los resultados

Las condiciones seleccionadas a partir del resultado de las superficies de respuesta fueron reproducidas en Erlenmeyer de 2 L con 1 L de cultivo y se determinó cuantitativamente la actividad *killer* por el método MWM (III.5.2).

Para poder comparar con las condiciones no optimizadas, se realizaron cultivos en Erlenmeyer de 2 L con 1 L de medio GPY líquido, 120 rpm y 20 °C. Se determinó cuantitativamente la actividad *killer* por el método MWM (III.5.2).

#### III.9 Cromatografía de afinidad

Como técnica para la purificación de las toxinas *killer* se empleó la cromatografía de afinidad basada en la capacidad de estas toxinas de unirse a los  $\beta$ -D-1,6-glucanos (pustulano específicamente) de la pared de las levaduras sensibles.

Se empleó 1 g de Sefarosa 6B epoxi activada (Sigma) que se resuspendió en agua hasta un volumen final de 3,5 mL. Este gel se lavó en primer lugar con 200 mL de agua destilada durante una hora. A continuación, para realizar el acoplamiento con el ligando, el gel se lavó con 20 mL de NaOH 0,1 M (pH 11,5) y se incubó en agitación con 40 mg de pustulano disuelto en 15 mL de NaOH 0,1 M (pH 11,5) durante 20 h a 35 °C. Tras este proceso, para eliminar el exceso de ligando, el gel se lavó varias veces con NaOH 0,1 M. Para inactivar los posibles sitios de unión remanentes (grupos oxiranos) se lavó el gel con etanolamina 1 M pH 8 durante toda la noche en agitación a 40 °C. Este gel se empaquetó en una columna de 1,5 cm de diámetro y se equilibró lavando varias veces con buffer citrato/fosfato 10 mM pH 3,5 con 0,5 M NaCl.

Los extractos crudos de toxinas obtenidos por ultrafiltración tangencial fueron filtrados en membranas de 0,22  $\mu\text{m}$  y sembrados en la columna. Las toxinas *killer* absorbidas en la columna se eluyeron de ésta empleando buffer citrato/fosfato pH 5 NaCl 1,5 M. Las fracciones recogidas fueron de 1 mL y se ajustaron inmediatamente a pH 4,5. Las fracciones fueron dializadas en buffer citrato/fosfato 0,1 M pH 4,5. Se tomaron alícuotas y se determinó DO a 280 nm para estimar su contenido proteico y UA por el método MWM (III.5.2).

### **III.10. Caracterización bioquímica de las toxinas purificadas**

#### **III.10.1 Determinación por microscopía de fluorescencia de muerte celular con ioduro de propidio (IP)**

Luego de incubar alícuotas de  $1 \cdot 10^6$  células /mL de las cepas sensibles con 1, 2 y 4 UA de SeKT, TdKT y WaKT durante 3 h y 24 h, se lavaron y resuspendieron en buffer PBS (III.3.2). Se agregó la solución stock de IP (1 mg/mL) hasta concentración final de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente en oscuridad. Las células teñidas se detectaron y contaron utilizando un microscopio de epifluorescencia en un rango de longitud de onda de emisión de 530 a 610 nm.

Se utilizó un tratamiento con  $\text{H}_2\text{O}_2$  como control positivo y un tratamiento con agua, como control negativo.

Los tratamientos se realizaron por cuadruplicado y se analizaron los campos necesarios de manera de contar con 400 células en promedio por tratamiento. Los resultados fueron analizados estadísticamente con ANOVA y Test de Tukey.

#### **III.10.2. Determinación del daño en la pared celular con Calcofluor White®**

Para determinar por microscopía de fluorescencia la integridad de la pared celular de las cepas sensibles luego de la acción de las diferentes toxinas *killer*, se utilizó Calcofluor White (2  $\mu\text{M}$ , Sigma-Aldrich, Milan).

Alícuotas de  $1 \cdot 10^6$  cel/mL de las cepas sensibles creciendo exponencialmente en medio GPY líquido a 20°C durante 24 h, se incubaron con 6 UA de SeKT, TdKT y WaKT durante 24 h a 20 °C. Después del tratamiento, se lavaron dos veces con agua estéril (por centrifugación 5 minutos a 5000 rpm), se resuspendieron en 30  $\mu\text{L}$  de Calcofluor White 2  $\mu\text{M}$  y se incubaron a temperatura ambiente en la oscuridad durante 30 min. Las células se observaron utilizando un microscopio de epifluorescencia (Nikon Eclipse 80i) con excitación y emisión de luz ultravioleta en una

longitud de onda rango de 300 a 440 nm. El control positivo fue realizado por incubación de las levaduras sensibles durante 3 h a 37 ° C con 2 mg/mL de Zymoliasa.

Los tratamientos se realizaron por cuadruplicado y se analizaron los campos necesarios de manera de contar con 400 células en promedio por tratamiento. Los resultados fueron analizados estadísticamente con ANOVA y Test de Tukey.

### **III.10.3. Determinación de la acumulación de especies reactivas del oxígeno (ROS) por estrés oxidativo**

Suspensiones de  $1.10^6$  cel/mL de las cepas sensibles se incubaron con 10 µg/mL de Dihidroethidium (DHE) por 60 minutos a 28°C en oscuridad. Se le agregaron las diferentes cantidades de toxinas *killer* y se incubaron durante 15, 30 y 60 minutos a temperatura ambiente. La coloración se observó en microscopio de epifluorescencia en un rango de longitud de onda de emisión de 530 a 610 nm. El tratamiento con peróxido de hidrógeno se utilizó como control positivo y con agua como control negativo.

Los tratamientos se realizaron por cuadruplicado y se analizaron los campos necesarios de manera de contar con 400 células en promedio por tratamiento. Los resultados fueron analizados estadísticamente con ANOVA y Test de Tukey.

### **III.10.4. Determinación de la externalización de la fosfatidilserina**

El fosfolípido fosfatidilserina (PS) normalmente se encuentra localizado en la cara interna de la membrana plasmática, pero en caso de apoptosis, se transloca y se expone hacia el exterior celular. La Anexina V se une específicamente a la fosfatidilserina y no logra entrar a la célula si la membrana está intacta, por lo que se utiliza como un marcador de apoptosis.

Suspensiones de  $1.10^6$  cel/mL de las cepas sensibles se incubaron durante una hora con alícuotas conteniendo 1, 2 y 4 UA de toxinas *killer*. Las células se centrifugaron y lavaron con 1 mL de buffer de unión a Anexina (preparado por dilución de la solución stock provista por el fabricante). Se agregaron 10 µl de solución de Anexina V libre y 10 µl de IP para determinar integridad de la membrana. Se incubaron en oscuridad a temperatura ambiente durante 30 minutos y se observó por microscopía de epifluorescencia. El tratamiento con peróxido de hidrógeno se utilizó como control positivo y con agua como control negativo.

Los tratamientos se realizaron por cuadruplicado y se analizaron los campos necesarios de manera de contar con 400 células en promedio por tratamiento. Los resultados fueron analizados estadísticamente con ANOVA y Test de Tukey.

### **III.10.5. Determinación de la morfología nuclear**

El efecto de la toxina sobre la morfología nuclear fue analizado por tinción de ADN con Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich, Milán). Se recolectaron células de levadura de diferentes tratamientos, se lavaron con buffer PBS y se fijaron con etanol al 70 %v/v. Se incubaron con Hoechst 33342 a una concentración final de 3 µg/mL durante 10 min a temperatura ambiente. Las células se examinaron tanto en campo claro como con fluorescencia a una longitud de onda de excitación a 380 nm y emisión en un rango de longitud de onda de 435–485 nm usando un microscopio de epifluorescencia. El tratamiento con peróxido de hidrógeno se utilizó como control positivo y con agua como control negativo.

Los tratamientos se realizaron por cuadruplicado y se analizaron los campos necesarios de manera de contar con 400 células en promedio por tratamiento. Los resultados fueron analizados estadísticamente con ANOVA y Test de Tukey.

### **III.11 Análisis de la inhibición de la producción de fenoles volátiles**

#### **III.11.1 Aclimatación de cepas al crecimiento en vino sintético**

Con el objeto de analizar la producción de fenoles volátiles en vino sintético con y sin agregado de toxina por parte de las levaduras contaminantes, se realizó un protocolo de adaptación fenotípica (Coronado *et al.* 2015).

Se inocularon las cepas contaminantes en 10 mL de medio GPY líquido e incubaron a 28 °C sin agitación. Se agitaron en vórtex 3 veces al día hasta saturación ( $1 \cdot 10^8$  cel/mL contadas en cámara de Neubauer). Se inoculó todo el volumen en 30 mL de mezcla GPY-acético en proporción 1:1. Se incubó a 28 °C por 3 días agitando 3 veces al día. Se mezcló ese cultivo en proporción 1:9 (3 mL de cultivo + 27 mL de vino) con vino sintético y se llevó a 28 °C con agitación durante 3 días. Se inoculó vino sintético puro con  $1 \cdot 10^6$  cel/mL del cultivo anterior.

#### **III.11.2 Determinación de producción de fenoles volátiles por HPLC**

Las diferentes cepas contaminantes fueron inoculadas en vino sintético en una concentración final de  $1 \times 10^5$  cel/mL y se agregaron 2 y 4 UA de toxina SeKT y TdKT activas (o inactivadas por calor) y 100 ppm de ácido *p*-cumárico, hasta un volumen final de 1,5 mL. Estos cultivos se incubaron a 28 °C y se tomaron muestras a los 10, 30 y 100 días de incubación. Una alícuota se utilizó para determinación de DO a 640nm. El resto se centrifugó y filtró en membranas de 0,22 µm para la cuantificación de fenoles volátiles.

Las muestras se analizaron por triplicado.

Para la cuantificación de fenoles volátiles se diluyeron los patrones en vino sintético. La fase móvil utilizada fue un gradiente de agua-ácido fórmico 0,12g /L y acetonitrilo según se indica a continuación:

min	agua/fórmico	ACN
0	70	30
5	70	30
10	60	40
15	50	50
20	40	60
21	70	30

La longitud de onda de lectura fue 230nm y se utilizaron patrones de 4- vinilguayacol, 4-etilfenol, 4-etilguayacol y 4-vinilfenol diluidos en vino sintético para las curvas de calibración y la determinación del tiempo de retención de cada compuesto.

## IV. RESULTADOS

### IV.1 CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR DE TOXINAS *KILLER*

En trabajos previos de investigación realizados en el Laboratorio de Biotecnología de Levaduras del PROBIEN se evaluó la capacidad *killer* de diferentes especies y cepas de levaduras vínicas regionales frente a levaduras contaminantes aisladas de ambientes de bodegas. Se seleccionaron las cepas *Torulaspota delbrueckii* NPCC 1033 y *Wickerhamomyces anomalus* NPCC 1027 por su capacidad antagónica y su espectro de acción frente a *M. guilliermondii*, *P. membranifaciens*, *P. manshurica* y *D. bruxellensis*. Asimismo, se realizaron ensayos preliminares para determinar si las toxinas proteicas producidas por estas cepas podrían producirse en condiciones de laboratorio y si eran resistentes a las condiciones de vinificación. Los resultados obtenidos confirmaron su potencial aplicación como agentes de biocontrol en vinos (Sangorrín *et al.* 2008b; Saez, 2016)

Por otra parte, se evaluaron con el mismo objetivo varias cepas aisladas de ambientes naturales de la región cordillerana de la provincia de Neuquén, y se seleccionó la cepa de *Saccharomyces eubayanus* NPCC 1302 por presentar actividad antagónica frente a cepas de referencia (Gonzalez Flores *et al.* 2017) y a un amplio espectro de cepas contaminantes de vinos sin presentar actividad antagónica frente a cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (Mazzuco *et al.* 2019).

#### IV.1.1 Determinación de capacidad antagónica frente a la biota de levaduras del proceso de producción vínica.

Se analizó la interacción de las levaduras seleccionadas como productoras de toxinas *killer*, con cepas pertenecientes a algunas de las diferentes especies de levaduras que se encuentran a lo largo del proceso productivo del vino, para evaluar su utilidad como organismos antagonistas biológicos.

En primer lugar, se determinó la actividad *killer* de las cepas de *S. eubayanus* NPCC 1302, *T. delbrueckii* NPCC 1033 y *W. anomalus* NPCC 1027 utilizando el método cualitativo detallado en el apartado III.5.1, frente a la levadura sensible de referencia *C. glabrata* NPCC 106 y a cepas de levaduras de especies contaminantes de vinos: *M. guilliermondii* (NPCC 1055), *P. manshurica* (NPCC 1038), *P. membranifaciens* (NPCC 1099) y *D. bruxellensis* (NPCC 130). Las tres levaduras productoras de toxinas *killer* conservaron la capacidad antagónica frente a las levaduras contaminantes.

En segundo lugar, se determinó la actividad antagónica de las mismas levaduras productoras de toxinas *killer*, utilizando el método cualitativo detallado en el apartado III.5.1, frente a cepas comerciales de *S. cerevisiae* utilizadas como iniciadores de fermentación en la industria

vitivinícola regional (Tabla IV.1). Se observó que la mayor parte de los cultivos comerciales fueron resistentes a las cepas *S. eubayanus* y *T. delbrueckii*, excepto en el caso del cultivo comercial Uvaferm BC. Por otro lado, únicamente las cepas de Uvaferm BC y Actiflore laffort F5 fueron sensibles a *W. anomalus*.

**Tabla IV.1** Sensibilidad de cepas comerciales de *S. cerevisiae* frente a las levaduras productoras de toxinas *killer* seleccionadas.

Cepa de <i>S. cerevisiae</i>	<i>T. delbrueckii</i> (NPCC 1033)	<i>W. anomalus</i> (NPCC 1027)	<i>S. eubayanus</i> (NPCC 1302)
Enoferm M2	-	-	-
Zimasil bayanus	-	-	-
Laffort F10	-	-	-
Uvaferm BC	+	+	+
Actiflore bayanus BO-213	-	-	-
Canadivin Sauvignon L3	-	-	-
Actiflore laffort F5	-	+	-
Fermol PB-2033	-	-	-
Zymaflore VLBC	-	-	-
Maurivin B	-	-	-
ALG 804 DSM	-	-	-
UL3	-	-	-
IOC- 18 2007	-	-	-
Lev. Excellence XR	-	-	-
Control <i>C. glabrata</i>	+	+	+
Control <i>S. cerevisiae</i> (NPCC 1178)	-	-	-

Se indica como (+) la aparición de un halo de inhibición alrededor del césped de levadura a ser evaluada frente a las levaduras productoras de toxinas, y como (-) el crecimiento normal del césped de levaduras.

#### IV.1.2 Cinética de producción de las toxinas *killer*

Las toxinas *killer* son metabolitos producidos por algunas levaduras que inhiben el crecimiento de otros microorganismos. Por esto, para obtener cantidades suficientes de toxinas y evitar su consumo o degradación en el medio de cultivo, es necesario conocer la cinética de producción de las toxinas en referencia a la cinética de crecimiento de la levadura que las sintetiza.

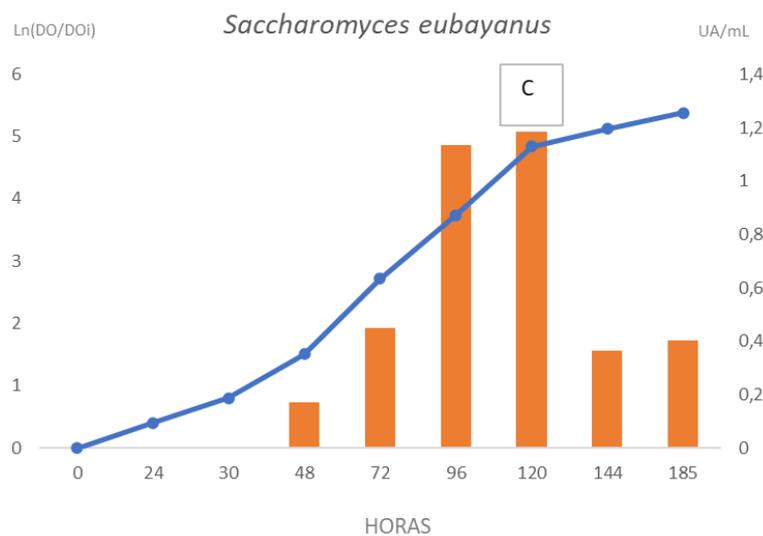
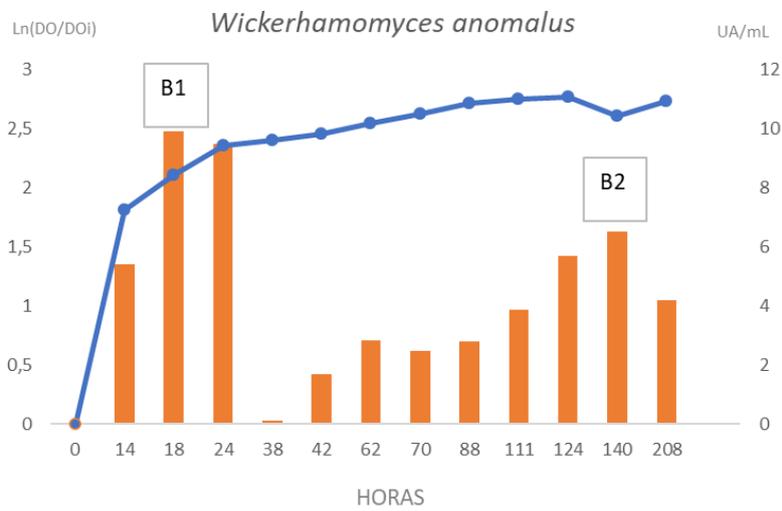
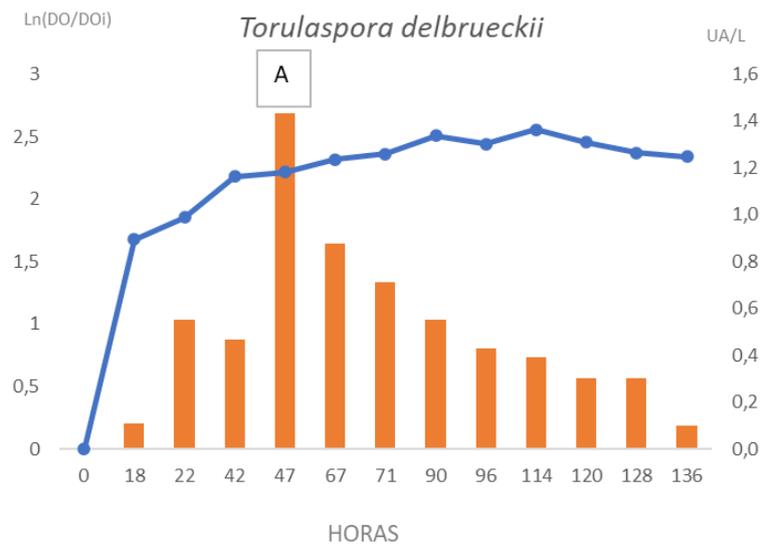
Para determinar el punto máximo de producción de las toxinas *killer* durante las diferentes etapas de crecimiento de las levaduras en cultivo líquido, se realizó el seguimiento de la curva de crecimiento de las diferentes cepas, al mismo tiempo que se realizó la preparación de un extracto crudo de cultivo concentrado y se determinó cuantitativamente su actividad *killer* utilizando el método descrito en el apartado III.5.3. En el caso de *T. delbrueckii* y *S. eubayanus* (Figura IV.1), se observó un único pico de producción a las 47h (fracción denominada A) y 120h (fracción denominada C) de cultivo, respectivamente con actividad *killer* frente a la levadura sensible, mientras que en el caso de *W. anomalus* se observaron dos picos identificados como B1 (a las 18 h) y B2 (a las 140 h) que presentaron actividad antagónica.

Luego de obtenidas las fracciones A, B1, B2 y C, con actividad antagónica frente a la levadura sensible de referencia, se realizó la determinación semicuantitativa de la actividad *killer* de las mismas frente a las cepas de levaduras contaminantes de vino (Tabla IV.2), utilizando el método descrito en el apartado III.5.2. Las fracciones A, B2 y C producidas en la fase estacionaria de crecimiento presentaron inhibición del crecimiento de las cepas contaminantes, mientras que para la fracción B1 producida por *W. anomalus* en la etapa exponencial de crecimiento, no presentó capacidad antagónica frente a las cepas contaminantes evaluadas.

**Tabla IV.2:** Inhibición de crecimiento de las cepas contaminantes de vino frente a las fracciones que presentaron actividad *killer*.

FRACCIÓN	CEPAS CONTAMINANTES			
	<i>M. guilliermondii</i>	<i>P. membranifaciens</i>	<i>P. manshurica</i>	<i>D. bruxellensis</i>
A	+	+	+	+
B1	-	-	-	-
B2	+	+	+	+
C	+	+	+	+

La cantidad de extracto correspondiente a 1 UA calculada para *C. glabrata* fue inoculada en placas con césped de cepas contaminantes. Se indica como (+) la aparición de un halo de inhibición alrededor del inóculo y como (-) el crecimiento normal del césped de levaduras alrededor del mismo.



**Figura IV.1:** Determinación de la cinética de producción de toxinas *killer* a lo largo de la curva de crecimiento de las levaduras seleccionadas. Densidad de cultivos celulares (—●— LN(DO/DOi)) y determinación de Unidades de actividad *killer* frente a *C. glabrata* (—■— UA/ml) en los diferentes momentos de la curva de crecimiento. A, B1, B2 y C presentan máximos de inhibición.

A partir de este punto, la fracción A producida por *T. delbrueckii* se denominó TdKT, la fracción B2 producida por *W. anomalus*, WaKT y la fracción C producida por *S. eubayanus*, SeKT.

#### IV.1.3 Obtención de extracto crudo

La actividad específica de las toxinas *killer* se define el número de unidades de actividad *killer* por unidad de masa de proteínas totales (UA/ mg proteínas). Con el objeto de obtener extractos con elevada actividad específica (AE) de toxina *killer*, se ensayaron diferentes estrategias de obtención de extracto crudo detallados en el apartado III.6 de materiales y métodos. Mientras mayor sea el valor de AE de los extractos, mayor será la pureza de la toxina obtenida (proporción de toxinas *killer* con respecto al contenido total de proteínas).

Los resultados de la determinación de actividad específica se ilustran en la Tabla IV.3. En la obtención de WaKT, se observó que no existen diferencias significativas entre la AE obtenida con precipitación con etanol y concentración con membrana, pero sí de ambos métodos con respecto a la precipitación con sulfato de amonio. Con respecto a la obtención de TdKT y SeKT, la determinación de unidades de actividad específica (AE) resultantes de la concentración con membrana fue significativamente mayor que con los otros dos métodos. Asimismo, se observó en los extractos crudos de las tres toxinas una cantidad total de UA colectadas superior con la concentración con membrana. Por esto se seleccionó el método de concentración con membrana como el apropiado para la obtención de los extractos.

**Tabla IV.3:** Comparación de métodos de obtención de extractos crudos de las diferentes toxinas

Cultivo	Obtención extracto crudo	Volumen mg/mL de		AE(UA/mg)	UA TOTALES
		final mL	proteínas		
WaKT	Sulfato de amonio+diálisis+azúcar	3,5	1,025	17,31 <sup>b</sup>	60,60
	Etanol	10	0,78	25,14 <sup>a</sup>	251,38
	Concentración con membrana	46,8	0,87	24,68 <sup>a</sup>	1154,94
TdKT	Sulfato de amonio+diálisis+azúcar	5	1,77	9,22 <sup>b</sup>	46,09
	Etanol	9	1,12	10,99 <sup>b</sup>	98,90
	Concentración con membrana	53	0,38	41,92 <sup>a</sup>	2221,82
SeKT	Sulfato de amonio+diálisis+azúcar	4,2	1,82	10,93 <sup>c</sup>	45,89
	Etanol	12	0,87	20,02 <sup>b</sup>	240,28
	Concentración con membrana	39	0,39	28,03 <sup>a</sup>	1093,18

Se muestran las medias de todas las determinaciones de un total de 3 producciones de cada toxina divididas en partes iguales. Los valores de AE son estadísticamente diferentes si difieren la letra para cada toxina (ANOVA de un factor y Test de Tukey HSD p valor<0,05).

#### IV.1.4. Producción en diversos medios de cultivo

Con el objeto de maximizar la producción de las toxinas se calculó la actividad específica de extractos producidos en tres medios de cultivo diferentes y obtenidos mediante concentración con membrana.

**Tabla IV.4:** Determinación de actividad específica de cada toxina en diferentes medios de cultivo.

Toxina	Medio	mg/mL proteína	AE(UA/mg)
TdKT	Killer	0,501	13,48 <sup>b</sup>
	GPY	0,164	63,64 <sup>a</sup>
	GPY 5% glicerol	0,142	83,26 <sup>a</sup>
WaKT	Killer	0,350	30,91 <sup>c</sup>
	GPY	0,207	84,77 <sup>b</sup>
	GPY 5% glicerol	0,146	137,75 <sup>a</sup>
SeKT	Killer	0,388	19,48 <sup>b</sup>
	GPY	0,234	46,34 <sup>a</sup>
	GPY 5% glicerol	0,211	55,94 <sup>a</sup>

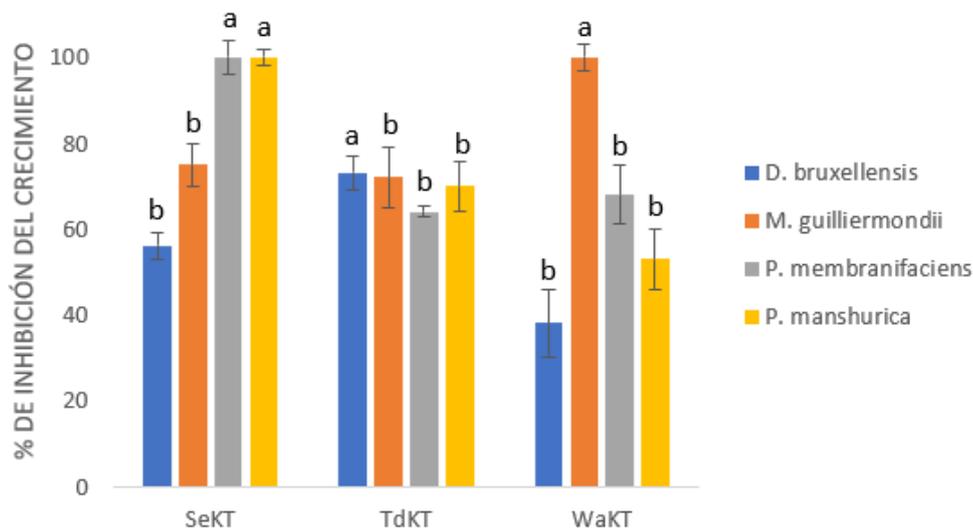
Se muestran las medias de las determinaciones de un total de 3 producciones de cada toxina en cada medio. Las diferentes letras para cada toxina, son estadísticamente diferentes (ANOVA de un factor y Test de Tukey HSD p valor<0,05)

En todos los casos la AE fue mayor en medio GPY adicionado con 5% de glicerol, pero el análisis estadístico no reveló diferencias significativas entre el medio GPY y el medio GPY adicionado con 5% de glicerol para la producción de TdKT y SeKT (Tabla IV.4). Solamente en el caso de WaKT la AE fue significativamente mayor en el medio GPY adicionado con glicerol al 5 % con respecto a los otros dos medios.

#### IV.1.5 Cuantificación de la inhibición de las cepas contaminantes de vinos

Se determinó cuantitativamente según lo descrito en III.5.3 la capacidad de inhibir el crecimiento de levaduras contaminantes de vinos, de alícuotas equivalentes de SeKT, TdKT y WaKT, para analizar el comportamiento diferencial frente a distintas cepas sensibles. Se utilizaron extractos crudos de TdKT y SeKT producidos en medio GPY líquido y concentrados con membrana. En el caso de los extractos crudos de WaKT fueron producidos en medio GPY líquido adicionado con 5% de glicerol y concentrados con membrana. Los volúmenes correspondientes a 3UA de cada toxina mostraron actividad antagónica diferente frente a las contaminantes de vinos. En la Figura IV.2 se observa que TdKT presentó mayor capacidad antagónica que el resto

frente a *B. bruxellensis* NPCC 130, WaKT presentó mayor capacidad antagonista frente a *M. guilliermondii* NPCC 1055 con respecto a las otras dos toxinas y SeKT presentó mayor capacidad antagonista frente a *P. membranifaciens* NPCC 1099 y *P. manshurica* NPCC 1038.



**FIGURA IV.2:** Actividad *killer* de SeKT, TdKT y WaKT frente a diferentes levaduras contaminantes de vinos. La actividad *killer* fue determinada por el método multiwell (MWM) utilizando 3 UA de cada toxina. Valores medios sin letra común entre cepas contaminantes difieren a  $p < 0,05$  ( $n=4$ ).

#### IV.1.6 Estabilidad de las toxinas en condiciones de estrés fisicoquímico.

Durante la fermentación vínica, existen diversos factores que varían durante el transcurso de la misma y limitan el crecimiento microbiano en el mosto. Estas variaciones también pueden afectar la estabilidad de los componentes biológicos que se adicionen como biocontroladores. El bajo pH, las elevadas concentraciones de azúcares y de anhídrido sulfuroso, la condición de anaerobiosis y los niveles crecientes de etanol que se generan durante la fermentación generan condiciones de estrés que influirán en la estabilidad de las toxinas (Beloch *et al.* 2008). Para evaluar su potencial aplicación biotecnológica en la industria vínica, se analizó la estabilidad de la actividad de las toxinas *killer* frente a condiciones de estrés que se dan en el proceso de vinificación (presencia de dióxido de azufre, aumento de la concentración de etanol en vinos, elevada concentración de azúcar en el mosto y diferentes valores de temperatura y pH). Estas condiciones se describen en el apartado III.7.1 de materiales y métodos. Se utilizaron extractos crudos de TdKT y SeKT producidos en medio GPY líquido y concentrados con membrana. En el caso de los extractos crudos de WaKT fueron producidos en medio GPY líquido adicionado con 5% de glicerol y concentrados con membrana. Se determinó cuantitativamente la actividad *killer* de SeKT, WaKT y TdKT según la metodología descrita en el apartado III.5.3.

**Tabla IV.5:** Actividad residual de SeKT, TdKT y WaKT bajo condiciones enológicas.

Parámetro enológico	Condición	% de actividad <i>killer</i> relativa		
		SeKT	TdKT	WaKT
SO <sub>2</sub> Libre	0-100 ppm	90,2	100	100
	100-160 ppm	68,9	100	100
Glucosa	0-300 g/L	100	100	100
pH	3-4,5	100	100	100
	5	60,4	75	100
	6	0	75	80
Etanol	0-16 %v/v	100	100	100
Temperatura	0-26°C	100	100	100
	26-37°C	66,8	26,7	100
	37-50°C	64,5	25	6
	40 g/L glucosa, pH 4,5 y 20 °C	100	100	100

La actividad *killer* residual de los extractos se determinó por el método multiwell (MWM) usando la levadura sensible *C. glabrata*. Las diferentes condiciones se muestran agrupadas en rangos con los mismos resultados. El porcentaje de actividad relativa se calculó en función de la actividad de las alícuotas en la condición control. Se muestran las medias de un n=4.

En la Tabla IV.5 se muestran los resultados obtenidos al evaluar la actividad *killer* de extractos en las diferentes condiciones de estrés. Se expresan en forma de actividad relativa en comparación con la determinación de actividad *killer* en el medio y condiciones control detalladas en el apartado III.5.3. La actividad de cada alícuota de toxina en la condición control se toma como 100 %, y el porcentaje de actividad relativa para el resto de las condiciones se calcula en función ella. En comparación con la condición control se observa que la elevada concentración de azúcares que caracteriza los estadios iniciales de la fermentación del mosto de uva, no afectó la actividad de ninguna de las tres toxinas, así como tampoco lo hizo la concentración creciente de etanol que se obtiene a medida que avanza la fermentación.

El dióxido de azufre que se utiliza como antiséptico, no puede ser reemplazado completamente por los antagonistas biológicos, sino que éstos deberían de poder ejercer su acción en presencia de éste (Guerrero Hidalgo *et al.* 2015). TdKT y WaKT no perdieron su capacidad antagónica aún en concentraciones límites de SO<sub>2</sub> mientras que SeKT se mostró más sensible a la presencia de este compuesto, especialmente en concentraciones de 100 a 160 ppm. En cuanto al pH, las tres toxinas conservaron el 100 % de su actividad *killer* en valores de hasta 4,5, siendo TdKT y WaKT las que conservaron un mayor porcentaje de actividad a medida que disminuye la acidez.

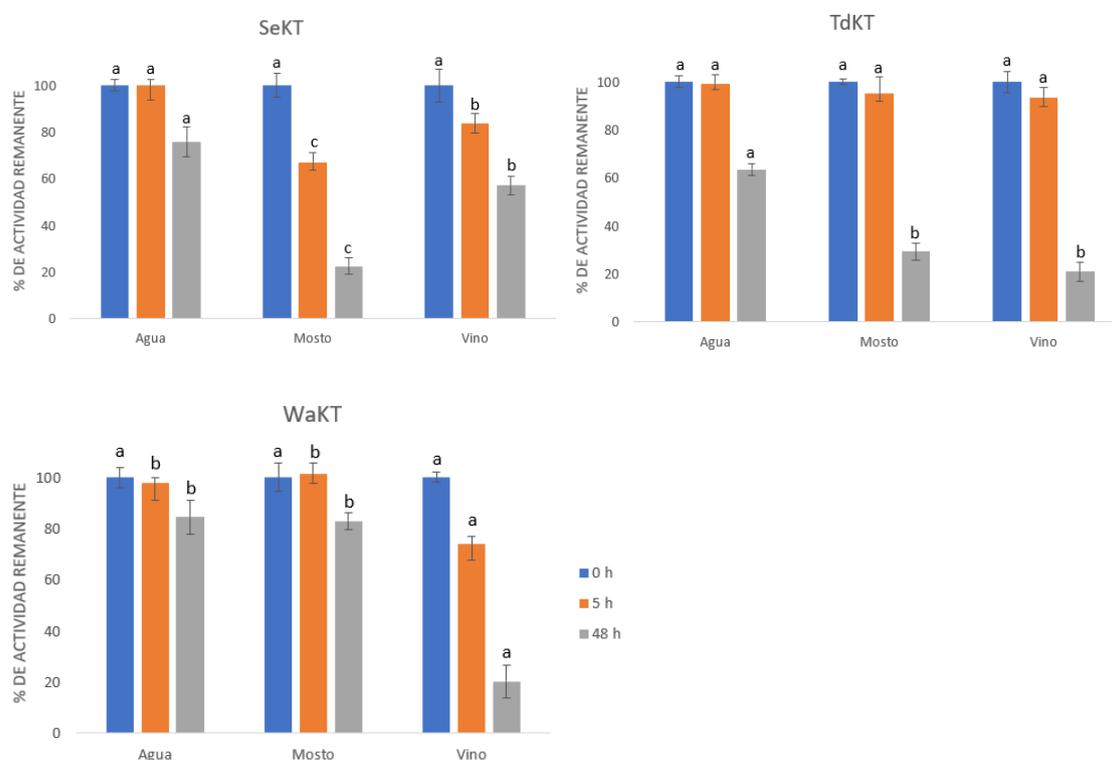
SeKT mostró ser la más estable frente a aumentos de temperatura, mientras que TdKT perdió un gran porcentaje de actividad al superar los 26 °C y WaKT al superar los 37 °C.

#### IV.1.7 Actividad remanente en mosto de uva y vino

Con el objeto de analizar la estabilidad de las toxinas en condiciones enológicas, se determinó la actividad *killer* remanente de cada toxina luego de su incubación en mosto de uva o vino durante 0, 5 y 48 h. Según se ilustra en la Figura IV.3, la pérdida de actividad de las toxinas se relacionó con la incubación en mosto o vino y se incrementó especialmente con el tiempo de incubación. En el caso de SeKT, la pérdida de actividad fue mayor al incubarse en mosto que en vino, llegando a conservar sólo el 20 % a las 48 h de incubación en mosto. TdKT presentó un comportamiento similar en mosto y vino, con un marcado descenso a las 48 h de incubación con respecto al control. WaKT se comportó de manera similar al incubarse en agua y mosto, y mostró una importante pérdida de actividad (80 %) al incubarse durante 48 h en vino. TdKT fue igual a WaKT a las 48 h perdió el 80% en los dos casos.

#### IV.1.8 Determinación de la interacción de las toxinas con los constituyentes de la pared celular

Las toxinas *killer* generalmente actúan en una primera etapa por unión a moléculas receptoras de la pared celular de las células sensibles.



**Figura IV.3:** Actividad remanente de SeKT, TdKT y WaKT frente a *C. glabrata* al inicio y luego de 5 y 48 horas de incubación a 4°C en agua, mosto de uva o vino. La actividad *killer* se determinó

por el método multiwell (MWM). Los valores medios de cada tiempo de incubación sin letra común difieren a  $p < 0,05$  ( $n=4$ ) ANOVA de un factor.

Con el objetivo de identificar la molécula blanco en la pared celular para las toxinas SeKT, TdKT y WaKT en la pared de las levaduras sensibles, se evaluó la inhibición competitiva de la actividad *killer* por diferentes polisacáridos de la pared celular a través del método semicuantitativo (WTM) que se describe en el apartado III.5.2 de materiales y métodos. Se evaluaron pustulano ( $\beta$ -1,6-glucano), manano ( $\alpha$ -1,2-glucano,  $\alpha$ -1,3-glucano y  $\alpha$ -1,6-glucano), curdulano ( $\beta$ -1,3--glucano), pululano ( $\alpha$ -1,4-glucano y  $\alpha$ -1,6-glucano), quitina ( $\beta$ -1,4-Nac glucosamina) y laminarina ( $\beta$ -1,3-glucano y  $\beta$ -1,6-glucano). Además, se evaluó la interacción con concanavalina A, una lectina o proteína de unión a carbohidratos que se enlaza específicamente a glicoproteínas que contienen residuos  $\alpha$ -D-manosa y  $\alpha$ -D-glucosa.

**Tabla IV.6:** Ensayos de competición llevados a cabo con polisacáridos de la pared celular de levaduras para detectar posibles sitios de unión de las toxinas.

	Tipo de molécula	% de actividad remanente		
		SeKT	TdKT	WaKT
PUSTULANO	$\beta$ -1,6-glucano	70	0	0
MANANO	$\alpha$ -1,2; 1,3 y 1,6-glucano	85	83	100
CURDULANO	$\beta$ -1,3-glucano	100	100	100
PULULANO	$\alpha$ -1,4 y 1,6-glucano	100	83	100
CONCAVALINA A	Lectina	100	100	100
QUITINA	$\beta$ -1,4-Nac glucosamina	60	67	100
LAMINARINA	$\beta$ -1,3 y 1,6-glucano	60	83	100
CONTROL	-	100	100	100

La actividad *killer* residual de los extractos se determinó por el método del well test (WTM) en comparación con la actividad *killer* en ausencia de glucanos. Se muestran las medias ( $n=4$ ).

En la tabla IV.6, se muestra que WaKT perdió el 100 % de actividad en presencia de pustulano, que fue capaz de inhibir completamente su actividad, indicando un potencial y único punto de unión a la cepa sensible. TdKT también mostró como posible receptor primario al pustulano, quien interfirió 100 % con su capacidad de interactuar con la cepa sensible e inhibir su crecimiento. TdKT también perdió actividad, en menor medida (17 % de inhibición de actividad por parte de manano, pululano, laminarina; y 33% por parte de quitina) en presencia de todos los glucanos salvo curdulano. Por último, para SeKT se observó una disminución de la actividad

*killer* (30 %) en presencia de pustulano, como también con otros glucanos (40 % en presencia de quitina y laminarina, 15 % en presencia de manano).

El curdulano fue el único glucano que no interfirió en la actividad de ninguna de las tres toxinas, indicando que los glucanos con enlaces de tipo  $\beta$ -1,3 no serían blancos de unión en la pared de la cepa sensible. Por otra parte, la concanavalina A no presentó interferencia en la actividad de ninguna de las tres toxinas, indicando esto la ausencia de residuos de  $\alpha$ -D-manosa y  $\alpha$ -D-glucosa en la estructura molecular de las toxinas o de las moléculas blanco de la pared celular, como las mananoproteínas.

#### **IV.1.9. Purificación por cromatografía de afinidad.**

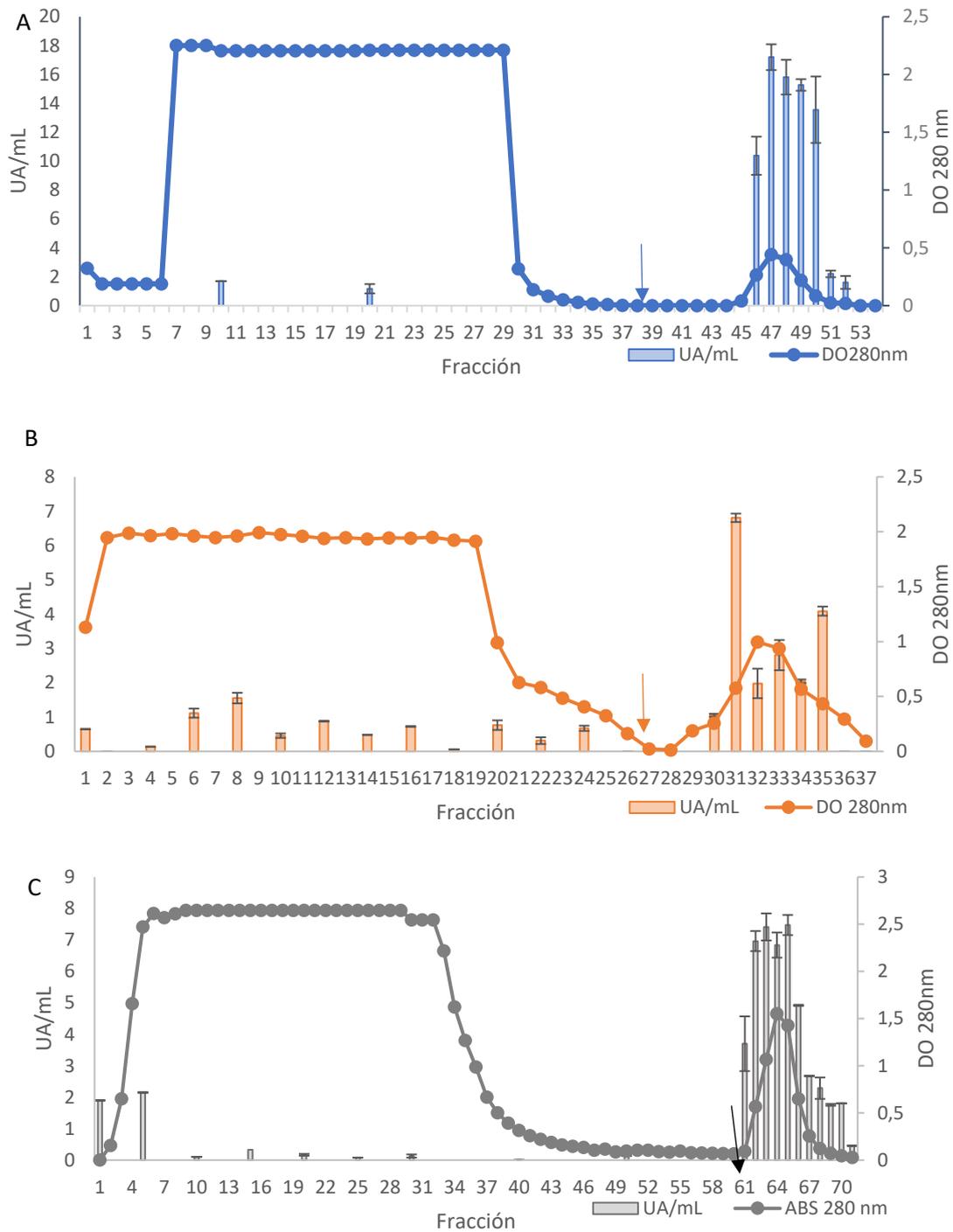
De acuerdo a los resultados observados en IV.1.8, en donde se evidenció la capacidad del pustulano para interactuar con las tres toxinas, se realizó la purificación de SeKT, TdKT y WaKT por cromatografía de afinidad.

Los tres extractos crudos con actividad *killer* se sembraron en cromatografía de pustulano-sefarosa y se eluyeron fracciones en las que se determinó el contenido de proteínas y la actividad *killer*, según se describe en el apartado III.9 de materiales y métodos.

En la figura IV.4 se observa que las tres toxinas fueron retenidas eficientemente por la columna con pustulano como ligando, evidenciando una pequeña proporción que no logró unirse y fue eluída con el buffer de corrida, y una fracción mayoritaria de elusión que conservó la actividad *killer*.

Aplicando estrategias secuenciales de concentración y purificación, se lograron obtener extractos de 21,3 UA/mg de proteína de SeKT, 8,6 UA/mg de proteína de TdKT y 7,2 UA/mg de proteína de WaKT. En el caso de TdKT y WaKT, el paso de filtración tangencial mostró ser crítico con respecto a la pérdida de actividad (pérdida del 56% y 42% del total de las UA *killer* respectivamente).

En la cromatografía de afinidad, si bien se perdieron UA totales de las tres toxinas, se aumentó el valor de actividad específica y en el último paso de ultrafiltración con membranas de punto de corte en 50 kDa fue cuando se logró en todos los casos un aumento de la actividad específica, especialmente para el caso de SeKT (Tabla IV.7).



**Figura IV.4:** Perfil de elución de SeKT (A), TdKT (B) y WaKT (C) en cromatografía de afinidad en columna de sefarosa-pustulano y su actividad *killer* frente a *C. glabrata*. La actividad retenida se eluyó sustituyendo el buffer de cromatografía por buffer citrato/fosfato 0,1 M pH 4,5 NaCl 1,5 M (↓).

**Tabla IV.7:** Tablas de purificación de las toxinas SeKT, TdKT y WaKT.

SeKT	Paso	Volumen total (mL)	Proteínas totales (mg)	Actividad total (UA)	Actividad específica	Rendimiento (%)	Factor*
	Extracto crudo	922	5825	4434	0,8	100	1
	Filtración tangencial (>30 kDa)	147	841	3265	3,9	73,6	5,1
	Cromatografía de afinidad pustulano	59	200	962	4,8	21,7	6,3
	Ultrafiltración (>50 kDa)	5	15	317	21,3	7,1	27,8

TdKT	Paso	Volumen total (mL)	Proteínas totales (mg)	Actividad total (UA)	Actividad específica	Rendimiento (%)	Factor*
	Extracto crudo	900	2168	4320	2,0	100	1
	Filtración tangencial (>30 kDa)	234	505	1896	3,8	43,9	1,9
	Cromatografía de afinidad pustulano	89	124	625	5,0	14,5	2,5
	Ultrafiltración (>50 kDa)	11	32	276	8,6	6,4	4,3

WaKT	Paso	Volumen total (mL)	Proteínas totales (mg)	Actividad total (UA)	Actividad específica	Rendimiento (%)	Factor*
	Extracto crudo	953	1798	2655	1,5	100	1
	Filtración tangencial (>30 kDa)	121	638	1542	2,4	58,1	1,6
	Cromatografía de afinidad pustulano	63	201	453	2,3	17,1	1,5
	Ultrafiltración (>50 kDa)	4	17	123	7,2	4,6	4,9

Los pasos indicados en la primer columna son secuenciales uno sobre el otro tal como están ordenados. (\*) El factor es una medida del grado de aumento de la actividad específica en cada paso de la purificación y se obtiene realizando el cociente entre la actividad específica de cada paso y la del extracto crudo. Se muestran las medias de las determinaciones de actividad total y proteínas totales (n=4).

## IV.2. DESARROLLO DE MEDIO DE CULTIVO Y PURIFICACIÓN DE LAS TOXINAS *KILLER*

### IV.2.1. Optimización de la producción

Con el objetivo de caracterizar las propiedades moleculares y los mecanismos de acción de las toxinas *killer* fue necesario producir una gran cantidad de cada una de ellas. Para ello se optimizaron y estandarizaron las condiciones de producción.

Ensayos de producción de otras toxinas *killer* ponen en evidencia diversos factores que influyen en la obtención de las mismas, especialmente relacionados con la composición del medio de cultivo, el pH, agregado de glicerol y aminoácidos (De Ingeniis *et al.* 2009; Guyard *et al.* 2002; Izgü y Altımbay, 2004). Para este ensayo se seleccionaron los factores temperatura de cultivo, velocidad de agitación, adición de glicerol y adición de tritón al medio de cultivo, como variables independientes que podrían afectar significativamente la producción de SeKT, TdKT y WaKT.

Para analizar la influencia de estos factores se realizó un diseño estadístico experimental, que permitió estimar además la interacción entre estos factores, estableciendo los valores de aquellos que permitieron la mayor producción de las toxinas (variable respuesta).

Para poder determinar la condición óptima en que se consigue la mayor producción de toxinas, se determinó como variables dependientes la actividad *killer* (UA), el contenido total de proteínas (variable que permite calcular la actividad específica y asociarla con el grado de pureza de las toxinas *killer*) y la actividad  $\beta$ -glucanasa. Esta última variable, se utilizó como una medida indirecta de la actividad *killer*, ya que es una actividad enzimática asociada a uno de los mecanismos de acción de las toxinas *killer*. La determinación de la actividad *killer* se realizó por el método WTM que se describe en el apartado III.5.3, el contenido de proteínas por el método de Lowry (III.5.4) y la actividad  $\beta$ -glucanasa según el método que se describe en el apartado III.5.5 de materiales y métodos. El método de detección y cuantificación de las unidades de actividad  $\beta$ -glucanasa (UG) es más rápido que la detección de UA *killer* y no implica un ensayo biológico con influencia de varios factores y un tiempo de resolución de 24 a 48 h como el caso del método del multiwell (MWM). En las tablas IV.8, IV.9 y IV.10 se muestran los resultados de las determinaciones de UA *killer*, UG y el contenido de proteínas para SeKT, TdKT y WaKT respectivamente. Se observa variabilidad en las determinaciones correspondientes a los puntos centrales que corresponden a réplicas de las condiciones medias. Esto puede deberse a diferencias tanto en el estado del inóculo inicial de levaduras, la progresión del crecimiento y a la posible inactivación y degradación (proteólisis) de las toxinas *killer* y enzimas glucanasas que puede darse en la obtención del extracto crudo.

Se realizó un diseño central compuesto centrado en las caras, con tres niveles de los 4 factores según se describe en las secciones III.8.1 y III.8.2. Las variables de respuesta analizadas en cada una de las 18 experiencias realizadas para SeKT indicaron que las dos condiciones que presentaron mayor actividad *killer* fueron la 11 y 18 (Tabla IV.8). La condición 11 presentó el mayor número de UA *killer* (46,7), un valor bajo de UG (2,992) y un valor bajo de proteínas (4,69 mg). La condición 18 presentó también un valor alto de UA *killer* (31,95), un valor bajo de UG (5,45) y un valor de proteínas de 7,38mg.

**Tabla IV.8:** Determinaciones experimentales de actividad *killer*, actividad  $\beta$ -glucanasa y proteínas totales para SeKT.

ENSAYO	Actividad <i>killer</i> (UA)	Actividad $\beta$ -glucanasa (UG)	Proteínas totales (mg)
1	10,12	355,22	7,02
2	6,99	23,91	7,98
3	30,73	52,05	10,19
4	18,49	4,2	8,81
5	36,25	7	21,8
6	3,14	9,88	5,4
7	9,89	36,98	6,17
8	5,59	10,6	21,2
9	15,44	18,04	5,83
10	4,39	28,91	8,99
11	46,7	2,992	4,69
12	7,71	0	10,12
13	9,24	17,49	9,49
14	19,55	45,36	19,42
15	3,6	7,9	4,64
16	9,36	0,3	4,26
17(C)	23,17	44,46	11,31
18(C)	31,95	5,45	7,38

Las variables de respuesta analizadas en cada una de las 18 experiencias realizadas para TdKT mostradas en la Tabla IV.9, revelaron varias condiciones con valores altos de UA *killer*. Estas condiciones fueron la 11 (179,27 UA), 18 (160 UA), 4 (151,6 UA), 1 (120,9 UA), 13 (118,119 UA) y 9 (115,6 UA). De todas estas condiciones, la condición 13 presentó un valor intermedio de

UG (49,39) y un valor mínimo de proteínas totales (3,33 mg). También se resaltó la condición 11, por presentar además del mayor valor de UA *Killer* (179,27), un valor elevado de UG (113,87) y un valor intermedio de proteínas totales (9,38 mg). La condición 5 que presentó mayor valor de UG (129,8), no presentó valores elevados de UA *killer* (10,7).

**Tabla IV.9:** Determinaciones experimentales de actividad *killer*, actividad  $\beta$ -glucanasa y proteínas totales para TdKT.

ENSAYO	Actividad <i>killer</i> (UA)	Actividad $\beta$ -glucanasa (UG)	Proteínas totales (mg)
1	120,9	0	30,8
2	3,759	2,06	12,63
3	6,51	33,08	8,79
4	151,6	8,08	11,41
5	10,7	129,8	8,389
6	0,99	16,39	4
7	7,18	27,23	6,3
8	9,408	14,128	5,592
9	115,6	27,74	3,92
10	7,112	19,24	10,43
11	179,27	113,87	9,38
12	25,3	23,36	8,96
13	118,119	49,39	3,33
14	39,52	9,7	12,31
15	33,88	12,18	32,45
16	6,36	0	6,21
17(C)	98,78	31,6	6,27
18(C)	160	33,38	9,71

Los resultados obtenidos para cada una de las 18 experiencias realizadas para la producción de WaKT en la Tabla IV.10, mostraron que las condiciones 17 y 18 presentaron mayor relación de UA/mg proteínas que el resto de las condiciones, presentando valores de 173,9 UA *killer*, 33,8 UG y 9,89 mg de proteínas y 70,34 UA *killer*, 81,18 UG y 4,84 mg de proteínas respectivamente. La condición 1 presentó el mayor valor de UG (445,26) pero un bajo número de UA *killer* (11,77).

**Tabla IV.10:** Determinaciones experimentales de actividad *killer*, actividad  $\beta$ -glucanasa y proteínas totales para WaKT.

ENSAYO	Actividad <i>killer</i> (UA)	Actividad $\beta$ -glucanasa (UG)	Proteínas totales (mg)
1	11,77	445,26	9,939
2	18,19	0	11,74
3	1,268	16,56	8
4	90,8	61	6,83
5	8,31	36,2	8,808
6	3,37	49,43	3,408
7	15,26	83,3	7,9
8	15,65	86,46	6,45
9	25,25	153,3	14,53
10	0	118,048	11,18
11	4,7144	75,18	8,14
12	11,024	0	7,73
13	29,078	0	9,066
14	5,97	80,72	7,85
15	1,245	71,5	3,765
16	0,0068	252,44	8,54
17(C)	173,9	33,8	9,89
18(C)	70,34	81,18	4,84

En la tabla IV.11 se muestran los resultados del modelado de las curvas de crecimiento según Gompertz para cada una de las experiencias para cada cepa, que se realizó según la metodología descrita en el apartado III.8.3 de materiales y métodos.

En el caso de *S. eubayanus*, la condición 11, que presentó los mejores valores de actividad específica *killer*, es la que presentó la mayor duración de la fase de latencia (140,74 h) y una velocidad de crecimiento baja ( $0,006 \text{ h}^{-1}$ ). Por otra parte, la condición que presentó mayor velocidad de crecimiento ( $0,344 \text{ h}^{-1}$ ) fue la 7, que no presentó un valor importante de UA *killer* (9,87).

Con respecto a los parámetros de crecimiento de *T. delbrueckii*, de las condiciones destacadas con mayor productividad de UA *killer* (1, 4, 9, 11, 13 y 18), las condiciones con mayor velocidad de crecimiento fueron la 1 (0,407 h<sup>-1</sup>), la 9 (0,294 h<sup>-1</sup>) y la 13 (0,143 h<sup>-1</sup>).

En el caso de *W. anomalus*, la condición 17 presentó una velocidad de crecimiento menor que la condición 18 (0,034 y 0,27 h<sup>-1</sup> respectivamente). La condición 13 superó a ambas (1,338 h<sup>-1</sup>) pero mostró valores medios de UA *killer* (29,078).

**Tabla IV.11:** Parámetros de crecimiento según el modelado de Gompertz para cada cepa, en las 18 condiciones ensayadas.

N°	<i>S. eubayanus</i>			<i>T. delbrueckii</i>			<i>W. anomalus</i>		
	A	μ	L	A	μ	l	A	μ	l
1	3,33	0,068	46,23	2,99	0,407	44,24	1,48	0,061	49,81
2	7,49	0,018	-83,66	2,05	0,070	158,80	4,25	0,121	189,70
3	0,84	0,193	109,85	3,27	0,065	56,03	1,06	0,018	47,44
4	5,20	0,038	123,28	5,73	0,073	171,35	5,56	0,144	78,29
5	4,12	0,040	11,50	4,38	0,096	38,20	2,91	0,067	44,07
6	0,69	0,004	45,24	0,69	0,004	45,23	0,84	0,012	60,64
7	7,08	0,344	46,29	2,08	0,037	65,39	0,85	0,012	61,62
8	3,77	0,053	37,44	5,94	0,114	21,68	6,37	0,091	23,95
9	1,31	0,029	124,70	1,50	0,294	55,49	1,30	0,006	3,76
10	2,15	0,018	32,74	1,48	0,021	42,12	1,08	0,005	47,93
11	1,29	0,006	140,74	2,58	0,032	43,08	0,70	0,007	141,55
12	3,22	0,147	41,71	4,47	0,328	3,66	2,59	0,238	50,72
13	1,84	0,125	74,20	1,85	0,143	55,41	1,99	1,338	53,80
14	2,49	0,060	39,39	2,87	0,109	74,13	1,44	0,021	24,59
15	1,46	0,101	52,69	4,51	0,215	40,45	5,76	0,103	1,89
16	3,74	0,086	23,45	1,88	0,039	45,39	3,56	0,066	23,99
17 (C)	1,46	0,101	52,69	1,79	0,038	27,94	1,79	0,034	28,23
18 (C)	3,30	0,105	-1,44	4,10	0,100	26,33	6,47	0,270	31,13

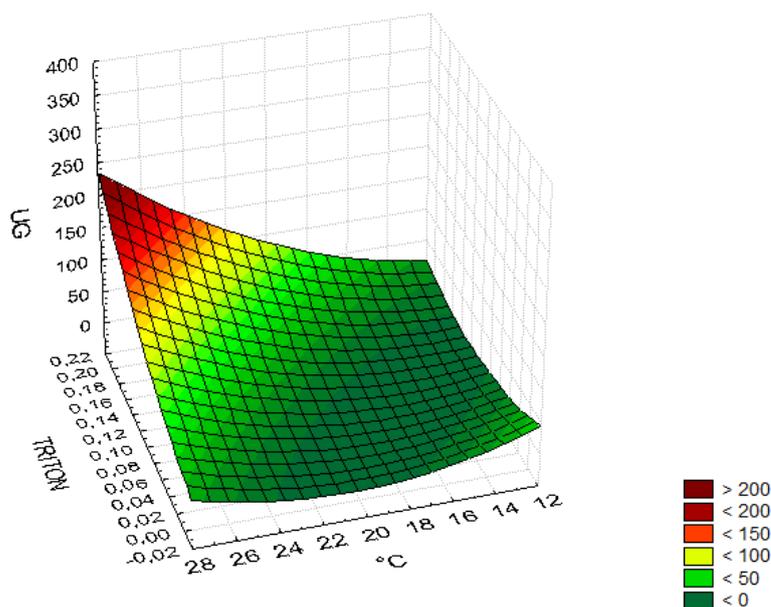
Velocidad específica de crecimiento (μ), Máximo valor alcanzado de la curva de crecimiento (A) y fase de latencia (l) de las curvas de crecimiento modeladas por Gompertz obtenidas en las diferentes condiciones de cultivo

Como resultado de la aplicación del diseño central compuesto, se presentan en Tabla IV.12, IV.13 y IV.14 los factores con un efecto significativo en las variables de respuesta analizadas,

para la toxina SeKT, TdKT y WaKT respectivamente. Teniendo en cuenta los factores analizados (temperatura, velocidad de agitación, contenido de glicerol y tritón) se reemplazaron los coeficientes de regresión obtenidos para cada factor en las ecuaciones que describen la actividad *killer*, la actividad  $\beta$ -glucanasa y las proteínas totales.

A partir de esta ecuación, se generaron las diferentes superficies de respuesta que ilustran el modelo obtenido por la estrategia de diseño experimental, según se describe en el apartado III.8.4 de materiales y métodos.

En cuanto a la producción de SeKT, ninguno de los factores analizados dentro del dominio definido influyó significativamente ( $p$  valor  $<0,05$ ) en la actividad *killer* ni en la producción de proteínas totales, pero sí lo hizo la temperatura en forma lineal y su interacción con tritón en la producción de  $\beta$ -glucanasas. Estos factores influyeron de manera positiva en el aumento de la actividad  $\beta$ -glucanasa, observándose un máximo de actividad UG en las condiciones del dominio en que el contenido de tritón es máximo y la temperatura también lo es, según lo ilustra la superficie de respuesta de la Figura IV.5.



**Figura IV.5:** Influencia de la temperatura y el contenido de tritón en la actividad  $\beta$ -glucanasa de producciones de SeKT. La Actividad  $\beta$ -glucanasa se expresa en UG, la temperatura en  $^{\circ}\text{C}$  y la cantidad de tritón en %v/v.

En el caso de la producción de TdKT se observó para el parámetro actividad *Killer* una influencia significativa de la interacción de los factores contenido de tritón y temperatura.

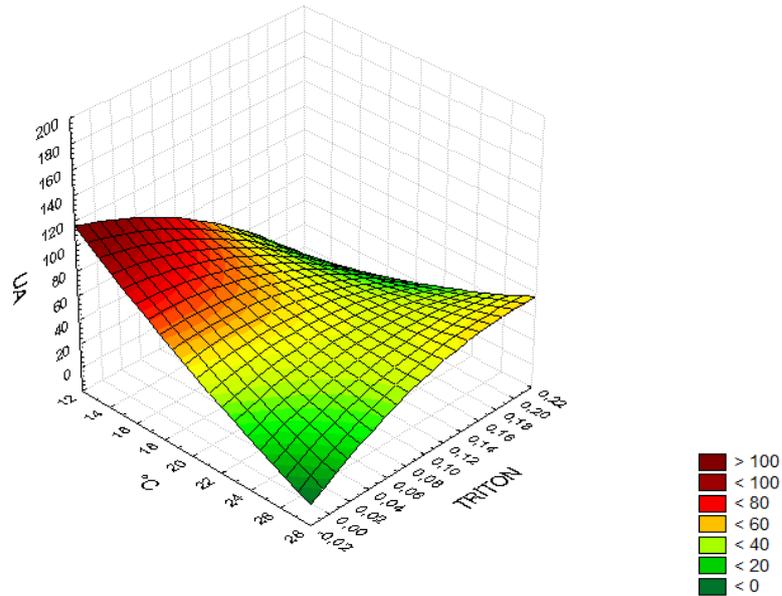
**Tabla IV.12:** Efectos estimados a partir del diseño central compuesto para las variables de respuesta en el caso de SeKT.

Parámetro	Factor	Coeficiente	p valor	R <sup>2</sup>
Actividad <i>killer</i>	Ninguno de los factores influyó significativamente			
β-glucanasas	Temperatura (L)	43,62	0,031	0,9655
	Tritón y temperatura	43,03	0,042	
Proteínas	Ninguno de los factores influyó significativamente			

Al analizar la superficie de respuesta de la Figura IV.6 el máximo de actividad se observó en el punto mínimo de cada factor. Para la actividad enzimática β-glucanasa, el contenido de glicerol mostró una influencia lineal decreciente y una influencia en forma cuadrática, al igual que la velocidad de agitación. La superficie de respuesta de la Figura IV.7 muestra que el máximo se dio en condiciones de agitación intermedia y un contenido bajo de glicerol. En cuanto que la interacción entre temperatura de crecimiento y contenido de tritón mostró un máximo para temperaturas bajas y alto contenido de tritón. En cuanto a la producción de proteínas totales, se observó influencia de manera lineal decreciente con el aumento de la velocidad de agitación, por lo que se definió un máximo en las velocidades más bajas del dominio.

**Tabla IV.13:** Efectos estimados a partir del diseño central compuesto para las variables de respuesta en el caso de TdKT.

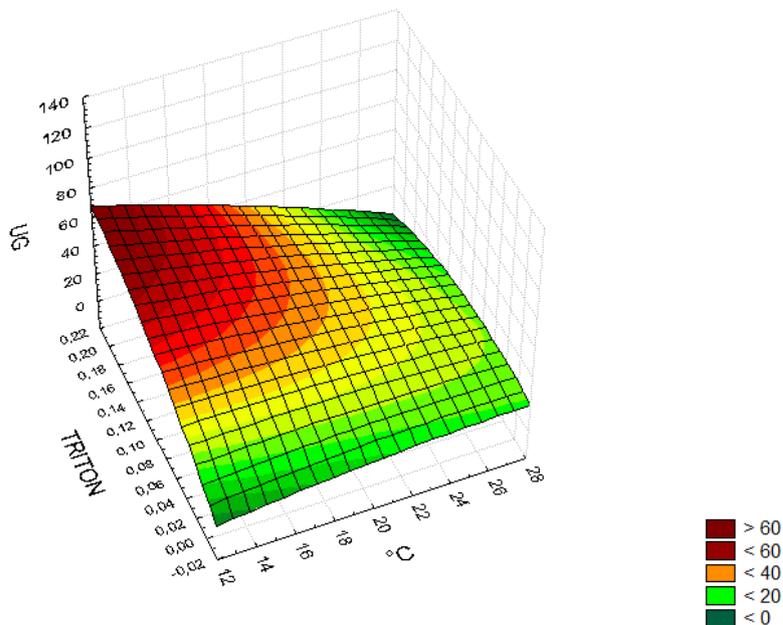
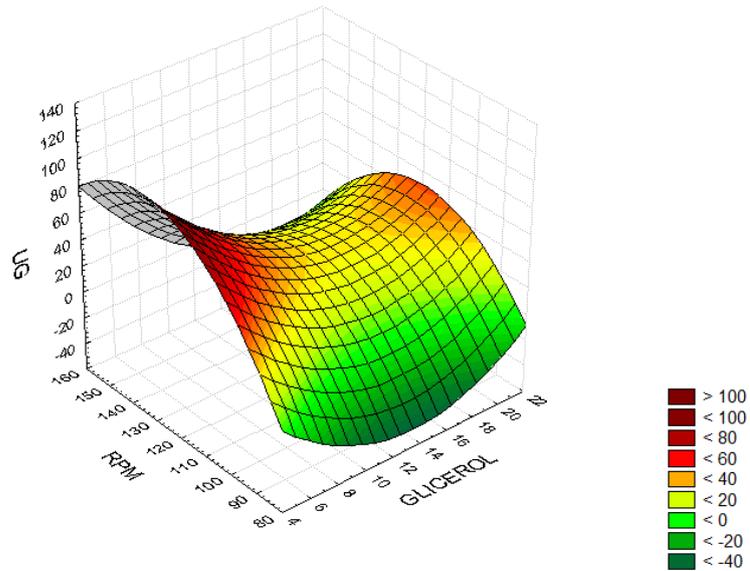
Parámetro	Factor	Coeficiente	p valor	R <sup>2</sup>
Actividad <i>killer</i>	Tritón y temperatura	-108,96	0,058	0,87831
β-glucanasa	Glicerol (L)	-45,25	0,02	0,97329
	Glicerol (Q)	34,55	0,03	
	Agitación (Q)	-27,96	0,05	
	Tritón y temperatura	-15,02	0,05	
Proteínas	Agitación (L)	-13,12	0,032	0,93571



**Figura IV.6:** Influencia de la temperatura y el contenido de tritón en la actividad *killer* de TdKT. La actividad *killer* se expresa en UA, la cantidad de tritón en %v/v y la temperatura en °C.

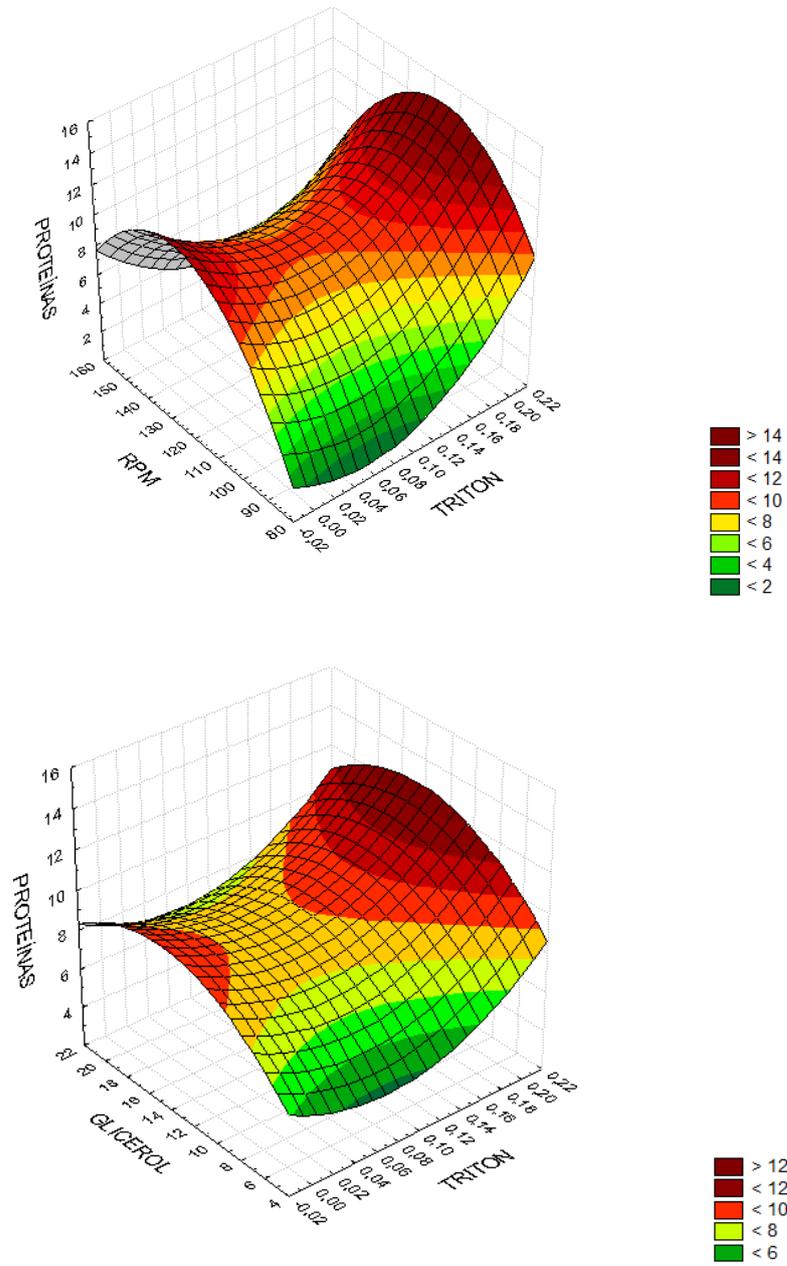
Con respecto a la producción de WaKT, para el parámetro actividad *killer* ninguno de los factores resultó ser significativo ( $p$  valor < 0,05). En cuanto a la producción de proteínas totales, las superficies de respuesta mostraron mínimos relativos en algunas regiones específicas del dominio. En este caso, en cuanto a la producción de proteínas totales se busca que los valores sean mínimos si es que en ese mismo rango los valores de actividad *killer* son buenos, de manera de maximizar la actividad específica (Figura IV.8). En cuanto a la agitación, la superficie de respuesta muestra mínimos relativos hacia los valores de agitación máxima y mínima del dominio, en especial, cuando el contenido de tritón en el medio es de hasta 0,08 %v/v. Con respecto al contenido de glicerol, si el contenido de tritón es inferior a 0,12 %v/v, valores de 5 % v/v o 20 %v/v (los valores mínimo y máximo del dominio) muestran mínimos relativos de producción de proteínas totales.

El análisis de actividad  $\beta$ -glucanasa, indicó que los cuatro factores influyeron en su producción, especialmente de manera interactiva entre ellos. Al observar las superficies de respuesta (Figura IV.9) el factor temperatura combinado con velocidad de agitación, contenido de glicerol y de tritón, muestra máximos relativos a los 28°C (el valor máximo del dominio analizado). Esta condición combinada con el agregado de 20 %v/v de glicerol, 0,2 %v/v de tritón y agitándose a 90 rpm presenta máximos relativos en las superficies de respuesta correspondientes.

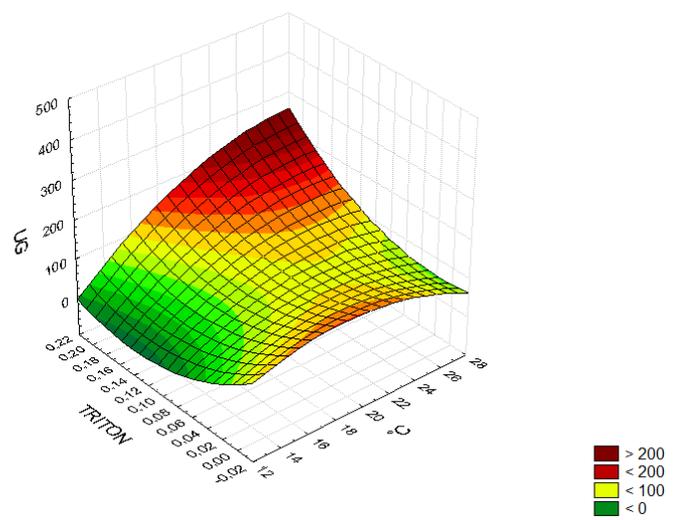
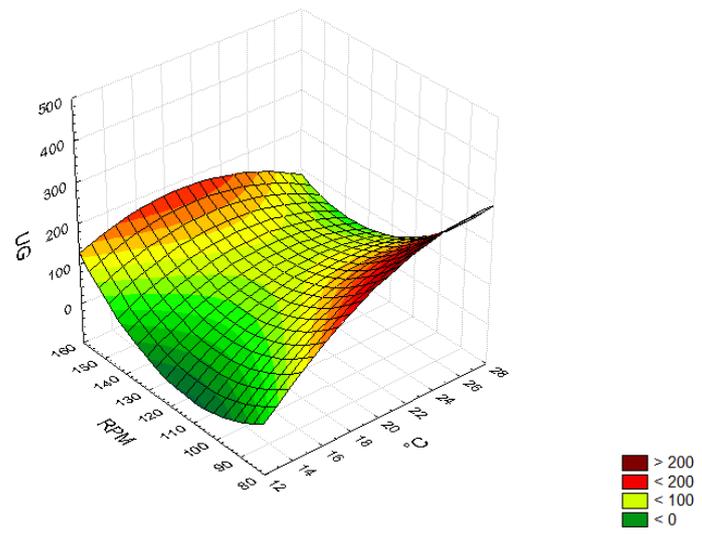
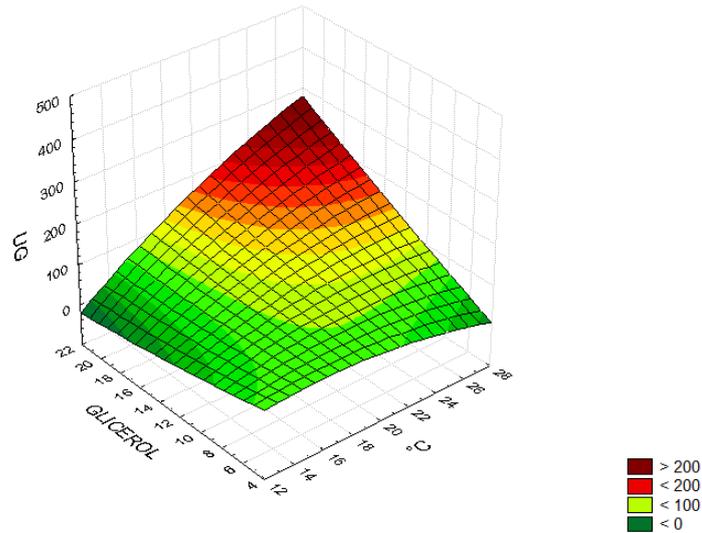


**Figura IV.7:** Influencia de la temperatura, la agitación, el contenido de tritón y glicerol en la actividad  $\beta$ -glucanasa de TdKT. La actividad  $\beta$ -glucanasa se expresa en UG, la temperatura en  $^{\circ}\text{C}$ , la velocidad de agitación en rpm, la cantidad de tritón y glicerol en %v/v

En el caso de las superficies de respuesta construidas para analizar el contenido de proteínas totales y actividad  $\beta$ -glucanasa de extractos de WaKT, no es posible asegurar que los máximos o mínimos absolutos se encuentran en un único punto del dominio, por la complejidad de la gráfica.



**Figura IV.8:** Influencia de la velocidad de agitación, el contenido de glicerol y tritón en el contenido de proteínas de WaKT. La cantidad de proteínas se expresa en mg, la velocidad de agitación en rpm y la cantidad de glicerol y tritón en %v/v.



**Figura IV.9:** Influencia de la velocidad de agitación, la temperatura, el contenido de glicerol y tritón en la actividad  $\beta$ -glucanasa de WaKT. La actividad  $\beta$ -glucanasa se expresa en UG, la velocidad en rpm, la temperatura en  $^{\circ}\text{C}$  y la cantidad de tritón y glicerol en %v/v.

**Tabla IV.14:** Efectos estimados a partir del diseño central compuesto para las variables de respuesta en el caso de WaKT.

Parámetro	Factor	Coficiente	p valor	R <sup>2</sup>
Actividad <i>killer</i>	Ninguno de los factores influye significativamente			
β-glucanasa	Temperatura (L)	49,16	0,024	0,97852
	Agitación (L)	90,47	0,04	
	Tritón y glicerol	138,48	0,017	
	Tritón y temperatura	55,04	0,024	
	Glicerol y temperatura	65,52	0,015	
	Temperatura y agitación	-50,69	0,029	
Proteínas	Tritón (L)	-1,67	0,03	0,99051
	Tritón (Q)	3,3	0,003	
	Agitación (L)	2,38	0,011	
	Agitación (Q)	-3,39	0,003	
	Tritón y glicerol	2,38	0,015	
	Glicerol y temperatura	-3,41	0,005	

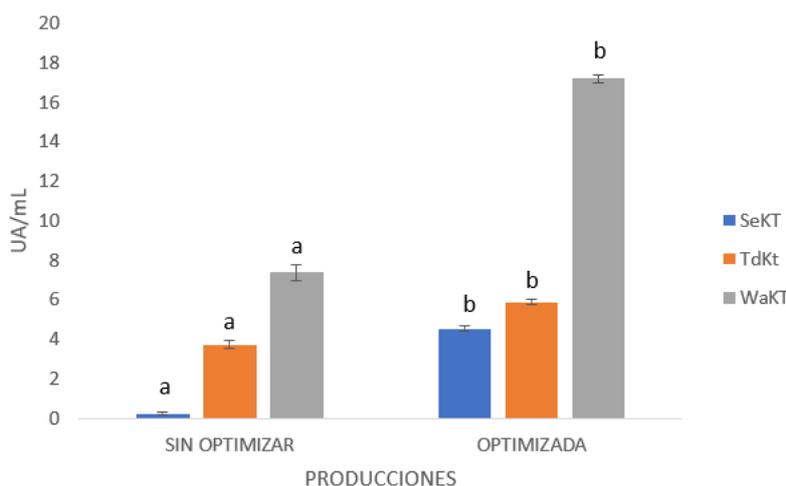
Luego del análisis de los resultados de los valores de UA, UG y mg de proteínas para cada condición, las superficies de respuesta y los parámetros de crecimiento de las tres cepas, se definieron las condiciones óptimas de cultivo para la producción de cada una de las toxinas (Tabla IV.15). En el caso de SeKT, el diseño estadístico indicó que de las variables analizadas en el dominio comprendido, ninguna influyó significativamente en la actividad *killer*, por esto, se seleccionó la condición 11 que fue la que presentó mayor actividad específica. En el caso de TdKT, se observó en la superficie de respuesta que a menor temperatura y menor contenido de tritón, se maximizó la actividad *killer* y se tuvo en cuenta que la condición 13 presentó mayor actividad específica, que incluye un valor mínimo de temperatura y un valor medio de tritón, por lo que fue seleccionada. Con respecto a WaKT, ninguna de las variables influyó significativamente en la actividad *killer*, por lo que se seleccionó la condición media que presentó el mayor valor de actividad específica y se condice con las superficies de respuesta para la producción de proteínas totales, que muestra sus mínimos en el centro del dominio.

**Tabla IV.15:** Condiciones óptimas de cultivo para la obtención de SeKT, TdKT y WaKT obtenidas a partir del diseño estadístico de experimentos.

TOXINA	GLICEROL (%v/v)	TRITÓN (%v/v)	AGITACIÓN (rpm)	TEMPERATURA (°C)
SeKT	5	0,1	120	13
TdKT	12,5	0,1	120	13
WaKT	12,5	0,1	120	20

El medio base para la elaboración de todas las condiciones es GPY líquido.

Las condiciones correspondientes a cada levadura fueron ensayadas en volúmenes de 1 L y se determinaron las variables de respuesta. Se compararon con ensayos similares en medio sin optimizar y condiciones de cultivo estándar (120 rpm y 20 °C) (Figura IV.10). En todos los casos se observaron diferencias significativas entre las producciones sin optimizar y optimizadas, viéndose aumentada la cantidad de UA/ml en esta últimas.



**Figura IV.10:** Actividad *killer* para condiciones de producción sin optimizar y optimizadas de SeKT, TdKT y WaKT. Valores medios sin letra común entre la misma toxina difieren a  $p < 0,05$  (ANOVA de un factor y Test de Tukey  $n=4$ ).

### IV.3 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LAS TOXINAS PURIFICADAS

#### IV.3.1 Inhibición de las cepas contaminantes

Con motivo de confirmar si las fracciones purificadas por cromatografía de afinidad, presentaban capacidad de inhibir el crecimiento de las cepas contaminantes como lo hacían los extractos crudos, se evaluó 1UA de cada toxina purificada calculada frente a *C. glabrata*. Los resultados indican que todos los extractos purificados presentaron actividad antagónica frente a las cepas contaminantes (Tabla IV.16).

**Tabla IV.16:** Inhibición del crecimiento de levaduras contaminantes de vinos por parte de las toxinas purificadas.

	INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO			
	<i>M. guilliermondii</i>	<i>P. membranifaciens</i>	<i>P. manshurica</i>	<i>D. bruxellensis</i>
	<i>NPCC1055</i>	<i>NPCC1099</i>	<i>NPCC 1038</i>	<i>NPCC 130</i>
<b>SeKT</b>	56,7 %	97,3 %	67,4 %	38,2 %
<b>TdKT</b>	27,1 %	99,8 %	75,3 %	30,8 %
<b>WaKT</b>	16,4 %	100,0 %	70,1 %	45,0 %

El porcentaje de inhibición de crecimiento se determinó por el método multiwell MWM, empleando 1 UA de toxina *killer* en todos los casos (n=4).

#### IV.3.2 Confirmación de la interacción con la pared de las cepas sensibles:

Extractos purificados por cromatografía de afinidad de las toxinas SeKT, TdKT y WaKT fueron incubados con los diferentes componentes purificados de la pared celular en conjunto con las cepas sensibles según se describe en el apartado III.7.3. Se observó que WaKT sólo presenta disminución (64 %) de actividad por interferencia del pustulano, que también lo hizo con TdKT (100 %) al igual que la quitina, aunque esta última en menor medida (20 %). Por otra parte, SeKT mostró interacción con laminarina, quitina, curdulano y pustulano (tabla IV.17).

En comparación con los resultados obtenidos en las determinaciones de interacción con los componentes de la pared de cepas sensibles realizadas por el método well test WTM y utilizando extractos crudos de las toxinas (Tabla IV.6), en el caso de WaKT se confirmó que el único punto de interacción con la pared de la cepa sensible sería en pustulano. Con el método de MWM, se observó que no se perdió totalmente la actividad como en el caso del WTM (36 % de actividad remanente), este hecho podría deberse a que el método multiwell al ser más sensible, permitió detectar ese porcentaje bajo de actividad remanente que no se podía cuantificar de manera precisa al medir el halo de inhibición en placa. En el caso de TdKT, la interacción con pustulano disminuyó el 100 % de la actividad en las determinaciones con los dos métodos. Con respecto a la unión a quitina, ambos métodos mostraron un bajo descenso de la actividad por interacción con esta molécula (33 % con el WTM y 20 % con MWM). Con respecto a manano, pululano y laminarina, que habían mostrado una posible interacción con TdKT por el método WTM, el MWM descartó esa posibilidad conservando el 100 % de actividad en todos los casos. Ese bajo porcentaje de inhibición de la actividad observada por el WTM (17 %) podría atribuirse a la acción de algún otro componente presente en el extracto crudo de TdKT que inhibió el crecimiento de la cepa sensible. Por último, el MWM confirmó la interacción de SeKT con

pustulano, quitina y laminarina. Se detectó un posible punto de unión a curdulano y la posible unión a manano que mostraba un 15 % de inhibición de actividad por WTM, fue descartada por el método MWM. Con respecto a concanavalina A, los resultados obtenidos por el método MWM confirmaron que ninguna de las toxinas posee residuos  $\alpha$ -D-manosa y  $\alpha$ -D-glucosa de unión a esta lectina, por lo que no interactúan con las mananoproteínas de la pared de la célula blanco a través de estos residuos.

**Tabla IV.17:** Ensayos de competencia con componentes purificados de la pared de levaduras para corroborar posibles sitios de unión de SeKT, TdKT y WaKT.

Polisacárido	Tipo de molécula	% de actividad remanente		
		SeKT	TdKT	WaKT
PUSTULANO	$\beta$ -1,6-glucano	70	0	36
MANANO	$\alpha$ -1,2; 1,3 y 1,6-glucano	100	100	100
CURDULANO	$\beta$ -1,3-glucano	65	100	100
PULULANO	$\alpha$ -1,4 y 1,6-glucano	100	100	100
CONCANAVALINA A	Lectina	100	100	100
QUITINA	B-1,4-Nac glucosamina	60	80	100
LAMINARINA	$\beta$ -1,3 y 1,6-glucano	90	100	100

La actividad *killer* residual de los extractos se determinó por el método multiwell (MWM) en comparación con la actividad *killer* en ausencia de glucanos (n=4).

### IV.3.3 Determinación del mecanismo de acción en la célula sensible:

Las toxinas *killer* pueden actuar a través de diversos mecanismos en las células sensibles, e inclusive de manera diferente de acuerdo a la cantidad de toxina. En términos generales se puede hablar de tres tipos principales de mecanismos de acción: los que se basan en la actividad enzimática de las toxinas para alterar componentes específicos de la pared celular, los que originan daños a nivel de la membrana plasmática debido a las propiedades ionofóricas de las toxinas, y los que interfieren con el ciclo celular mediante la internalización de las toxinas en la célula sensible y su posterior acceso al núcleo.

Los dos primeros, se relacionan con una muerte del tipo necrótica, mientras que los del tercer tipo se relacionan con inducción de muerte celular programada o apoptosis. La necrosis ocurre mediante una agresión que produce desorganización y lisis del citoplasma, con dilatación del retículo endoplásmico y las mitocondrias, disolución de la cromatina y pérdida de la continuidad de la membrana citoplasmática. El ADN es partido en fragmentos irregulares al azar. Debido a la

pérdida de la integridad de la membrana celular, el contenido del citoplasma es volcado al espacio extracelular. La apoptosis se caracteriza por la condensación o encogimiento de los componentes del citoplasma, con condensación de la cromatina que lleva a la formación de cuerpos apoptóticos, mientras que la membrana celular permanece intacta.

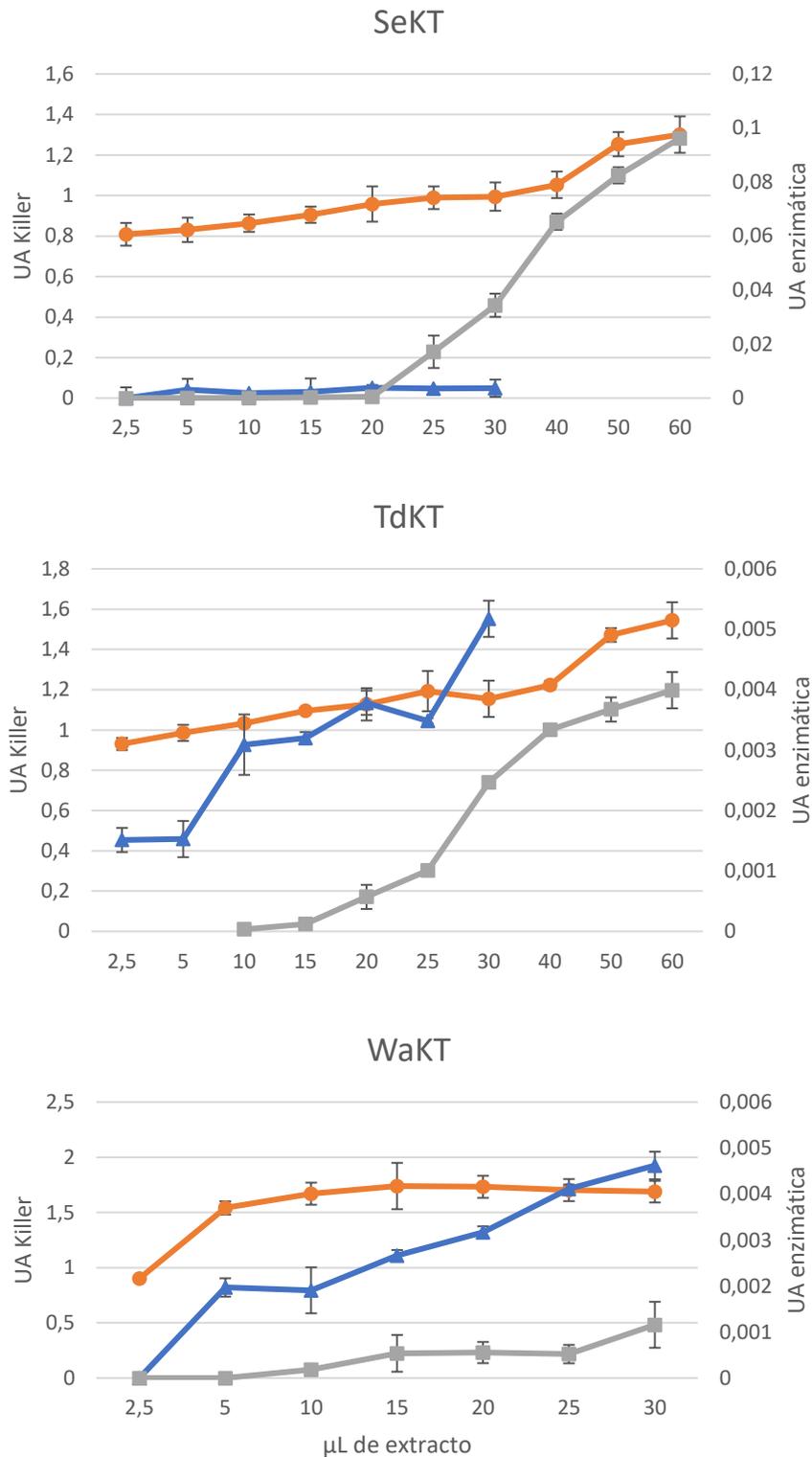
Para determinar el mecanismo de acción mediante el cual las toxinas inhiben el crecimiento de las células sensibles, se incubaron cantidades crecientes de cada una de las toxinas purificadas a intervalos crecientes de tiempo y se analizaron diferentes aspectos de la célula sensible por microscopía de fluorescencia o cuantificación de actividad enzimática.

#### **IV.3.3.1 Actividad enzimática**

Uno de los mecanismos de acción reportados para las toxinas *killer* es la actividad enzimática que hidroliza o altera componentes específicos de la pared celular. El pustulano, curdulano y laminarina, son  $\beta$ -glucanos presentes en la pared de las levaduras, así como también la quitina. Por esta razón, se determinó actividad  $\beta$ -glucanasa y actividad quitinasa y su posible relación con la inhibición del crecimiento de las cepas sensibles. La metodología usada para determinar la actividad *killer* se describe en el apartado **III.5.3**, para la actividad  $\beta$ -glucanasa en el apartado **III.5.5** y para la actividad quitinasa en el apartado **III.5.5**.

En el caso de SeKT y TdKT, la actividad *killer* y la actividad  $\beta$ -glucanasa aumentaron proporcionalmente con la cantidad de toxina, por lo que se pudo establecer una relación directa entre las dos actividades. Los valores de unidades de actividad  $\beta$ -glucanasa para 1UA *killer* fueron diez o más veces mayores para SeKT que en el caso de TdKT y WaKT.

TdKT y WaKT presentaron actividad quitinasa, en cantidades levemente superiores en el caso de TdKT respecto de WaKT. La actividad quitinasa de SeKT fue prácticamente indetectable y no se observó una relación proporcional entre el aumento de UA *killer* y el aumento de las UA quitinasa. Esto podría indicar que no utiliza este mecanismo de acción para inhibir el crecimiento de las células sensibles (Figura IV.11).



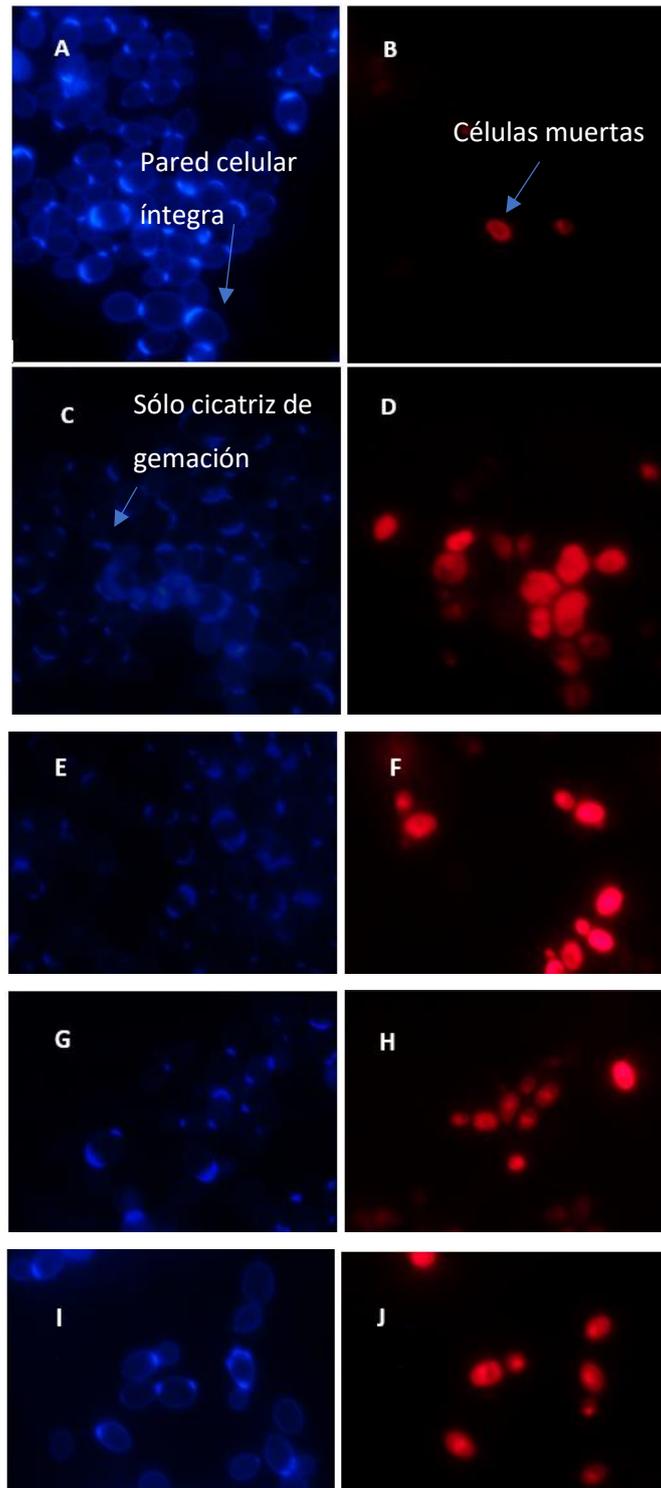
**Figura IV.11:** UA *killer* (naranja), quitinasa (azul) y glucanasa (gris) para diferentes volúmenes de SeKT TdKT y WaKT purificadas por cromatografía de afinidad. 1 UA *killer* inhibe el 50% del crecimiento de la cepa sensible, 1UA Glucanasa libera 1 nmol de pNP por minuto y 1UA Quitinasa libera 1 $\mu\text{mol}$  de n-acetilglucosamina por minuto. Se muestran las medias con desvío estándar (n=4).

#### IV.3.3.2 Determinación del daño en la pared celular

Las funciones de la pared celular de las levaduras son la protección mecánica del protoplasma ante las posibles perturbaciones de origen físico, la estabilidad osmótica intracelular debido a la regulación parcial del transporte de iones y moléculas osmóticamente activas, el control del tamaño y la forma celular, y el anclaje de proteínas con actividad enzimática, de adhesión o receptoras. La alteración de esta estructura, provoca alteración de la homeostasis iónica de las levaduras sensibles, induciendo una respuesta de estrés en general comparable a la del choque hiperosmótico. La determinación de la pérdida de integridad de la pared celular y de la alteración en la permeabilidad de la membrana plasmática pueden indicar la presencia de un mecanismo de tipo ionofórico de las toxinas.

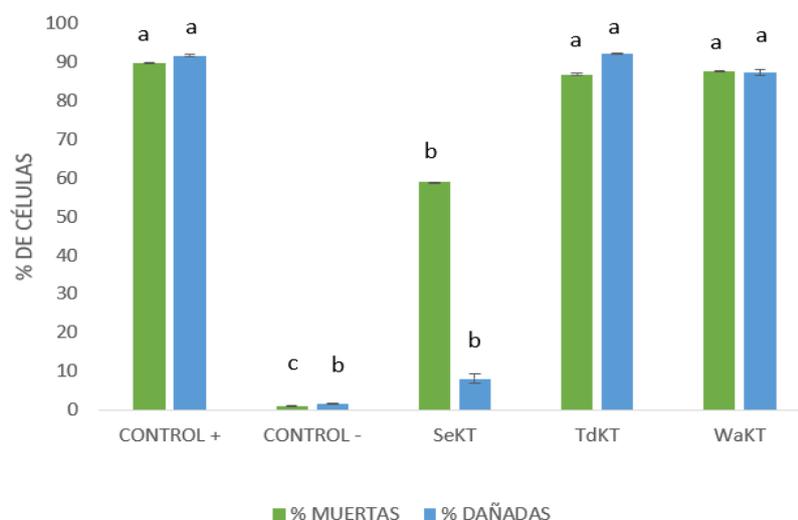
Para determinar si la acción de las toxinas *killer* ocasiona un daño en la pared celular de las cepas sensibles, se analizó la integridad de la misma luego de incubación con SeKT, TdKT y WaKT utilizando la tinción con Calcofluor White como se describe en el apartado III.10.2. Este compuesto se une a los polisacáridos  $\beta$ -1,3 y  $\beta$ -1,4 de la quitina presente en la pared celular. Dependiendo de la integridad de la pared celular, la tinción con Calcofluor White puede ser intensa o tenue, continua o interrumpida. En el caso de células en las que se afecta el mecanismo de síntesis de componentes de pared, o en aquellas en las que por acción enzimática se hidrolizan dichos componentes (actividad quitinolítica) la tinción va a ser tenue, concentrada en las cicatrices de gemación, y se va a observar un perímetro discontinuo. Las células también se tiñeron con yoduro de propidio (IP) para establecer una relación entre células muertas y fenotipos con pared celular dañada bajo la metodología descrita en el apartado III.10.1. El IP es un indicador de la viabilidad celular, ya que no es capaz de atravesar la membrana plasmática si se encuentra íntegra. La capacidad de IP para entrar en una célula depende de la permeabilidad de la membrana; no tiñe las células apoptóticas tempranas debido a que la membrana plasmática está intacta. En células apoptóticas tardías y necróticas, la integridad de la membrana plasmática y nuclear disminuye lo que permite el ingreso del IP a través de las membranas, se intercalan en los ácidos nucleicos, y las células se tiñen de color rojo.

En la Figura IV.12 se muestra la relación entre las células muertas (IP+) y las células que presentan daño en la pared celular (disminución de la tinción de pared Calcofluor White) luego de 24 h de incubación en los diferentes tratamientos. Al analizar el porcentaje de células dañadas, se observó que tanto TdKT como WaKT produjeron un daño a la pared celular de la cepa sensible equivalente al que produce la enzima zymoliasa. Lo mismo sucedió al analizar el porcentaje de células muertas (IP+), esto indicaría que estas toxinas podrían actuar alterando la integridad de la pared celular (Figura IV.13).



**Figura IV.12:** Evaluación del posible daño a la pared celular por tinción doble con Calcofluor White/ioduro de propidio. Se muestra en azul la tinción de la pared celular con Calcofluor White y en rojo la tinción celular con ioduro de propidio. La visualización de un perímetro intenso y continuo indica pared celular íntegra. La ausencia de un perímetro intenso con visualización de coloración en la cicatriz de gemación indica pared celular dañada. (A-B) células sin toxina, (C-D) células incubadas con zymoliasa, (E-F) células incubadas con TdKT, (G-H) WaKT, (I-J) SeKT.

Con respecto a SeKT se observó al analizar el porcentaje de daño de la pared de la célula sensible, no presentó diferencias significativas con el control negativo (células tratadas con agua), pero sí presentó diferencias significativas con el control negativo al analizar el porcentaje de células muertas (60 % y 1 % respectivamente). Esto indicaría que el mecanismo por el cual induce la muerte celular no estaría relacionado con la alteración de la integridad de la pared celular (Figura IV.12 y IV.13).

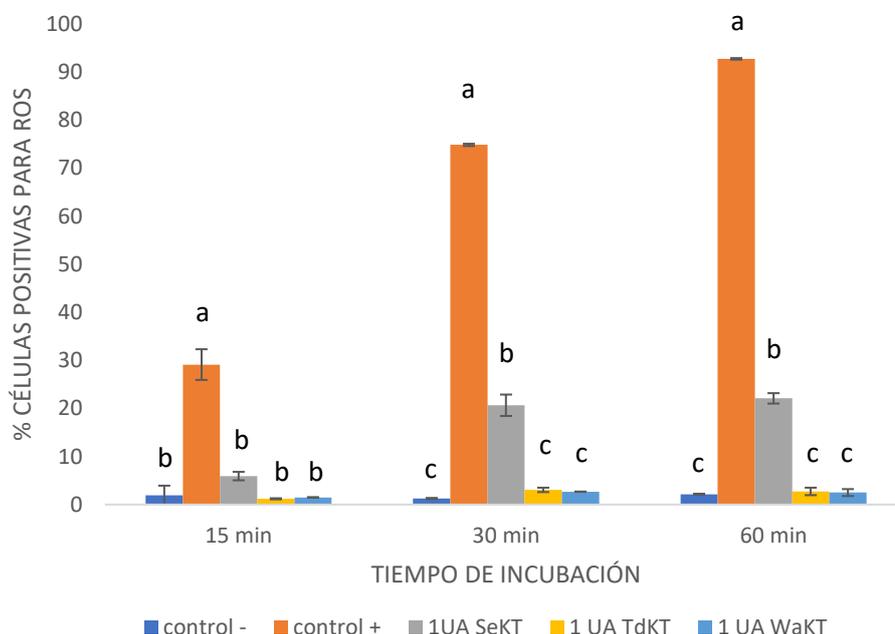


**Figura IV.13:** Proporción de muerte y daño en la pared celular de células de *C. glabrata*, luego de 24 horas de incubación con 4 UA de SeKT, TdKT y WaKT. Los controles negativos se realizaron con agua y los positivos con zymoliasa. Las letras diferentes indican que los resultados de cada ensayo (IP o calcofluor) son significativamente diferentes entre las diferentes levaduras y controles. (ANOVA de un factor y Test de Tukey HSD p valor<0,05 n=400).

#### IV.3.3.3 Determinación de la acumulación de especies reactivas del oxígeno (ROS) por estrés oxidativo.

En los organismos aeróbicos, las especies reactivas del oxígeno surgen como productos de la respiración y del metabolismo oxidativo normal. La célula posee mecanismos antioxidantes de defensa, que le permiten capturar radicales libres. Cuando se produce un desbalance entre la formación de ROS y el sistema antioxidante surge el estrés oxidativo, lo cual conduce al daño celular y la apoptosis (Madeo *et al.* 2002). Se determinó la acumulación de ROS por tinción Dihidroetidio (DHE) en cepas sensibles incubadas con las toxinas durante períodos cortos de tiempo, según se describe en el apartado III.10.3. La sonda (DHE), es un compuesto no fluorescente que puede atravesar la membrana de células. En el interior se oxida por el anión superóxido produciendo etidio, compuesto que se intercala en el ácido desoxirribonucleico (ADN) emitiendo fluorescencia. La aparición y el incremento de fluorescencia en las células se

correlaciona con un aumento de las especies reactivas del oxígeno, y en consecuencia mayor estrés oxidativo.



**Figura IV.14:** Proporción de células de *C. glabrata* según tinción selectiva DHE por microscopía de fluorescencia, luego de incubación con SeKT, TdKT y WaKT durante 15, 30 y 60 minutos. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre las levaduras y controles para un dado tiempo (ANOVA de un factor y Test de Tukey HSD p valor<0,05 n=400). En el control negativo las células se incubaron con agua y en el control positivo se incubaron con peróxido de hidrógeno.

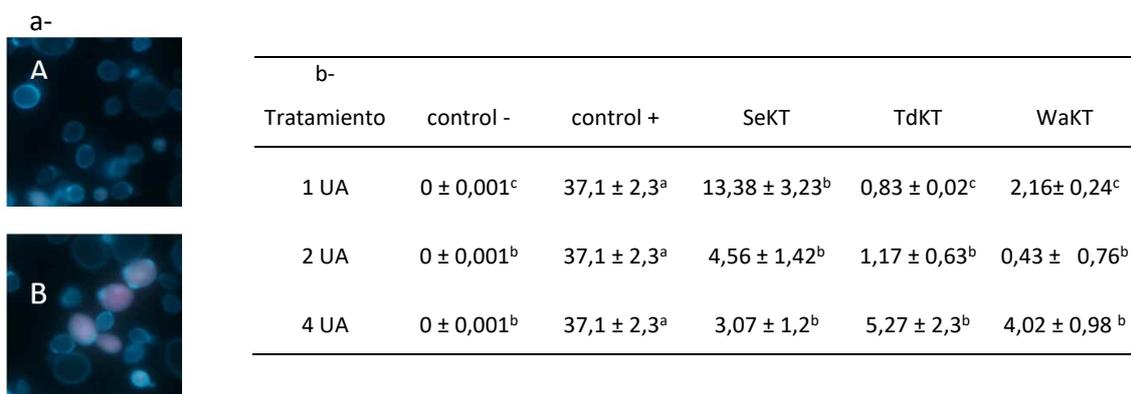
Los resultados indican que, a los 15 minutos de incubación, ninguno de los tratamientos presentó diferencias significativas con el control negativo (células sensibles incubadas con agua). A partir de los 30 minutos de incubación y manteniéndose hasta los 60 minutos, SeKT presentó diferencias significativas con los dos tratamientos control, presentando valores de 20 y 22 % de células con acumulación de especies reactivas del oxígeno. Esto indicaría que una de las estrategias por las cuales podría desencadenar el proceso de apoptosis, es a través de la generación de estrés oxidativo. TdKT y WaKT a 30 y 60 minutos se comportaron de igual manera que el control negativo, indicando que no producen la acumulación de ROS en la cepa sensible.

#### IV.3.3.4 Determinación de la translocación de fosfatidilserina hacia la cara externa de la membrana plasmática.

Las levaduras tienen una distribución asimétrica de los fosfolípidos dentro de la membrana plasmática (Yang *et al.* 2006). Un marcador morfológico de la apoptosis temprana es la exposición de la fosfatidilserina (PS) en la cara externa de la membrana plasmática.

Se determinó la exposición de la PS por unión a la Anexina V en cepas sensibles incubadas durante 1 hora con diferentes cantidades de las toxinas *killer* siguiendo la metodología descrita en el apartado III.10.4. Se realizó tinción simultánea con yoduro de propidio para evidenciar integridad de la membrana plasmática. Las células en proceso de apoptosis presentaron solamente tinción en la periferia con Anexina V (Figura IV.15.A (a)). Las células muertas por ruptura de la membrana plasmática presentaron simultáneamente tinción con Anexina V e internalización de yoduro de propidio (Figura IV.15.A (b)).

En el caso del tratamiento con 1UA de SeKT se observó un 13,4% de células que presentaron fenotipo apoptótico significativamente diferente al control negativo. Sólo en el control positivo y en el tratamiento con 1 UA de SeKT se observan diferencias significativas con el control negativo., Cantidades mayores de esta toxina no mostraron diferencias significativas con el control de células incubadas con agua. Esto indicaría que pequeñas cantidades de SeKT al cabo de 1 hora de incubación, presentarían un mecanismo de inducción de apoptosis de la célula sensible. Tanto TdKT como WaKT no presentaron diferencias con respecto al control negativo (Figura IV.15).



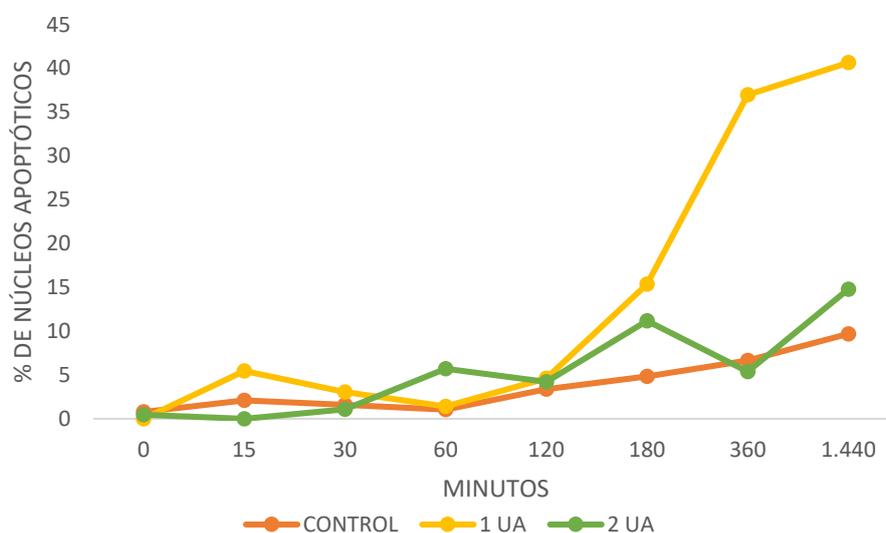
**Figura IV.15:** a- Evaluación de la translocación de la fosfatidilserina por tinción dual con Anexina V libre/ yoduro de propidio. (A) células con translocación de fosfatidilserina. (B) Células con ruptura de membrana plasmática. b- Porcentaje de células de *C. glabrata* con exposición de la Fosfatidilserina como marcador apoptótico. Se calculó por diferencia entre células teñidas con Annexina V y las que presentaban ambas coloraciones sobre el total de células. No se tiene en cuenta el número total de células muertas. Las diferentes letras indican diferencias significativas (ANOVA de un factor y Test de Tukey p valor < 0,05 n=400). Control negativo: células incubadas con agua y Control positivo: células incubadas con peróxido de hidrógeno.

#### IV.3.3.5 Determinación de integridad nuclear.

Los ensayos de determinación de integridad de la pared celular, de acumulación de ROS y de externalización de la fosfatidilserina, indicaron que el mecanismo de acción de TdKT y WaKT no

estaría relacionado con la inducción de apoptosis. Por otra parte, los resultados respecto a SeKT sugirieron que esta toxina en concentraciones bajas (1 UA) podría inducir apoptosis. Para confirmar esta hipótesis se analizó la morfología nuclear relacionada con fenotipos apoptóticos (condensación irreversible de cromatina o picnosis) o necróticos (fragmentación del núcleo y cromatina) (Yang *et al.* 2006) mediante la tinción con Hoechst 33342, un fluorocromo permeable a la membrana plasmática que tiñe selectivamente el ADN. La tinción se realizó siguiendo el protocolo descrito en el apartado III.10.5. En el caso de células normales, se observa una coloración azul en centro de las células, en el caso de células apoptóticas, los núcleos se vuelven más pequeños y brillantes, y en el caso de células necróticas, los núcleos se observan más grandes y dispersos (fragmentación) e inclusive se observa una coloración puntiforme a su alrededor relacionada con la fragmentación de la cromatina.

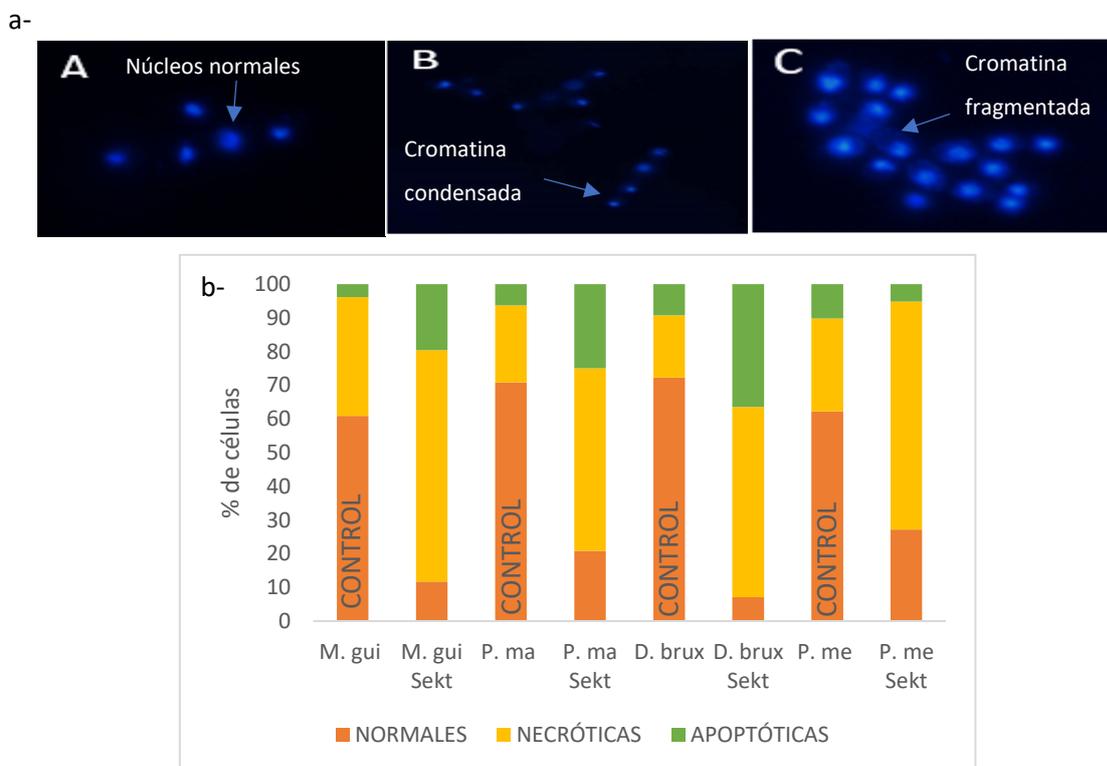
Las células expuestas a 1 UA de SeKT presentaron un incremento en el desarrollo de núcleos apoptóticos en función del tiempo, llegando a un 40 % del total a las 24 h, en comparación con 9,7 % en el control de células incubadas con agua. Las células expuestas a 2 UA de SeKT no presentaron diferencias con el control. Este resultado y el resultado observado en la exposición de la fosfatidilserina, indicaría que pequeñas cantidades de SeKT inducirían apoptosis en las células sensibles.



**Figura IV.16:** Determinación del avance de fenotipo apoptótico en *C. glabrata* incubada con agua (control), 1 y 2UA de SeKT. El porcentaje de núcleos apoptóticos se calcula como el cociente células que presenta condensación de la cromatina evidenciada por tinción con Hoeschst sobre células totales (n=400).

Para estimar si SeKT posee mecanismos de acción relacionados con la inducción de apoptosis frente a las cepas contaminantes de distintas especies, se determinó la proporción de células apoptóticas (núcleos picnóticos evaluados por tinción con Hoeschst) y células necróticas (IP

positivas) luego de una hora de incubación con 1 UA. Los resultados indicaron que el tratamiento con 1 UA de SeKT induce la aparición de núcleos apoptóticos en el transcurso de una hora de incubación (Figura IV.17). En el caso de *B. bruxellensis* se observó el mayor porcentaje de núcleos apoptóticos (36,5 % con respecto a 9,2 % del control) y un 56,5 % de células necróticas, con respecto al 18,5 % del control. Lo que indicaría que 1 UA de SeKT, es capaz de desencadenar mecanismos de muerte por apoptosis y por necrosis en *B. bruxellensis*. De la misma manera lo hace con *P. manshurica* y *M. guilliermondii*, con valores de núcleos apoptóticos de 25 y 20 % respectivamente, y valores de células necróticas de 54 y 69 % respectivamente. En el caso de *P. membranifaciens*, sólo se observó un aumento de valores de células necróticas de 67 % con respecto a 27,6 % en el control, indicando en esta cepa un mecanismo de acción más bien del tipo necrótico.



**Figura IV.17:** a- Evaluación de la morfología nuclear con tinción de Hoechst (A) núcleos normales, (B) núcleos apoptóticos y (C) núcleos necróticos. b- Proporción de células necróticas y apoptóticas luego de la incubación de cepas contaminantes, *M. guilliermondii* (M. gui), *P. manshurica* (P. ma), *D. bruxellensis* (D. brux) y *P. membranifaciens* (P. me) con 1 UA de SeKT durante una hora. Los controles negativos se incubaron sin toxina. En todos los casos se observan diferencias significativas en la proporción de núcleos apoptóticos en el tratamiento con SeKT frente al control (ANOVA de un factor p valor < 0,05 n=400).

#### IV.4 APLICACIÓN EN LA INDUSTRIA VITIVINÍCOLA

##### IV.4.1 ANÁLISIS DE LA INHIBICIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE FENOLES VOLÁTILES.

Se realizaron curvas de crecimiento de las levaduras contaminantes en vino sintético, en presencia de diferentes cantidades de las toxinas SeKT y TdKT con el objetivo de determinar su posible aplicación en fermentaciones vínicas, analizando su capacidad antagónica en estas condiciones. Se seleccionaron estas dos toxinas, teniendo en cuenta que existen varias investigaciones sobre diferentes toxinas producidas por cepas de *W. anomalous*. Se observó en la caracterización preliminar y la caracterización bioquímica de WaKT, una gran similitud con las toxinas producidas por diferentes cepas de *W. anomalous*: KTcf20, K8, WAKTa y WAKTb, KT y WA18 antes reportadas (Fernández de Ulivarri *et al.* 2018; Błaszczuk *et al.* 2017; Farkas *et al.* 2012; Cecarini *et al.* 2019; Comitini *et al.* 2021). Estudios recientes indicaron que la toxina WA18 redujo los niveles de fenoles volátiles producidos por cepas de *D. bruxellensis* después del tiempo de evaluación de 60 días, mostrando una reducción de aproximadamente 10 veces en comparación con muestras sin presencia de toxina (Comitini *et al.*, 2021).

Las levaduras *M. guilliermondii* NPCC 1055, *P. membranifaciens* NPCC 1099, *P. manshurica* 1038 y *D. bruxellensis* NPCC 130 se adaptaron al crecimiento en vino sintético y se incubaron en presencia de diferentes cantidades de cada toxina y ácido  $\rho$ -cumárico, con el objetivo de analizar su capacidad de producir fenoles volátiles durante 100 días. Esta metodología se describe en el apartado III.11.

En vino sintético inoculado con *M. guilliermondii* o *P. membranifaciens* sin SeKT, hubo producción de 4-vinilfenol en niveles entre 35,2 y 80,2 mg/L, respectivamente, después de 100 días de incubación. Se detectaron niveles altos de 4-etilfenol (126 mg/L) o 4-etilguayacol (21,8 mg/L) después del mismo período de tiempo para *D. bruxellensis* y *P. manshurica*, respectivamente.

El cultivo de las levaduras contaminantes con 2 UA de SeKT mostró un descenso en la producción de fenoles volátiles de *M. guilliermondii*, *P. membranifaciens*, *P. manshurica* y *D. bruxellensis* en 94, 78, 100, y 89 %, respectivamente, después de 100 días de cultivo. El cultivo con 4 UA de SeKT mostró un descenso en la producción de fenoles volátiles de *M. guilliermondii*, *P. membranifaciens*, *P. manshurica* y *D. bruxellensis* en 94, 96, 100 y 98 % (Tabla IV.18).

**Tabla IV.18:** Actividad antagonista de SeKT sobre a la producción de fenoles volátiles de cepas contaminantes a 30 y 100 días de incubación.

Levadura contaminante	UA/mL SeKT	4-VINILFENOL		4-ETILFENOL		4-ETILGUAYACOL	
		30 días	100 días	30 días	100 días	30 días	100 días
<i>Meyerozima guilliermondii</i>	0	23,2 ± 1,3 <sup>b</sup>	35,2 ± 3,2 <sup>a</sup>	nd	Nd	nd	nd
	2	22,1 ± 3,2 <sup>b</sup>	1,9 ± 0,5 <sup>d</sup>	nd	Nd	nd	nd
	4	10,8 ± 2,3 <sup>c</sup>	1,9 ± 0,5 <sup>d</sup>	nd	Nd	nd	nd
<i>Pichia membranifaciens</i>	0	21,7 ± 2,5 <sup>b</sup>	80,2 ± 3,6 <sup>a</sup>	nd	Nd	nd	nd
	2	22,2 ± 2,3 <sup>b</sup>	17,1 ± 2,2 <sup>bc</sup>	nd	Nd	nd	nd
	4	14,0 ± 2,9 <sup>c</sup>	2,9 ± 0,5 <sup>d</sup>	nd	Nd	nd	nd
<i>Pichia manshurica</i>	0	nd	nd	nd	Nd	44,2 ± 3,1 <sup>a</sup>	21,8 ± 2,8 <sup>b</sup>
	2	nd	nd	nd	Nd	nd	nd
	4	nd	nd	nd	Nd	nd	nd
<i>Dekkera bruxellensis</i>	0	nd	nd	39,2 ± 5,3 <sup>b</sup>	126,7 ± 8,5 <sup>a</sup>	nd	nd
	2	nd	nd	nd	13,9 ± 1,3 <sup>c</sup>	nd	nd
	4	nd	nd	nd	3,0 ± 0,4 <sup>d</sup>	nd	nd

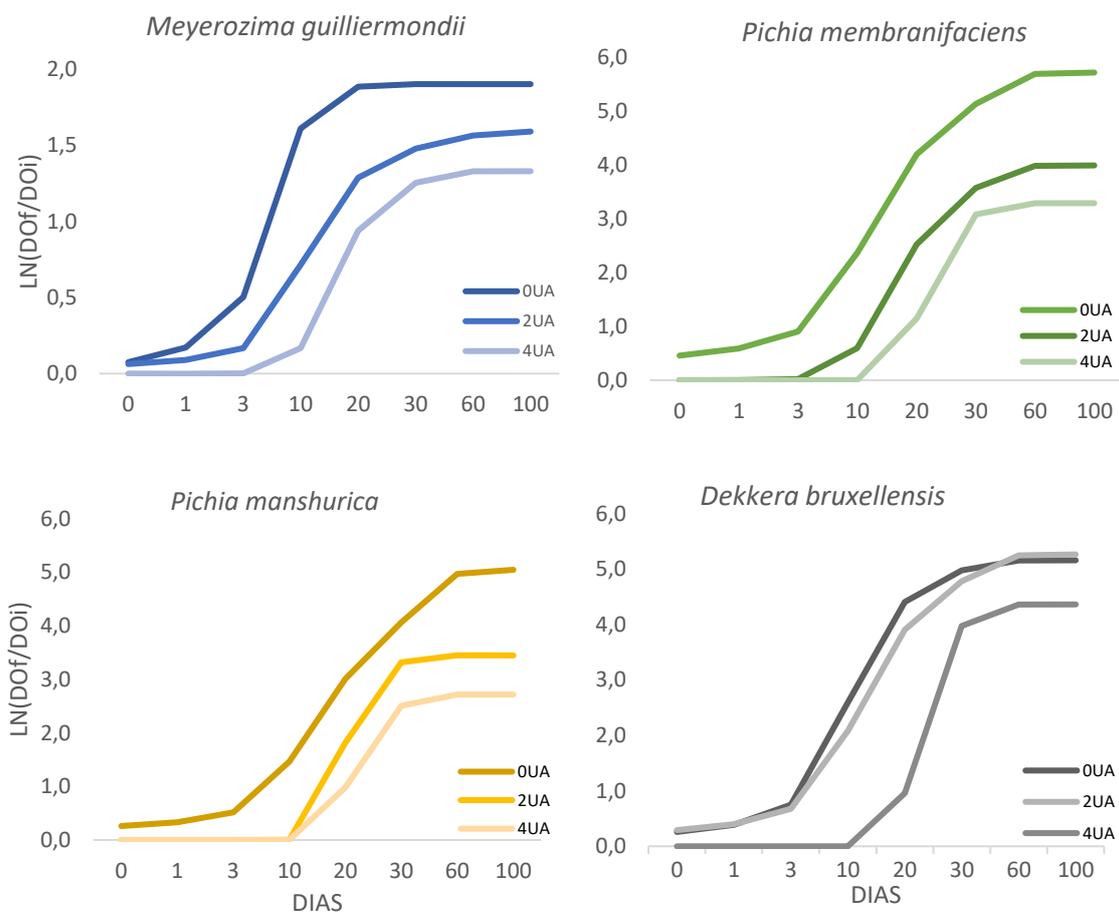
Los valores se expresan en mg/L (media ± desvío estándar). Nd: no detectado. Las diferentes letras dentro de la misma especie de levadura y tipo de fenol volátil son estadísticamente diferentes (p valor <0,05 Test de Tukey n=4)

**Tabla IV.19:** Actividad antagonista de TdKT sobre a la producción de fenoles volátiles de cepas contaminantes a 30 y 100 días de incubación.

Levadura contaminante	UA/mL TdKT	4-VINILFENOL		4-ETILFENOL		4-ETILGUAYACOL	
		30 días	100 días	30 días	100 días	30 días	100 días
<i>Meyerozima guilliermondii</i>	0	23,2 ± 1,3 <sup>b</sup>	35,2 ± 3,2 <sup>a</sup>	nd	nd	nd	nd
	2	24,69 ± 3,7 <sup>b</sup>	22,9 ± 0,5 <sup>b</sup>	nd	nd	nd	nd
	4	14,4 ± 2,3 <sup>c</sup>	15,9 ± 0,5 <sup>c</sup>	nd	nd	nd	nd
<i>Pichia membranifaciens</i>	0	21,7 ± 2,5 <sup>d</sup>	80,2 ± 3,6 <sup>a</sup>	nd	nd	nd	nd
	2	20,36 ± 3,3 <sup>d</sup>	65,5 ± 3,2 <sup>b</sup>	nd	nd	nd	nd
	4	15,38 ± 1,9 <sup>d</sup>	54,94 ± 1,6 <sup>c</sup>	nd	nd	nd	nd
<i>Pichia manshurica</i>	0	nd	nd	nd	nd	44,2 ± 3,1 <sup>a</sup>	21,8 ± 2,8 <sup>b</sup>
	2	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	4	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<i>Dekkera bruxellensis</i>	0	nd	nd	39,2 ± 5,3 <sup>d</sup>	126,7 ± 8,5 <sup>a</sup>	nd	nd
	2	nd	nd	26,6 ± 4,2 <sup>e</sup>	86,62 ± 6,5 <sup>b</sup>	nd	nd
	4	nd	nd	17,17 ± 1,24 <sup>e</sup>	61,31 ± 7,6 <sup>c</sup>	nd	nd

Los valores se expresan en mg/L (media ± desvío estándar). Nd: no detectado. Las diferentes letras dentro de la misma especie de levadura y tipo de fenol volátil son estadísticamente diferentes (p valor <0,05 Test de Tukey n=4)

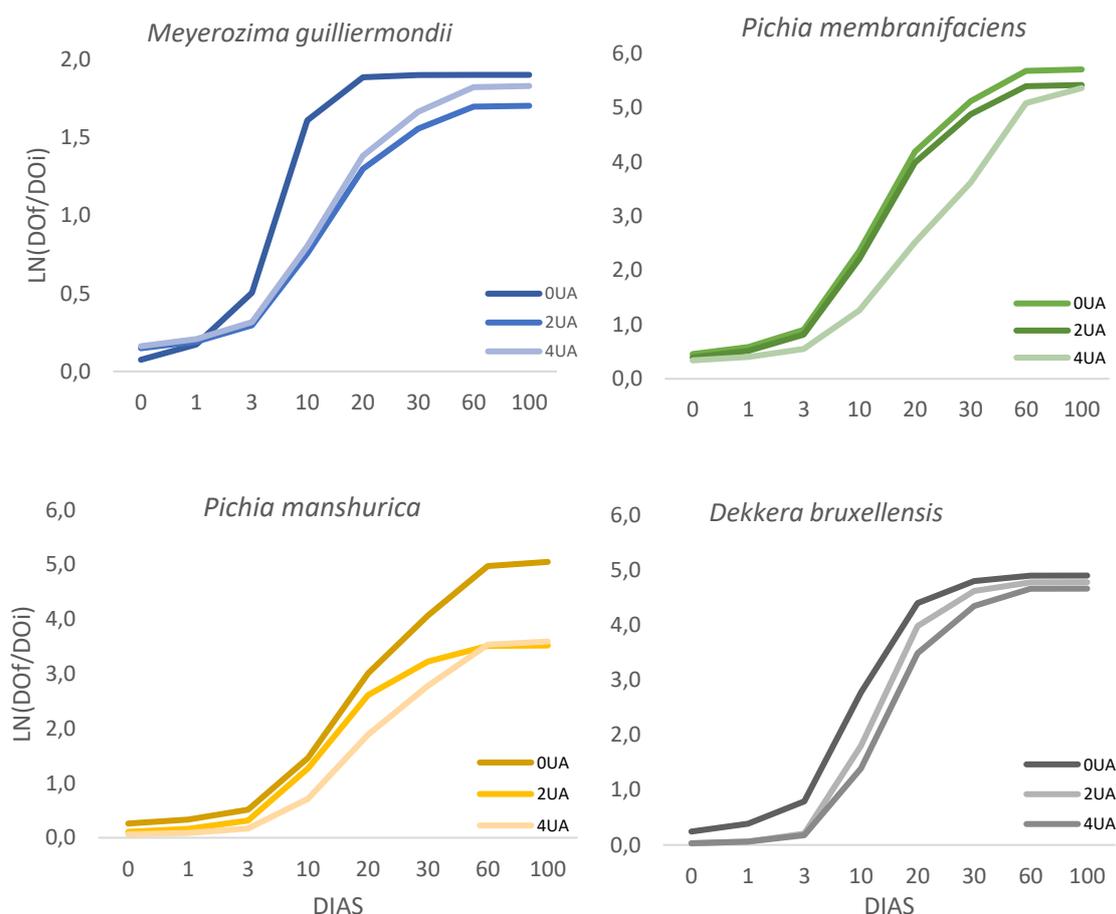
El cultivo de levaduras contaminantes con 2 UA de TdKT presentó una disminución en la producción de fenoles volátiles de *M. guilliermondii*, *P. membranifaciens*, *P. manshurica* y *D. bruxellensis* en 35, 16, 100 y 32 % respectivamente, después de 100 días de cultivo. El cultivo con 4 UA de TdKT mostró una disminución en la producción de fenoles volátiles de *M. guilliermondii*, *P. membranifaciens*, *P. manshurica* y *D. bruxellensis* en 35, 31, 100 y 52 % (Tabla IV.19).



**Figura IV.18:** Curvas de crecimiento modeladas según Gompertz de *Meyerozima guilliermondii*, *Pichia membranifaciens*, *Pichia manshurica* y *Dekkera bruxellensis* en vino sintético con 0, 2 y 4UA de SeKT.

El descenso de producción de fenoles volátiles en presencia de SeKT se ve acompañado variaciones en la cinética de crecimiento de los cultivos con respecto al control sin toxina (Figura IV.18). Esto se evidenció con el cálculo de los parámetros de crecimiento de las curvas modeladas (Tabla IV.20). En el caso de *M. guilliermondii*, 4 UA de SeKT mostraron descenso del 30 % en el máximo valor alcanzado de la curva de crecimiento (A), un descenso del 57 % en la velocidad de crecimiento ( $\mu$ ) y un aumento de 8 horas en la duración de la fase de latencia (lag),

con respecto al control sin toxina. Respecto de *P. membranifaciens*, disminuyó 30 % con 2 UA y 42 % con 4 UA de SeKT el valor de A y aumentó la fase lag en los cultivos con respecto al control (de una fase lag inexistente en el control a 7,5 y 16,6 horas con 2 y 4 UA respectivamente). En el caso de los cultivos de *D. bruxellensis* se observaron cambios en el cultivo con 4 UA de SeKT en A (descendió un 15,5 %) y en la duración de la fase lag (aumentó 17,3 horas).



**Figura IV.19:** Curvas de crecimiento modeladas según Gompertz de *Meyerozima guilliermondii*, *Pichia membranifaciens*, *Pichia manshurica* y *Dekkera bruxellensis* en vino sintético con 0, 2 y 4 UA de TdKT.

Con respecto a TdKT, también se observaron variaciones en la cinética de crecimiento de los cultivos con respecto al control sin toxina (Figura IV.19). En el caso de *M. guilliermondii*, la velocidad de crecimiento ( $\mu$ ) disminuyó 66,7 % en los cultivos con 2 y 4 UA de TdKT respecto al control. En el caso de *P. membranifaciens*,  $\mu$  disminuyó 41 % en el cultivo con 4 UA respecto al control. En el caso de *D. bruxellensis* se observó una disminución de A en los cultivos con 2 UA (7,4 %) y 4 UA (9,7 %) respecto a la levadura sola. Asimismo, la duración de la fase de latencia aumentó 6 veces al incubarse con 2 UA y 6,6 veces con 4 UA de TdKT.

**Tabla IV.20:** Parámetros de crecimiento según el modelado de Gompertz para cada cepa en ausencia o presencia de 2 y 4 UA de SeKT y TdKT.

Levadura	Condición	A	$\mu$	l
<i>Meyerozima guilliermondii</i>	0 UA	1,90	0,21	0,58
	2 UA SeKT	1,90	0,21	0,58
	4 UA SeKT	1,33	0,09	8,49
	2 UA TdKT	1,70	0,07	-0,99
	4 UA TdKT	1,83	0,07	-1,06
<i>Pichia membranifaciens</i>	0 UA	5,71	0,22	-0,70
	2 UA SeKT	3,99	0,21	7,48
	4 UA SeKT	3,29	0,34	16,59
	2 UA TdKT	5,42	0,21	-0,35
	4 UA TdKT	5,39	0,13	0,26
<i>Pichia manshurica</i>	0 UA	5,05	0,16	1,00
	2 UA SeKT	3,45	0,36	14,88
	4 UA SeKT	2,72	0,25	16,14
	2 UA TdKT	3,52	0,16	2,03
	4 UA TdKT	3,59	0,12	4,33
<i>Dekkera bruxellensis</i>	0 UA	5,16	0,28	0,65
	2 UA SeKT	5,26	0,22	0,55
	4 UA SeKT	4,36	0,45	17,91
	2 UA TdKT	4,78	0,29	3,85
	4 UA TdKT	4,66	0,24	4,31

Velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), máximo valor alcanzado de la curva de crecimiento (A) y fase de latencia (l) de las curvas de crecimiento modeladas por Gompertz.

## V. DISCUSIÓN

Para ser utilizadas como agentes de control biológico en vinificación, las toxinas *killer* deben poder ejercer actividad antagónica contra una amplia gama de cepas contaminantes o responsables del deterioro del vino. La aplicación industrial en fermentaciones de las toxinas *killer* se puede realizar en forma purificada o se pueden utilizar las cepas productoras como cultivos iniciadores (Capece, *et al.* 2020; Nardi, 2020). Por lo tanto, es importante analizar el comportamiento de las levaduras *killer* en cultivos mixtos con cepas contaminantes, así como también con las levaduras fermentativas. Para una aplicación industrial exitosa de levaduras *killer* como cultivo iniciador en las industrias de fermentación, es esencial que la levadura *killer* pueda eliminar los contaminantes sensibles silvestres.

Las cepas de levaduras *killer* utilizadas en esta Tesis tienen la capacidad de inhibir selectivamente el crecimiento de algunas cepas contaminantes encontradas a lo largo de las fermentaciones vínicas sin afectar el desarrollo de la mayoría de las cepas de *S. cerevisiae* que se utilizan como cultivos iniciadores del proceso de obtención del vino. Por esto, resulta interesante su uso como estrategia de control de contaminantes siendo inocuas para la microbiota de las fermentaciones vínicas.

La capacidad máxima de producción de toxinas de una levadura puede variar según el tipo de cepa, su composición genética y condiciones ambientales empleadas durante la fermentación. Durante el cultivo de las cepas productoras de toxinas, se puede observar una reducción de la actividad antagónica después de una prolongada la incubación debido a la interacción de la toxina *killer* con el medio o con componentes secretados por las levaduras, como por ejemplo algunas proteasas (Magliani *et al.* 1997; Liu *et al.* 2015).

El tiempo de cultivo para la máxima producción de cada toxina varía entre varias levaduras *killer*. Izgu *et al.* (2005) observaron la producción máxima de toxina *killer* a partir de la levadura *W. anomala* NCYC 432 después de 24 h. En el caso de *W. saturnus var mrakii*, el máximo de producción se dio a las 20 h de cultivo (Guyard *et al.* 2002). El máximo de producción de la toxina *killer* producida por *P. kudriazevii* se dio a las 72 h de cultivo (Bajaj *et al.* 2012). Otros autores (Kenza Labbani *et al.* 2015) reportan la producción de la toxina *killer* de *P. kluyveri* DBVPG 5826 con un máximo entre las 8 y 24 h. La toxina KTCf20 producida por *W. anomalus* presentó un máximo de producción a las 96 h de cultivo (Fernández de Ulivarri *et al.* 2018), mientras que la toxina Wa18 producida por *W. anomalus* presentó un máximo de producción entre las 22 y 26 h (Comitini *et al.* 2021). En todos los casos, la producción máxima de las toxinas se desarrolla en la fase estacionaria de crecimiento, mostrando que se trata de metabolitos secundarios que

otorgan una ventaja a las cepas productoras en situaciones competitivas por un determinado nicho ecológico. La producción máxima de las tres toxinas caracterizadas en este estudio se da también en la fase estacionaria de crecimiento, a las 47 h (TdKT), 120 h (SeKT) y 140 h (WaKT).

Las toxinas *killer* son proteínas o glicoproteínas, monoméricas o multiméricas, que se liberan al medio extracelular donde ejercen su actividad antagónica (Manazzu *et al.* 2019). Por su naturaleza química, se utilizan diferentes estrategias para su purificación, que incluyen precipitación salina, cromatografía de intercambio iónico, filtración en gel, etc. (Kulakovskaya *et al.* 2019; Cecarini *et al.* 2019). La toxina *killer* de *P. membranifaciens* se concentró por ultrafiltración, se purificó y se analizó mediante PAGE nativo, HPLC y gel filtración (Błaszczuk *et al.* 2017). La toxina *killer* purificada tenía peso de 30 kDa. Las toxinas *killer* de *C. guilliermondii* y *P. ohmeri* se purificaron mediante el uso de purificación en un solo paso por proceso de HPLC (Coelho *et al.* 2009). En el caso de la obtención de la toxina producida por *Pichia anomala* NCYC 432 la estrategia de concentración utilizada fue la ultracentrifugación a través de membranas con punto de corte de 30 kDa (Izgu *et al.* 2006). Teniendo en cuenta estas metodologías y los antecedentes presentados por Saez (2016) las toxinas *killer* producidas por *T. delbrueckii*, *W. anomalus* y *S. eubayanus* se concentraron por filtración tangencial a través de membranas con punto de corte de 30 kDa, se purificaron por cromatografía de afinidad a través de columnas pustulano-sefarosa epoxi activadas y se concentraron con ultrafiltración a través de membranas de punto de corte de 50 kDa. Esta metodología, permitió obtener extractos purificados con 28 veces más actividad específica que el extracto crudo en el caso de SeKT, 4,5 veces mayor en el caso de TdKT y 5 veces más en el caso de WaKT. El rendimiento obtenido fue de 7,1 % para SeKT, 6,4 % para TdKT y 4,6 % para WaKT.

La temperatura y el pH óptimos de las toxinas *killer* varían entre diferentes tipos de levadura. Estas características, deben tenerse en cuenta al momento de analizar el potencial uso de las toxinas *killer* en enología. Las temperaturas a las que la mayoría de las toxinas *killer* desarrollan su máxima actividad, se encuentran dentro de los valores a los que se desarrollan las fermentaciones de vinos blancos (10-15 °C) y tintos (18-30 °C). Las toxinas *killer* de *P. membranifaciens* CYC 1086 (Błaszczuk *et al.* 2017) y *P. anomala* (Izgu *et al.* 2006) mostraron actividad óptima a 20° C y 15° C, respectivamente. La toxina producida por *P. kudriavzevii* RY55 presenta actividad máxima a los 30 °C (Bajaj *et al.* 2012). Las toxinas *killer* SeKT, WaKT y TdKT, presentaron actividad máxima a los 20 °C, conservando el 100 % de su actividad remanente luego de ser incubadas a temperaturas de entre 4 y 26 °C, por lo que podrían ser utilizadas en fermentaciones vínicas.

La variación del pH provoca cambios en el estado de ionización de las proteínas y por lo tanto puede conducir a alteraciones en la conformación estructural (estructura terciaria o cuaternaria) de la molécula, que influye directamente en la actividad y la estabilidad. Las toxinas producidas por *P. membranifaciens* y *P. anomala* presentan un pH óptimo de 4,5. La toxina *killer* CnKT producida por *C. nodaensis* mostró actividad dentro del rango de pH de 4,5 a 6 (da Silva *et al.* 2007). Otras toxinas presentan un rango de estabilidad mayor, como por ejemplo la toxina *killer* producida por *Hansenula (Williopsis) mrakii* K9 mostró estabilidad en un amplio rango de pH (2 a 11) (Liu *et al.* 2013). SeKT y TdKT, presentan un rango de pH óptimo de acción entre 3 y 4,5; mientras que el pH óptimo de acción de WaKT fue de 3 a 5. Teniendo en cuenta que el mosto tiene un pH entre 2,8 y 3,5 y el pH de los vinos varía entre 3 y 4, estos resultados son alentadores pensando su uso en vino y mosto.

El aumento de la concentración de etanol a lo largo de la fermentación puede resultar altamente tóxico para algunas especies de levaduras y es necesario analizar el efecto que puede tener en la actividad de las toxinas *killer*. Tanto SeKT, TdKT como WaKT presentaron un 100 % de tolerancia a concentraciones de hasta 16 % v/v de etanol, logrando conservar la totalidad de la actividad *killer* en esas condiciones, indicando que su aplicación podría realizarse en estadios iniciales o finales de la fermentación.

Durante la fermentación, la concentración de azúcares reductores disminuye de 220 a 2 g/L aproximadamente (Charoenchai *et al.* 1998). Esta variación podría generar un estrés osmótico inicialmente o un estrés respecto a la limitación de nutrientes hacia al final de la fermentación. En el caso de las toxinas *killer*, como se trata de moléculas con actividad antagónica y no células en crecimiento, esta actividad no se vio afectada por este factor. El análisis de la actividad *killer* de SeKT, TdKT y WaKT en presencia de 0 a 300 g/L de glucosa no presentó pérdidas de actividad remanente.

En el caso en que las toxinas *killer* se utilicen como antagonistas biológicos en el proceso de vinificación, deberán exponerse a niveles variados de dióxido de azufre. Este antiséptico químico podría ser parcialmente reemplazado por las toxinas, pero no eliminado por completo (Berbegal *et al.* 2017; Cordero-Bueso *et al.* 2017; Capece *et al.* 2020) por lo que es imperioso analizar la conservación de actividad *killer* de las toxinas en presencia de concentraciones de hasta 160 ppm de dióxido de azufre. Tanto TdKT como WaKT no presentaron pérdida de actividad *killer* en presencia de 0 a 160 ppm de SO<sub>2</sub>. Por otra parte, SeKT se mostró sensible a la incubación con este compuesto, presentando una pérdida del 10 % de actividad en presencia de 100 ppm de SO<sub>2</sub> y de hasta 30 % en presencia de 160 ppm.

Además de analizar la influencia de algunos factores de estrés físicoquímico del proceso de vinificación por separado, es preciso verificar que la composición química del mosto de uva y del vino, sea compatible con la actividad de las toxinas *killer*. El mosto de uva, además de tener una elevada concentración de azúcares, contiene nitrógeno, sales minerales, vitaminas, ácidos y compuestos fenólicos que podrían afectar la estabilidad de las toxinas *killer*. (Possner y Kliewe, 1985; Conde *et al.* 2007). Por otra parte, el vino además de contener una elevada concentración de etanol y sulfitos ya analizados, contiene una variedad de compuestos orgánicos producidos por el metabolismo de las levaduras que podrían alterar la actividad de las toxinas *killer*. SeKT mostró mayor estabilidad en vino que en mosto, con una retención de solamente un 20 % de su actividad a las 48 h de incubación en este último. TdKT presentó un comportamiento similar en mosto y vino, con un marcado descenso a las 48 h de incubación. En el caso de WaKT, la estabilidad en mosto fue muy elevada (conservando el 80 % de actividad a las 48 h), pero fue mucho más sensible a la incubación en vino, con una consecuente pérdida del 80 % de actividad a las 48 h. Estas diferencias notables, podrían tenerse en cuenta al momento de seleccionar en qué momento del proceso de vinificación inocular con las toxinas, inclusive se podrían ensayar aplicaciones secuenciales con diferentes combinaciones de toxinas. Por ejemplo, al inicio de la fermentación se podrían aplicar WaKT y TdKT y hacia finales de la fermentación SeKT y TdKT.

Luego de la caracterización preliminar de las toxinas *killer* con el objeto de definir la posible aplicación como agentes de biocontrol en la industria vitivinícola, resulta imperioso obtener estrategias de producción de grandes cantidades de estas toxinas para la realización de ensayos de caracterización bioquímica y aplicación industrial. En el presente trabajo se realizó la optimización de la producción de las tres toxinas en escala de laboratorio. Se aplicaron herramientas estadísticas y de diseño que demostraron ser útiles y eficientes para llevar a cabo la optimización del medio de cultivo para la producción de SeKT, TdKT y WaKT. Hasta la fecha sólo hay registros bibliográficos sobre la optimización estadística de producción de biomasa (Wang *et al.* 2011) o de enzimas (Guo *et al.* 2018). La producción de toxinas *killer* utilizando diseños experimentales, ha sido realizada y reportada por primera vez para SeKT en nuestro laboratorio (Mazzuco *et al.* 2019). A pesar que los diseños estadísticos son ampliamente empleados, pocos trabajos aplican estos diseños de forma correcta. La selección y aplicación de diseños debe realizarse de forma secuencial, lo cual permite la determinación de niveles y factores que influyen sobre la respuesta óptima de la/las variables determinadas. El proceso de optimización involucró la identificación de aquellos factores del medio de producción y condiciones de cultivo con efecto significativo sobre la variable de respuesta (producción de toxinas *killer*). La selección de los factores que se involucraron en el screening preliminar

obedeció a experiencias previas del grupo de investigación en la producción de las toxinas en medio sintético y a la revisión bibliográfica de estrategias de producción de otras proteínas extracelulares por levaduras. Está reportado que la producción de toxinas *killer* a partir *S. cerevisiae* está influenciada por las condiciones de cultivo como el pH, la temperatura, la composición del medio, la presencia de agentes estabilizadores y el grado de agitación durante el crecimiento (Young y Philliskirk, 1977). Esto guarda relación con el hecho de que las toxinas *killer* son proteínas o glicoproteínas susceptibles de inactivarse frente a cambios fisicoquímicos del medio. Entre los varios métodos disponibles para mejorar la estabilidad proteica, la aplicación de compuestos de bajo peso molecular que modifican las características del macroambiente de la proteína, ha sido uno de los más estudiados y utilizados en el campo biotecnológico dado que es sencillo, fácil, económico así como también práctico. Los grupos de compuestos más estudiados, que han demostrado un efecto estabilizante, pertenecen al grupo de: polioles, azúcares, detergentes o surfactantes y sales. La modificación del macroambiente mediante la aplicación de estos aditivos, conduce a la inhibición de la agregación de la proteína y por tanto a su estabilización mediante interacciones preferenciales. Dichas moléculas favorecen la estabilidad, en la mayoría de casos, sin interactuar directamente con la proteína, alterando las propiedades del solvente que la rodea y por tanto las interacciones solvente – proteína. La adición de tritón X-100 se reporta como efectiva en el aumento de la vida útil de las proteínas. Estudios de termoestabilidad sobre enzimas como  $\alpha$ -amilasa (Yoon y Robyt, 2005),  $\beta$ -amilasa (Takeda y Hizukuri, 1972), lacasas (Azimi *et al.* 2016) y lipasas (Nicanuzia *et al.* 2006), han demostrado que se mantiene entre un 80 y 110 % de actividad inicial bajo concentraciones entre 0,02 % y 10 % p/v de tritón, siendo la primera una de las más utilizadas. La adición de glicerol al medio de cultivo impide la desnaturalización de las proteínas provocada principalmente por variaciones de temperatura, pH o por efectos de la agitación (Ouchi *et al.* 1978). El glicerol en concentraciones de 5, 10 y 50 %v/v, se reporta como uno de los más efectivos para mantener la estabilidad proteica obteniendo porcentajes de actividad relativa superiores al 90 % y aumento de los valores de vida media a temperaturas entre 60 y 70 °C, por intervalos de tiempo de hasta 16 h (Singh *et al.* 2000). Por otro lado, los factores físicos agitación y temperatura también son importantes porque determinan la cantidad de oxígeno disuelto en el medio, nutriente importante para el desarrollo aeróbico de las levaduras productoras de las toxinas *killer*.

Se analizó entonces, la influencia de la temperatura, velocidad de agitación, agregado de tritón y glicerol al medio de cultivo, en la producción de toxinas *killer* por parte de *S. eubayanus* NPCC 1302, *T. delbrueckii* NPCC 1033 y *W. anomalus* NPCC 1027. Como medida directa de la

producción de toxinas *killer* se determinaron las unidades de actividad (UA) *killer*; como medida indirecta (pero más rápida y biológicamente estable) se determinó la actividad  $\beta$ -glucanasa; y para el cálculo de la actividad específica se determinó el contenido de proteínas totales de los extractos. Con el objetivo de determinar los niveles óptimos de estos cuatro factores para maximizar la producción de las toxinas, se utilizó un diseño central compuesto (DCC).

Por lo general en el DCC se define la condición de producción máxima mediante el método de máxima pendiente. El punto crítico, si es que existe, será un conjunto de condiciones en  $x$  tal que las derivadas parciales son simultáneamente cero. El punto crítico que se encuentre puede ser un punto máximo, un punto mínimo o un punto de ensilladura de la producción (Draper y Lin, 1990)

En cuanto a la producción de SeKT, ninguno de los factores analizados dentro del dominio definido influyó significativamente en la actividad *killer* ni en la producción de proteínas totales, pero sí lo hizo la temperatura en forma lineal y su interacción con tritón en la producción de  $\beta$ -glucanasas. Este hecho puede deberse a la alta variabilidad de los resultados de la determinación de UA *killer* por el método multiwell. Esta determinación depende no sólo de la presencia de las toxinas *killer*, sino de la posibilidad de inactivación por aumento de la temperatura en la manipulación, presencia de proteasas en el extracto y el estado fisiológico de las levaduras sensibles. Al analizar las superficies de respuesta que ilustran la influencia de la temperatura de cultivo y el agregado de tritón en la producción de  $\beta$ -glucanasas, y al analizar las condiciones experimentales que arrojaron un mayor número de UA *killer*, se seleccionó la condición 11 (5 %v/v de glicerol, 0,1 %v/v de tritón, 120 rpm y 13 °C) detallada en la tabla III.5.

En el caso de la producción de TdKT se observó para el parámetro actividad *Killer* una influencia significativa de la interacción de los factores contenido de tritón y temperatura. Al analizar la superficie de respuesta, el máximo de actividad se observó en el punto mínimo de cada factor. Se observó también que la condición 13 (12,5 %v/v de glicerol, 0,1 %v/v de tritón, 120 rpm y 13 °C) detallada en la tabla III.5, fue la que presentó experimentalmente el mayor contenido de UA *killer*. Como contiene un valor mínimo de temperatura y un valor bajo de tritón, fue seleccionada como condición óptima.

Con respecto a WaKT, ninguna de las variables influyó significativamente en la actividad *killer*, por lo que se seleccionó la Condición 17 (12,5 %v/v de glicerol, 0,1 %v/v de tritón, 120 rpm, 20 °C) detallada en la tabla III.5, que presentó el mayor valor de actividad *killer* y se condice con las superficies de respuesta para la producción de proteínas totales, que muestra sus mínimos en el centro del dominio. La comparación de la producción de las toxinas en medios optimizados y

sin optimizar, demostró el éxito de la estrategia de optimización, con un aumento de 18 veces en la producción de SeKT, 1,6 veces en la producción de TdKT y 2,3 veces para WaKT.

Las levaduras *killer* han demostrado una gran biodiversidad en cuanto a sus características bioquímicas, determinantes genéticos, espectros de acción y mecanismos de acción de sus toxinas (Nardi, 2020). La elucidación de los mecanismos moleculares de su acción será útil para desarrollar estrategias y diseñar productos biológicos para combatir las levaduras contaminantes de vinos. Para avanzar en esta temática, se utilizaron extractos purificados de las toxinas, producidos a partir de las condiciones optimizadas.

Con respecto a la manera en que actúan en la cepa sensible, se ha informado que hay dos tipos de receptores para las toxinas *killer*: los receptores primarios y secundarios. El primario generalmente se encuentra en la pared celular y el secundario se ubica en la membrana plasmática. Los principales componentes de la pared celular de la levadura son (1,3) - $\beta$ -D-glucano, (1,6) - $\beta$ -D-glucano, mananoproteínas y quitina (Santos *et al.* 2000). Muchos ensayos con esferoplastos han demostrado que la presencia pared celular es necesaria para la acción de las toxinas *killer* y los receptores de las diferentes toxinas pueden ser los diferentes componentes de la pared celular (Cecarini *et al.* 2019; Sheppard y Dikicioglu, 2019).

Las toxinas virales (K1 y K2) producidas por *S. cerevisiae* matan a las células sensibles por un proceso de dos pasos mediados por receptores (Lukša *et al.*, 2015). El primer paso implica una unión rápida e independiente de energía a un receptor dentro la pared celular de sus células diana sensibles. En el caso de las toxinas K1 y K2, este receptor primario se ha identificado como  $\beta$ -1,6-D-glucano. En el caso de la toxina producida por *W. saturnus var. mrakii* MUCL 41968, el receptor primario puede ser  $\beta$ -1,3 o  $\beta$ -1,6-glucanos (Guyard *et al.* 2002). Para las toxinas *killer* producidas por *H. uvarum* y *P. membranifaciens*, los componentes de unión también se han identificado como  $\beta$ -1,6-glucanos. La toxina *killer* (PiKT) producida por *W. anomalus* DBVPG 3003 interactúa con  $\beta$ -1,6-glucanos. En este trabajo, se confirma este hallazgo, ya que se define que la toxina WaKT producida por *W. anomalus* NPCC 1027 se une a  $\beta$ -1,6-glucanos. Asimismo, también se establece que el receptor primario de TdKT son los  $\beta$ -1,6-glucanos. Por otra parte, SeKT utiliza como receptor primario, tanto los  $\beta$ -1,6-glucanos como los  $\beta$ -1,3-glucanos.

El receptor de la pared celular para la toxina viral K28 producida por *S. cerevisiae* es una  $\beta$ -1,3-mananoproteína de alto peso molecular (Becker y Schmitt, 2017). Las mananoproteínas también son los receptores de la toxina *killer* producida por *Z. bailii*. En las toxinas analizadas en este trabajo, no se detectó interacción con estos componentes de la pared celular, ya que la Concanavalina A no compete con la actividad de las toxinas *killer* estudiadas.

Está reportado que la quitina también es un receptor primario presente en la pared de la célula sensible. La zimocina producida por *K. lactis* tiene un dominio de unión a quitina y una enzima con actividad exo quitinasa (Butler *et al.* 1991). Las toxinas *killer* de *P. acaciae* y *P. inositovora* se unen a la quitina de la célula diana. En este estudio, se ha demostrado que tanto SeKT como TdKT se unen a la quitina de las células sensibles, aunque solamente TdKT presenta actividad quitinasa.

Hasta ahora, se ha considerado en general que las toxinas *killer* matan sus células sensibles a través de varios mecanismos, como inhibición de la replicación del ADN, inducción de cambios en la permeabilidad de la membrana, detención del ciclo celular en la fase G1 y otros (Manazzu *et al.* 2019). Además, en algunos casos, una toxina puede interferir con síntesis de la pared celular mediante la inhibición de la  $\beta$ -1,3-glucano sintasa o hidrolizando los principales componentes de la pared celular en las células sensibles (Liu *et al.* 2013; Blättel *et al.* 2011; Cecarini *et al.* 2019).

La toxina *killer* producida por *W. anomalus* YF07b, la toxina *killer* producida por *W. anomalus* WaF17.12 y la toxina *killer* KTCf20 producida por *W. anomalus* Cf20 presentan actividad  $\beta$ -1,3-D-glucanasa (Liu *et al.* 2013; Blättel *et al.* 2011; Cecarini *et al.* 2019). La toxina *killer* WaKT producida por *W. anomalus* NPCC 1027, caracterizada en este estudio, también presenta actividad  $\beta$ -1,3-D-glucanasa. En este caso, 1 UA *killer* representa  $5 \cdot 10^{-4}$  UA glucanasa y en el caso de KTCf20, 1UA *killer* representa  $3,5 \cdot 10^{-7}$  UA glucanasa. En el análisis de las curvas que representan el aumento de la actividad *killer* y glucanasa en función del aumento de volumen de toxina, no se puede observar una correlación entre ambas actividades en WaKT. Las toxinas SeKT y TdKT también presentan actividad  $\beta$ - glucanasa, donde 1 UA *killer* de SeKT representa 0,034 UA glucanasa y 1 UA *killer* de TdKT representa  $1,2 \cdot 10^{-4}$  UA glucanasa. Asimismo, las curvas de relación de volumen de toxina respecto a UA *killer* y UA glucanasa son proporcionales, pudiendo indicar esta actividad enzimática como un posible mecanismo de acción de estas dos toxinas.

La presencia de actividad  $\beta$ -glucanasa es una característica positiva para el empleo de toxinas *killer* en la industria vitivinícola. La aplicación práctica de las  $\beta$ -1,3-glucanasas está muy extendida (Bertrand, 2013). El uso de preparaciones enzimáticas comercializadas con actividad  $\beta$ -1,3-glucanolítica ha demostrado tener éxito en la inhibición de levaduras contaminantes como *Zygosaccharomyces baillii* y *Dekkera bruxellensis*, pero este efecto se observó utilizando dosis hasta 20 veces superiores a las recomendadas por el fabricante (RESOLUCION OIV-OENO 488-2013). Una adición tal alta de proteínas podría requerir una posterior clarificación del vino.

Asimismo, estos extractos proteicos tienen además otras actividades enzimáticas, mientras que la actividad glucanasa de las toxinas *killer* es altamente específica.

La toxina K1 producida por *S. cerevisiae* ejerce su efecto letal por la formación de canales de iones y la interrupción de función de la membrana citoplasmática, liberando K<sup>+</sup>, ATP y otros metabolitos. La toxina *killer* de *P. kluyveri* es muy similar a K1 en su acción. Las células tratadas con toxina se vuelven más permeables a los protones y el pH intracelular desciende, resultando en la muerte celular debido a la fuga de potasio y ATP (Ahmed *et al*, 1999; Kulakovskaya *et al*, 2019; Novotna *et al*, 2004).

La toxina K28 producida por *S. cerevisiae* atraviesa la vía de secreción de la levadura sensible a la inversa (a través de Golgi y retículo endoplasmático), ingresa al citosol y transduce su señal tóxica en el núcleo de la célula de levadura donde ocurren eventos letales. Como resultado, la síntesis de ADN se inhibe rápidamente, la viabilidad celular se pierde más lentamente y las células se detienen al inicio de la Fase S fase del ciclo celular quedando con un núcleo pre-replicado (Becker y Schmitt, 2017).

El mecanismo de acción ejercido por zimocina de *S. cerevisiae* y de *K. lactis* implica la escisión del ARN de transferencia. De esta manera, se inhibe la síntesis de proteínas y se induce la muerte celular (Lu *et al*. 2005; Liu *et al*. 2013; Jablonowski y Schaffrath, 2007).

La metodología de estudio de estas tres hipótesis implica técnicas complejas para dilucidar el mecanismo de acción de las toxinas *killer*. En el caso de TdKT y WaKT, ambas toxinas presentan actividad  $\beta$ -glucanasa y quitinasa y generan la muerte celular por disrupción de la membrana plasmática de las levaduras sensibles incubadas con 4 UA equivalentes al daño por incubación con zymoliasa. Resta dilucidar si el daño en la membrana se produce como consecuencia de la actividad enzimática, o como consecuencia del arresto del ciclo celular. Futuros estudios en el laboratorio posibilitarán definirlos con mayor detalle.

Un mecanismo secundario se describió recientemente y se relaciona con la exposición a concentraciones medias a bajas de toxinas. Se demostró que las toxinas inducen muerte celular en concentraciones que no fueron suficientes para desencadenar las vías de acción primarias. Se demostró que las células sensibles afectadas entraban en un estado apoptótico; exhibiendo marcadores como la fragmentación del ADN, la condensación de la cromatina y la externalización de la fosfatidilserina. La activación de metacaspasa 1 (Yca1p) de las levaduras por acción de toxinas eventualmente favorecería a la liberación de especies reactivas del oxígeno, desencadenando una cascada de eventos que conducen a la célula a muerte por apoptosis (Mazzoni y Falcone, 2008). Esta respuesta parece ser inducida universalmente a bajas

concentraciones, independientemente de la naturaleza de la proteína toxina en cuestión. Se ha propuesto que la acción tóxica a través de la muerte celular programada es el principal mecanismo por el cual las levaduras *killer* matan especies sensibles en entornos naturales donde se encuentran en concentraciones mucho más bajas (Sheppard y Dikicioglu, 2019).

En este estudio, las células de *C. glabrata* incubadas con 1 UA de SeKT presentan luego 30 y 60 minutos acumulación de especies reactivas del oxígeno. Luego de la incubación durante 1 h con 1 UA, las células sensibles presentan exposición de la fosfatidilserina y predominio de núcleos apoptóticos. Esto indicaría que, en bajas concentraciones, SeKT induce daño del ADN y apoptosis al menos en esta levadura. Para determinar si SeKT utiliza el mismo mecanismo para actuar en otras especies de levaduras, se analizó comparativamente la aparición de fenotipos apoptóticos o necróticos en presencia de 1 UA de toxina. En estos experimentos se observó que esta toxina es capaz de desencadenar mecanismos de muerte por apoptosis y por necrosis en *B. bruxellensis*, *P. manshurica* y *M. guilliermondii*. En el caso de *P. membranifaciens*, sólo se observó un aumento de valores de células necróticas de 67 % con respecto a 27,6 % en el control, indicando en esta cepa un mecanismo de acción más bien del tipo necrótico.

La composición del vino al final de la fermentación maloláctica (elevada concentración de etanol, bajo contenido de azúcares fermentables, bajo pH y la presencia de dióxido de azufre) previene el crecimiento de la mayoría de las bacterias y levaduras. Sin embargo, las levaduras contaminantes pueden crecer en estas condiciones y son las responsables de la producción de fenoles volátiles que generan defectos en el sabor y olor del vino (Saez *et al.* 2011; Sangorrín *et al.* 2013). Las moléculas precursoras de fenoles volátiles (etilfenoles) que producen aromas desagradables, son los ácidos cinámicos  $\rho$ -cumárico y ferúlico, aportados por las uvas o la madera.

Simonin *et al.* (2018) ha reportado el uso de cepas de *T. delbrueckii* como estrategia de inhibición del crecimiento de levaduras contaminantes de vinos, pero no de toxinas purificadas, por lo que resulta interesante el avance en la utilización de TdKT. Hasta el momento, sólo nuestro grupo de investigación ha reportado la producción y caracterización de toxinas *killer* producidas por *S. eubayanus*, por lo que su uso representa un gran avance en innovación en la industria vitivinícola. Teniendo en cuenta su originalidad y los resultados de la caracterización bioquímica de SeKT y TdKT, se determinó la capacidad de evitar en la producción de fenoles volátiles por parte de levaduras contaminantes de vinos en medio suplementado con ácido  $\rho$ -cumárico.

La vía biosintética para la síntesis de fenoles volátiles consiste en la transformación por parte de la levadura de ácidos cinámicos (ácido ferúlico,  $\rho$ -cumárico o cafeico) presentes naturalmente

en el mosto, en derivados vinílicos y etílicos a través de una cinamato descarboxilasa (CD) y una vinilfenol reductasa (VR) (Chatonnet *et al.* 1995).

En este trabajo se confirmó la capacidad de *M. guilliermondii* y *P. membranifaciens*, para producir el derivado del ácido  $p$ -cumárico, 4-vinilfenol (4-VP) (22 a 80 mg/L) en vino sintético. Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio también demostraron la producción de 4-VP y su acumulación por *M. guilliermondii* debido a la falta de actividad VR en varias cepas (Lopes y Sangorrín, 2009; Saez *et al.* 2011; Sangorrín *et al.* 2013). Además, *B. bruxellensis* produjo altos niveles de 4-etilfenol (4-EP) (126 mg/L), capacidad ampliamente reportada en esta especie (Berbegal *et al.* 2017). La cepa de *P. manshurica* fue capaz de consumir ácido ferúlico presente de forma natural en el mosto, produciendo altos niveles de 4-EG (44 mg/L), como se había observado anteriormente (Saez *et al.* 2011).

La incubación de *M. guilliermondii*, *P. membranifaciens*, *P. manshurica* y *D. bruxellensis* en presencia de 2 y 4 UA de SeKT y TdKT, resultó en cambios en los parámetros de crecimiento y disminución de la producción de fenoles volátiles con respecto a las cepas sin toxina. El agregado de 4 UA de SeKT es suficiente para mostrar un descenso en la producción de fenoles volátiles en porcentajes mayores al 94 % después de 100 días de cultivo. El agregado de 4 UA de TdKT muestra un descenso en la producción de fenoles volátiles en proporciones que van desde el 30 % en *P. membranifaciens* hasta el 100 % en *P. manshurica*.

En conclusión, SeKT y TdKT demostraron su capacidad para controlar el crecimiento y la producción de fenoles volátiles de cuatro de las levaduras que más frecuentemente deterioran el vino. Además, la actividad *killer* de SeKT, TdKT y WaKT fue estable en condiciones de estrés fisicoquímico típicamente presentes en vinificación. Estos hallazgos junto con la caracterización bioquímica y modo de acción sobre levaduras sensibles, postulan a estas toxinas como potenciales agentes antimicrobianos naturales para controlar las levaduras contaminantes presentes durante el envejecimiento y almacenamiento del vino.

## VI. BIBLIOGRAFÍA

- Abbot, D., Hynes, S. y Ingledew, W. «Growth rates of *Dekkera/Brettanomyces* yeasts hinder their ability to compete with *Saccharomyces cerevisiae* in bath corn mash fermentations.» *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2005: 641-647.
- Agrawal T. y Kotasthane A. «Chitinolytic assay of indigenous *Trichoderma* isolates collected from different geographical locations of Chhattisgarh in Central India.» *Springerplus*, 2012: 2-3.
- Aguilar Uscanga, B., Solis Pacheco, J. y Francois, J. «Estudio de la variación de la composición de los polisacáridos contenidos en la pared celular de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.» *e-Gnosis*, 2005.
- Ahmed, A. Sesti, F., Ilan, N., Shih, T. M., Sturley, S. L. y Goldstein, S. «A molecular target for viral killer toxin: TOK1 Potassium Channels.» *Cell*, 1999: 283-291.
- Allen, A., Islamovic, E., Kaur, J., Gold, S., Shah, D. y Smith, T. «The virally encoded killer proteins from *Ustilago maydis*.» *Fungal Biology Reviews*, 2013: 166-173.
- Anwar, M.I., Muhammad, F., Awais, M.M., y Akhtar, M. «A review of  $\beta$ -glucans as a growth promoter and antibiotic alternative against enteric pathogens in poultry.» *World's Poultry Science Journal*, 2017: 1-11.
- Argentino, Código Alimentario. *Capítulo XIII: Bebidas Fermentadas. Buenos Aires, Argentina.* 2020. [http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/Capitulo\\_XIII.pdf](http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/Capitulo_XIII.pdf)
- Azimi, M., Nafissi N. y Mogharabi M. «Study of lacasse activity and stability in the presence of ionic and non-ionic surfactans and the bioconversion of indole in lacasse- TX-100 system.» *Journal of Molecular Catalysis*, 2016: 69-75.
- Bajaj, B. K., Raina, S. y Singh, S. «Killer toxin from a novel killer yeast *Pichia kudriavzevii* RY55 with idiosyncratic antibacterial activity.» *Journal of Basic Microbiology*, 2012: 645-656.
- Barata, A., Nobre, A., Correia, P., Malfeito-Ferreira, M. y Loureiro, V. «Growth and 4-ethylphenol production by the yeast *Pichia guilliermondii* in grape juices.» *American Journal of Enology and Viticulture*, 2006: 133-138.
- Bauer, F. F. y Pretorius, I. S. «Yeast stress response and fermentation efficiency: how to survive the making of wine.» *South African Journal of Enology and Viticulture*, 2000: 27-51.

- Becker, B. y Schmitt, M. J. «Yeast Killer Toxin K28: Biology and Unique Strategy of Host Cell Intoxication and Killing.» *Toxins*, 2017.
- Belda, I., Ruiz, J., Alonso, A., Marquina, D. y Santos, A. «The biology of *Pichia membranifaciens* killer toxins.» *Toxins*, 2017: 1-28.
- Belloch, C., Orlic, S., Barrio, E. y Querol, A. «Fermentative stress adaptation of hybrids within the *Saccharomyces sensu stricto* complex.» *International Journal of Food Microbiology*, 2008: 188-195.
- Berbegal, C., Garofalo, C. y Russo P. «Use of Autochthonous Yeasts and Bacteria in Order to Control *Brettanomyces bruxellensis* in Wine.» *Fermentation*, 2017.
- Berradre, M., Sulbarán B., Ojeda de Rodríguez G., Fernández V., Soto L., Martínez J. y Esteve-Zarzo. «Dinámica poblacional de levaduras durante la fermentación espontánea de uva blanca variedad Malvasía.» *Revista de la Facultad de Agronomía*, 2012: 453-474.
- Bertrand, A. «Determinación de la actividad  $\beta$ -glucanasa de *Botrytis* en las preparaciones enzimáticas.» *OIV*, 2013.
- Bevan, E. A. y M. Makower. «The physiological basis of the killer character in yeast.» *Proceedings of the XIth International Congress on Genetics*, 1963: 202-203.
- Bevan, E. A. y Woods D.R. «Studies on the Nature of the Killer Factor Produced by *Saccharomyces cerevisiae*.» *J. gen. Microbiology*, 1968: 115-126.
- Błaszczuk, U., Sroka, P., Satora, P. y Dulinski, R. «Effect of *Wickerhamomyces anomalus* and *Pichia membranifaciens* Killer Toxins on Fermentation and Chemical Composition of Apple Wines Produced from High-Sugar Juices.» *Journal of Food and Nutrition Research*, 2017: 189-199.
- Bleve, G., Grieco, F., Cozzi, G., Logrieco, A. y Visconti, A. «Isolation of epiphytic yeasts with potential for biocontrol of *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* on grape. » *International Journal of Food Microbiology*, 2006: 204-209.
- Blättel, V., Larisika, M., Pfeiffer, P., Nowak, C., Eich, A., Eckelt J. y König, H. « $\beta$ -1,3-Glucanase from *Delftia tsuruhatensis* Strain MV01 and Its Potential Application in Vinification .» *Applied and Environmental Microbiology*, 2011: 983-990.
- Borneman, A. R., Schmidt, S. A. y Pretorius, I. S. « At the cutting-edge of grape and wine biotechnology.» *Trends in Genetics*, 2013: 263-271.
- Bruen, J. «The *Ustilago maydis* killer toxins.» *Topics in Current Genetics*, 2005: 157-174.

- Butler, A., O'Donnell, R., Martin, V., Gooday, G. y Stark, M. «*Kluyveromyces lactis* toxin has an essential chitinase activity.» *European Journal of Biochemistry*, 1991: 483-488.
- Capece, A., R. Pietrafesa, G. Siesto, y Romano, P. «Biotechnological Approach Based on Selected *Saccharomyces cerevisiae* Starters for Reducing the Use of Sulfur Dioxide in Wine.» *Microorganisms*, 2020.
- Carboni, G. Fancello, F., Zara, G., Zara, S., Ruiu, L., Marova, I., Pinna, G. y Budroni, M. «Production of a lyophilized ready-to-use yeast killer toxin with possible applications in the wine and food industries.» *International Journal of Food Microbiology*, 2020.
- Carmona-Gutierrez, D., Eisemberg, T., Bütner, S., Meisinger, C., Kroemer, G. y Madeo, F. «Apoptosis in yeast: triggers, pathways, subroutines.» *Cell Death and Differentiation*, 2010: 763-773.
- Carrasco, P., Querol, A. y del Olmo, M. «Analysis of the stress resistance of commercial wine yeast strains.» *Archives of Microbiology*, 2001: 450-457.
- Catania, C. D., Avagnina de del Monte, S., Uliarte, E. M., del Monte, R. F. y Tonietto, J. «El clima vitícola de las regiones productoras de uvas para vinos de Argentina.» En *Caracterização climática de regiões vitivinícolas Ibero-Americanas.*, de J. y Sotés, V. Tonietto, 64. Embrapa Uva e Vinho, 2007.
- Cecarini, V., Cuccioloni, M., Bonfili, L., Ricciutelli, M., Valzano, M., Cappelli, A., Amantini, C., Favia, G., Eleuteri A., Angeletti, M. y Ricci, I. «Identification of a Killer Toxin from *Wickerhamomyces anomalus* with  $\beta$ -Glucanase Activity.» *Toxins*, 2019.
- Charoenchai, C., Fleet, G. H. y Henschke, P. A. «Effects of temperature, pH and sugar concentrations on the growth rates and cell biomass of wine yeasts.» *American Journal of Enology and Viticulture*, 1998: 283-288.
- Chatonnet, P., Dubordeau, D. y Boidron, J. N. «The influence of *Brettanomyces/Dekkera* sp. yeast and lactic acid bacteria on the ethyl phenol content of red wines.» *American Journal of Enology and Viticulture*, 1995: 463-468.
- Ciani, M. y Fatichenti, F. «Killer toxin of *Kluyveromyces phaffii* DBVPG 6067 as a biopreservative agent to control apiculate wine yeasts.» *Applied and Environmental Microbiology*, 2001: 3058-3063.
- Coelho, A. R., Tachi, M., Pagnocca, F. C., Andrade Nobrega, G. M., Hoffman, F. L., Harada, K. y Hirooka, E. Y. «Purification of *Candida guilliermondii* and *Pichia ohmeri* killer toxin as an

- active agent against *Penicillium expansum*.» *Food Additives and Contaminants*, 2009: 73-81.
- Comitini, F., Mannazzu, I. y Ciani, M. «*Tetrapisispora phaffii* killer toxin is a highly specific -glucanase that disrupts the integrity of the yeast cell wall.» *Microbial cell factories*, 2009.
- Comitini, F., Agarbati, A., Canonico, L., Galli, E. y Ciani, M. « Purification and Characterization of WA18, a New Mycocin Produced by *Wickerhamomyces anomalus* Active in Wine Against *Brettanomyces bruxellensis* Spoilage Yeasts.» *Microorganisms*, 2021.
- Conde, C., Silva, P., Fontes, N., Dias, A.C.P., Tavares, R.M. y Sousa, M.J. «Biochemical Changes throughout Grape Berry Development and Fruit and Wine Quality.» *Food*, 2007: 1-22.
- Cordero-Bueso, G., Mangieri N., Maghradze D., Foschino R., Valdetara F., Cantoral J. M. y Vigentini I. «Wild Grape-Associated Yeasts as Promising Biocontrol Agents against *Vitis vinifera* Fungal Pathogens .» *Frontiers in Microbiology* , 2017.
- Coronado, P., Aguilera, S., Carmona, L., Godoy, L., Martínez, C., y Ganga, M. A. «Comparison of the behaviour of *Brettanomyces bruxellensis* strain LAMAP L2480 grown in authentic and synthetic wines.» *Antonie van Leeuwenhoek*, 2015: 1217-1223.
- da Silva, S., Calado, S., Lucas, C. y Aguiar, C. «Unusual properties of the halotolerant yeast *Candida nodans* Killer toxin, CnKT.» *Microbiological Research*, 2007: 243-251.
- De Ingeniis, J., Raffaelli, N., Ciani, M. y Mannazzu, I. «*Pichia Anómala* DBVPG 3003 secretes a ubiquitin-like protein that has antimicrobial activity.» *Applied and Environmental Microbiology*, 2009: 1129-1134.
- Degré, R. «Selection and commercial cultivation of wine yeast and bacteria. Wine.» En *Wine Microbiology and Biotechnology*, 421-447. Switzerland: Harwood Academic: Fleet, 1993.
- Dias, L., Pereira-da-Silva, S., Tavares, M., Malfeito-Ferreira, M. y Loureiro, V. «Factors affecting the production of 4-ethylphenol by the yeast *Dekkera bruxellensis* in enological conditions.» *Food microbiology*, 2003: 377-384.
- Díaz, A., Flórez, J. y Cotes, A. M. «Optimización de un medio de cultivo para la producción de la levadura *Pichia onychis*.» *Revista Colombiana de Biotecnología* , 2005: 51-58.
- Divol, B., du Toit, M. y Duckitt, E. «Surviving in the presence of sulphur dioxide: strategies developed by wine yeasts.» *Applied Microbiology and Biotechnology* , 2012: 601-613.
- Draper, N. y Lin, D. *Small Response Surface Design*. Madyson. Department of statistics, University of Wisconsin, 1990.

- Du Toit, M. y Pretorius, I. S. «Microbial Spoilage and reservation of wine: using weapons from nature's own arsenal.» *South African Journal of Enology and Viticulture* , 2000: 74-96.
- Escalante-Minakata, P., e Ibarra-Junquera V. «Los cultivos mixtos y las fermentaciones alcohólicas.» *Biotecnología*, 2007: 11.
- Farkas, Z., Márki-Zay, J., Kucsera, J., Vágvölgyi, Cs., Golubev, W. I. y Pfeiffer, I. « Characterization of two different toxins of *Wickerhamomyces anomalus (Pichia anomala)* VKM Y-159.» *Acta Biologica Hungarica* , 2012: 277-287.
- Farris, G. A., Zara S., Pinna G. y Budroni M. «Genetic aspects of flor yeasts Sardinian strains, a case of study.» En *Biodiversity and Biotechnology of wine yeasts.*, de Ciani M., 71-83. Kerala, India: Research Signpost, 2002.
- Fernández de Ulivarri, M., Mendoza, L. y Raya, R. «Characterization of the killer toxin KTCf20 from *Wickerhamomyces anomalus*, a potential biocontrol agent against wine spoilage yeasts.» *Biological control*, 2018: 223-228.
- Fleet, G. H. «Cell walls. The yeasts.» En *Yeast organelles Vol 4*, 200-277. Rose A. H. y Harrison, 1991.
- Fleet, G. H. y Heard G. «Yeasts growth during fermentation.» En *Wine Microbiology and Biotechnology*, de Fleet G. H., 27-55. Chur, Switzerland: Harwood Academic Publishers, 1993.
- Fleet, G. H., Prakitchaiwattana C., Beh A. L. y Heard G. «The yeast ecology of wine.» En *Biodiversity and Biotechnology of Wine Yeasts.*, de M. Ciani, 1-17. Kerala, India: Research Signpost, 2002.
- Fleet, G. H. «Yeasts in foods and beverages: impact on product quality and safety.» *Current Opinion in Biotechnology*, 2007: 1-6.
- Fugelsang, K. C. y Edwards, C. G. *Wine microbiology*. New York: Springer Science, 2007.
- Garijo-Jimenez, M. P. «Tesis doctoral: Estudio del aire como vía de diseminación de microorganismos enológicos.» Universidad de La Rioja, 2013.
- Gonzalez Flores, M., Rodríguez, M. E., Oteiza, J. M., Barbagelata, R. J. y Lopes, C. A. «Physiological characterization of *Saccharomyces uvarum* and *Saccharomyces eubayanus* from Patagonia and their potential for cidermaking.» *International Journal of Food Microbiology*, 2017: 9-17.

- Guerrero Hidalgo, R. F., Cantos Villar E., Puertas García B. y Ortiz Somovilla V. *Sulfuroso en la elaboración de vinos.* 2015. [https://hortintl.cals.ncsu.edu/sites/default/files/articles/sulfuroso\\_elaboracion\\_vinos.pdf](https://hortintl.cals.ncsu.edu/sites/default/files/articles/sulfuroso_elaboracion_vinos.pdf).
- Guo, F., Zheng, H., Cheng, Y., Song, S., Zheng, Z. y Jia, S. «Medium optimization for e-poly-L-lysine production by *Streptomyces diastatochromogenes* using response surface methodology.» *Applied Microbiology*, 2018: 124-131.
- Guyard, C., Séguy, N., Cailliez, J. C., Drobecq, H., Polonelli, L., Dei-Cas, E., Mercenier, A. y Menozzi, F. D. «Characterization of a *Williopsis saturnus* var. *mrakii* high molecular weight secreted killer toxin with broad-spectrum antimicrobial activity.» *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2002: 961-971.
- Heresztyn, T. «Formation of substituted tetrahydropyridines by species of *Brettanomyces* and *Lactobacillus* isolated from mousy wines.» *American Journal of Enology and Viticulture*, 1986: 127-132.
- Hidalgo Togados, J. «Tratado de Enología.» Tomo II. Ed. Mundi-Prensa, 2003.
- Hohmann, S. y Mager, W. H. «Yeast stress responses.» Segunda edición, 389. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2003.
- Hutchins, K. y Bussey H. «Cell wall receptor for yeast killer toxin: involvement of (1-6)  $\beta$ -D-Glucan.» *Journal of Bacteriology*, 1983: 161-169.
- Instituto Nacional de Vitivinicultura. «La nueva vitivinicultura de la Región Patagónica Argentina.» Mendoza, Argentina, 2015.
- Iyer, P. y Ananthanarayan, L. «Enzyme stability and stabilization- Aquos and no aquos environment.» *Process Biochemistry*, 2008: 1019-1032.
- Izgü, F. y Altımbay, D. «Isolation and characterization of the K5-Type yeast killer protein and its homology with an exo-B-1,3-glucanase.» *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 2004: 685-693.
- Izgü, F., Altımbay, D. y Sertkaya, A. «Enzymic activity og the K5-type yeast killer toxin and its characterization.» *Bioscience and Biotechnological Biochemistry*, 2005: 2200-2206.
- Izgü, F., Altımbay, D. y Acun, T. «Killer toxin of *Pichia anomala* NCYC 432; purification, characterization and its exo-b-1,3-glucanase activity.» *Enzyme and microbial technology*, 2006: 659-676.

- Jablonowski, D. y Schaffrath, R. «Zymocin, a composite chitinase and tRNase killer toxin from yeast.» *Biochemical Society Transactions* , 2007: 1533-1537.
- Kast, A., Klassen, R. y Meinhardt, F. «rRNA fragmentation induced by a yeast killer toxin.» *Molecular Microbiology*, 2014: 606-617.
- Kenza Labbani, F., Turchetti, B., Bennamoun, L., Dakhmouche, S., Roberti, R., Corazzi, L., Meraihi, Z. y Buzzini, P. «A novel killer protein from *Pichia kluyveri* isolated from an Algerian soil: purification and characterization of its in vitro activity against food and beverage spoilage yeasts.» *Antonie van Leeuwenhoek* , 2015: 961-970.
- Kulakovskaya, E., Zvonarev, A. y Farofonova, V. «Characteristics of Killer Toxin of the Yeast *Cryptococcus pinus*.» *Journal of Biosciences and Medicines*, 2019: 73-82.
- Lavarello, P., Gutman, G. y Filipetto, S. «Biotecnología en la Industria Vitivinícola en Argentina: ¿Nuevas Modalidades de Innovación en una Actividad Tradicional?» *Journal of Technology Management & Innovation*, 2011: 176-188.
- Liu, G.-L., Wang, G.-Y., Wang, Z.-P., Li, Y., y Chi, Z.-M. «Yeast killer toxins, molecular mechanisms of their action and their application.» *Critical reviews in Biotechnology*, 2013: 1-13.
- Lopes, C.A., Lavalle T.L., Querol A. y Caballero A.C. «Combined use of killer biotype and mtDNA-RFLP patterns in a Patagonian wine *Saccharomyces cerevisiae* diversity study.» *Antonie van Leeuwenhoek*, 2006: 147-156.
- Lopes, C. A., Rodriguez, M. E., Sangorrín, M. P., Querol, A y Caballero, A. C. «Patagonian wines: implantation of an indigenous strain of *Saccharomyces cerevisiae* in fermentations conducted in traditional and modern cellars.» *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2007: 139-149.
- Lopes, C. A. y Sangorrín, M. P. «Differential response of *Pichia guilliermondii* spoilage isolates to biological and physical-chemical factors prevailing in Patagonian wine fermentations.» *Canadian Journal of Microbiology*, 2009: 801-809.
- Lopes, C.A. y Sangorrín M.P. «Optimization of killer assays for yeast selection protocols.» *Revista Argentina de Microbiología*, 2010: 298-306.
- Loureiro, V., y Malfeito-Ferreira, M. «Spoilage yeast in the wine industry.» *International Journal of Food Microbiology*, 2003: 23-50.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. y Randall, R. J. «Protein measurement with the folin phenol reagent.» *Journal of Biological Chemistry*, 1951: 263-275.

- Lu, J., Huang, B., Esberg, A., Johanson, M. y Byström A. «The *Kluyveromyces lactis*  $\gamma$ -toxin targets tRNA anticodons.» *RNA*, 2005: 1648-1654.
- Lukša J, Podoliankaite M., Vepštaitel., Strazdaite Žieliene Z. y Urbonavičius J. «1,6-glucan is a primary target for the *Saccharomyces*.» *Yeast*, 2015: 406-414.
- Madeo, F., Engelhardt, S., Herker, E., Lehmann, N., Maldener, C., Proksch, A., Wissing, S. y Fröhlich, K.U. «Apoptosis in yeast: a new model system with applications.» *Current Genetics*, 2002: 208-216.
- Magliani, W., Conti, S., Gerloni, M., Bertolotti, D. y Polonelli, L. «Yeast Killer Systems.» *clinical microbiology reviews*, 1997: 369-400.
- Mannazzu, I., Domizio P., Carboni G., Zara S., Zara G., Comitini F., Budroni M. y Ciani M. «Yeast killer toxins: from ecological significance to application.» *Critical Reviews in Biotechnology*, 2019.
- Marquina, D.A., Santos, A. y Peinado, J.M. «Biology of killer yeasts.» *International Journal of microbiology*, 2002: 65-71.
- Mazzoni, C. y Falcone, C. «Caspase-dependent apoptosis in yeast.» *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 2008: 1320-1327.
- Mazzuco, M. B., Ganga, M. A. y Sangorrín, M. P. «Production of a novel killer toxin from *Saccharomyces eubayanus* using agro-industrial waste and its application against wine spoilage yeasts.» *Antonie van Leeuwenhoek*, 2019.
- Mehlomakulu, N. N., Setati, M. E., y Divol, B. «Characterization of novel killer toxins secreted by wine-related non-*Saccharomyces* yeasts and their action on *Brettanomyces* spp.» *International journal of food microbiology*, 2014: 83-91.
- Mehlomakulu, N. N., Prior, K. J., Setati, M. E., y Divol, B. «*Candida pyralidae* killer toxin disrupts the cell wall of *Brettanomyces bruxellensis* in red grape juice.» *Journal of applied microbiology*, 2016: 747-758.
- Miller, G. L. «Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar.» *Analytical Chemistry*, 1959: 426-428.
- Moura, V. S., Pollettini, F. L., Luriany P., Ferraz, M., Mazzi, V. y Kupper, K. «Purification of a killer toxin from *Aureobasidium pullulans* for the biocontrol of phytopathogens.» *Journal of Basic Microbiology*, 2020: 77-87.
- Nardi, T. «Microbial Resources as a Tool for Enhancing.» *Microorganisms*, 2020.

- Nicanuzia, J., Aparecida J. y Pastore G. «Characterization of alkaline lipase from *Fusarium oxysporum* and the effect of different surfactants and detergents on the enzyme activity.» *Brazilian Journal of Microbiology*, 2006: 505-509.
- Nikel, P. I., Pettinari, M. J., Mendez, B. S. y Galvano, M. A. «Statistical optimization of a culture medium for biomass and poly(3-hydroxybutyrate) production by a recombinant *Escherichia coli* strain using agroindustrial byproducts.» *International Microbiology*, 2005: 243-250.
- Novotna, D., Flegelova, H. y Janderova, B. «Different action of killer toxins K1 and K2 on the plasma membrane and the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*.» *FEMS Yeast Research*, 2004: 803-813.
- Ocon, E., Garijo, P., Santamaría, P., López, R., Olarte, C., Gutiérrez, A. R. y Sanz, S. « Comparison of culture media for the recovery of airborne yeast in wineries.» *Letters in Applied Microbiology*, 2013: 241-248.
- Oro, L., Ciani, M., Bizzaro, D., y Comitini, F. «Evaluation of damage induced by Kwkt and Pikt zymocins against *Brettanomyces/Dekkera* spoilage yeast, as compared to sulphur dioxide.» *Journal of applied microbiology*, 2016: 207-214.
- Ouchi, K., Kawase, N., Nakano, S. y Aikama, H. «Stabilization of Yeast Killer Factor by Glycerol.» *Agricultural and Biological Chemistry*, 1978: 1-5.
- Peña, R., Vílches, J., Pobleto, C. G. y Ganga, M.A. «Effect of *Candida intermedia* LAMAP1790 Antimicrobial Peptides against Wine-Spoilage Yeasts *Brettanomyces bruxellensis* and *Pichia guilliermondii*.» *Fermentation*, 2020.
- Pérez, F., Ramírez M. y Regodón J. A. «Influence of killer strains of *Saccharomyces cerevisiae* on wine fermentation.» *Antonie van Leeuwenhoek*, 2011: 393-399.
- Phaff, H. J. «Cell wall og yeast. » *Annual Review of Microbiology*, 1963: 15-30.
- Pinto, L., Baruzzi, F., Cocolin, L. y Malfeito-Ferreira, M. «Emerging technologies to control *Brettanomyces* spp. in wine: Recent advances and future trends.» *Trends in Food Science & Technology*, 2020: 88-100.
- Possner, D.R.E. y Kliewer, W.M. «The localisation of acids, sugars, potassium and calcium in developing grape berries.» *Vitis*, 1985: 229-240.
- Pretorius, I. S. «Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking.» *Yeast*, 2000.

- Reiter, J., Herker, E., Madeo, F. y Schmitt, M. «Viral killer toxins induce caspase-mediated apoptosis in yeast.» *Journal of Cell Biology*, 2005: 353-358.
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A. y Dubourdie, D. «Tratado de enología 2. Química del vino. Estabilización y tratamientos.» Ediciones Mundi-Prensa, 1998.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Doneche, B. y Lonvaud, A. «The microbiology of wine and vinifications.» En *Handbook of enology*. West Sussex, Inglaterra: Wiley, 2006.
- Robledo-Leal, E., Elisondo-Zertuche, M., Treviño-Rangel, R. J., González, G. M., Hernández-Luna, C. y Huerta-González, N. « Isolation of killer yeasts from ants of the genus *Atta* and their effect on the red tomato's fungal pathogen *Geotrichum candidum*. » *Revista Mexicana de Fitopatología*, 2016: 258-269.
- Rogers, H. ., Perkins, H. R. y Ward, J. B. «Biosynthesis of wall components in yeast and filamentous fungi.» En *Microbial Cell Walls and Membranes*. Eds. Rogers, Perkins y Ward. 1980: 478-505.
- Rodriguez, M. E., Barbagelata, R. J., Crisóstomo, B., Apablaza, O., Giraudo, M. R. y Caballero, A. «The use of non-*Sacharomyces* yeasts in winemaking.» *Simposio Internacional de Biotecnología*. Tucumán, 2004: 1-15.
- Saez, J., Lopes, C. Kirs, V. y Sangorrín, M. «Production of volatile phenols by *Pichia manshurica* and *Pichia membranifaciens* isolated from spoiled wines and cellar environment in Patagonia.» *Food Microbiology*, 2011: 503-509.
- Saez, J.S. Tesis Doctoral: *Levaduras contaminantes de vinos patagónicos: identificación y biocontrol basado en interacciones killer*. Universidad Nacional del Comahue, 2016.
- Sangorrín, M., Zajonskovsky I., van Brook M., y Caballero A. «The use of killer biotyping in an ecological survey of yeast in an old Patagonian winery.» *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2002: 115-120.
- Sangorrín, M., Giraudo M. R., Caballero A. C., Rodríguez M. E., Lavalle L., Zajonskovsky I., Lopez C. A., Barbagelata R., Mariconda L., Arcucci G. y Méndez P. «Diversidad de levaduras nativas de la Región Vitivinícola Sur.» *El Vino y la Industria* , 2004: 55-56.
- Sangorrín, M. P., Lopes, C. A., Della Negra, J. G., Jofré, V. y Caballero, A. C. «Caracterización de la levadura *Pichia guilliermondii*: potencial contaminante de vinos de la Patagonia.» *El vino y su Industria*, 2008a: 46-52.

- Sangorrín, M., Lopez C.A., Jofré V., Querol A. y Caballero A.C. «Spoilage yeasts from Patagonian cellars: characterization and potential biocontrol based on killer interactions.» *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2008b: 945-953.
- Sangorrín, M., García, V., Lopes, C., Martínez, C. y Ganga, M. «Molecular and physiological comparison of spoilage wine yeast.» *Journal of Applied Microbiology*, 2013: 1066-1074.
- Santos A., Marquina D., Leal J.A. y Peinado J.M. «(1→6)-β-D-glucan as cell wall receptor for *Pichia membranifaciens* killer toxin.» *Applied and Environmental Microbiology*, 2000: 1809-1813.
- Santos A., Marquina D., Barroso J. y Peinado J.M. «(1→6)-β-D-glucan as cell wall binding site for *Debaryomyces hansenii* killer toxin.» *Letter in Applied Microbiology*, 2002: 95-99.
- Santos, A., Sanchez, A., y Marquina, D. «Yeast as biological agents to control *Botrytis cinerea*.» *Microbiological research*, 2004: 331-338.
- Schaffrath, R., Meinhardt, F., y Klassen, R. «Yeast killer toxins: fundamentals and applications.» En *The Mycota: Physiology and genetics Vol 2*, de & A. Schuffler T. Anke, 103-134. Springer international publishing., 2018.
- Schmitt, M. y Radler F. «Molecular structure of the cell wall receptor for killer toxin KT28 in *Saccharomyces cerevisiae*.» *Journal of Bacteriology*, 1988: 2192-2196.
- Schmitt, M. y Breinig, F. «Yeast viral killer toxins: lethality and self-protection.» *Reviews*, 2006: 212-221.
- Sheppard, S. y Dikicioglu, D. « Dynamic modelling of the killing mechanism of action by virus-infected yeasts.» *Journal of The Royal Society Interface*, 2019.
- Simonin, S., Alexandre, H., Nikolantonaki, M., Coelho, C. y Tourdot-Maréchal, R. «Inoculation of *Torulaspora delbrueckii* as a bio-protection agent in winemaking.» *Food Research International*, 2018: 451-461.
- Singh, S., Pillay B. y Prior B. «Thermal stability of Beta-xylanases produced by different *Thermomyces lanuginosus* strains.» *Enzyme and Microbial Technology*, 2000: 502-508.
- Singh, A.K., Mehta, G y Chhaptar, H. S. «Optimizatio of mediu constituents from improved chitinase production by *Paenibacillus* sp. D1 using statistical approach.» *Letters in Applied Microbiology*, 2009: 708-714.
- Somers, J. M. y Bevan E. A. «The inheritance of the killer character in yeast.» *Genetics Research*, 1969: 71-83.

- Sponholz, W. «Spoilage by wine microorganisms.» En *Wine Microbiology and Biotechnology*, de G. H. En Fleet, 395-420. Switzerland: Harwood Academic Publishers, 1993.
- Stratford, M. « Food and beverage spoilage yeast. .» En *Yeasts in food and beverages*, de A. y Feet, G. Querol, 335-379. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2006.
- Suárez-Lepe, J. A. e Iñigo Leal, B. «Microbiología Enológica.» En *Fundamentos de Vinificación.*, 550. Madrid, España: Ed. Mundi-Prensa Libros, 2004.
- Swiegers, J. H. y Pretorius, I. S. « Yeast Modulation of Wine Flavor.» *Advances in Applied Microbiology*, 2005: 131-175.
- Takeda, Y. y Hizukuri, S. «Effect of Triton X-100 on sweet potato  $\beta$ -Amylase.» *Bioquímica et Biophysica Acta*, 1972: 175-183.
- Taczman-Brückner, A., Mohácsi-Farkas, Cs., Balla, Cs., y Kiskó, G. «Mode of action of *Kluyveromyces lactis* in biocontrol of *Penicillium expansum*.» *Acta Alimentaria*, 2005: 153-160.
- Vanbeneden, N., Gils, F., Delvaux, F. y Delvaux, F. R. «Occurrence of volatile phenolic flavour compounds in beer and distribution of Pad1-activity among brewing yeasts.» *Food Chemistry*, 2008: 221-230.
- Vino, Organización Internacional de la Viña y el. «Definiciones y descripciones de los productos.» 2020. <http://www.oiv.int/public/medias/3736/definici-n-de-productos-es.pdf>.
- Wang, P., Liu, X., Wang, Y., Ruang, H. y Zeng, X. «Statistical media optimization for the biomass production of postharvest biocontrol yeast *Rhodosporidium paludigenum*.» *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 2011: 382-387.
- Wemhoff, S., Klassen, R. y Meinhardt, F. «DNA Damage Induced by the Anticodon Nuclease from a *Pichia acaciae* Killer Strain Is Linked to Ribonucleotide.» *Cellular microbiology Reductase Depletion*, 2016: 211-222.
- Yang, H., Ren, Q. y Zhang, Z.J. «Chromosome or chromatin condensation leads to meiosis or apoptosis in stationary yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) cells.» *FEBS Yeast.*, 2006: 1254-1263.
- Yoon, H. y Robyt, J. «Activation and stabilization of 10 starch - degrading enzymes by Triton X-100, polyethylene glycols and polyvinyl alcohols.» *Enzyme and Microbial Technology*, 2005: 556-562.

- Young, T.W. y Philliskirk, G. «The production of a yeast killer factor in the chemostat and the effects of killer yeasts in mixed continuous culture with a sensitive strain.» *Journal of Applied Bacteriology*, 1977: 425-436.
- Zuzuarregui, A., Carrasco P., Palacios A., Julien A. y Del Olmo M. «Analysis of the expression of some stress induced genes in several commercial wine yeast strains at the beginning of vinification.» *Journal of Applied Microbiology*, 2004: 299-307.
- Zwieterin, M. H., Jongenburger, I., Rombouts, F. M. y van' T Riet, K. «Modeling of the bacterial growth curve.» *Applied and Environmental Microbiology*, 1990: 1875 - 1881.



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Food Microbiology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro](http://www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro)

Short communication

## TdKT, a new killer toxin produced by *Torulaspora delbrueckii* effective against wine spoilage yeasts



María Leticia Villalba<sup>a</sup>, Julieta Susana Sáez<sup>a,b</sup>, Silvana del Monaco<sup>a,c</sup>,  
Christian Ariel Lopes<sup>a,b</sup>, Marcela Paula Sangorrín<sup>a,d,\*</sup>

<sup>a</sup> Grupo de Biodiversidad y Biotecnología de Levaduras, Instituto de Investigación y Desarrollo en Ingeniería de Procesos, Biotecnología y Energías Alternativas (PROBIEN), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, Universidad Nacional del Comahue, Buenos Aires 1400, (8300) Neuquén, Argentina

<sup>b</sup> Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Comahue, Argentina

<sup>c</sup> Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional del Comahue, Argentina

<sup>d</sup> Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional del Comahue, Argentina

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 24 July 2015

Received in revised form 8 September 2015

Accepted 6 October 2015

Available online 8 October 2015

## Keywords:

*Torulaspora delbrueckii**Wickerhamomyces anomalus*

Killer toxins

Spoilage yeasts

Wine

## ABSTRACT

Microbiological spoilage is a major concern throughout the wine industry, and control tools are limited. This paper addresses the identification and partial characterization of a new killer toxin from *Torulaspora delbrueckii* with potential biocontrol activity of *Brettanomyces bruxellensis*, *Pichia guilliermondii*, *Pichia manshurica* and *Pichia membranifaciens* wine spoilage. A panel of 18 different wine strains of *T. delbrueckii* killer yeasts was analysed, and the strain *T. delbrueckii* NPCC 1033 (TdKT producer) showed a significant inhibitory effect on the growth of all different spoilage yeasts evaluated. The TdKT toxin was then subjected to a partial biochemical characterization. Its estimated molecular weight was ~30 kDa and it showed glucanase and chitinase enzymatic activities. The killer activity was stable between pH 4.2 and 4.8 and inactivated at temperature above 40 °C. Pustulan and chitin – but not other cell wall polysaccharides – prevented sensitive yeast cells from being killed by TdKT, suggesting that those may be the first toxin targets in the cell wall. TdKT provoked an increase in necrosis cell death after 3 h treatment and apoptotic cell death after 24 h showing time dependence in its mechanisms of action. Killer toxin extracts were active at oenological conditions, confirming their potential use as a biocontrol tool in winemaking.

© 2015 Published by Elsevier B.V.

## 1. Introduction

As producers of toxins that can neutralize the activities of spoilage yeasts in wines, killer yeasts represent an interesting biocontrol strategy (Meinhardt and Klassen, 2009; Viljoen, 2006). Several authors have proposed the use of killer toxins produced by *Candida pyralidae*, *Kluyveromyces wickerhamii*, *Pichia membranifaciens* and *Wickerhamomyces anomalus* (e.g., *Pichia anomala*) to control the development of *Dekkera/Brettanomyces*, the principal wine spoilage yeast (Comitini et al., 2004a; Mehlomakulu et al., 2014; Sangorrín et al., 2008). Killer toxins from *Metschnikowia pulcherrima*, *Pichia kluyveri*, *Tetrapispora phaffii* (e.g., *Kluyveromyces phaffii*) and *W. anomalus*, have also been proposed as control agents towards spoilage yeasts present during the early stages of winemaking such as *Candida boidinii*, *Hanseniaspora uvarum* and *Pichia guilliermondii* (Ciani and Faticenti, 2001; Lopes et al., 2009; Sangorrín et al., 2008). Despite this relatively high number of killer toxins reported

in the bibliography, no commercial product formulated with any of these compounds has been developed so far. Practical application of killer toxins is generally limited because most of them are unstable or inactive at wine conditions (Schmitt and Breinig, 2002). Grape must and wine environment are characterized by their high sugar content (>250 g/L), low pH values around 3.5 and high ethanol and SO<sub>2</sub> concentrations (Bauer and Pretorius, 2000; Fleet and Heard, 1993). In this context, the search for new toxins that are resistant to wine stress factors with potential applicability in winemaking is still necessary.

Several screening studies focused on determining the occurrence of killer yeasts in winemaking environments have been carried out, and they have demonstrated the presence of killer phenotypes in different species from wines, cellar surfaces and the winery equipment (Musmanno et al., 1999; Sangorrín et al., 2007, 2008). In previous studies carried out in our laboratory, most yeasts isolated from spontaneously fermenting grape musts evidenced the killer character (Lopes et al., 2007; Sangorrín et al., 2002). These studies provide an exceptional source of potential antagonist yeasts to be used in biocontrol. In particular, killer yeasts belonging to *Torulaspora delbrueckii* species have shown the broadest killer spectrum against wine spoilage yeasts

\* Corresponding author at: PROBIEN (CONICET-UNCo), Buenos Aires 1400, (8300) Neuquén, Argentina.

E-mail address: [sangorrimarcela@conicet.gov.ar](mailto:sangorrimarcela@conicet.gov.ar) (M.P. Sangorrín).

(Lopes and Sangorrín, 2010; Sangorrín et al., 2008). The killer capacity of *T. delbrueckii* was reported for the first time in a previous work from our laboratory (Sangorrín et al., 2007) but only some ecological aspects of this capacity have been evaluated until now (Lopes and Sangorrín, 2010). Because *T. delbrueckii* is ethanol-tolerant wine yeast detected in advanced stages of wine fermentations in North-Patagonia and other wine-regions worldwide (Ciani and Maccarelli, 1998; Renaud et al., 2009), the killer toxins produced by this species could be interesting for wine spoilage yeast biocontrol.

This paper focuses on the characterization of a killer toxin of *T. delbrueckii*, its biochemical properties and its ability to biocontrol different wine spoilage species. Crude extracts of the selected killer toxin were used to evaluate the stability of TdKT in oenological conditions and its putative mode of action, on sensitive strains.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Yeast strains and media

Eighteen *T. delbrueckii* killer yeast strains from North Patagonia, the type strains of *T. delbrueckii* NRRL Y-866 and the sensitive reference strain *Candida glabrata* NCYC 388 were used for killer assays. A total of 12 strains of *Brettanomyces bruxellensis* (NRRL Y-411, CECT 2113, INTA VC20), *Pichia manshurica* (NPCC 1038), *P. membranifaciens* (NRRL Y-2026, INTA K21, USACH 3000, NPCC 1099) and *P. guilliermondii* (NRRL Y-075, NPCC 1055, USACH 3008, NPCC 1070) from different origins were used as representatives of wine spoilage yeasts. The yeasts were maintained in the GPY-agar medium (20 g/L glucose, 10 g/L peptone, 5 g/L yeast extract and 20 g/L agar, pH 6.0). In the case of *B. bruxellensis* strains, the medium was supplemented with 5 g/L of calcium carbonate. All strains were maintained in the North Patagonian Culture Collection (NPCC, Neuquén, Argentina). Six commercial *Saccharomyces cerevisiae* yeast starters habitually used in North Patagonian wineries from different supplier companies were also used.

### 2.2. Killer toxin activity assays

#### 2.2.1. Qualitative method (QLM)

The killer sensitivity evaluation was performed following the procedure described by Lopes and Sangorrín (2010). The lawn yeast was designated as sensitive when a clear zone of inhibition generally fringed with blue colour was observed surrounding the killer yeast streak after incubation for 48 h at 20 °C. Assays were performed in duplicate.

#### 2.2.2. Quantitative methods

**2.2.2.1. Well test method (WTM).** Killer activity of the crude extracts (Section 2.3) was determined against *C. glabrata* NCYC 388 according to De Ingeniis et al. (2009) with modifications. The killer activity was evaluated as the diameter of the inhibition halo (3–5 mm) around the well after incubation for 48 h at 20 °C, and it was defined as the mean of two replicate wells.

**2.2.2.2. Multiwell method (MWM).** Killer activity of crude extracts (Section 2.3) was determined against *C. glabrata* NCYC 388 according to Guyard et al. (2002) with modifications. One unit of killer activity (KU) was defined as the volume of toxin extract necessary to inhibit 50% of the sensitive reference strain growth after 48 h of incubation at 20 °C. Assays were performed in quadruplicate.

### 2.3. Production of killer toxin extracts

Cultures were performed in 2 L Erlenmeyer flasks containing 1 L YEPD broth incubated at 20 °C. Growth was evaluated by measuring the OD<sub>640</sub>. The production of killer toxins was monitored during the batch cultivation of the producing strain by means of the multiwell

method (MWM), aliquots of 30 mL of the cultures were collected daily and used for crude extract preparation. Once cultures reached the stationary phase, cells were removed by centrifugation at 5000 ×g for 10 min at 4 °C. The protein mix containing TdKT was obtained by precipitation of culture supernatant with 80% w/v ammonium sulphate and centrifugation at 7000 ×g. The pellet obtained was resuspended in a 100 mM citrate-phosphate buffer pH 4.5, dialyzed overnight in the same buffer and threefold concentrated with sugar in dialyzing tubing (cut off 2 kDa). This concentrated supernatant was used as the crude killer toxin extracts. Aliquots of concentrated supernatants containing 20% v/v glycerol were filter-sterilized through 0.22 μm pore-size membrane filters (Millipore) and stored at –20 °C until their use for killer activity detection.

### 2.4. Killer toxin characterization

#### 2.4.1. Molecular weight estimation

Amicon Ultra Centrifugal Filters (Millipore, Billerica, MA, US) with cut-off at 3, 10 and 30 kDa were used to separate proteins from the crude extract preparation according to the recommended conditions of the supplier. The killer activity concentrated 10-fold by ultrafiltration flow-through of each different cut-off was tested in WTM assays against *C. glabrata* NCYC 388.

#### 2.4.2. Effect of oenological parameters on killer toxin stability

The stability of the toxin was examined by testing the residual killer activity after 2 h incubation in each different condition. We tested the effect of different values of temperature (8, 15, 20, 26, 37, 50 °C), pH (3, 3.2, 3.6, 3.8, 4.4, 5, 6), ethanol concentration (0, 3, 6, 9, 12, 14, 16% v/v), glucose concentration (0, 10, 20, 210, 240, 280 g/L) and free SO<sub>2</sub> concentration (0, 25, 50, 75, 100, 150 ppm) employing the MWM against *C. glabrata* NCYC 388. YEPD was used as the general medium and different pH conditions were obtained using a citrate-phosphate buffer. After toxin incubation with sodium metabisulphite, the aliquots were extensively dialyzed against a 10 mM citrate-phosphate buffer (pH 4.5) and assayed for killer activity as previously described. The temperature and pH used for the assays at different ethanol, glucose and SO<sub>2</sub> were 20 °C and pH 4.5.

The stability of TdKT under oenological conditions was also examined by testing the residual activity after incubation (1:10 v/v) for 72 h at 20 °C in Sauvignon Blanc grape must (pH 3.7; initial sugar content, 14.6%; total SO<sub>2</sub>, 150 ppm) and in Malbec red wine (pH 2.2; ethanol 12% v/v; total SO<sub>2</sub>, 50 ppm). After toxin incubation, the aliquots were assayed for killer activity as previously described. All experiments were carried out in duplicate.

#### 2.4.3. Identification of cell wall putative binding sites for the killer toxins

In order to determine the primary toxin binding sites in the yeasts cell wall, WTM and MWM assays were performed, as mentioned above. Sensitive yeast *C. glabrata* NCYC 388 growing exponentially at 20 °C for 24 h (10<sup>8</sup> cells/mL) was treated with the killer toxins in the absence or presence of the following polysaccharides: laminarin, pustulan, curdulan, mannan, chitin (Sigma, St. Louis, MO, USA) and pullulan (Elicityl, Crolles, France). Polysaccharides (1 mg/μL) were added to the killer toxin extract (15 AU) and incubated for 4 h at 20 °C. The residual killer activities were tested against the sensitive strains by WTM and MWM.

#### 2.4.4. Determination of chitinase and β-glucanase activities

Chitinase activity was assayed by a DNS method (Miller, 1959) using 1% colloidal chitin (w/v) as substrate. One unit of chitinase activity (UCh) was defined as the amount of enzyme releasing 1 μmol of N-acetylglucosamine (GlcNAc) in the reaction mixture per hour. The standard curve was prepared using GlcNAc.

β-1,3-β-glucanase activity of the killer toxin was determined according to Wang et al. (2007) using 0.25% laminarin (w/v) as substrate. The

amount of reducing sugar in the reaction mixture was assayed by a DNS method (Miller, 1959). The standard curve was prepared using glucose. One unit of  $\beta$ -glucanase activity (UG) was defined as the quantity of enzyme releasing 1  $\mu$ mol of glucose per hour.

All assays were performed in duplicate.

#### 2.4.5. Effects on sensitive cells by fluorescence microscopy

**2.4.5.1. Detection of cell-wall damage.** Yeast cells growing exponentially at 20 °C for 24 h ( $1 \times 10^9$  cells/mL) on GPY were incubated with 6 AU of killer toxin crude extract for 24 h at 20 °C. After the treatment, cells were collected by centrifugation, washed twice with sterile water, resuspended in 30  $\mu$ L of calcofluor white stain (2  $\mu$ M, Sigma-Aldrich, Milan) and incubated at room temperature in the dark for 30 min. Cells were observed using an epi-fluorescence microscope (Nikon Eclipse 80i) with UV light excitation and emission at a wavelength range of 300 to 440 nm. Positive control treatment was performed by incubation for 3 h at 37 °C with 2 mg/mL of Zymolyase (Seikagaku Co) (Comitini et al., 2009).

**2.4.5.2. Detection of apoptotic and necrotic phenotypes.** The proportion of total dead cells was determined by propidium iodide (PI) staining. Yeast cells were incubated for 3 and 24 h with 6 AU of the toxin. After incubation, cells were washed, resuspended in a PBS buffer (g/L:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  6.1, NaCl 80, KCl 2 in distilled  $\text{H}_2\text{O}$ , pH 7.6) and stained with 50  $\mu$ g/mL of PI. Stained cells were detected and counted using an epi-fluorescence microscope at 530–610 nm emission wavelength range. A treatment with  $\text{H}_2\text{O}_2$  was used as a positive control and a treatment with  $\text{H}_2\text{O}$  as a negative control.

The effect of the toxin on nuclear morphology was assayed by the membrane-permeable DNA dye, Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich, Milan). Yeast cells were collected, washed with a PBS buffer and fixed with 70% v/v ethanol. The nuclei were stained with Hoechst 33342 for 10 min at a final concentration of 3  $\mu$ g/mL for 10 min at room temperature. Cells were examined with both bright field and fluorescence with excitation wavelength at 380 nm and emission at a wavelength range of 435–485 nm using an epi-fluorescence microscope. Apoptotic, necrotic and healthy cells phenotypes were identified.

#### 2.5. Statistical analyses

The data were subjected to the analysis of variance (ANOVA) and means were separated according to the Tukey test ( $P = 0.05$ ) using the STATISTICA data analysis software system, version 8 (Stat-Soft, 2007, France).

### 3. Results

#### 3.1. Selection of indigenous killer yeasts

In this work, the killer activities of a panel of 18 indigenous wine strains of *T. delbrueckii* were evaluated by QTM against 12 wine spoilage yeast strains belonging to the species *B. bruxellensis*, *P. guilliermondii*, *P. manshurica* and *P. membranifaciens*.

Although the complete panel had demonstrated killer activity against *C. glabrata* reference sensitive strain, only six strains (37%) were able to kill at least one spoilage yeast. In particular, the strain *T. delbrueckii* NPCC 1033 showed the greatest spectrum of action, as it was able to kill 83.3% of the spoilage yeast strains evaluated. These killer strains were then tested by QTM against six commercial starter strains of *S. cerevisiae*; all starter strains were resistant to the killer toxins of *T. delbrueckii* NPCC 1033 (data not shown).

#### 3.2. Time course and biochemical characterization of the killer toxins

In order to evaluate the potential biotechnological application of the killer toxins of the selected strain, their biochemical nature was studied. For that purpose *T. delbrueckii* NPCC 1033 was grown on a liquid medium, showing a maximum killer activity at the beginning of the stationary growth phase (Fig. 1). The maximum peak of killer activity showed a total protein concentration of 100  $\mu$ g/mL and approximately 70% inhibitory activity by MWM against the four spoilage yeasts (data not shown). The killer toxin produced was named TdKT (*T. delbrueckii* killer toxin).

To elucidate the biochemical properties of TdKT, particularly those related to their potential use in winemaking, the crude extracts obtained from stationary phase in *T. delbrueckii* cultures were subjected to a set of assays. Firstly, the stability of the killer activity under different physicochemical stress conditions typically present in wine fermentations (pH, temperature, ethanol, free sulphur dioxide and sugar concentration) was tested by MWM. TdKT was not affected at the highest sugar concentrations evaluated (up 250 g/L) and it was also stable in the presence of  $\text{SO}_2$ , the most important antimicrobial compound used in winemaking, in concentrations ranging from 0 (control) to 150 mg/L. The toxin was not affected by the ethanol concentrations evaluated (0–12% v/v) (Table 1), although it considerably lost its activity at temperatures above 37 °C and pH conditions above pH 4.5. Moreover, the activity persisted in the must at least for three days and, in the wine, at least for two days (Table 1).

The approximate molecular mass of TdKT was determined by filtering the culture supernatant. Only the protein fraction that was larger than 30 kDa showed killer activity, suggesting that the molecular mass of the killer protein was above 30 kDa (data not shown).

#### 3.3. Mode of action

##### 3.3.1. Molecular targets of TdKT

Competitive inhibition of killer action by different cell wall polysaccharides was evaluated with the aim of identifying the first binding site for TdKT on the envelope of the sensitive yeast (Table 2). The residual killer activity tested by means of the well test method (WTM) demonstrated that pustulan ( $\beta$ -1,6 glucan) completely inhibited TdKT activity, while chitin – as well as the mixed-linkage polysaccharides laminarin, mannan and pullulan – showed only partial competition with TdKT (Table 2). These results were partially confirmed in a liquid medium

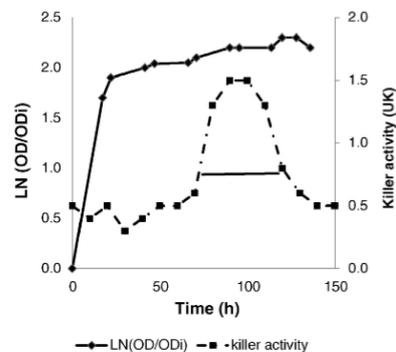


Fig. 1. Growth and killer toxin production kinetic during the batch cultivation of *T. delbrueckii* NPCC 1033. Growth was measured as  $\text{OD}_{600}$ ;  $\ln(\text{OD}/\text{OD}_i)$  where OD is the optical density at time t,  $\text{OD}_i$  is the initial optical density. The AU was determined against *C. glabrata* NCCY 388 by MWM. Line: pool fraction with killer activity.

**Table 1**

TdKT residual activity under physicochemical (sulphite, glucose, pH, ethanol and temperature) and environmental parameter (grape must and wine).

Enological stresses	Conditions	Relative killer activity (%)
Free SO <sub>2</sub>	0–160 ppm	100%
Glucose	0–300 g/L	100%
pH	3–4.5	100%
	5–6	75%
Ethanol	0–16% v/v	100%
Temperature	0–35 °C	100%
	40–60 °C	25%
Grape must	24 h	100%
	72 h	90%
Wine	1 h	100%
	24 h	50%

Residual activity was regarded as the percentage of activity remaining after incubation of the toxin under a specific parameter, activity at time zero was used as reference (see Section 2).

using the multiwell method (MWM). Once more, pustulan binds to the toxin and chitin only showed low competition (80% residual activity).

### 3.3.2. $\beta$ -glucanase and chitinase activities

Considering the previous result and to address the possibility that TdKT may exhibit some hydrolytic activity ( $\beta$ -glucanase and chitinase) as part of their mechanism of action, the toxin was incubated with the corresponding polymers (laminarin and chitin, respectively). As shown in Fig. 2,  $\beta$ -glucanase and chitinase activities were detected in the extracts and a direct relationship between  $\beta$ -glucanase, chitinase and killer activities was observed for TdKT.

### 3.3.3. Effects of TdKT on sensitive yeasts

In order to know whether the killer toxins treatment induces a cell-wall modification in the sensitive spoilage yeast, the cells were incubated with calcofluor white (CW) — a fluorescent dye that stains the polysaccharide chitin — and propidium iodide (PI) — that stains the nucleic acids of dead or damaged cells — providing an indirect measure of cell membrane integrity. Yeast exposed to enzymatic digestion with zymolyase (positive control) showed a reduction in the CW signal, and a discontinuous cell perimeter (Fig. 3C). The same appearance was observed on the surface of all spoilage yeasts treated with TdKT after 24 h of incubation, except for *B. bruxellensis*, which needed 48 h to develop the same phenotype (data not shown). In all yeast treated with TdKT, the PI staining showed an increase in the dead cell number after treatment (Fig. 3F).

Finally, the effect of TdKT on yeast viability and the mechanisms mediating cell death was also evaluated with fluorescence microscopy (Fig. 4). Sensitive yeasts were exposed to the killer toxin and the arising apoptotic or necrotic phenotypes were examined using the PI-Hoescht double-staining assay. Fig. 4B presents the percentages of apoptosis

and necrosis observed after toxin treatment on the sensitive reference yeast *C. glabrata* and the spoilage yeasts. TdKT generated a significant increase in the number of necrotic cells after 3 h of incubation, showing the highest percentages in *P. guilliermondii* and *P. membranifaciens*. Longer exposure to the same toxin (24 h) determined a significant increase in the amount of yeasts with apoptotic nuclei, with the highest percentages in *C. glabrata* and *B. bruxellensis*. These facts were associated with a decreased percentage of healthy yeasts at the same time point.

## 4. Discussion

Different wine spoilage yeasts which were able to produce high levels of volatile phenols (including *P. guilliermondii*, *P. manshurica* and *P. membranifaciens*) have been detected and characterized over the last few years in the Argentinean North-Patagonia (Sáez et al., 2010, 2011). *P. manshurica* and *P. membranifaciens* can grow in wine due to their resistance to ethanol content, while *P. guilliermondii* tolerates the elevated sugar concentration typically present in the fresh must, spoiling early stages of winemaking (Lopes et al., 2009). In this context, a broad-spectrum control system effective against a wide set of the spoilage yeast species colonizing both musts and wine is of great importance in this region. For this purpose, a panel of different killer strains of the wine killer species *T. delbrueckii* was tested against regional spoilage yeasts, and against the most common wine spoilage yeast species worldwide *B. bruxellensis*.

Although a variability in killer capacity of tested strains was observed within the strains *T. delbrueckii* NPCC 1033 was selected on the basis of its broad killer spectrum. Previous works carried out in our laboratory have also demonstrated that this killer strain could be a good candidate for wine spoilage yeast biocontrol. *T. delbrueckii* NPCC 1033 — isolate 24 in Sangorrín et al. (2008) — also showed killer activity against *H. uvarum* and *B. bruxellensis* and some other strains of *P. guilliermondii* and *P. membranifaciens* (Lopes and Sangorrín, 2010). In order to evaluate the potential biotechnological application of TdKT, the tolerance to winemaking stress factors, biochemical nature and mode of action on spoilage sensitive yeasts were studied.

The effect of different physicochemical stress conditions governing wine fermentation has been proposed as an important feature to be taken into account for winemaking killer toxin selection. Most reported killer toxins produced by wine yeasts have been evaluated for their stability during a few hours at ethanol, temperature and pH values typical of wine (Comitini et al., 2004a; Izgü and Altınbay, 2004; Mehlomakulu et al., 2014; Santos et al., 2009). Only some studies have evaluated the stability of killer toxins for 1–2 h in the presence of SO<sub>2</sub> (Comitini and Ciani, 2011; Santos et al., 2011), and only one study has reported the stability of TdKT against osmotic stress (higher sugar concentrations) (Mehlomakulu et al., 2014). TdKT was stable in must and wine for at least one day, as well as pH, temperatures, ethanol, glucose and sulphur dioxide concentration simulating several winemaking conditions, evidencing their potential utility.

In a first stage, killer toxins generally act by binding to cell wall receptors of the sensitive cells (Schmitt and Breinig, 2002). Receptor molecules for different killer toxins have been identified as  $\beta$ -glucans, mannans, chitin, etc. (Liu et al., 2013; Meinhardt and Klassen, 2009). The TdKT killer activity was prevented in this work by the presence of  $\beta$ -1,6-glucans and chitin which indicates that these polymers provide TdKT with putative binding sites on the wall of the sensitive target cell. The binding to these polymers could also be related to a hydrolytic activity as part of the toxin mechanism of action. Colussi et al. (2005) found a *Kluyveromyces lactis* killer toxin that had both chitin binding and chitinase activity. Additionally, strong  $\beta$ -1,3-glucanase activity has been associated with the primary killing mechanism of other killer toxins such as those produced by *Williopsis saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 (Guyard et al., 2002), *K. phaffii* (Comitini et al., 2004b) and *W. anomalous* (Grevesse et al., 2003; Izgü et al., 2007; Walker, 2011). In this context, the  $\beta$ -1,3-glucanase and chitinase activities of TdKT were

**Table 2**

Competition assays carried out with pure polysaccharides from yeast cell wall to detect putative binding sites of TdKT using two different methods (WTM and MWM).

Polysaccharides	Molecules evaluated	Main linkage type (monomer)	Residual killer activity (%)	
			WTM <sup>a</sup>	MWM <sup>b</sup>
Pullulan		$\alpha$ 1-4,1-6 (glucose)	83	100
Mannan		$\alpha$ 1-2, 1-3, 1-6 (mannose)	83	100
Laminarin		$\beta$ 1-3, 1-6 (glucose)	83	100
Curdian		$\beta$ 1-3 (glucose)	100	100
Chitin		$\beta$ 1-4 (N-acetylglucosamine)	67	80
Pustulan		$\beta$ 1-6 (glucose)	0	0
Control		–	100	100

<sup>a</sup> WTM: well test method.

<sup>b</sup> MWM: multiwell method.

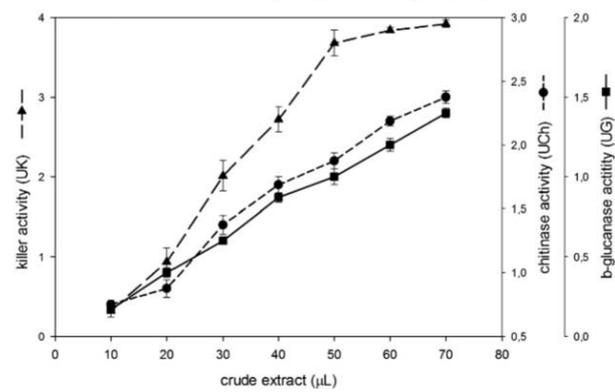


Fig. 2. Comparison of glucanase (—■—), chitinase (---●---), and killer toxin (---▲---) activities of TdKT. Vertical bars represent standard deviation of the mean.

investigated and confirmed in this work. TdKT killer activities tended to saturate when the amount of the toxin increased, which could be explained by the toxin association to the cell wall receptors. However,

the two enzymatic activities showed a catalyst behaviour as they increased proportionally with the amount of TdKT. The decrease in fluorescence of the cell wall in the presence of TdKT evidenced after CW

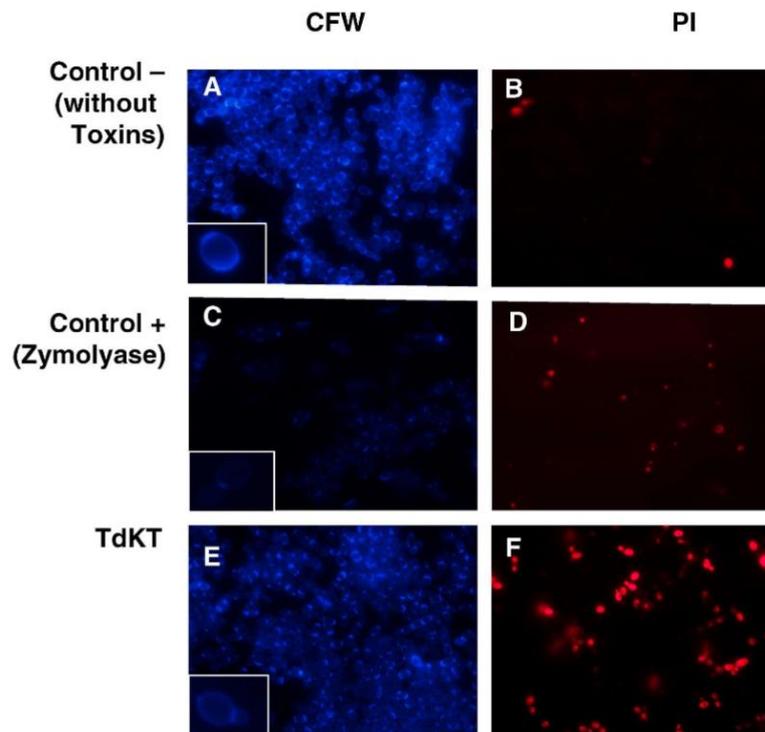
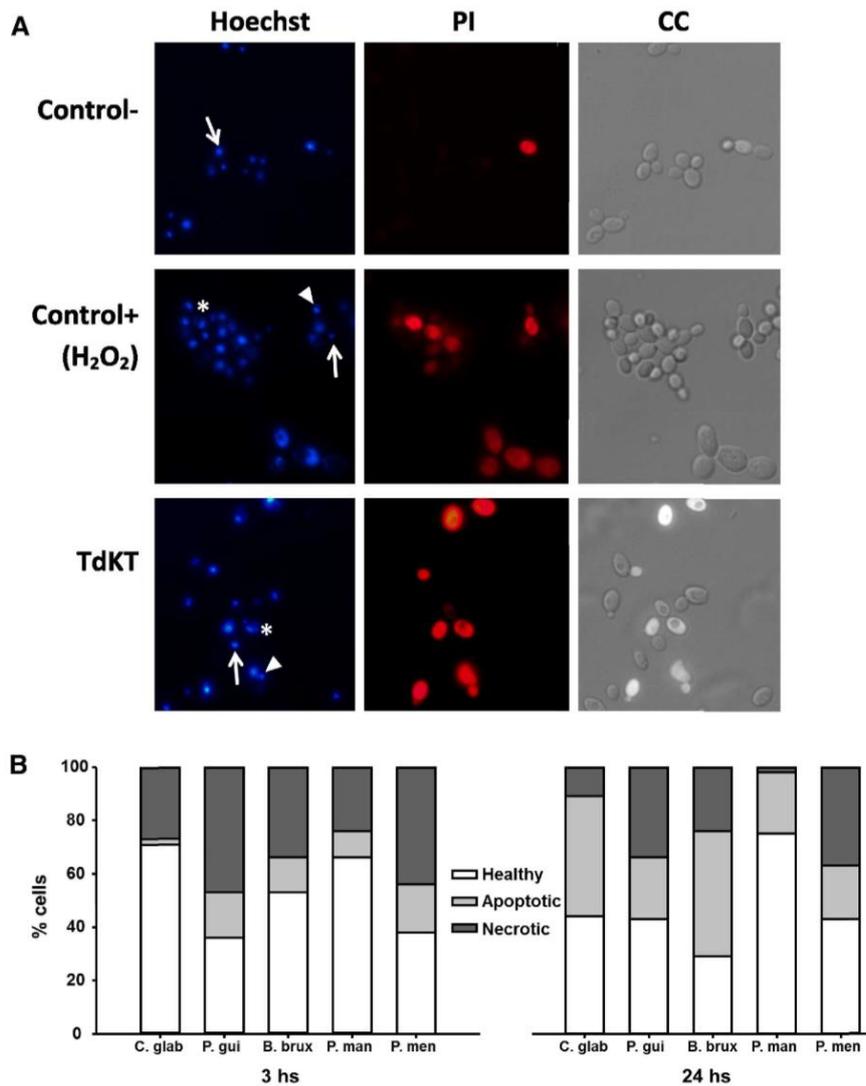


Fig. 3. Evaluation of damage of the yeast wall by double staining CFW-PI. A, B) Untreated yeast. C, D) Yeast after treatment for 2 h at 37 °C with zymolyase (1 mg/mL). E, F) Yeast treated for 2 h with 6 KU of partially purified TdKT. CPW = calcofluor white staining, PI = propidium iodine staining. Yeast strains: *C. glabrata*.



**Fig. 4.** Evaluation of yeast death pathways by fluorescence microscopy analysis. a) Propidium iodide-Hoechst 33258 double staining in yeast sensitive strains (*C. glabrata* NCYC 388) under TdKT treatment (6 UT, 24 h). Negative and positive controls were carried out with H<sub>2</sub>O or 15 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, respectively. Representative images of the same culture are paired in lines, for the columns Hoechst: Hoechst 33258 staining, PI: propidium iodide staining and CC: bright field image. In the first column, asterisks (\*) indicate fragmented nuclei for apoptotic cells; arrow heads (▲) indicate necrotic cells and arrows (→) indicate healthy cells. b) Percentages of healthy, apoptotic or necrotic phenotypes after treatments with TdKT (6 UT) for 3 h and 24 h at 20 °C. B. brux = *B. bruxellensis* INTA VC20, C. glab = *C. glabrata* NCYC 388, P. gui = *P. guilliermondii* NPCC 1055, P. mem = *P. membranifaciens* NPCC 1099 and P. man = *P. manshurica* NPCC 1038.

staining could be due to the chitinase and glucanase activities detected for the toxin. This effect produces a disruption in the cell wall structure as well as the appearance of necrosis or early apoptotic death processes, as evidenced by input PI.

Apoptotic and necrotic cell death in yeasts can be triggered by various factors such as H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, cell ageing, acetic acid or toxins (Carmona-Gutierrez et al., 2010; Reiter et al., 2005). Both mechanisms of cell death were detected in the different spoilage yeasts after incubation with TdKT. An

increase in necrosis cell death after 3 h treatment and apoptotic cell death after 24 h were observed, showing time dependent mechanisms of action and generating different percentages of the three phenotypes in each studied species (Fig. 4). According to our results, the toxin effects may present different strategies to kill different spoilage yeasts. Schmitt and Reiter (2008) and Santos et al. (2013), have defined that the killer toxins produced by *S. cerevisiae* and *P. membranifaciens* respectively may present different strategies to kill sensitive cells, inducing apoptosis or necrosis in susceptible target cells. Further research is needed to elucidate the regulation on yeast apoptosis in response to TdKT crude extracts and purified toxins as well. Purification strategies are currently in progress in our laboratory in order to confirm the results obtained with crude extracts.

In brief, the new TdKT exhibits a broad spectrum against wine spoilage yeasts and its biochemical characterization evidenced a molecular mass higher than 30 kDa. The toxin possesses glucanase and chitinase activities and it is stable in winemaking conditions. The TdKT putative mode of action includes binding to  $\beta$ 1-6 glucan and chitin in the initial interaction of the toxin with sensitive cells, with a potential degradation of these polysaccharides (due to their  $\beta$ -glucanase and chitinase activities), cell wall disruption (chitin decrease in microscopy evaluation) and finally, cell death by necrosis at initial time and by apoptosis at 24 h. The results presented in this study constitute the first step in the characterization and elucidation of the killing mechanism of a toxin produced by the *T. delbrueckii* yeast species.

TdKT has shown potential to control a broad spectrum of wine spoilage yeasts, without inhibiting the growth of the fermenting yeast *S. cerevisiae*. This killer toxin is resistant to stress conditions typically found at both initial and final stages of wine fermentation. The collective data presented in this study make TdKT interesting to control spoilage yeasts present during the whole winemaking process.

#### Acknowledgements

This work was supported by Universidad Nacional del Comahue (1147), ANPCyT (PICT 1674) and CONICET (PIP 470). J. Sáez and L. Villalba are the recipient of a fellowship from CONICET.

#### References

- Bauer, F.F., Pretorius, I.S., 2000. Yeast stress response, fermentation efficiency: how to survive the making of wine. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 21, 27–51.
- Carmona-Gutierrez, D., Eisenberg, T., Büttner, S., Meisinger, C., Kroemer, G., Madeo, F., 2010. Apoptosis in yeast: triggers, pathways, subroutines. *Cell Death Differ.* 17, 763–773.
- Ciani, M., Faticenti, F., 2001. Killer toxin of *Kluyveromyces phaffii* DBVPG 6076 as a biopreservative agent to control apiculate wine yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 3058–3063.
- Ciani, M., Maccarelli, F., 1998. Oenological properties of non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 14, 199–203.
- Colussi, P.A., Specht, C.A., Taron, C.H., 2005. Characterization of a nucleus-encoded chitinase from the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 2862–2869.
- Comitini, F., Ciani, M., 2011. *Kluyveromyces wickerhamii* killer toxin: purification and activity towards *Brettanomyces/Dekkera* yeasts in grape must. *FEMS Microbiol. Lett.* 316, 77–82.
- Comitini, F., De Ingeniis, J., Pepe, L., Mannazzu, L., Ciani, M., 2004a. *Pichia anomala* and *Kluyveromyces wickerhamii* killer toxins as new tools against *Dekkera/Brettanomyces* spoilage yeasts. *FEMS Microbiol. Lett.* 238, 235–240.
- Comitini, F., Di Pietro, N., Zacchi, L., Mannazzu, L., Ciani, M., 2004b. *Kluyveromyces phaffii* killer toxin active against wine spoilage yeasts: purification and characterization. *Microbiology* 150, 2535–2541.
- Comitini, F., Mannazzu, L., Ciani, M., 2009. *Tetrapispora phaffii* killer toxin is a highly specific  $\beta$ -glucanase that disrupts the integrity of the yeast cell wall. *Microb. Cell Factories* 8.
- De Ingeniis, J., Raffaelli, N., Ciani, M., Mannazzu, L., 2009. *Pichia anomala* DBVPG 3003 secretes a ubiquitin-like protein that has antimicrobial activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 1129–1134.
- Fleet, G.H., Heard, G.M., 1993. Yeast-growth During Fermentation. In: Fleet, G.H. (Ed.), *Wine Microbiology*. Biotechnology. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland, pp. 27–54.
- Grevesse, C., Lepoivre, P., Jijakli, M.H., 2003. Characterization of the exoglucanase-encoding gene PaEXG2 and study of its role in the biocontrol activity of *Pichia anomala* strain K. *Phytopathology* 93, 1145–1152.
- Guyard, C., Dehecq, E., Tissier, J.P., Polonelli, L., Dei-Cas, E., Cailiez, J., Menozzi, F., 2002. Involvement of  $\beta$ -glucans in the wide-spectrum antimicrobial activity of *Willopsis saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 killer toxin. *Mol. Med.* 8, 686–694.
- Izgü, F., Altınbay, D., 2004. Isolation and characterization of the K5-type yeast killer protein and its homology with an exo- $\beta$ -1,3-glucanase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68, 685–693.
- Izgü, F., Altınbay, D., Türeli, A.E., 2007. *In vitro* activity of panomyocin: a novel exo- $\beta$ -1,3-glucanase isolated from *Pichia anomala* NCYC 434, against dermatophytes. *Mycoses* 50, 1–34.
- Liu, L.G., Chi, Z., Wang, G.Y., Wang, Z.P., Li, Y., Chi, Z.M., 2013. Yeast killer toxins, molecular mechanisms of their action and their applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* 1–13 (Early Online).
- Lopes, C.A., Sangorrín, M.P., 2010. Optimization of killer assays for yeast selection protocols. *Rev. Argent. Microbiol.* 42, 298–306.
- Lopes, C.A., Rodríguez, M.E., Sangorrín, M.P., Querol, A., Caballero, A., 2007. Patagonian wines: implantation of an indigenous isolate of *Saccharomyces cerevisiae* in fermentations conducted in traditional and modern cellars. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 34, 139–149.
- Lopes, C.A., Sáez, J.S., Sangorrín, M.P., 2009. Differential response of *Pichia guilliermondii* spoilage isolates to biological, physical-chemical factors prevailing in Patagonian wine fermentations. *Can. J. Microbiol.* 55, 801–809.
- Mehliomakulu, N.N., Sebati, M.E., Divol, B., 2014. Characterization of novel killer toxins secreted by wine-related non-*Saccharomyces* yeasts and their action on *Brettanomyces* spp. *Int. J. Food Microbiol.* 188, 83–91.
- Meinhart, M., Klassen, R., 2009. Yeast Killer Toxins, Fundamentals and Applications. In: Anke, T., Weber, D. (Eds.), *Physiology, Genetics*, 1st edn The Mycota XV, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 107–130.
- Miller, C.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31, 426–428.
- Musmanno, R.A., Di Maggio, T., Coratza, G., 1999. Studies on strong, weak killer phenotypes of wine yeasts, production, activity of toxin in must, and this effect in mixed culture fermentation. *J. Appl. Microbiol.* 87, 932–938.
- Reiter, J., Herker, E., Madeo, F., Schmitt, M.J., 2005. Viral killer toxins induce caspase-mediated apoptosis in yeast. *J. Cell Biol.* 168, 353–358.
- Renauld, P., Miot-Sertier, C., Marullo, P., Hernández-Orte, P., Lonvaud-Funel, A., Bely, M., 2009. Genetic characterization, phenotypic variability in *Torulaspora delbrueckii* species and potential applications in the wine industry. *Int. J. Food Microbiol.* 134, 201–210.
- Sáez, J.S., Lopes, C.A., Kirs, V.C., Sangorrín, M.P., 2010. Enhanced volatile phenols in wine fermented with *Saccharomyces cerevisiae*, spoiled with *Pichia guilliermondii* and *Dekkera bruxellensis*. *Lett. Appl. Microbiol.* 51, 170–176.
- Sáez, J.S., Lopes, C.A., Kirs, V.C., Sangorrín, M.P., 2011. Production of volatile phenols by *Pichia manshurica*, *Pichia membranifaciens* isolated from spoiled wines, cellar environment in Patagonia. *Food Microbiol.* 28, 503–509.
- Sangorrín, M.P., Lopes, C.A., Graudo, M.R., Caballero, A.C., 2007. Diversity, killer behaviour of indigenous yeasts isolated from the fermentation vat surfaces in four Patagonian wineries. *Int. J. Food Microbiol.* 119, 351–357.
- Sangorrín, M.P., Lopes, C.A., Jofré, V., Querol, A., Caballero, A.C., 2008. Spoilage yeasts associated with Patagonian cellars. Characterization, potential biocontrol based on killer interactions. *World J. Microb. Biotechnol.* 24, 945–953.
- Sangorrín, M.P., Zajonkovsky, I., van Broock, M., Caballero, A., 2002. The use of killer biotyping in an old Patagonian winery yeast ecological survey. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 18, 115–120.
- Santos, A., Alonso, A., Belda, I., Marquina, D., 2013. Cell cycle arrest, apoptosis and two alternative mechanisms for PMK2 killer activity. *Fungal Genet. Biol.* 50, 44–54.
- Santos, A., Navascués, E., Bravo, E., Marquina, D., 2011. *Ustilago maydis* killer toxin as a new tool for the biocontrol of the wine spoilage yeast *Brettanomyces bruxellensis*. *Int. J. Food Microbiol.* 145, 147–154.
- Santos, A., San Mauro, M., Bravo, E., Marquina, D., 2009. PMK2, a new killer toxin from *Pichia membranifaciens*, and its promising biotechnological properties for control of the spoilage yeast *Brettanomyces bruxellensis*. *Microbiology* 155, 624–634.
- Schmitt, M.J., Breinig, F., 2002. The viral killer system in yeast and from molecular biology to application. *FEMS Microbiol. Rev.* 26, 257–276.
- Schmitt, M.J., Reiter, J., 2008. Viral induced yeast apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta* 1783, 1413–1417.
- Viljoen, B.C., 2006. Yeast Ecological Interactions: Yeast–Yeast, Yeast–Bacteria, Yeast–Fungi Interactions and Yeasts as Biocontrol Agents. In: Querol, A., Fleet, H. (Eds.), *Yeasts in Food and Beverages*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 83–110.
- Walker, G.M., 2011. *Pichia anomala*, cell physiology and biotechnology relative to other yeasts. *Antonie Van Leeuwenhoek* 99, 25–34.
- Wang, X., Chi, Z., Yue, L., Li, J., 2007. Purification and characterization of killer toxin from a marine yeast *Pichia anomala* YF07b against the pathogenic yeast in crab. *Curr. Microbiol.* 55, 396–401.



Contents lists available at ScienceDirect

## International Journal of Food Microbiology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro](http://www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro)

## Purification and characterization of *Saccharomyces eubayanus* killer toxin: Biocontrol effectiveness against wine spoilage yeasts



María Leticia Villalba<sup>a</sup>, María Belén Mazzucco<sup>a</sup>, Christian Ariel Lopes<sup>a,b</sup>, María Angélica Ganga<sup>c</sup>, Marcela Paula Sangorrín<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Instituto de Investigación y Desarrollo en Ingeniería de Procesos, Biotecnología y Energías Alternativas (PROBIEN, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas - Universidad Nacional del Comahue), Buenos Aires 1400, 8300 Neuquén, Argentina

<sup>b</sup>Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Comahue, Ruta 151 km 12-5, Cinco Saltos, Río Negro, Argentina

<sup>c</sup>Laboratorio de Biotecnología y Microbiología Aplicada, Departamento en Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Facultad Tecnológica, Universidad de Santiago de Chile, Alameda 3363, Estación Central, Santiago, Chile

## ARTICLE INFO

**Keywords:**  
*Saccharomyces eubayanus*  
 Killer toxin  
 Biocontrol  
 Wine  
 Spoilage yeasts  
 Purification

## ABSTRACT

Microbiological contamination by spoilage yeasts species are frequent during winemaking, and biological control using antagonistic yeasts is considered a more beneficial alternative to conventional synthetic antimicrobials. *Saccharomyces eubayanus* killer toxin (SeKT) was produced and purified in a synthetic optimized medium. Purification procedure allowed the identification of SeKT as protein with an apparent molecular mass of 70 kDa and activity at physicochemical conditions suitable for winemaking process. Purified SeKT reduced the levels of volatile phenols produced by the spoilage yeasts *Brettanomyces bruxellensis*, *Pichia membranifaciens*, *Meyerozyma guilliermondii* and *Pichia manshurica* in wine-like medium. The putative mode of action of SeKT on sensitive yeast strains comprises cell wall disruption through  $\beta$ -glucanase and chitinase activities as well as necrotic and apoptotic death in a toxin dose dependent manner. Thus, SeKT appears to be a promising biocontrol agent against spoilage yeasts during wine aging and storing.

## 1. Introduction

Killer toxins are proteins that are often glycosylated and bind to specific receptors on the surface of their target microorganism, which is then killed through a target-specific mode of action. The killer character is widespread among yeasts. Such yeasts secrete a killer protein, although they are immune to their own toxins (Liu et al., 2013; Mannazzu et al., 2019). During the last 50 years, since the discovery of *Saccharomyces cerevisiae* killer character (Bevan and Makower, 1963), killer toxins activity has been reported in > 100 yeast species, several of them with a potential application in food industries (Çorbacı and Uçar, 2018; Mannazzu et al., 2019; Villalba et al., 2016a). In particular, the application of killer toxins in winemaking is an interesting biocontrol tool in helping to improve wine quality by removing undesirable spoilage yeasts and reducing the amount of certain chemistry preservatives (Berbegal et al., 2018; Escott et al., 2017; Mehlomakulu et al., 2014). Among the toxins produced by non-*Saccharomyces*, CpKT obtained from *Candida pyralidae* (Mehlomakulu et al., 2017), PiKt from *Wickerhamomyces anomalus* (Oro et al., 2016) and KwKt from

*Kluyveromyces wickerhamii* (Oro et al., 2016) are effective against *Brettanomyces bruxellensis*, the principal wine spoilage yeast present during wine fermentations and in the post-fermentative aging processes. In particular, killer toxins produced by *Torulospira delbrueckii* have shown a broad killer spectrum against wine spoilage yeasts (Ramírez et al., 2015; Velázquez et al., 2015; Villalba et al., 2016b). The well characterized PMKT is obtained from *P. membranifaciens* and proved to have fungicidal activity against *B. bruxellensis* (Santos et al., 2009) and also other spoilage yeasts present in grapes (Alonso et al., 2015; Santos and Marquina, 2004), therefore, it extends its application to the early stages of winemaking.

The molecular mechanisms of killer toxin action have been extensively studied. The inhibition of synthesis or hydrolysis of cell-wall components, ion leakage through the cytoplasmic membrane and DNA synthesis blocking and damaging accompanied with toxin-induced necrosis or apoptosis are well characterized (Belda et al., 2017; Schmitt and Breinig, 2006).

Several killer toxin producer yeasts have been isolated from grape must by our research group (Lopes et al., 2009; Saez et al., 2011;

\* Corresponding author at: PROBIEN (CONICET-UNCo), Buenos Aires 1400, 8300 Neuquén, Argentina.

E-mail addresses: [leticia.villalba@probien.gob.ar](mailto:leticia.villalba@probien.gob.ar) (M.L. Villalba), [clopes@conicet.gov.ar](mailto:clopes@conicet.gov.ar) (C.A. Lopes), [angelica.ganga@usach.cl](mailto:angelica.ganga@usach.cl) (M.A. Ganga), [sangorrimarcela@conicet.gov.ar](mailto:sangorrimarcela@conicet.gov.ar) (M.P. Sangorrín).

<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108714>

Received 28 November 2019; Received in revised form 26 May 2020; Accepted 2 June 2020

Available online 05 June 2020

0168-1605/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

Sangorrín et al., 2001). *Saccharomyces eubayanus* was described not too long ago in Patagonia (Libkind et al., 2003). The killer capability of *S. eubayanus* was reported for the first time in a previous work from our laboratory (González Flores et al., 2017) and its effectiveness to inhibit the growth of wine spoilage yeasts was demonstrated employing toxin extracts (Mazzucco et al., 2019).

Species such as *B. bruxellensis*, *P. membranifaciens*, *P. manshurica* and *M. guilliermondii* are frequently responsible of wine spoilage associated with the production of phenolic aromas (Saez et al., 2011; Sangorrín et al., 2013; Wedral et al., 2010). Volatile phenols like 4-vinylphenol (4-VP), 4-ethylphenol (4-EP), 4-vinyguaiaicol (4-VG) and 4-ethyguaiacol (4-EG) produced by *B. bruxellensis* and other yeasts are aromatic compounds that, above certain levels, negatively affect wine quality (Loureiro and Malfeito-Ferreira, 2003; Wedral et al., 2010). Some wine spoilage yeasts degrade p-coumaric and ferulic (cinnamic acids contained in grape juice and wine) into these volatile phenols (Lopes et al., 2009; Sangorrín et al., 2013; Suárez et al., 2007). The sensorial threshold of 4-EP is 230 µg/L. Higher concentrations of this compound in red wine are associated with unpleasant aromas interpret as "leather", "horse sweat", "stable" or "varnish" (Chatonnet and Dubourdieu, 1995). The presence of > 47 µg/L of 4-EG in wine has been associated with "bacon" or "smoked" expressions (Chatonnet and Dubourdieu, 1995). Although the influence of vinylphenols is usually ignored, concentrations > 600 µg/L of 4-VP or than 770 µg/L of a mixture of 4-VG/4-VP (1,1) have been associated with phenolic and pharmaceutical off-odors in wines (Chatonnet and Dubourdieu, 1995; Duckitt, 2012).

The use of killer toxins as biocontrol agents in winemaking is considered to be an improved and necessary alternative to conventional synthetic antimicrobials as sulphur dioxide (Divol et al., 2012); however, little progress has been made in this issue mainly due to toxin instability in winemaking conditions (Escott et al., 2017; Pérez et al., 2001).

This paper focuses on the optimized production and characterization of a killer toxin from *S. eubayanus* (SeKT) to elucidate its possible role as a natural antimicrobial agent for the biocontrol of spoilage yeasts during wine aging and storing.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Yeast strains

*Saccharomyces eubayanus* NPCC 1302 is the killer toxin producer yeast (González Flores et al., 2017; Mazzucco et al., 2019; Rodríguez et al., 2014). *Brettanomyces bruxellensis* (NRRL-411), *Pichia manshurica* (NPCC 1038), *Pichia membranifaciens* (NPCC 1099) and *Meyerozyma guilliermondii* (NPCC 1070) are wine spoilage yeasts. *Candida glabrata* (NPCC 104) is the sensitive reference strain use in killer assays. All strains are deposited in the North Patagonian Culture Collection (NPCC), Neuquén, Argentina. Yeasts were maintained in the GPY-agar medium (20 g/L glucose, 10 g/L peptone, 5 g/L yeast extract and 20 g/L agar, pH 6.0). The medium was supplemented with 5 g/L of calcium carbonate for *B. bruxellensis* strain conservation.

### 2.2. Optimization of *S. eubayanus* killer toxin production

For Central Composite Design assay, cultures were performed in 250 mL Erlenmeyer flask containing 100 mL YM broth as a base medium (% v/v: 0.3 yeast extract, 0.5 peptone, 0.3 malt extract, 1 glucose, pH 4.6) plus triton X-100 and glycerol according to the design. Inoculum of *S. eubayanus* was prepared from a 25 °C overnight culture in GPY agar and inoculated to each flask at a final concentration of approximately 10<sup>5</sup> cell/mL. Yeast growth was evaluated by measuring DO<sub>600</sub>. Aliquots of the cultures (crude extract) were collected at the beginning of the stationary phase, centrifuged (5000g for 10 min at 4 °C) and the supernatants were sterilized using a 0.22 µm pore size membrane filters (Millipore). Killer activity was measure in the aliquots

**Table 1**

Central Composite Design and response observed for SeKT production.

Run	Triton X-100 (% v/v)	Glycerol (% v/v)	Temperature (°C)	Stirring (rpm)	Killer activity (KU/mL)
	(CD)	(CD)	(CD)	(CD)	(Response) <sup>a</sup>
1	0.2 (+1)	20 (+1)	27 (+1)	90 (-1)	10.12
2	0.2 (+1)	20 (+1)	13 (-1)	90 (-1)	6.99
3	0.2 (+1)	5 (-1)	27 (+1)	150 (+1)	30.73
4	0 (-1)	20 (+1)	13 (-1)	150 (+1)	18.49
5	0.2 (+1)	5 (-1)	13 (-1)	150 (+1)	36.25
6	0 (-1)	5 (-1)	27 (+1)	90 (-1)	3.14
7	0 (-1)	20 (+1)	27 (+1)	150 (+1)	9.89
8	0 (-1)	5 (-1)	13 (-1)	90 (-1)	5.59
9	0 (-1)	12.5 (0)	20 (0)	120 (0)	15.44
10	0.2 (+1)	12.5 (0)	20 (0)	120 (0)	4.39
11	0.1 (0)	5 (-1)	13 (-1)	120 (0)	46.7
12	0.1 (0)	20 (+1)	20 (0)	120 (0)	7.71
13	0.1 (0)	12.5 (0)	13 (-1)	120 (0)	9.24
14	0.1 (0)	12.5 (0)	27 (+1)	120 (0)	19.55
15	0.1 (0)	12.5 (0)	20 (0)	90 (-1)	3.6
16	0.1 (0)	12.5 (0)	20 (0)	150 (+1)	9.36
17	0.1 (0)	12.5 (0)	20 (0)	120 (0)	23.17
18	0.1 (0)	12.5 (0)	20 (0)	120 (0)	31.95

<sup>a</sup> The production of killer toxins (KU) was monitored at the beginning of the exponential phase of the cultivation of the producing strain by means of the multiwell method (MWM). Coded values (CD) for each parameter were expressed between brackets. R<sup>2</sup> = 0.9. Lack of fit: Not significant.

by means of the multiwell method (MWM).

A face-centred Central Composite Design (Myers and Montgomery, 2002) was employed for the evaluation of four physicochemical variables that could significantly affect SeKT production. Triton X-100 and glycerol concentration, temperature and stirring were tested at three levels. Relationships between real and coded values are shown in Table 1. In developing the regression equation, the test variables were coded according to the equation:

$$x_i = Xi - X0/\Delta Xi \quad i = 1...n$$

where  $x_i$  is the independent variable coded value,  $X_i$  the independent variable real value on the centre point and  $\Delta X_i$  the value of step change of variable.

Two replicates were included as centre points and, thus, a total of 18 experiments were employed (Table 1). Regression coefficients are interpreted as the increase or decrease in the response, when the factor changes by one unit. The coefficient of determination R<sup>2</sup> (percentage of variability of the response explained by the model) adjusted above 0.9 and the not significant lack of fit validated the model. The statistical analysis was performed by means of ANOVA test using STATISTICA 8.0 (StatSoft, Tulsa, OK, USA), considering significant  $p < 0.05$ .

### 2.3. Purification of *S. eubayanus* killer toxin

*S. eubayanus* was cultured in 2000 mL Erlenmeyer flask containing 1000 mL of the optimized YM broth and culture conditions. The supernatant of the yeast culture at the beginning of the stationary phase was concentrated by tangential flow with 30-kDa cut-off membrane (Vivaflow 50R, Sartorius, US). The concentrated fraction was applied onto a pustulan-coupled Sepharose Chromatography. Pustulan-Sepharose affinity matrix was prepared by coupling 75 mg pustulan (Oligotech, France) to 2 g epoxy-activated Sepharose 6B (GE Healthcare, US). The column was eluted with 0.15 M NaCl. Protein content was evaluated in 1.5 mL aliquots by measuring OD<sub>280</sub>. The eluted fraction was concentrated by ultrafiltration flow with 50-kDa cut-off membrane (AMICON Ultra Centrifugal Filters, Millipore, US). The concentrated toxin was filter-sterilized through 0.22 µm pore-size membrane filters (Millipore) and stored at -20 °C until its use for killer

activity detection. The protein concentration was measured by Lowry et al. (1951).

#### 2.4. Measurement of killer toxin activity

**Qualitative method (QLM):** Antagonistic activity was evaluated using the seeded-agar-plate technique described by Lopes and Sangorin (2010).

**Multiwell method (MWM):** Killer toxin activity was determined by means of the multiwell method (MWM) using YM medium according to Villalba et al. (2016b). One unit of toxin activity (KU) was calculated as the volume of SeKT extract that inhibits 50% of the sensitive strain growth (DO 640 nm) at 20 °C after 48 h of incubation. Assay was carried out in triplicate.

The strain *C. glabrata* NCC 104 was used as sensitive reference yeast for both, QLM and MWM methods.

#### 2.5. Characterization of SeKT

##### 2.5.1. Molecular weight estimation

Both, the purity and molecular mass of the killer toxin were evaluated in the concentrated fractions with killer activity by means of sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (Laemmli, 1970) under reducing conditions on 12% polyacrylamide gel. The proteins were stained with colloidal Coomassie blue G-250 (Sigma-Aldrich) (Weiss et al., 2009) in 20% v/v methanol, 17% m/v (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2% v/v H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>.

##### 2.5.2. Killer toxin stability under oenological parameters

The stability of the purified toxin was examined by testing the residual killer activity after 2 h incubation in each different condition using the MWM method. YM was used as the general base medium, conditioned to obtain all individual conditions. Different values of temperature (4 to 50 °C), pH (3.2 to 6 using a citrate-phosphate buffer), ethanol concentration (0 to 16% v/v), glucose concentration (0 to 280 g/L) and free SO<sub>2</sub> concentration (0 to 150 ppm using sodium metabisulphite) were tested. Temperature and pH values were fixed at 20 °C and 4.5, respectively, to examine the stability of the toxin in different ethanol, glucose and SO<sub>2</sub> concentrations.

##### 2.5.3. Enzymatic activity

Chitinase activity of the purified killer toxin was determined according to Villalba et al. (2016b) using colloidal chitin (Sigma-Aldrich) as substrate. One unit of chitinase activity (UCh) was defined as the amount of enzyme releasing 1 μmol of N-acetylglucosamine (Sigma-Aldrich) in the reaction mixture per hour. β-1,3-D-glucanase activity of the purified killer toxin was determined according to Wang et al. (2007) using 0.25% w/v laminarin (Sigma-Aldrich) as substrate and glucose for the standard curve. One unit of β-glucanase activity (UG) was defined as the quantity of enzyme releasing 1 μmol of glucose per hour. The DNS method (Miller, 1959) was used to determine the amount of reducing sugar in the reaction mixture for both, chitinase and glucanase activities. All assays were performed in duplicate.

##### 2.5.4. Determination of SeKT activity in the presence of different polysaccharides

*C. glabrata* growing exponentially (10<sup>6</sup> cells/mL) was treated with toxin extracts (15 KU) in presence (1 mg/μL) or absence of the polysaccharides laminarin, pustulan, curdulan, mannan, chitin (Sigma-Aldrich) or pullulan (Elicityl). After 4 h of incubation at 20 °C killer activity was measured in the toxin extracts by MWM assay.

#### 2.6. Effects of SeKT on sensitive cells

##### 2.6.1. Detection of cell-wall damage

*C. glabrata* growing exponentially (10<sup>6</sup> cells/mL) were incubated

with 1 or 2 KU of purified SeKT for 3 or 24 h on GPY at 20 °C with 1 or 2 KU of purified SeKT. After incubation, cells were collected by centrifugation, washed with sterile water and incubated in 30 μL of calcofluor white stain (2 μM, Sigma-Aldrich) at room temperature in the dark for 30 min. Cells were observed using an epi-fluorescence microscope (Nikon Eclipse 80i) with u.v. light excitation and emission at a wavelength range of 300 to 440 nm. Positive control: incubation with 2 mg/mL of Zymolyase (Seikagaku Co) for 3 h at 37 °C (Comitini et al., 2009).

##### 2.6.2. Detection of apoptotic and necrotic phenotypes

*C. glabrata* growing exponentially (10<sup>6</sup> cells/mL) were incubated with 1 or 2 KU of the purified toxin for 3 and 24 h. After incubation, cells were washed, resuspended in a PBS buffer and stained with 50 μg/mL of PI (Sigma-Aldrich). Cells were observed using an epifluorescence microscope at 530–610 nm emission wavelength range. The stained cells were counted and the percentage of dead cells was determined. Positive control treatment: incubation for 3 h at 37 °C with 15 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. To evaluate the effect of the toxin on nuclear morphology, sensitive yeast cells were incubated with the purified toxin as previously, washed, fixed with 70% v/v ethanol and stained with 3 μg/mL of the membrane-permeable DNA dye, Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) for 10 min at room temperature. Cells were observed with bright field and using an epifluorescence microscope at 435–485 nm emission wavelength range. Apoptotic, necrotic and healthy cells phenotypes were identified.

#### 2.7. Effects of *S. eubayanus* killer toxin against spoilage yeasts

The effect of purified SeKT against the spoilage yeasts *B. bruxellensis*, *P. membranifaciens*, *M. guilliermondii* and *P. manshurica* was assayed by means of both, growth determination using MWM method (see Section 2.4) and through the detection of volatile phenols production after incubation with SeKT in a wine-like assay. Wine-like assay was carried out in 22 mL screw cap tubes containing 1.5 mL of a medium containing glucose 0.6 g/L, fructose 1.2 g/L, trehalose 0.3 g/L, yeast extract 0.3 g/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 g/L, MgSO<sub>4</sub> 0.4 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 g/L, pH 3.8, biotin 0.25 mg/L, thiamine 4.5 μg/L, ethanol 10% v/v, sterilized and supplemented with 100 mg/L of p-coumaric acid (Sigma-Aldrich) according to Saez et al. (2011). Spoilage yeasts growing exponentially (10<sup>5</sup> cells/mL) were inoculated separately with 0, 2 or 4 KU of the purified toxin and incubated at 20 °C during 30 or 100 days without agitation. After incubation, volatile phenols 4-vinylphenol (4-VP), 4-ethylphenol (4-EP), 4-vinylguaiacol (4-VG) and 4-thylguaiacol (4-EG) were analyzed using the method described by (Ross et al., 2009). Chromatographic separation was performed by HPLC (Waters Corporation, Milford, MA, USA) using a u.v.-visible detector. Millennium software (Waters, Oshawa, Canada) was employed for chromatographic control. The separations were performed on a reversed phase column C18 (150 × 4.6 mm). The elution gradient was acetonitrile (5 min 30%, 10 min 40%, 30 min 60%). pH was fixed at 3.5 adding formic acid. The flow was fixed at 1 mL/min. Quantification was performed at 230 nm by comparison against an external phenols standard (Sigma-Aldrich) (25, 50 and 100 ppm).

#### 2.8. Statistical analyses

The data were analyzed by analysis of variance (ANOVA) and the mean values were compared with Tukey's test ( $\alpha = 0.05$ ) using the STATISTICA data analysis software system (Stat-soft, 2007, France).

## 2.9. Accepted STAR methods

Resource	Source	Identifier
Chemical		
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		
1,3-D		
4-ethylphenol		
4-VG		
4-vinylguaiaacol		
4-vinylphenol		
4-VP		
acetonitrile		
acridine orange		
calcium carbonate		
calcofluor white		
Coomassie blue G-250		
epoxy-		
ethanol		
formic acid		
glycerol		
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>		
Hoechst 33342		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		
methanol		
MgSO <sub>4</sub>		
N-acetylglucosamine		
N-acetylglucosamine		
NaCl		
NPCC		
p-coumaric acid		
phenols		
phosphate		
PI		
Propidium Iodide		
SO <sub>2</sub>		
sodium dodecyl sulphate		
sodium metabisulphite		
thiamine		
trehalose		
Waters		
X-100		
ProteinPeptide		
PI		

## 3. Results

## 3.1. Purification of SeKT

The main effect of triton X-100 and glycerol concentrations, temperature and stirring, was evaluated by means of a DCC design in order to find out the combination of variables levels which optimize SeKT production (Table 1). The ANOVA analysis showed that none of the tested variables had significant influence on SeKT production (see Table 1 in Supplementary material). Values of 0.1% triton X-100, 5% glycerol, 13 °C and 120 rpm were selected as YM optimized medium since this condition presented the highest SeKT production (experimental run number 11: 46.7 KU/mL).

SeKT was concentrated and purified by successive steps of tangential flow, ultrafiltration and affinity chromatography. We have investigated the possibility that SeKT interacts with cell wall components as polysaccharides and mannoproteins. SeKT binding to primary components of the yeast cell wall was tested via competitive inhibition of the killing process by different cell-wall polysaccharides (Table 2). The decrease in the residual killer activity demonstrated that pustulan inhibited 41.4% of SeKT activity. Laminarin, curdulan, chitin and pustulan showed less partial competition with SeKT, whereas pullulan and mannan did not evidence competition capacity.

Based on these results, a pustulan-coupled Sepharose column was employed for the affinity chromatography step (Fig. 1A). Fractions obtained from the purification steps were assayed for toxin activity

Table 2

Competition assays carried out with synthetic polysaccharides from yeast cell wall to detect putative binding sites of SeKT.

Polysaccharides	Main linkage type (monomer)	Residual killer activity (%) <sup>a</sup>
Pullulan	α 1-4,1-6 (glucose)	100
Mannan	α 1-2, 1-3, 1-6 (mannose)	100
Laminarin	β 1-3, 1-6 (glucose)	89.2
Curdulan	β 1-3 (glucose)	66.3
Chitin	β 1-4 (N-acetylglucosamine)	72.11
Pustulan	β 1-6 (glucose)	58.57
Control	-	100

<sup>a</sup> Residual killer activity was detected by means of the multiwell method (MWM).

(Table 3). The killer toxin was purified with a 28-fold increase in specific activity and a yield of 7.1% of the total activity found in the crude extract (Table 3). The purification procedure resulted in a toxin preparation that contains a single protein with a relative molecular mass of 70 kDa (Fig. 1B).

## 3.2. Characterization of SeKT

## 3.2.1. β-Glucanase and chitinase activities of SeKT

To address the possibility that SeKT exhibits some hydrolytic activity as part of its mechanism of action, β-glucanase and chitinase activities were assessed. Purified SeKT showed both, chitinase and β-glucanase activities: specific activity 0.95 nmol N-acetylglucosamine mg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> and 21.6 nmol glucose mg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>, respectively.

## 3.2.2. SeKT effects on sensitive yeasts

The effects of SeKT on the sensitive yeast *C. glabrata* growth were tested at two different toxin concentrations. Fig. 2 shows that the population of *C. glabrata* declined considerably after treatment with increasing concentrations (1 KU and 2 KU) of SeKT in comparison to the control without toxin. At the maximum SeKT concentration, a 100% and 78.5% reduction of *C. glabrata* population was detected during 3 and 24 h of growth, respectively. No significant differences were detected for 2 KU of SeKT between 0 and 24 h of incubation, indicating that the total antagonist effect of the toxin persists until this time. However, a 6-fold and 4-fold increase in *C. glabrata* growth was detected after 48 h of incubation with 1 and 2 KU, respectively, in comparison to 0 h of the same SeKT concentration (Fig. 2).

In order to study the mode of SeKT-induced cell killing, toxin-treated cells were stained with Hoechst 33258, Calcofluor white (CW), and Propidium Iodide (PI), and fluorescence microscopy was performed after 3 and 24 h. These time values were selected because the greatest killer activity was observed (Fig. 2). After incubation with CW, a fluorescent dye that selectively links chitin in the cell wall, untreated sensitive yeast cells (negative control) showed an intense and continuous fluorescence perimeter (Fig. 3A). In contrast, the fluorescence was significantly reduced and not well localized in the sensitive yeast incubated with 4 KU of SeKT (Fig. 3B). Incubation with zymolyase (positive control) produced a greater reduction in the CW signal and a discontinuous cell perimeter was evidenced.

Both, the effect of SeKT on sensitive yeasts viability as well as the mechanisms mediating cell death were also evaluated by fluorescence microscopy. The effect of the toxin on nuclear morphology was assayed by the membrane-permeable DNA dye, Hoechst. Simultaneously, membrane integrity was followed by determining the fluorescence of SeKT-treated cells labelled with the membrane-not permeable PI dye. Co-staining with these two fluorophores allowed discrimination between apoptotic cells exhibiting fragmented nuclei and necrotic cells exhibiting not fragmented nuclei and PI positive (Fig. 3A). Treatment of sensitive yeasts with low concentrations of toxin (1 KU) resulted in a moderate rate of cell death by necrosis (18.8%) and apoptosis (15.4%)

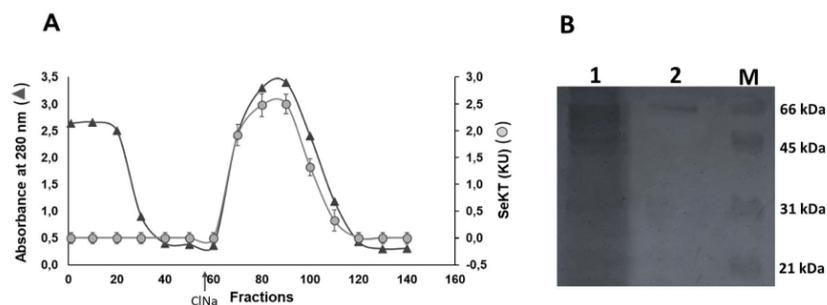


Fig. 1. A) Elution profile of SeKT on a pustulan-coupled Sepharose affinity chromatography column and its killer activity against *C. glabrata*. B) SDS-PAGE and Coomassie colloidal blue staining: crude extract (lane 1) and sample collected after affinity chromatography (lane 2). Lane M, protein standard weight marker.

after 3 h of incubation (Fig. 3C). Longer exposure to the toxin (24 h) showed a greater increase in the amount of apoptotic (40.6%) and necrotic (32.9%) phenotypes. The highest SeKT concentration (2 KU) produced a mainly necrotic phenotype on sensitive yeasts (91% after 24 h of incubation) (Fig. 3C).

### 3.2.3. Oenological application of SeKT

The potential use of SeKT as a biocontrol agent in wine was addressed through different trials. Firstly, SeKT stability was tested under physicochemical stress conditions typically present in wine and wine fermentations (pH, temperature, ethanol, free sulphur dioxide and sugar concentration) (Table 4). SeKT was not affected by the highest glucose and ethanol concentrations evaluated (300 g/L and 16% v/v, respectively) and it was also stable (90.2% residual activity) in the presence of  $\text{SO}_2$ , the most important antimicrobial compound used in winemaking, in concentrations ranging from 0 to 100 mg/L. However, SeKT considerably lost its activity at temperatures above 26 °C and pH conditions above pH 5 (Table 4).

In order to study the antagonistic activity of purified SeKT against wine spoilage yeasts growth, SeKT was assayed against *B. bruxellensis*, *P. membranifaciens*, *M. guilliermondii* and *P. manshurica* by means of MWM, and a high inhibition of spoilage yeasts growth was detected (see Fig. 1 in Supplementary material). Furthermore, the capacity of SeKT to inhibit spoilage yeasts growth assessed through the measurement of volatile phenols levels produced by the spoilage yeasts also evidenced significant differences (Table 5). In fermentations assays inoculated with *M. guilliermondii* or *P. membranifaciens* without SeKT, 4-vinylphenol (4-VP) was produced in levels between 35.2 and 80.2 mg/L, respectively, after 100 h of incubation. High levels of 4-ethylphenol (126 mg/L) or 4-EG (21.8 mg/L) were detected after the same period of time for *B. bruxellensis* and *P. manshurica*, respectively. Cultivation with 2 KU of SeKT inhibited *M. guilliermondii*, *P. membranifaciens*, *P. manshurica* and *B. bruxellensis* volatile phenols production in 94, 100, 78 and 89%, respectively, after 100 days of cultivation. Cultivation with a higher toxin concentration (4 KU) produced a greater decrease in volatile phenols levels.

Table 3

Summary of the purification procedures for the killer toxin from *S. eubayanus*.

Steps <sup>a</sup>	Total volume (mL)	Total protein (mg)	Total activity (KU)	Specific activity (KU/mg)	Yield (%)	Factor
Crude extract	922	5825	4434	1	100	1
Tangential flow (> 30 kDa)	147	841	3265	4	73.6	5.1
Affinity chromatography <sup>b</sup>	59	200	962	5	21.7	6.3
Ultrafiltration (> 50 kDa)	5	15	317	21	7.1	28.0

<sup>a</sup> Purification procedure are described in Materials and methods; 1 KU, the volume of toxin extract that inhibits 50% of the sensitive strain growth.

<sup>b</sup> Pustulan-coupled Sepharose Affinity Chromatography column.

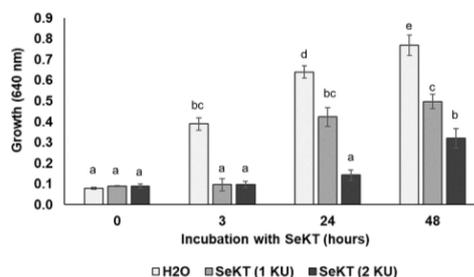
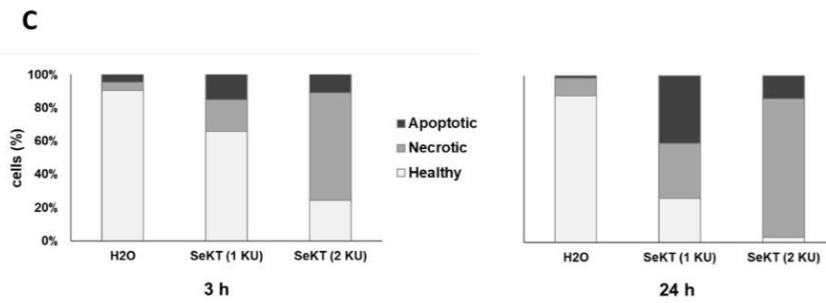
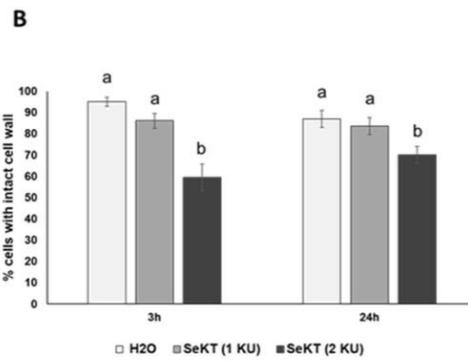
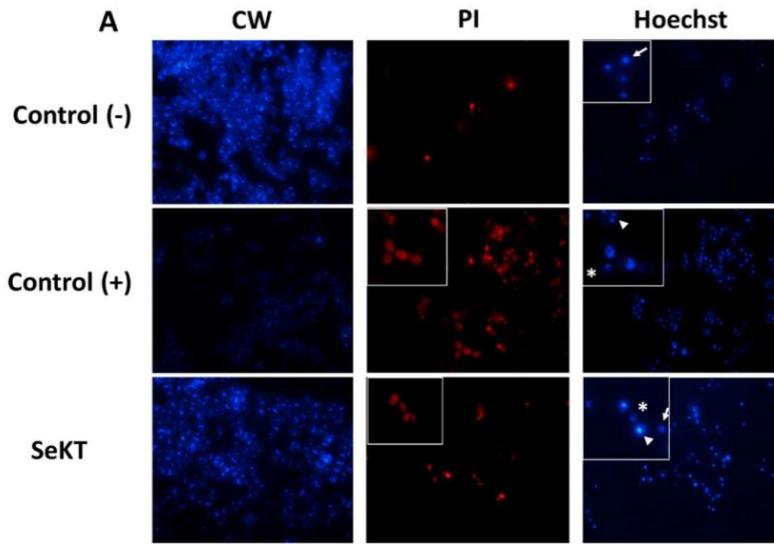


Fig. 2. Effect of SeKT on sensitive strain growth. *C. glabrata* was grown in YM broth buffered at pH 4.5. The initial inoculum contained  $10^5 \text{ mL}^{-1}$  cells. Killer activity of SeKT was evaluated by DO 640 nm. Linear vertical bars represent standard deviation. Mean values (represented by bars) with different letters are statistically different (two-way ANOVA and Tukey's HSD test,  $\alpha = 0.05$ ,  $n = 3$ ).

## 4. Discussion

In a previous study we demonstrated that SeKT extracts (*S. eubayanus* killer toxin) inhibited the growth of wine spoilage yeasts (Mazzucco et al., 2019). In this context, the present research goals were to purify and characterize the antimicrobial activity of SeKT in order to evaluate its potential use as a biocontrol tool during wine aging and storage.

Results of statistical optimization on YM based medium for SeKT production showed that none of the four tested physicochemical variables including triton X-100 and glycerol concentration, temperature and stirring, affected SeKT production significantly. However, the medium containing 0.1% v/v triton X-100, 5% v/v glycerol and an agitation of 120 rpm was selected as an optimized YM medium to continue the study due to its high SeKT production. SeKT production was similar in a greater volume (1000 mL) using the optimized medium



(caption on next page)

**Fig. 3.** Evaluation of cell-wall damage and death pathways induced by SeKT in a sensitive strain (*C. glabrata*) by fluorescence microscopy analysis. A) Representative images of the same culture are paired in lines for the columns Hoechst: Hoechst 33258 staining and PI: propidium iodide staining. In the third column, asterisks (\*) indicate fragmented nuclei for apoptotic cells; arrow heads (▲) indicate necrotic cells and arrows (→) indicate healthy cells. Negative and positive controls were carried out with H<sub>2</sub>O or 15 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, respectively. For calcofluor white (CW) staining, negative and positive controls were carried out with H<sub>2</sub>O or zymolyase, respectively. B) Percentage of sensitive strain with intact cell wall (by CW staining) after SeKT treatment. Linear vertical bars represent standard deviation. Mean values (represented by bars) with different letters are statistically different (two-way ANOVA and Tukey's HSD test,  $\alpha = 0.05$ ,  $n = 3$ ). C) Percentages of healthy, apoptotic and necrotic phenotypes in sensitive strain after SeKT treatment.

**Table 4**  
Residual activity of SeKT under winemaking conditions.

Oenological parameters	Conditions	Residual activity (%) <sup>a</sup>
Ethanol	0–16% v/v	100
Glucose	0–300 g/L	100
Free SO <sub>2</sub>	0–100 ppm	90.2
	100–150 ppm	68.9
pH	3–4.5	100
	5	60.4
	6	0
Temperature	0–26 °C	100
	26–37 °C	66.8
	37–50 °C	64.5

<sup>a</sup> Residual killer activity was detected by means of the multiwell method (MWM).

and maximum production occurred at the end of the exponential phase, as we had already shown using agroindustrial waste as economic media for SeKT production (Mazzucco et al., 2019). Purification of toxin crude extract was assessed via molecular weight cut-off membranes and affinity chromatography with a pustulan-coupled Sepharose column. Pustulan was selected based on its competitive inhibitory effect on SeKT killer activity. The purification procedure resulted in a 28-fold increase in specific activity, which indicates that a considerable loss of contaminants protein was achieved. However, a low yield was obtained, possible attributable to toxin denaturation among purification, mainly in the affinity chromatography step. The main eluted fraction with killer activity was detected as a single 70 kDa band, probably belonging to SeKT. This molecular weight is coincident with the protein band observed in previous study using the hole crude extract (Mazzucco et al., 2019). Other works have reported killer toxins of molecular weights between 50 and 80 kDa for different yeast genera (Comitini and Ciani, 2011; Guyard et al., 2002; Mehlomakulu et al., 2014).

The negative effect of physicochemical stress conditions present in a wine environment has limited the use of killer toxins for winemaking (Liu et al., 2013). We had previously found that SeKT retained its killer activity for at least 48 h in wine (Mazzucco et al., 2019). In this work, incubation of SeKT under the effect of independent winemaking factors

as glucose (0–300 g/L), ethanol (0–16% v/v), free SO<sub>2</sub> (0–100 ppm), acidic pH and temperatures until 26 °C, did not affect its killer activity. Besides, SeKT killer activity lasted up to 100 days in wine-like medium. Taken together, these data indicate that SeKT could be an interesting biotechnological tool to be tested in winemaking.

Understanding the mode of action of a toxin is essential for developing more effective antagonistic isolates that could contribute to achieve spoilage control (Belda et al., 2017; Schafraat et al., 2018). The inhibitory effect of the polysaccharide pustulan on SeKT killer activity allowed us to consider this molecule as a possible primary cell wall receptor for the toxin. Also, SeKT  $\beta$ -glucanase and chitinase activities suggest a putative mode of action that includes binding to  $\beta$ -1,6-glucan and chitin in the initial interaction of the toxin with sensitive cells, with a potential degradation of these polysaccharides. This mode of killing has been reported for several killer toxins (Comitini et al., 2009; Izgü et al., 2006; Santos et al., 2002; Schafraat et al., 2018; Wang et al., 2007). Additionally, the study of the sensitive cell walls treated with SeKT using CW stain -a fluorescent dye that selectively links chitin in the cell wall- showed a decreased or not well localized signal which could be indicative of cell-wall damage through chitin hydrolysis. Others also reported that fluorescence was mainly localized on untreated samples whereas, on killer toxin treated samples, fluorescence was diffused throughout the cells (Comitini et al., 2009; Mehlomakulu et al., 2017). The use of additional fluorophores as Hoechst and Propidium Iodide showed that SeKT may present different strategies to kill sensitive cells: at low toxin dose, it triggers apoptosis in susceptible target cells, whereas at high concentrations, toxin-induced necrosis plays a major role. Interestingly, the same killing phenotype is reported for killer toxins from *S. cerevisiae* killer K28 (Becker and Schmitt, 2017) and *P. membranifaciens* PMKT2 (Belda et al., 2017).

The necrotic and apoptotic phenotypes observed in SeKT treated sensitive cells (*C. glabrata*) indicate a fungicidal character of the toxin, at least on this yeast specie. However, the sensitive yeast partially recovered after 48 h of growth, pointing out that the critical concentration necessary for a fungicidal effect is higher than 2 KU/mL. Similarly, other killer toxins showed a fungistatic and fungicidal effect at low and high concentration, respectively (Ciani and Fatichenti, 2001; Mehlomakulu et al., 2017).

**Table 5**  
Antagonistic activity of SeKT against wine spoilage yeasts volatile phenols production after 30 and 100 days of incubation.

Spoilage yeast	SeKT (KU/mL)	4-VP		4-EP		4-EG	
		30 days	100 days	30 days	100 days	30 days	100 days
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0	23.2 ± 1.3 <sup>b</sup>	35.2 ± 3.1 <sup>a</sup>	nd	nd	nd	nd
	2	22.1 ± 3.2 <sup>b</sup>	1.9 ± 0.5 <sup>d</sup>	nd	nd	nd	nd
	4	10.8 ± 2.3 <sup>c</sup>	1.9 ± 0.5 <sup>d</sup>	nd	nd	nd	nd
<i>Pichia membranifaciens</i>	0	21.7 ± 2.5 <sup>b</sup>	80.2 ± 3.6 <sup>e</sup>	nd	nd	nd	nd
	2	22.2 ± 2.3 <sup>b</sup>	17.1 ± 2.2 <sup>bc</sup>	nd	nd	nd	nd
	4	14.0 ± 2.9 <sup>c</sup>	2.9 ± 0.5 <sup>d</sup>	nd	nd	nd	nd
<i>Pichia manshurica</i>	0	nd	nd	nd	nd	44.2 ± 3.1 <sup>a</sup>	21.8 ± 2.8 <sup>b</sup>
	2	nd	nd	nd	nd	nd <sup>c</sup>	nd <sup>c</sup>
	4	nd	nd	nd	nd	nd <sup>c</sup>	nd <sup>c</sup>
<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	0	nd	nd	39.2 ± 5.3 <sup>b</sup>	126.7 ± 8.5 <sup>a</sup>	nd	nd
	2	nd	nd	nd <sup>d</sup>	13.9 ± 1.3 <sup>c</sup>	nd	nd
	4	nd	nd	nd <sup>d</sup>	3.0 ± 0.4 <sup>d</sup>	nd	nd

4-VP: 4-vinylphenol, 4-EP: 4-ethylphenol, 4-EG: 4-ethylguaicol. Values expressed in mg/L (mean ± standard deviation). nd: not detected. Values with different superscript letter (a, b, c, d) within the same yeast specie and volatile phenol type are statistically different (two-way ANOVA and Tukey's HSD test,  $\alpha = 0.05$ ,  $n = 3$ ).

Wine spoilage yeasts produce high amounts of volatile phenols associated with disagreeable odors (Saez et al., 2011; Sangorrín et al., 2013; Wedral et al., 2010). In order to analyze the putative oenological use of SeKT, the antagonistic activity of SeKT against a set of four wine spoilage yeasts was assessed. As we had already seen in a recent work (Mazzucco et al., 2019), crude extract of SeKT inhibited the growth of *B. bruxellensis*, *P. membranifaciens*, *M. guilliermondii* and *P. manshurica*. This effect was confirmed using the purified SeKT obtained in this work, and an increased antagonistic activity against *P. membranifaciens* was evidenced.

The capacity of purified SeKT to inhibit spoilage yeasts growth was assessed through the measurement of volatile phenols levels produced by the spoilage yeasts in presence or absence of the toxin in wine-like medium supplemented with p-coumaric acid. Biosynthetic pathway for the synthesis of volatile phenols consists in yeast transformation of cinnamic acids (ferulic, p-coumaric or caffeic acid) naturally present in the must, into vinyl and ethyl derivatives through a cinnamate decarboxylase (CD) and a vinylphenol reductase (VR) (Chatonnet and Dubourdieu, 1995). In this work, we confirmed the ability of both, *M. guilliermondii* and *P. membranifaciens*, to produce the p-coumaric acid derived 4-vinylphenol (4-VP) (22 to 80 mg/L) in wine-like medium. Previous works carried out in our laboratory also observed 4-VP production and its accumulation by *M. guilliermondii* due to the lack of VR activity in several strains (Lopes et al., 2009; Saez et al., 2011; Sangorrín et al., 2013). Additionally, *B. bruxellensis* produced high levels of 4-ethyl phenol (4-EP) (126 mg/L), widely reported capacity in this specie (Suárez et al., 2007). *P. manshurica* strain was able to consume ferulic acid naturally present in the must, yielding high levels of 4-EG (44 mg/L), as we had previously observed (Saez et al., 2011). Interestingly, we found that SeKT produced a significant reduction (80 to 90%) in volatile phenols levels produced by spoilage yeasts in wine-like medium, which would improve the organoleptic characteristics of the beverage.

In conclusion, this paper addresses the production and characterization of *S. eubayanus* killer toxin (SeKT). SeKT demonstrated the capability to control the growth and the volatile phenol production of four of the most common wine spoilage yeasts. Also, SeKT killer activity was stable under physicochemical stress conditions typically present in winemaking. These finding together with the characterization of SeKT biochemistry and mode of action on sensitive yeasts, postulate SeKT as a potential natural antimicrobial agent to control spoilage yeasts present during wine aging and storage.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108714>.

#### Declaration of competing interest

None.

#### Acknowledgments

This work was supported by Universidad Nacional del Comahue, ANPCyT PICT 2014-2780 and CONICET PUE0067. Mazzucco is the recipient of a fellowship from CONICET. M. A. Ganga gives thanks to Grant DICYT Asociativo 081871GM\_DAS.

#### References

- Alonso, A., Belda, I., Santos, A., Navascués, E., Marquina, D., 2015. Advances in the control of the spoilage caused by *Zygosaccharomyces* species on sweet wines and concentrated grape musts. *Food Control* 51, 129–134. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.11.019>.
- Becker, B., Schmitt, M.J., 2017. Yeast killer toxin k28: biology and unique strategy of host cell intoxication and killing. *Toxins* 9, 1–15. <https://doi.org/10.3390/toxins9100333>.
- Belda, I., Ruiz, J., Alonso, A., Marquina, D., Santos, A., 2017. The biology of *Pichia membranifaciens* killer toxins. *Toxins* 9. <https://doi.org/10.3390/toxins9040112>.

- Berbegal, C., Spano, G., Fragasso, M., Grieco, F., Russo, P., Capozzi, V., 2018. Starter cultures as biocontrol strategy to prevent *Brettanomyces bruxellensis* proliferation in wine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 569–576. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8696-x>.
- Bevan, E.A., Makower, M., 1963. The physiological basis of the killer-character in yeast. In: Geerts, S.J. (Ed.), *Genetics Today, XI International Congress of Genetics*. I. Pergamon Press, Oxford, UK, pp. 202–203.
- Chatonnet, P., Dubourdieu, D.B.J., 1995. The influence of *Brettanomyces/Dekkera* sp. yeasts and lactic acid bacteria on the ethylphenol content of red wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 46, 7.
- Ciani, M., Faticenti, F., 2001. Killer toxin of *Kluyveromyces phaffii* DBVPG 6076 as a biopreservative agent to control apiculate wine yeasts. *J. Appl. Environ. Microbiol.* 67, 3058–3063. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.7.3058>.
- Comitini, F., Ciani, M., 2011. *Kluyveromyces wickerhamii* killer toxin: purification and activity towards *Brettanomyces/Dekkera* yeasts in grape must. *FEMS Microbiol. Lett.* 316, 77–82. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.02194.x>.
- Comitini, F., Mannazzu, I., Ciani, M., 2009. *Tetrapispora phaffii* killer toxin is a highly specific  $\beta$ -glucanase that disrupts the integrity of the yeast cell wall. *Microb. Cell Factories* 8, 55. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-8-55>.
- Corbaci, C., Uçar, F.B., 2018. Purification, characterization and in vivo biocontrol efficiency of killer toxins from *Debaryomyces hansenii* strains. *Int. J. Biol. Macromol.* 119, 1077–1082. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.07.121>.
- Divol, B., Du Toit, M., Duckitt, E., 2012. Surviving in the presence of sulphur dioxide: Strategies developed by wine yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 95, 601–613. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4186-x>.
- Duckitt, E., 2012. Investigating the Impact of Sulphur Dioxide on *Brettanomyces bruxellensis* at a Molecular and Cellular Level. Science of Master. Stellenbosch University, South Africa.
- Escott, C., Loira, I., Morata, A., Bañuelos, M.A., Suárez-Lepe, J.A., 2017. Wine Spoilage Yeasts: Control Strategy. IntechOpen. Open Access Peer-reviewed Chapter. <https://doi.org/10.5772/intechopen.69942>.
- González Flores, M., Rodríguez, M.E., Oteiza, J.M., Barbagelata, R.J., Lopes, C.A., 2017. Physiological characterization of *Saccharomyces uvarum* and *Saccharomyces eubayanus* from Patagonia and their potential for cidemaking. *Int. J. Food Microbiol.* 249, 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.02.018>.
- Guyard, C., Dehecq, E., Tissier, J.-P., Polonelli, L., Dei-Cas, E., Cailliez, J.-C., Menozzi, F.D., 2002. Involvement of [beta]-glucans in the wide-spectrum antimicrobial activity of *Williopsis saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 killer toxin. *Mol. Med.* 8, 686–694 (12520085).
- Izgül, F., Altınbay, D., Acun, T., 2006. Killer toxin of *Pichia anomala* NCYC 432: purification, characterization and its  $\alpha$ -D-1,3-glucanase activity. *Enzym. Microb. Technol.* 39, 669–676. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.11.024>.
- Laemmli, U., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>.
- Libkind, D., Brizzio, S., Ruffini, A., Gadanho, M., van Broock, M., Sampaio, J.P., 2003. Molecular characterization of carotenogenic yeasts from aquatic environments in Patagonia, Argentina. *Antonie van Leeuwenhoek. Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 84, 313–322. <https://doi.org/10.1023/A:1026058116545>.
- Liu, G.L., Chi, Z., Wang, G.Y., Wang, Z.P., Li, Y., Chi, Z.M., 2013. Yeast killer toxins, molecular mechanisms of their action and their applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* 35, 222–234. <https://doi.org/10.3109/07388551.2013.833582>.
- Lopes, C.A., Sangorrín, M., 2010. Optimization of killer assays for yeast selection protocols. *Rev. Argent. Microbiol.* 42, 298–306.
- Lopes, C.A., Jofré, V., Sangorrín, M.P., 2009. Spoilage yeasts in Patagonian winemaking: molecular and physiological features of *Pichia guilliermondii* indigenous isolates. *Rev. Argent. Microbiol.* 41, 177–184.
- Loureiro, V., Malfeito-Ferreira, M., 2003. Spoilage yeasts in the wine industry. *Int. J. Food Microbiol.* 86, 23–50. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00246-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00246-0).
- Lowry, O., Rosbrough, N., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. The folin by oliver. *Readings* 193, 265–275. [https://doi.org/10.1016/0304-3894\(92\)87011-4](https://doi.org/10.1016/0304-3894(92)87011-4).
- Mannazzu, I., Donizio, P., Carboni, G., Zera, S., Zera, G., Comitini, F., Budroni, M., Ciani, M., 2019. Yeast killer toxins: from ecological significance to application. *Crit. Rev. Biotechnol.* 39, 603–617. <https://doi.org/10.1080/07388551.2019.1601679>.
- Mazzucco, M.B., Ganga, M.A., Sangorrín, M.P., 2019. Production of a novel killer toxin from *Saccharomyces eubayanus* using agro-industrial waste and its application against wine spoilage yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek. Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 112, 965–973. <https://doi.org/10.1007/s10482-019-01231-5>.
- Mehlomakulu, N.N., Setati, M.E., Divol, B., 2014. Characterization of novel killer toxins secreted by wine-related non-*Saccharomyces* yeasts and their action on *Brettanomyces* spp. *Int. J. Food Microbiol.* 188, 83–91. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.07.015>.
- Mehlomakulu, N.N., Prior, K.J., Setati, M.E., Divol, B., 2017. *Candida pyralidae* killer toxin disrupts the cell wall of *Brettanomyces bruxellensis* in red grape juice. *J. Appl. Microbiol.* 122, 747–758. <https://doi.org/10.1111/jam.13383>.
- Miller, G., 1959. Use of dinitrosalicylic acid agent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31, 426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>.
- Myers, R.H., Montgomery, D.C., 2002. *Response Surface M 554 Ethodology: Product and Process 555 Optimization Using Designed Experiments*, 2nd edition. John Wiley & Sons, New York.
- Oro, L., Ciani, M., Bizzaro, D., Comitini, F., 2016. Evaluation of damage induced by Kwk1 and Pkt2 zymocins against *Brettanomyces/Dekkera* spoilage yeasts, as compared to sulphur dioxide. *J. Appl. Microbiol.* 121, 207–214. <https://doi.org/10.1111/jam.13121>.
- Pérez, F., Ramírez, M., Regodón, J.A., 2001. Influence of killer strains of *Saccharomyces cerevisiae* on wine fermentation. *Anton. Leeuw. Int. J. G. Gen.* 79, 393–399. <https://doi.org/10.1023/a:1012034608908>.

- Ramírez, M., Velázquez, R., Maqueda, M., López-Piñero, A., Ribas, J.C., 2015. A new wine *Torulaspota delbrueckii* killer strain with broad antifungal activity and its toxin-encoding double-stranded RNA virus. *Front. Microbiol.* 6, 983. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00983>.
- Rodríguez, M.E., Pérez-Través, I., Sangorrín, M.P., Barrio, E., Lopes, C.A., 2014. *Saccharomyces eubayanus* and *Saccharomyces uvarum* associated with the fermentation of *Araucaria araucana* seeds in Patagonia. *FEMS Yeast Res.* 14, 948–965. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12183>.
- Ross, K.A., Beta, T., Arnfield, S.D., 2009. A comparative study on the phenolic acids identified and quantified in dry beans using HPLC as affected by different extraction and hydrolysis methods. *Food Chem.* 113, 336–344. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.07.064>.
- Saez, J.S., Lopes, C.A., Kirs, V.E., Sangorrín, M., 2011. Production of volatile phenols by *Pichia manshurica* and *Pichia membranifaciens* isolated from spoiled wines and cellar environment in Patagonia. *Food Microbiol.* 28, 503–509. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.10.019>.
- Sangorrín, M.P., Zajonkovsky, I.E., Lopes, C.A., Rodríguez, M.E., Giraudo de van Broock, M.R., Caballero, A.C., 2001. Killer behaviour in wild wine yeasts associated with Merlot and Malbec type musts spontaneously fermented from Northwestern Patagonia (Argentina). *J. Basic Microbiol.* 41, 105–113. [https://doi.org/10.1002/1521-4028\(200105\)41:2<105::AID-JOBM105>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/1521-4028(200105)41:2<105::AID-JOBM105>3.0.CO;2-W).
- Sangorrín, M.P., García, V., Lopes, C.A., Sáez, J.S., Martínez, C., Ganga, M.A., 2013. Molecular and physiological comparison of spoilage wine yeasts. *J. Appl. Microbiol.* 114, 1066–1074. <https://doi.org/10.1111/jam.12134>.
- Santos, A., Marquina, D., 2004. Killer toxin of *Pichia membranifaciens* and its possible use as a biocontrol agent against grey mould disease of grapevine. *Microbiology* 150, 2527–2534. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27071-0>.
- Santos, A., Marquina, D., Barroso, J., Peinado, J.M., 2002. (1→6)- $\beta$ -D-glucan as the cell wall binding site for *Debaromyces hansenii* killer toxin. *Lett. Appl. Microbiol.* 34, 95–99. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2002.01053.x>.
- Santos, A., San Mauro, M., Bravo, E., Marquina, D., 2009. PMKT2, a new killer toxin from *Pichia membranifaciens*, and its promising biotechnological properties for control of the spoilage yeast *Brettanomyces bruxellensis*. *Microbiology* 155, 624–634. <https://doi.org/10.1099/mic.0.023563-0>.
- Schaffrath, R., Meinhart, F., Klassen, R., 2018. Yeast killer toxins: fundamentals and applications. *Physiol. Genet.* 107–130. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-00286-1\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-642-00286-1_6).
- Schmitt, M.J., Breinig, F., 2006. Yeast viral killer toxins: lethality and self-protection. *Nat. Rev. Microbiol.* (3), 212–221. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1347>.
- Suárez, R., Suárez-Lepe, J.A., Morata, A., Calderón, F., 2007. The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera*: a review. *Food Chem.* 102, 10–21. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.03.030>.
- Velázquez, R., Zamora, E., María, L., Álvarez, M.L., Hernández, L.M., Ramírez, M., 2015. Effects of new *Torulaspota delbrueckii* killer yeasts on the must fermentation kinetics and aroma compounds of white table wine. *Front. Microbiol.* 6, 1222. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00983>.
- Villalba, M.L., Lutz, M.C., Lopez, S., Fildain, M.B., Sangorrín, M.P., 2016a. Patagonian antagonist yeasts for food biopreservation. In: Olivera, N., Libkind, D., Donati, E. (Eds.), *Biology and Biotechnology of Patagonian Microorganisms*. Springer, pp. 301–323.
- Villalba, M.L., Susana Sáez, J., del Monaco, S., Lopes, C.A., Sangorrín, M.P., 2016b. TdKT, a new killer toxin produced by *Torulaspota delbrueckii* effective against wine spoilage yeasts. *Int. J. Food Microbiol.* 217, 94–100. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.10.006>.
- Wang, X., Chi, Z., Yue, L., Li, J., 2007. Purification and characterization of killer toxin from a marine yeast *Pichia anomala* YF07b against the pathogenic yeast in crab. *Curr. Microbiol.* 55, 396–401. <https://doi.org/10.1007/s00284-007-9010-y>.
- Wedral, D., Shewfelt, R., Frank, J., 2010. The challenge of *Brettanomyces* in wine. *J. Food Sci. Technol.* 43, 1474–1479. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.06.010>.
- Weiss, W., Weiland, F., Görg, A., 2009. Protein detection and quantitation technologies for gel-based proteome analysis. *Proteomics* 9, 59–82. [https://doi.org/10.1002/978-1-60761-157-8\\_4](https://doi.org/10.1002/978-1-60761-157-8_4).