



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY



FACULTAD DE  
**CIENCIAS**

UDELAR | [fcien.edu.uy](http://fcien.edu.uy)

TESINA DE GRADO

Licenciatura en Bioquímica

# INMOVILIZACIÓN DE LEVADURAS POR ATRAPAMIENTO PARA LA FERMENTACIÓN DE MOSTOS

CECILIA GARCÍA SEIJAS

TUTOR: PAULA GONZALEZ POMBO

CO-TUTOR: STEFANI DE OVALLE

Área Bioquímica, Dpto. de Biociencias, Facultad de Química, UDELAR

## **AGRADECIMIENTOS**

Al finalizar esta etapa, quiero agradecer a la Facultad de Ciencias – Universidad de la República, por la formación brindada durante todos estos años.

A Paula González, mi tutora, por permitir realizar mi tesina de grado en el Laboratorio de Bioquímica, en la Facultad de Química. Gracias por el apoyo dado durante todo el desarrollo de la misma.

A Stefani de Ovalle, mi co-tutora, por acompañarme, guiarme y apoyarme durante este trabajo.

Gracias a las dos, por la paciencia, por la búsqueda de soluciones, por la comprensión. Gracias.

A mis compañeros del Laboratorio de Bioquímica, Agustín, Karen, Ceci. P, Ceci. G, Guillermo, Larissa, por el apoyo, el aporte de conocimiento, por siempre estar dispuestos a dar una mano.

A Eugenia, compañera de las mañanas en el laboratorio, por el apoyo tanto emocional como técnico. Por esas palabras de ánimo que muchas veces uno necesita.

Al Laboratorio de Microbiología y al Laboratorio de Biocatálisis y Biotransformaciones (LBB) por permitirme usar equipos indispensables para la realización de este trabajo.

A mi evaluadora, Susana Castro, por dedicar su tiempo en la corrección de mi tesis y aportar su conocimiento.

A mis padres y hermana por el apoyo incondicional, por alentarme a seguir adelante SIEMPRE.

A mis hijas, mis dos soles.

A mis amigos, por estar siempre dando para adelante.

Gracias a todos, por formar parte de esta etapa en mi vida.

**ÍNDICE**

RESUMEN .....	6
INTRODUCCIÓN .....	8
Breve historia del vino en Uruguay .....	9
Fermentación alcohólica .....	9
Factores que afectan el desarrollo de la fermentación alcohólica .....	10
Principales metabolitos de fermentación .....	13
Levaduras vínicas .....	14
Inmovilización de levaduras .....	16
Métodos de inmovilización .....	16
Usos de células inmovilizadas en vinificación .....	18
Inmovilización por atrapamiento dentro de una matriz porosa .....	20
Alginato como soporte de inmovilización .....	21
Recubrimiento de perlas de alginato .....	22
Métodos para la conservación de células inmovilizadas a largo plazo .....	24
OBJETIVOS .....	28
MATERIALES Y MÉTODOS .....	30
Cepa de levadura y mantenimiento .....	31
Condiciones de cultivo .....	31
Recuento de biomasa .....	31
Condiciones de inmovilización .....	31
Obtención de las perlas de alginato .....	32

---

Recubrimiento de las perlas .....	32
Solubilización de las perlas de alginato y recuento de células inmovilizadas .....	33
Estabilidad de las perlas de alginato en heladera .....	34
Caracterización de las perlas .....	34
Medios utilizados en las fermentaciones .....	34
Condiciones de fermentación alcohólica .....	35
Estudio de liberación de células desde las perlas de alginato .....	35
Balance de masa luego de la fermentación .....	35
Análisis de Metabolitos de Microvinificación .....	36
Liofilización .....	37
Sistema concentrador de vacío.....	37
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>38</b>
Optimización de condiciones para la inmovilización de <i>S. cerevisiae</i> .....	39
Caracterización de las perlas de alginato .....	40
Tamaño de las perlas de alginato .....	40
Estabilidad de las perlas de alginato en heladera .....	41
Estabilidad mecánica de las perlas de alginato .....	42
Caracterización de las perlas de alginato luego de uso en fermentación en símil mosto .....	42
Estabilidad operacional de las perlas de alginato .....	42
Recubrimiento de las perlas de alginato .....	44
Evaluación de fermentaciones con células libres vs células inmovilizadas .....	46
Seguimiento de pérdida de peso durante el proceso de fermentación .....	46
Análisis de metabolitos de microvinificación .....	47

Consumo de azúcares en medio símil mosto y mosto Tannat .....	51
Caracterización de las perlas de alginato luego del uso en fermentación de mosto Tannat .....	53
Viabilidad de las células inmovilizadas luego de su uso en fermentaciones .....	53
Evaluación de métodos de deshidratación de las perlas para posible reúso .....	55
<b>CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS</b> .....	<b>59</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>62</b>

# Resumen

---

## RESUMEN

El vino es un producto obtenido de la fermentación alcohólica, proceso en el cual los azúcares de la uva se transforman en etanol y dióxido de carbono gracias a la acción de levaduras. En los últimos años, se comenzaron a estudiar levaduras inmovilizadas para vinificación como alternativa por sus ventajas técnicas y económicas. El objetivo del presente estudio fue inmovilizar células de *Saccharomyces cerevisiae* por atrapamiento en perlas de alginato de calcio y caracterizar las mismas para su evaluación en procesos fermentativos. Se ensayaron diferentes concentraciones de alginato: 1,5, 2,5 y 3,5% m/v y diferente carga de biomasa. Adicionalmente, como forma de mejorar la estabilidad de las perlas de alginato, se estudió su recubrimiento utilizando quitosano (0,4 m/v) y alginato de calcio libre de células (0,17 y 0,5% m/v). La fermentación se realizó en medio similar mosto y en mosto Tannat. Se caracterizaron las perlas de alginato luego del proceso de fermentación en base a su estabilidad operativa (estabilidad mecánica, liberación de células desde la perla de alginato al medio y balance de masa), siendo óptima para el uso en fermentación la perla de alginato 2,5% m/v. El análisis de los metabolitos de microvinificación se realizó por cromatografía HPLC. En medio similar mosto se obtuvo una mayor producción de etanol y glicerol con mayor consumo de los azúcares por parte de las células inmovilizadas en comparación con las células libres, sin embargo, se obtuvieron altas concentraciones de ácido acético. En mosto Tannat, en cambio, no se observaron diferencias significativas en cuanto a la producción de etanol entre células libres e inmovilizadas. La compleja composición del mosto Tannat, conteniendo elevada concentración de compuestos no metabolizables, podría conllevar a problemas de difusión de nutrientes en la perla. La ventaja del uso de células inmovilizadas se basa en su facilidad de recuperación al finalizar la fermentación, permitiendo el posible reúso de las mismas. Como estrategia de almacenamiento, se evaluó la liofilización y el sistema concentrador de vacío (speedvac) como técnicas de deshidratación de las perlas de alginato utilizando como agentes protectores leche descremada UHT suplementada con 5% m/v de glucosa y glicerol 20% v/v.

**Palabras claves:** inmovilización celular, *Saccharomyces Cerevisiae*, perlas de alginato calcio, caracterización, recubrimiento, fermentación, deshidratación, etanol, glicerol, ácido acético.

# Introducción

---

## **BREVE HISTORIA DEL VINO EN URUGUAY**

En Uruguay, la historia del vino comenzó de la mano de los colonizadores españoles, los cuales plantaron la vid, junto al olivo y al nogal, a mediados del siglo XVII<sup>1</sup>.

Estas primeras vides, fueron uvas de mesa, probablemente Moscatel, que se cultivaron en parral, exclusivamente para consumo familiar. A partir de 1870, la industria vitivinícola cambia su perfil comercial gracias a Pascual Harriague, introductor, en San Antonio Chico (Salto), de la cepa francesa Tannat, siendo hoy la variedad más representativa de nuestro país a nivel mundial y Francisco Vidiella, introductor de la variedad francesa Folle Noire, en Colón (Montevideo). A partir de allí, comenzaron a darse en el país las condiciones necesarias para el cultivo de vid a mayor escala y con fines de producción comercial. En 1903 se promulgó la primera Ley Vitivinícola Nacional, que reglamenta la producción y comercialización del "vino natural"<sup>2</sup>.

La mayor parte del vino uruguayo proviene de las viñas del sur del país, de los departamentos de Canelones, Montevideo y San José. Con unas 10.000 hectáreas de vid y unas 200 bodegas, Uruguay frente a los grandes productores mundiales no puede competir en cantidad, sino en calidad<sup>1</sup>.

Uruguay es el cuarto productor de vino de Sudamérica, caracterizado por ser un país productor y un gran consumidor de vino, siendo el nivel de consumo per cápita cercano a los 30 litros por año<sup>3</sup>.

La gran calidad de los vinos uruguayos, hace que el país se destaque a nivel internacional, ya que los mismos han demostrado que tienen un buqué perfecto que genera un especial disfrute en el paladar de los catadores con mayor reconocimiento y experiencia en el mundo<sup>4</sup>.

## **FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA**

Hace miles de años, los procesos de fermentación han sido utilizados por el hombre con el fin de preservar alimentos, como así también, para producir bebidas y comestibles con sabores, texturas y aromas específicos, como el yogurt, quesos, cerveza, vinos, panes, entre otros<sup>5</sup>.

El vino es un producto obtenido de la fermentación alcohólica, proceso en el cual los azúcares de la uva se transforman en etanol y dióxido de carbono gracias a la acción de levaduras. Éstas, a su vez, están implicadas en la generación de compuestos secundarios que determinarán la calidad final del vino, como por ejemplo glicerol, alcoholes superiores, ésteres, ácidos orgánicos, etc<sup>6</sup>. Son varios los factores

que afectan la calidad del vino, siendo el más importante, la calidad de la uva. La composición final de la uva depende del genotipo de la variedad, de las condiciones ambientales (clima, suelo y manejo del cultivo) y de la interacción entre genotipo y ambiente<sup>7</sup>.

Dentro de los metabolitos secundarios que se generan durante la fermentación alcohólica se encuentran<sup>8</sup>:

- **Alcoholes superiores:** son beneficiosos organolépticamente a bajas concentraciones, confiriendo una gran variedad de aromas vegetales y de sensaciones de dulzor y suavidad. Algunos ejemplos son: alcohol isoamílico, isopropanol, entre otros.
- **Ésteres:** imparten sabores y aromas floreales y frutales (por ejemplo, acetato de etilo).
- **Acetaldehído:** en exceso provoca en el vino la denominada maderización o gusto oxidado.
- **Ácidos orgánicos:** contribuyen de forma beneficiosa a la astringencia característica (por ejemplo, ácido succínico, ácido cítrico, ácido acético, entre otros). El ácido succínico es uno de los más importantes en el vino y contribuye significativamente a la acidez característica del producto. El ácido acético en exceso transmite al vino gusto a picado y aroma "avinagrado".
- **Polialcoholes:** el glicerol es el polialcohol mayoritario, el cual se produce durante el metabolismo normal de las levaduras o cuando las levaduras están sometidas a estrés osmótico. Contribuye a la viscosidad deseada en el vino, transmite al vino cuerpo, consistencia y suavidad.
- **Compuestos azufrados:** se pueden diferenciar en compuestos de contribución sensorial positiva que forma parte de la identidad varietal del vino aportando aromas característicos (los compuestos tiólicos, derivados de la cisteína) y los de naturaleza sensorial negativa que constituyen el problema más habitual tanto en vinificación como en vino embotellado que ocultan las características frutales y varietales de los vinos (sulfuros, mercaptanos, tioles y ésteres tiólicos)<sup>9</sup>.

### *Factores que afectan el desarrollo de la fermentación alcohólica*

El éxito de la fermentación alcohólica, y, por ende, la calidad del vino, depende de la composición del mosto, definida por la variedad y la calidad de la uva. El mosto de uva es el jugo obtenido del prensado del fruto conteniendo piel, pulpa y semillas. En términos generales el mosto se compone de agua

(representando el 70-80% del mosto), azúcares (principalmente glucosa y fructosa), polifenoles (por ejemplo, antocianos, taninos, flavonoides), ácidos orgánicos (tartárico, málico, cítrico, de los cuales dependerá la acidez del vino) y materia nitrogenada. Adicionalmente se encuentran también factores de crecimiento y sustancias formadas por restos de pulpa, hollejos, semillas (estas sustancias le confieren al mosto nutrientes y vitaminas), levaduras y bacterias<sup>10,11</sup>.

Son varios los factores que pueden conducir a una fermentación alcohólica inapropiada y lenta. Dentro de ellos se encuentran:

- **Concentraciones elevadas de azúcar:** principalmente glucosa y fructosa. La cantidad de azúcares reductores presentes en el mosto varía entre 120-250 g/L, dependiendo de la variedad de la uva y su grado de maduración. Una concentración elevada de azúcar obliga a las levaduras a metabolizarla en fase de declive, con poblaciones en situación de supervivencia, y con actividad metabólica reducida (presión osmótica), pudiendo dar lugar a fermentaciones largas e incluso incompletas<sup>12</sup>. Asimismo, se genera un grado alcohólico elevado o azúcar residual al final de la fermentación, dando lugar a que bacterias lácticas puedan descomponer el exceso de azúcar, causando la conocida quiebra láctica en vino<sup>13</sup>.
- **Déficit o exceso de nitrógeno asimilable:** el rango de nitrógeno total contenido en el mosto oscila entre 60 y 2400 mg/L. Sin embargo, sólo una parte de éste es aprovechable en forma inmediata por las levaduras en condiciones de vinificación. Las levaduras utilizan la materia nitrogenada para formar sus estructuras celulares y reproducirse (producción de biomasa), asegurando un número suficiente de células para consumir todos los azúcares del mosto. El nitrógeno en el mosto puede estar presente en forma de: ion amonio (forma inorgánica) y aminoácidos, que son las formas fácilmente asimilables, mientras que las proteínas pueden ser metabolizadas de forma excepcional. Los aminoácidos son muy variables como fuentes nitrogenadas ya que algunos son consumidos ávidamente (por ejemplo, glutamina), mientras que otros no lo son en absoluto en condiciones anaerobias, como la prolina, el cual, junto con la arginina, son los dos aminoácidos mayoritarios en mostos de uva. Se considera que la cantidad de nitrógeno asimilable en el mosto inicial debe ser superior a 150 mg N/L<sup>14,15,16</sup>. Un déficit del mismo puede ocasionar fermentaciones lentas y además problemas de calidad como mayor propensión a olor a ácido sulfhídrico (huevo podrido)<sup>14</sup>. Sin embargo, un exceso de nitrógeno asimilable puede limitar el crecimiento microbiano, dando lugar

a la aparición de compuestos indeseables como la urea (compuesto que puede dar lugar a la formación de carbamato de etilo, el cual es un compuesto cancerígeno)<sup>13</sup>.

- **Déficit de factores de crecimiento:** los factores de crecimiento son indispensables para el crecimiento y actividad celular de los microorganismos. Algunos ejemplos son biotina, piridoxina, ácido pantoténico, riboflavina, tiamina, mesoinositol<sup>11</sup>. El déficit de estos factores puede deberse al mal estado sanitario de la uva o inmadurez de la misma dando lugar a una parada de fermentación<sup>13</sup>.
- **Ausencia total de oxígeno al inicio de la fermentación:** se ha estudiado, que si bien la presencia de oxígeno es necesaria para que las levaduras desarrollen un metabolismo respiratorio (aerobio), no es una condición suficiente para que el metabolismo se dirija a esa vía. *S. cerevisiae* tiene gran capacidad para fermentar, lo que le da una ventaja frente a otras especies en condiciones de fermentación espontánea. Su metabolismo aeróbico se caracteriza por presentar efecto Crabtree, esto es, que a altas concentraciones de azúcares la ruta metabólica más activa será la fermentación, con independencia de la disponibilidad de oxígeno para respirar. Esta actividad se acrecienta aun en presencia de oxígeno (efecto Pasteur negativo). Además, el oxígeno está ligado a su participación en la síntesis de ácidos grasos insaturados de cadena larga y esteroides que solo se producen en aerobiosis<sup>12</sup>. Estos compuestos son factores de supervivencia que se encuentran en la membrana mitocondrial y citoplasmática, teniendo un rol en la integridad y permeabilidad de la membrana. A su vez, estos compuestos se relacionan con el transporte de nutrientes a través de la membrana, y con la resistencia a las sustancias tóxicas producidas por las levaduras. Una buena oxigenación inicial permite una presencia mayor de estos compuestos, aumentando la viabilidad de las levaduras y evitando una parada de la fermentación<sup>17</sup>.
- **Temperatura de fermentación:** la temperatura óptima de fermentación depende de la especie de levadura empleada. La temperatura ideal para vinos tintos generalmente oscila entre los 20-30°C. Dentro de los rangos que soportan las distintas levaduras, a mayor temperatura la fermentación es más rápida y la asimilación del nitrógeno es mejor. Las fermentaciones a bajas temperaturas (13°C o inferiores) son interesantes en la elaboración de vinos blancos o rosados, ya que aumentan la producción y la retención de los aromas, y por lo tanto la calidad del producto final. Sin embargo, a bajas temperaturas disminuye la velocidad de consumo de azúcares, se produce una asimilación más lenta del nitrógeno, obteniendo fermentaciones más largas y con mayor riesgo de paradas. Por

encima de los 35°C la actividad metabólica de las levaduras decrece rápidamente y en torno a los 45°C mueren<sup>17,18,19</sup>.

- **Etanol:** es el principal producto de la fermentación alcohólica, sin embargo, en exceso afecta las membranas celulares, la integridad y permeabilidad de la misma al sustituir las moléculas de agua de su interior por alcohol, alterando el transporte de aminoácidos y azúcares e inhibiendo el desarrollo de las levaduras<sup>13,17</sup>. A su vez, al aumentar la concentración de etanol al final de la fermentación, este genera la degradación de los esteroides de la membrana que son los que aumentan la rigidez de la misma y disminuyen su permeabilidad<sup>20</sup>.
- **Antagonismo entre microorganismos:** conocido como "efecto *Killer*", se genera por toxinas liberadas por ciertas cepas de levaduras que matan o inhiben el crecimiento de otras cepas que son sensibles a éstas<sup>13</sup>.
- **pH:** la mayoría de las levaduras toleran un rango de pH entre 3 y 8, pero les resulta óptimo un medio ligeramente ácido con un pH alrededor de 4,5. Cuanto menor sea el pH del medio, menor será la tasa de crecimiento de las levaduras. Las bacterias lácticas presentes, en cambio, pueden trabajar en la fermentación a un pH entre 3,3 y 3,6<sup>14, 21</sup>

### Principales metabolitos de fermentación

#### Producción de etanol

El éxito de la fermentación alcohólica depende de mantener la población de levaduras viables a niveles suficientes hasta que todos los azúcares fermentables han sido consumidos. El agotamiento de los azúcares es obligatorio para obtener un equilibrio del vino: 98% del azúcar de la uva se debe convertir a etanol y CO<sub>2</sub>. El rendimiento alcohólico es el valor del consumo de azúcar para generar 1% de alcohol etílico. Durante la fermentación, aproximadamente el 95% de los azúcares se convierten en etanol, el 1% en material celular y el 4% en productos como el glicerol. La cantidad de etanol hallada en vinos oscila entre 10 a 14% v/v<sup>22</sup>. Según la OIV (Organización Internacional de la Viña y el Vino) el contenido de etanol en los mismos no puede ser inferior a 8,5% v/v. En vino tinto, la cantidad de etanol se encuentra, generalmente, entre un 12-13 % v/v.

## Producción de glicerol

El glicerol es un compuesto no volátil sin propiedades aromáticas, pero que contribuye significativamente a la calidad del vino, dando la sensación de dulzor en la boca, suavidad, consistencia y cuerpo. Es el subproducto más importante de la fermentación alcohólica en cantidad, después del etanol y el dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). La cantidad de glicerol formada por *S. cerevisiae* generalmente ronda entre los 2 y 11 g/L, pero las concentraciones normales se encuentran en el rango de los 4–9 g/L<sup>23,24,25</sup>.

## Producción de acidez volátil

Se refiere al ácido acético. Durante la fermentación, el acetaldehído derivado del piruvato se transforma en acetato por acción de la acetaldehído deshidrogenasa. En general, la cantidad de ácido acético producida por las levaduras *S. cerevisiae* es escasa, entre 0,25 a 0,5 g/L, pero puede ser mucho más elevada en determinadas condiciones, sobre todo en los mostos muy ricos en azúcares, en los que la presión osmótica del medio sobre la célula de la levadura es especialmente importante e impide que ésta se multiplique adecuadamente. Para compensar esta presión externa, la levadura produce y acumula glicerol intracelular y uno de los productos inevitables de esta acumulación es el ácido acético. La elevada acidez volátil afecta la calidad del vino, dando un gusto avinagrado<sup>14,26</sup>. Según la OIV el límite máximo permitido es 1.2 g/L (expresada en ácido acético).

## LEVADURAS VÍNICAS

Tradicionalmente, la producción de vinos se ha realizado a partir de fermentaciones de los mostos, llevadas a cabo por cepas de levaduras endémicas residentes en las superficies de las uvas y de los equipos de las bodegas (fermentación espontánea). Dado que la fermentación espontánea, es un proceso no controlado, pueden existir en el medio, microorganismos que no producen alcohol ni compuestos volátiles benéficos para la bebida, pero, utilizan los azúcares del medio, ocasionando una disminución del rendimiento. A su vez, estos microorganismos pueden producir sustancias que provocan olores y sabores desagradables como también sustancias tóxicas para las levaduras (provocando un aumento en el tiempo de fermentación o parada de la misma). Hoy en día, se inoculan levaduras seleccionadas o "starters" como forma de asegurar, con éxito, el proceso de fermentación<sup>14,25,27,28</sup>.

Las levaduras son hongos unicelulares ascomicetos o basidiomicetos, anaerobios facultativos. Generalmente su reproducción es asexual, por gemación.

Las levaduras presentan un patrón de crecimiento similar al ciclo de crecimiento clásico de los microorganismos<sup>12</sup>. En primer lugar, se da la fase de latencia, la cual es una fase de adaptación de la célula al nuevo entorno. A continuación, se produce la multiplicación activa de las levaduras donde el metabolismo se convierte en anaeróbico debido al aumento de la concentración de CO<sub>2</sub> (fase de crecimiento). Cuando la levadura alcanza el máximo crecimiento de la población, se mantiene la viabilidad sin multiplicación celular, fase conocida como fase estacionaria. Debido al agotamiento de nutrientes y al aumento de la concentración de productos y subproductos, que actúan como sustancias tóxicas (etanol y factor *killer*) se conduce a la muerte celular<sup>12</sup>.

Las levaduras abarcan un gran número de géneros que representan más de 700 especies. El género *Saccharomyces* tiene gran utilidad como fermentador, por lo cual, especies como *S. cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. pastorianus*, *S. uvarum*, *S. kudriavzevii*, entre otras, son conocidas en el campo de la elaboración del vino<sup>14,25</sup>. Durante la fermentación alcohólica, las levaduras presentes, se pueden dividir en dos grupos: las levaduras *Saccharomyces* (provenientes de equipo de bodega principalmente) y las levaduras no-*Saccharomyces* (provenientes principalmente de la uva). Estas últimas son las encargadas de comenzar la fermentación y sus poblaciones van variando conforme cambia el grado alcohólico, ya que se caracterizan por tener un bajo poder fermentativo y gran sensibilidad al etanol. Entre ellas se encuentran levaduras de géneros *Hanseniaspora/Kloeckera*, *Cándida*, *Pichia*, *Torulaspota*, *Kluyveromyces* y *Metschnikowia*. La actividad inicial de estas levaduras se considera importante para el perfil final de compuestos aromáticos en el vino. Los metabolitos formados por algunas especies de estas levaduras pueden contribuir a la calidad del vino, por ejemplo, con la producción de glicerol o ésteres<sup>29</sup>. A su vez, otras especies poseen actividad β-Glucosidasa que pueden hidrolizar precursores aromáticos<sup>30</sup>. Sin embargo, otras especies se asocian con la producción de ácido acético que puede ser perjudicial para la calidad del vino. A medida que aumenta el grado alcohólico, los nutrientes se reducen y se genera una presión selectiva que determina la especie que predomine cada etapa<sup>28</sup>. La especie fermentativa por excelencia es *S. cerevisiae*, con un poder fermentativo alto y resistencia a altas concentraciones de etanol (mayores de 13,5% v/v), por lo que domina la fermentación alcohólica. *S. cerevisiae* parece haberse adaptado a lo largo de su evolución para optimizar su tasa de crecimiento en ambientes ricos en nutrientes fácilmente asimilables como

azúcares y aminoácidos, pudiendo metabolizar la glucosa y la fructosa tanto por vía respirativa como por vía fermentativa, y para crecer en condiciones aerobias o anaerobias. Tienen una gran capacidad de crecer en el mosto de uva, caracterizado por un alto contenido de azúcares, produciendo altas cantidades de etanol, inhibiendo el crecimiento de cepas no- *Saccharomyces*<sup>28,31</sup>.

## INMOVILIZACION DE LEVADURAS

El término inmovilización se refiere al confinamiento físico o localización de células o biocatalizadores, en una región definida en el espacio, reteniendo sus propiedades y actividades catalíticas<sup>6,32,33</sup>.

### *Métodos de inmovilización de células*

Existen varias técnicas de inmovilización celular estudiadas, que se pueden clasificar en cuatro grandes categorías según el mecanismo empleado<sup>32,33,34,35</sup> (Figura 1):

- **Inmovilización sobre la superficie de un soporte sólido:** adsorción física por fuerzas electroestáticas o uniones covalentes entre la membrana celular y la superficie del soporte.
- **Atrapamiento dentro de una matriz porosa:** inclusión de células dentro de una red rígida para evitar que las células se difundan en el medio circundante, permitiendo la transferencia masiva de nutrientes y metabolitos. Ejemplos de matrices: alginato, agar, quitosano, carragenina.
- **Floculación celular (agregación):** agregación de células para formar una unidad más grande o la propiedad de células en suspensión para adherirse rápidamente en grupos. En cultivos celulares donde no se da la floculación de forma natural, se utilizan agentes de entrecruzamiento ("*cross-linkers*") para estimular la agregación celular.
- **Contención mecánica detrás de una barrera:** se puede usar filtros de membrana microporosa, atrapamiento en microcápsulas, inmovilización en una superficie de interacción de dos líquidos inmiscibles.

Existen diferentes requisitos que deben tomarse en cuenta durante la elección del soporte a utilizar para la inmovilización celular. Debe existir una alta relación superficie/volumen del soporte para alcanzar una alta densidad celular, así como también, debe ser fácil de manipular y regenerar. El soporte, además

de ser de bajo costo, debe contar con estabilidad mecánica, química, térmica y biológica y no ser tóxico. La porosidad del soporte debe ser uniforme y controlable permitiendo intercambio de sustratos, productos y cofactores<sup>32, 34</sup>.

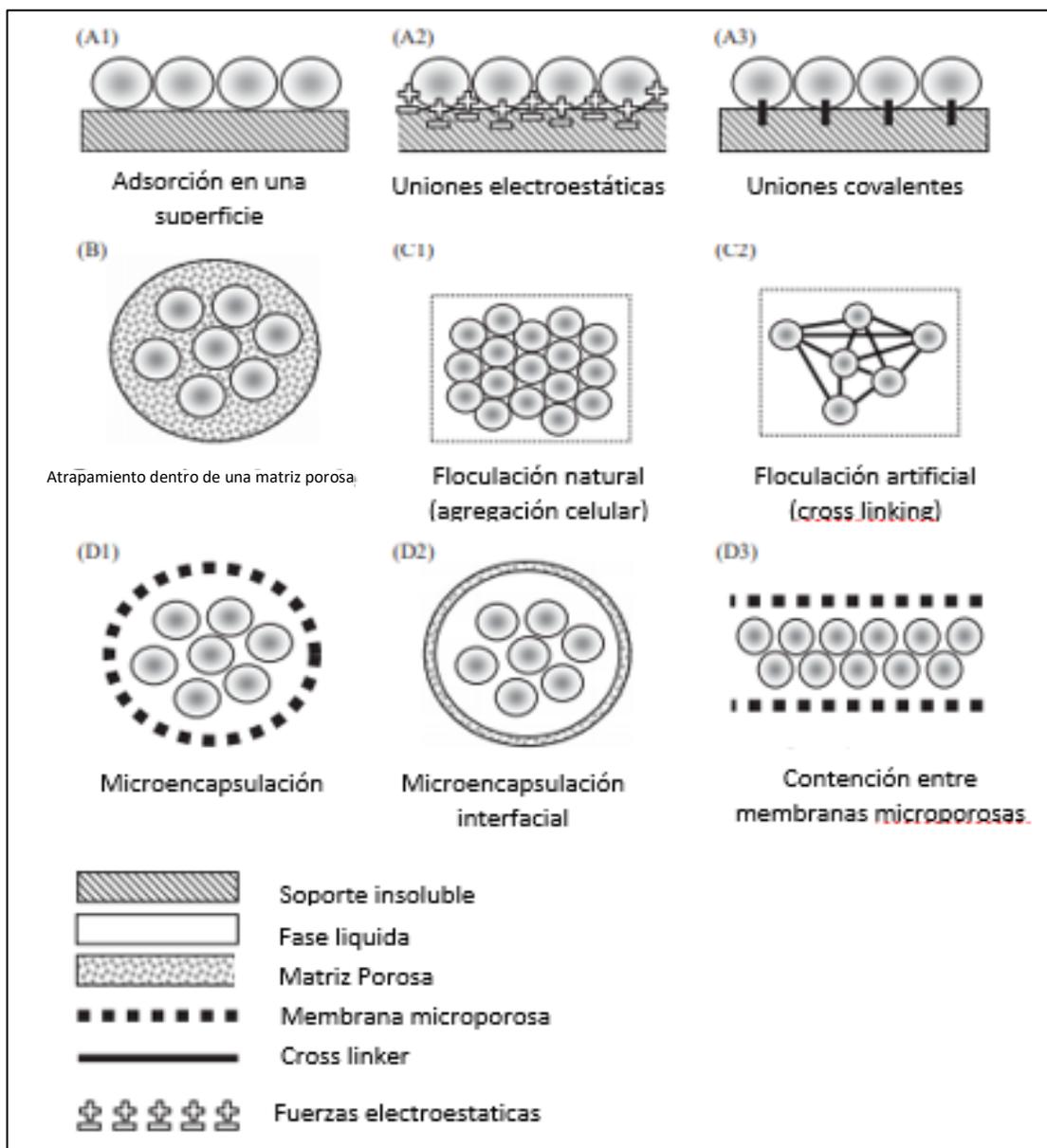


Figura 1. Métodos de inmovilización celular. A, Inmovilización en la superficie de un soporte sólido. B, Atrápmiento dentro de una matriz porosa. C, Floculación celular. D, Contención mecánica detrás de una barrera. Extraído de<sup>32</sup>.

## Usos de células inmovilizadas en vinificación

En los últimos años, se comenzaron a estudiar levaduras inmovilizadas para vinificación como alternativa por sus ventajas técnicas y económicas. En la **Tabla 1** se muestran algunas ventajas y desventajas que acarrea el uso de células inmovilizadas<sup>6,32,36,37</sup>.

**Tabla 1.** Ventajas y desventajas del uso de células inmovilizadas sobre la fermentación convencional con células libres.

VENTAJAS	DESVENTAJAS
Fácil separación de células del medio donde se encuentran	Problemas de difusión por alta densidad celular y baja solubilidad del oxígeno en agua.
Reutilización de las células	Cambios en la fisiología celular que podrían afectar la productividad (por condiciones no naturales)
El soporte actúa como agente protector frente a efectos fisicoquímicos como pH, temperatura, solventes y frente a agentes tóxicos y estrés ambiental.	Inestabilidad mecánica del soporte y pérdida de la actividad celular en operaciones prolongadas.
Fácil operativa y bajo consumo de energía	
Reducción del riesgo de contaminación	
Posibilitan procesos continuos de fermentación que se pueden optimizar y controlar mejor	
Posibilitan la realización de fermentaciones a baja temperatura para mejorar la calidad del producto	
Aumento en la absorción de sustratos y mejoras en el rendimiento	
Aumento de la tolerancia a alta concentración de sustrato y reducción de la inhibición por producto	
Permite operar a una alta densidad celular por unidad de volumen	

La inmovilización celular tiene una serie de aplicaciones en la elaboración del vino, algunas se han llevado a cabo a nivel industrial y otras se están adaptando a nivel de laboratorio para su estudio. Dentro de ellas se destacan:

- **Producción de vinos espumosos:** el vino espumoso se elabora a partir de una segunda fermentación alcohólica de un vino base al cual se le añade azúcar y una cepa de levadura de la especie *S. cerevisiae* o *S. bayanus* seleccionada para este fin. La fermentación del vino espumoso elaborado por el método tradicional o 'champenoise' se realiza en el interior de botellas tipo 'champagne'. Cuando la segunda fermentación se completa, las levaduras se extraen completamente del medio donde han fermentado para evitar la turbidez del producto antes de su salida al mercado. Esta remoción de las levaduras es bastante complicada. Las botellas se colocan en posición inclinada y se remueven repetitivamente durante un periodo sustancial de tiempo hasta que se consigue que los sedimentos de las levaduras se depositen en el cuello de la botella. Posteriormente en la etapa de degüelle, el cuello se congela, la botella se abre y los sedimentos de las levaduras congelados salen expulsados por la presión adquirida en el interior del recipiente. El removido es una operación larga que necesita una mano de obra importante para cada botella ya que tiene que ser manipulada durante muchos días. A finales de la década de los años 80, se estudió la inmovilización celular, para la realización de la segunda fermentación en botella de los vinos espumosos, porque aporta una mejora tecnológica que reduce trabajo, tiempo y costos. La introducción de una cantidad de levaduras encapsuladas directamente en la botella puede reemplazar la adición tradicional de levaduras libres, donde el proceso de remoción, se realiza en pocos segundos, invirtiendo la botella<sup>33,38,39,40,41</sup>.
- **Mejorar la calidad del vino a través de fermentación a baja temperatura:** se sabe que las fermentaciones a bajas temperaturas mejoran la calidad del vino y reduce la toxicidad sobre las levaduras. Sin embargo, bajo estas condiciones, las levaduras crecen más lentamente y pueden producirse paradas de fermentación. El uso de levaduras inmovilizadas evita el enlentecimiento de este tipo de fermentaciones, porque la biomasa introducida es mayor, y, en consecuencia, aumenta la productividad en relación a levaduras libres<sup>38,40,41</sup>.
- **Para la desacidificación biológica:** un microorganismo que se usa para controlar la desacidificación biológica de mostos es *Schizosaccharomyces pombe*. Esta levadura es una buena alternativa para

la eliminación del ácido málico y para la desacidificación química. Normalmente, se le considera un contaminante, porque si permanece mucho tiempo en el vino después de la fermentación alcohólica o de la maloláctica, puede producir malos olores. La inmovilización de la levadura en perlas de alginato permite monitorizar y retirar con rapidez esta levadura, solucionando el problema de los malos olores<sup>38,41</sup>.

- **Producción de vinos dulces:** se pueden retirar las células inmovilizadas y detener la fermentación alcohólica en el nivel deseado (con una concentración de azúcar residual definida), sin recurrir a un inhibidor. También se utilizan para incrementar la cantidad de glicerol en el vino<sup>38,40,41</sup>.
- **Para controlar el pardeamiento de vinos blancos:** levaduras inmovilizadas sobre geles (carragenato o alginato) para controlar el pardeamiento de los vinos blancos, tanto de los que ya han pardeado (acción correctora) como de los susceptibles de pardear a lo largo del tiempo (acción preventiva). Se ha comprobado que las levaduras inmovilizadas en perlas de carragenato interactúan con compuestos fenólicos y retrasan el pardeamiento del vino<sup>41</sup>.

### *Inmovilización por atrapamiento dentro de una matriz porosa*

El atrapamiento implica la contención de células vivas dentro de una red, permitiendo la difusión de sustratos y productos, lo que hace posible el crecimiento y mantenimiento de células activas. Los polisacáridos naturales (por ejemplo, alginato, carragenina, quitosano, agar, ácido poligalacturónico), polímeros sintéticos (cloruro de polivinilo, Lentikat, poliacrilamida) y proteínas (gelatina, colágeno) pueden gelificarse en matrices hidrófilas en condiciones suaves, lo que permite el atrapamiento celular con una mínima pérdida de viabilidad. El crecimiento celular en la matriz porosa depende de las limitaciones difusionales impuestas por la porosidad de la matriz y el espacio intersticial disponible, que disminuye en el tiempo con la propagación celular y la acumulación de biomasa. Debido a la formación de gradientes de sustrato dentro del soporte de atrapamiento, la mayor parte de la biomasa se concentra en una capa "activa" (ubicada cerca de la interfaz con el medio externo)<sup>35,37,40,42</sup>.

Las matrices a utilizarse en la industria alimentaria deben estar compuestas por materiales no tóxicos, reconocidos como seguros, económicos y que sean capaces de soportar determinadas condiciones de temperatura, pH, presión y contenido de etanol<sup>6</sup>. En relación a esto, las matrices más adecuadas son los polímeros naturales como el alginato, el carragenato y el agar ya que polimerizan en

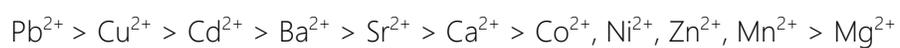
condiciones muy suaves, aunque también se pueden usar matrices sintéticas como poliacrilamida y poliuretano<sup>32,34</sup>.

### Alginato como soporte de inmovilización

Los geles de alginato de calcio son los más utilizados para este tipo de inmovilización por la facilidad para manipular las propiedades gelificantes y la resistencia del gel. Además, cuando la inmovilización se realiza en perlas de alginato, estas pueden ser resolubilizadas con agentes quelantes, con lo que se obtienen células libres para su conteo o evaluación<sup>43,44,45</sup>.

El alginato es un polisacárido de origen natural extraído de diversas especies de algas pardas y también de bacterias como *Pseudomonas* y *Azotobacter*<sup>46</sup>. Ha sido utilizado con éxito en la industria alimentaria como un agente espesante, gelificante y como estabilizador coloidal. Químicamente, los alginatos son una familia de polisacáridos no ramificados constituidos por subunidades de ácido 1-4-D-manurónico (M) y su epímero C5, el ácido-L-gulurónico (G). Se compone de secuencias de M (bloques M), secuencias de G (bloques G), y secuencias de residuos intercalados (bloques M-G). La composición del polímero (%G y %M), la abundancia de bloques y el peso molecular varían según la fuente y las especies que lo producen. Los alginatos tienen la capacidad de unir cationes divalentes para formar hidrogeles siendo el calcio el más utilizado para formar los mismos. La formación del gel ocurre por las interacciones entre bloques G con cationes divalentes, quienes se asocian formando un entrecruzamiento, intercambiándose el ion  $\text{Na}^+$  por el ion  $\text{Ca}^{2+}$  formándose alginato de calcio. Los bloques de MG también participan formando uniones débiles. La estructura hidrofílica de entrecruzamiento se ha descrito por el modelo llamado caja de huevos ("egg box"), donde cada átomo de  $\text{Ca}^{2+}$  es coordinado por los grupos carboxilatos y del oxhidrilo de monómeros de cuatro unidades de G pertenecientes a dos cadenas de polímeros adyacentes. Así, los alginatos con alto contenido de G producen geles más resistentes o con mayor entrecruzamiento<sup>47,48</sup> (Figura 2). Las afinidades de los iones metálicos divalentes son dependientes de las cantidades relativas de ácido D-manurónico y L-gulurónico en el alginato. Dicha afinidad disminuye en el orden siguiente<sup>50</sup>.

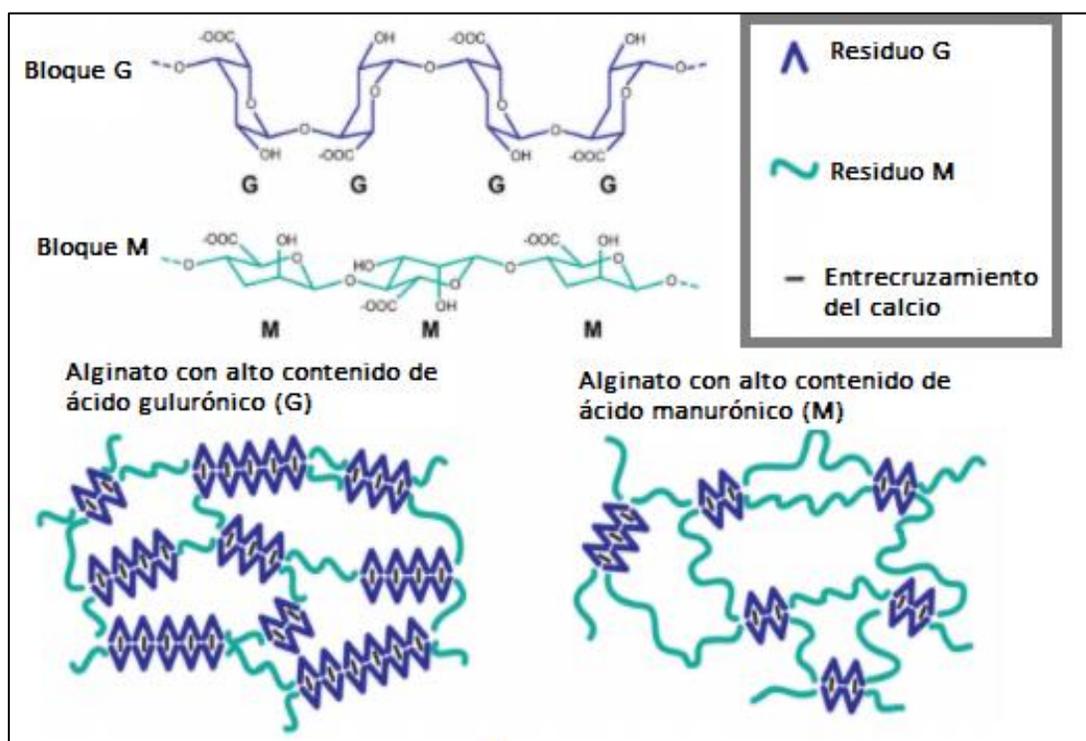
→ Para el alginato rico en M



→ Para el alginato rico en G



Algunos autores han reportado que el atrapamiento en soportes que contienen calcio, como el alginato, permite una mayor actividad de las levaduras en comparación con la matriz, por ejemplo, de  $\kappa$ -carragenina. Se encontró que los iones de calcio aumentan la estabilidad de la membrana plasmática, previniendo la liberación de compuestos citoplasmáticos. Sin embargo, el calcio antagoniza la absorción de magnesio (cofactor para muchas enzimas), bloqueando los procesos metabólicos esenciales dependientes del magnesio<sup>32,51</sup>.



**Figura 2.** El alginato está formado por residuos de ácido gulurónico (G) y ácido manurónico (M). El calcio entrecruza con los residuos G, lo que lleva a una configuración de "caja de huevos". Extraído de <sup>49</sup>

### Recubrimiento de perlas de alginato

En las perlas de alginato, las células están homogéneamente distribuidas tanto cerca como en la superficie de las mismas en la etapa inicial del cultivo. Uno de los problemas del atrapamiento celular dentro de una matriz porosa es la capacidad de las células ubicadas en la superficie externa de las perlas

para multiplicarse y liberarse de la misma. Esto lleva a un sistema que comprende tanto inmobilizado y células libres. La tasa de liberación celular de la matriz polimérica se ve afectada por las propiedades físicas de la matriz, como resistencia mecánica y tamaño de poro, así como tensión celular, concentración celular inicial y condiciones de cultivo<sup>52</sup>.

Para evitar este problema, se han desarrollado técnicas de recubrimiento de la perla con una capa externa libre de células, entonces las perlas tendrán un núcleo interno, el cual contiene las células y una capa externa, impidiendo que las células del núcleo escapen. Una técnica muy eficaz para evitar la liberación de células, es recubrir la perla con una capa de alginato de calcio libre de células. También se puede realizar un doble recubrimiento con alginato de calcio<sup>52,53</sup> (Figura 3).

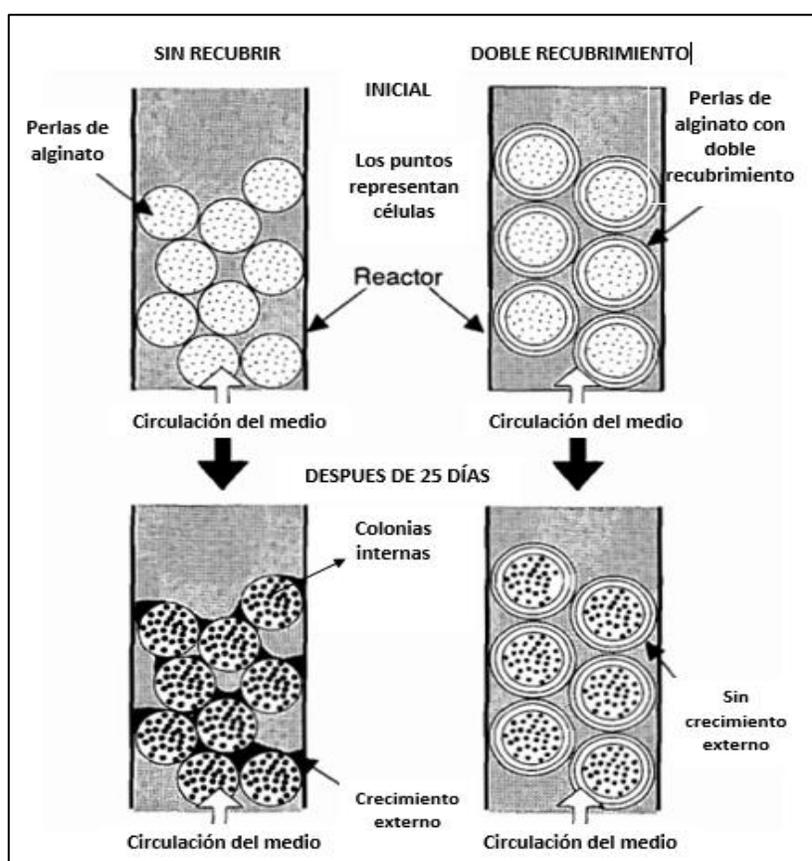


Figura 3. Efecto del doble recubrimiento en el crecimiento celular durante la fermentación. Extraído de <sup>53</sup>.

Existen otras técnicas de recubrimiento que involucran tanto interacciones iónicas como covalentes entre la superficie del gel de alginato y el material de recubrimiento<sup>54</sup>.

### **Recubrimiento iónico “crosslinking”**

La formación de una capa externa de policationes en la superficie cargada negativamente de la cápsula de gel de alginato se puede realizar a través de la interacción iónica entre grupos carboxílicos del alginato y terminales amino de policationes. Los principales policationes utilizados para formar complejos con alginato son los poliaminoácidos: Poli-L-lisina (PLL) y poli-L-ornitina (PLO), polímeros naturales (p. Ej., Quitosano) y polímeros sintéticos (p. Ej., Polietileimina, polimetileno-guadina (PMCG), poli-alilamina (PAA) y poli-vinilamina. El quitosano es un polielectrolito catiónico soluble en soluciones ácidas a un pH menor de 6,5 debido a la presencia de los grupos amino. La cantidad de quitosano unido al gel de alginato se rige por la difusión restringida del quitosano en la red de alginato. En consecuencia, varios factores afectan la unión del quitosano, entre ellos se encuentran: la porosidad del gel de alginato, el peso molecular del quitosano, y el pH ambiente. La estabilidad de las cápsulas recubiertas está relacionada con el espesor de la capa externa de quitosano, por lo tanto, con la cantidad de quitosano unido. La resistencia mecánica de las cápsulas es mayor a medida que aumenta la concentración de quitosano de la solución de recubrimiento. Cuando la mayoría de los carboxilos cargados negativamente en la superficie del gel de alginato se unieron con grupos amino cargados positivamente de quitosano, el grosor de la membrana no crece más, incluso con concentraciones más altas de quitosano. Se pueden generar, de esta manera, perlas recubiertas de quitosano, y a su vez recubrirlas con otra capa de alginato<sup>48,54</sup>.

### **Recubrimiento covalente**

Los compuestos utilizados para el entrecruzamiento covalente confieren a los geles una estabilidad mejorada y resistencia mecánica. Sin embargo, estos pueden ser tóxicos y su aplicación para el área de alimentos no es recomendable. Uno de los reactivos ampliamente conocido es el glutaraldehído que mediante la reacción de sus grupos aldehído con los grupos hidróxilo del alginato forman una red de hidrogel de alginato entrecruzado. A su vez, se ha reportado en algunos casos que la actividad metabólica de las células inmovilizadas disminuye a medida que aumenta la concentración de glutaraldehído<sup>54</sup>.

### *Métodos para la conservación de células inmovilizadas a largo plazo*

Generalmente, las células inmovilizadas solo se pueden almacenar durante un periodo corto, por lo que, para el almacenamiento de las mismas por un periodo medio-prolongado con la finalidad de un

posterior reuso, es recomendable la deshidratación de éstas, ya que, así, se reduce el metabolismo celular a nivel basal, deteniendo el crecimiento celular dentro de la perla. Adicionalmente, se contribuye a disminuir el riesgo de contaminación<sup>6,55,56,57</sup>. La deshidratación sin compromiso de la estabilidad de las células allí inmovilizadas, tiene como ventaja el no requerimiento de equipamientos refrigerados para su almacenamiento.

Existen diferentes técnicas de secado que se pueden utilizar para la deshidratación de levaduras, entre ellas se destacan secador de lecho fluido, sistema concentrador de vacío y liofilización:

### **Secador de lecho fluido**

Es un método muy eficaz y rápido de secado de partículas sólidas. La superficie de las partículas es expuesta para su secado al suspenderla en un flujo de aire (estado fluidizado) que sopla hacia arriba a una velocidad suficientemente alta como para ponerlas en movimiento, lo que resulta en una mejor transferencia de calor y un menor tiempo de secado. Para el secado de las perlas de alginato es conveniente el uso de un secador en lecho fluido a baja temperatura para evitar la pérdida de viabilidad celular. La concentración de alginato tiene gran importancia en la viabilidad de las levaduras inmovilizadas. A baja concentración de alginato la pérdida de viabilidad celular luego del secado es mayor. De todas maneras, luego del secado el porcentaje de viabilidad celular oscila entre un 81-92% dependiendo de la concentración de alginato utilizada en la inmovilización<sup>6,58,59</sup>.

### **Sistema concentrador de vacío (speedvac)**

Utiliza las tecnologías de centrifugación, vacío y calor para eliminar disolventes y concentrar muestras sin poner en peligro su integridad. Funciona mediante la reducción de la presión en el sistema de la centrífuga, permitiendo que el solvente pueda quitarse rápidamente mientras que las muestras no se calientan a temperaturas perjudiciales. Generalmente se usa para concentrar y secar muestras de ácidos nucleicos, preparados de PCR y oligonucleótidos sintéticos de forma rápida y segura<sup>60</sup>. Para *S. cerevisiae* se ha observado una pérdida de viabilidad menor luego del secado al vacío en comparación con el proceso de liofilización, utilizando en ambos casos trehalosa como protector (sección: uso de agentes protectores)<sup>59,61</sup>.

### **Liofilización**

La liofilización es un método que se usa con gran frecuencia para la conservación y

almacenamiento de muestras biológicas. Consiste fundamentalmente en extraer por sublimación, bajo condiciones de alto vacío, el agua de las células congeladas para detener su metabolismo y así poder ser conservadas a temperatura ambiente por largos períodos de tiempo. Sin embargo, este método presenta efectos indeseados en las células preservadas tales como destrucción de su estructura celular debido a la formación de cristales de hielo intracelular y extracelular, daño por deshidratación excesiva, daño celular por incremento en la concentración de solutos dentro de la célula gracias a la pérdida de agua provocando un gradiente osmótico perjudicial, entre otros. Para controlar estos efectos, además de la selección de una rampa de congelación y sublimación adecuadas, se emplean diferentes sustancias denominadas lioprotectores los cuales protegen a las células de los daños causados durante la liofilización<sup>62</sup>.

### Uso de agentes protectores

Debido al daño celular que pueden ocasionar los procedimientos de deshidratación en microorganismos, afectando su viabilidad, se utilizan sustancias protectoras con el fin de reducirlo<sup>63</sup>. Por ejemplo, en el proceso de liofilización se suelen utilizar como agentes protectores con gran eficacia carbohidratos como la trehalosa, lactosa, maltosa, sacarosa y glucosa, la leche descremada y diversos polialcoholes, como el glicerol (15-20% v/v). Aunque su mecanismo de acción no está completamente esclarecido, estos compuestos (altamente hidrofílicos) son capaces de inmovilizar el agua e impedir su cristalización cuando los mismos ingresan al interior de la célula evitando así la deshidratación celular además de modificar propiedades funcionales de algunos elementos celulares<sup>62</sup> (Figura 4). La leche descremada es un lioprotector ampliamente utilizado para proteger células eucariotas, especialmente las levaduras, al contener una mezcla de proteínas (lactoalbúmina y caseína), las cuales sirven como agentes de carga y los aminoácidos contenidos en las mismas ayudan a reparar el daño causado durante la liofilización<sup>62</sup>. Berny y Hennebert reportaron que luego de la liofilización, utilizando leche descremada como protector, *S.cerevisiae* muestra un 30% de viabilidad, valor que puede aumentar a un 96-98% si se combina la leche descremada con compuestos como la miel, glutamato de sodio, trehalosa o rafinosa<sup>64</sup>. Los disacáridos, como la trehalosa, reemplazan el agua de las membranas después de la deshidratación y evitan el despliegue y la agregación de las proteínas por enlaces de hidrógeno con los grupos polares de estas, de esta forma, las células no pasan de su estado de cristal líquido a la fase de gel y mantienen su estructura celular intacta, lo cual posibilita que la membrana no sufra rupturas durante el proceso de liofilización y rehidratación<sup>62</sup>. También se ha reportado el uso de mosto al 18% como lioprotector, con un

porcentaje de sobrevivencia del 20%<sup>65</sup>. Para la deshidratación realizada a través de corrientes de aire, los agentes protectores más utilizados son leche descremada suplementada con azúcares (glucosa, fructosa, galactosa, sacarosa, trehalosa, lactosa, maltosa, entre otros), polioles (manitol, sorbitol, inositol), o compuestos nitrogenados (glutamato monosódico y peptona). Se ha reportado una supervivencia de las levaduras inmovilizadas en perlas de alginato de 92% secadas a través de corriente de aire utilizando 10% leche descremada + 10 % trehalosa<sup>57</sup>.

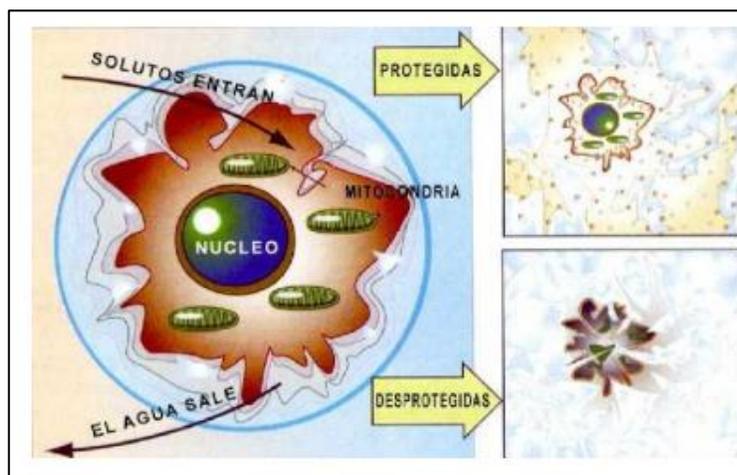


Figura 4. Diferencias entre una célula protegida con crioprotectores y sin crioprotectores. Extraído de<sup>66</sup>.

# Objetivos

---

## OBJETIVO GENERAL

Inmovilizar células de *Saccharomyces cerevisiae* en alginato de calcio y caracterizar las perlas de alginato para su evaluación en procesos fermentativos.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener perlas de alginato: optimizar las condiciones de inmovilización de *S. cerevisiae* T73-4 en alginato de calcio.
- Caracterizar las perlas de alginato
- Aplicar las perlas de alginato en fermentación en medios símil mosto y mosto Tannat.
- Evaluar la estabilidad operativa de las perlas de alginato y posible reuso luego del proceso de fermentación.

# Materiales y métodos

---

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Cepa de levadura y mantenimiento*

Se utilizó la cepa *Saccharomyces cerevisiae* T73-4, otorgada por el Dr. Ramón González del Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (ICVV) de Logroño, España. El mantenimiento de la cepa se realizó en freezer -80°C en medio YPD líquido (10 g/L de extracto de levadura, 20 g/L de peptona y 20 g/L de glucosa) suplementado con 20% v/v de glicerol como crioprotector.

### *Condiciones de cultivo*

A partir de una colonia pura (aislada de placa YPD agar) se inocularon 25 mL de medio YPD líquido y se incubó overnight a 28°C y 180 rpm (pre-cultivo). A continuación, se transfirió el pre-cultivo a 250 mL de medio YPD líquido, los cultivos se realizaron durante 72 hs. a 28°C y agitación de 180 rpm. Para la obtención de la biomasa, el cultivo se centrifugó a 5000 rpm durante 5 min a 4°C, descartándose el sobrenadante. A continuación, el pellet (biomasa) se lavó dos veces resuspendiendo el contenido celular en 5 mL de suero fisiológico estéril, centrifugando a 5000 rpm y 4°C, durante 2 minutos.

### *Recuento de biomasa*

Se preparó una solución estándar correspondiente a 0,1 gramo de biomasa y 900 µL de azul de metileno 0,01%. A partir de ésta y con factor de dilución 40, se procedió a realizar el recuento en cámara de Neubauer.

### *Condiciones de inmovilización*

Se prepararon soluciones de 1,5, 2,5 y 3,5 % m/v de alginato (*Macrocystis pyrifera*. SIGMA) en suero fisiológico estéril, a 50°C con agitación de 350 rpm, durante 30 minutos. Para la inmovilización por atrapamiento de *S. cerevisiae* T73-4, la biomasa, resuspendida en 4 mL de suero fisiológico, se adicionó a cada solución de alginato (a temperatura ambiente). Las cargas aplicadas fueron de 0,5 y 1 g de biomasa, en 30 mL de alginato<sup>67</sup>.

### Obtención de las perlas de alginato

La solución de alginato, conteniendo la biomasa, se dejó gotear sobre una solución estéril de  $\text{CaCl}_2$  0,05 M y NaCl 0,2 M en frío<sup>68</sup> (en agua con hielo), mediante bomba peristáltica con agitación de 200 rpm por 30 minutos (**Figura 5**). El diámetro del orificio de salida de la manguera utilizada para el goteo fue de 2,8 mm. Las perlas obtenidas se dejaron durante toda la noche en solución de  $\text{CaCl}_2$  0,05 M en heladera, para su estabilización<sup>43</sup>. Una vez estabilizadas, se lavaron con suero fisiológico estéril y se conservaron en heladera hasta su uso. Nos referiremos en este trabajo al término de perlas de alginato a las células de *S. cerevisiae* T73-4 inmovilizadas en la matriz de alginato de calcio.



**Figura 5.** Procedimiento de la inmovilización en perlas de alginato de calcio.

### Recubrimiento de las perlas de alginato

- **Recubrimiento con quitosano:** Se preparó una solución de 0,4% m/v de quitosano de crustáceo centollón en ácido acético 0,4% v/v y se ajustó a pH 5,0 con NaOH 1M. Las perlas obtenidas de la inmovilización se lavaron con agua destilada y se sumergieron en 100 mL de la solución de quitosano con agitación de 200 rpm durante 40 minutos. Luego las perlas se lavaron con agua destilada y se almacenaron en heladera (4°C) tanto en una solución de suero fisiológico estéril como en una solución de peptona 0,1% m/v<sup>69</sup>.

- **Recubrimiento con una capa de alginato:**

Recubrimiento con alginato 0,17 % (m/v) – R1: Las perlas obtenidas de la inmovilización se lavaron con agua destilada y se mezclaron con una solución 0,17% (m/v) de alginato de sodio durante 20 minutos a 100 rpm, a temperatura ambiente<sup>70</sup>. Luego las perlas se lavaron con agua destilada y se almacenaron en heladera (4°C) en una solución de suero fisiológico estéril.

Recubrimiento con alginato 0,5 % (m/v) – R2: Las perlas obtenidas de la inmovilización se transfirieron a una solución de NaCl 0,2M y CaCl<sub>2</sub> 0,05M en agitación, luego de 15 minutos, se transfirieron a una solución 0,5% m/v de alginato de sodio, con agitación durante 10 minutos. Se lavaron las perlas con agua destilada y se guardaron durante toda la noche en CaCl<sub>2</sub> 0,05M para su estabilización<sup>68</sup>. Una vez estabilizadas, se lavaron con suero fisiológico estéril y se conservaron en heladera hasta su uso.

### *Solubilización de las perlas de alginato y recuento de células inmovilizadas*

En las distintas etapas del proceso, la cantidad de células y su viabilidad, se determinaron mediante recuento en una cámara de Neubauer y tinción con solución de azul de metileno 0,01% (m/v). El porcentaje de viabilidad se calculó a partir del cociente entre el número de células vivas y el número total de células x 100.

El recuento de las células inmovilizadas se realizó solubilizando una perla de alginato en 1 mL de tampón citrato de sodio 0,1 M pH 5.0, con agitación vigorosa entre 10-25 minutos, dependiendo de la concentración de alginato en la misma. La solución obtenida se diluyó 1/10 empleando una solución de azul de metileno 0,01% (m/v) para su recuento en cámara de Neubauer. Este procedimiento se realizó por triplicado.

A partir del recuento en cámara de Neubauer de la solubilización de una perla, se calculó el porcentaje de inmovilización de la siguiente manera:

$$\begin{aligned} & \text{Recuento de la solubilización de 1 perla} \times \text{número total de perlas en ensayo} \\ & = \text{cantidad de células inmovilizadas} \end{aligned}$$

$$\% \text{ de inmovilización} = \frac{\text{cantidad de células inmovilizadas} \times 100}{\text{cantidad de células aplicadas}}$$

La cantidad de células aplicadas corresponde a la cantidad inicial de células en 0,5 g o 1g de biomasa (dependiendo de la inmovilización).

### *Estabilidad de las perlas de alginato en heladera*

La estabilidad de las perlas de alginato en heladera (temperatura 4°C) con suero fisiológico, se determinó mediante recuento del porcentaje de células vivas contenidas en las mismas en función del tiempo. El procedimiento se realizó para todas las inmovilizaciones, semanalmente.

### *Caracterización de las perlas de alginato*

El diámetro de las perlas de alginato se estimó utilizando papel milimetrado. La estabilidad mecánica de las mismas se monitoreó según el tiempo necesario para solubilizar la perla en condiciones de agitación vigorosa, en tampón citrato de sodio 0,1 M pH 5.0.

### *Medios utilizados en las fermentaciones*

**Composición de medio símil Mosto:** glucosa 100 g/L, fructosa 100 g/L, 300 mg/L de nitrógeno asimilable (cloruro de amonio 460 mg/L, 180 mg/L aminoácidos) en tampón citrato de sodio 50 mM pH 5.0. La mezcla de aminoácidos contenía, en mg/L: t-prolina 20,5, L-glutamina 16,9, L-arginina 1,25, L-triptófano 6, L-alanina 4,9, L-ácido glutámico 4, L-serina 2,6, L-treonina 2,6, L-leucina 1,6, L-ácido aspártico 1,5, L-valina 1,5, L-fenilalanina 1,3, L-iso-leucina 1,1, L-histidina 1,1, L-metionina 1,1, L-tirosina 0,6, L-glicina 0,6, L-lisina 0,6, L-cisteína 0,4. Se optimizó el medio agregando una fuente de nitrógeno adicional, yeast nitrogen base 10x (YNB- SIGMA ALDRICH). Se determinó los grados Brix del mosto con alcoholímetro (Brewer's Elite). El símil mosto contenía 18° Brix a una temperatura de 22°C, lo que corresponde con una concentración total de azúcares de 169,4 g/L, alcohol probable 9,9 % v/v y densidad 80 g/L.

Mosto Tannat: se preparó a partir de uvas Tannat de vendimia de marzo 2019 de un viñedo de Maldonado, Uruguay. Las uvas se despalillaron y se estrujaron en mortero estéril hasta obtener un volumen aproximado de 250 mL de mosto. A continuación, se pasteurizó en autoclave, mediante un ciclo corto con incremento de temperatura hasta 105°C y 1 atm de presión, y posterior descenso paulatino de estas condiciones. Al mosto conteniendo 23,5 °Brix a una temperatura de 20,3°C, correspondiente a una

concentración de azúcar de 233,2 g/L, 13,3% v/v de alcohol probable, densidad 1,110 g/mL se le adicionaron 150 mg/L de fuente de nitrógeno (THIAZOTE® PH - LAFFORT®).

Los medios se distribuyeron en tubos falcón estériles previamente pesados y tapados con válvulas airlock, de modo de generar condiciones de semi-anaerobiosis.

### *Condiciones de fermentación alcohólica*

Las fermentaciones se realizaron en dos condiciones: medio símil mosto y mosto Tannat con las perlas de alginato. En paralelo, se realizó un control de fermentación con células T73-4 libres. La fermentación alcohólica se realizó por triplicado en tubos falcón de 50 mL. Para cada ensayo se utilizó 25 mL de medio de cultivo (símil mosto o mosto Tannat) y se inoculó con una concentración de  $1,3 \times 10^7$  células/mL (20 perlas de alginato de calcio). La fermentación se llevó a cabo a 28°C y su seguimiento se realizó controlando la liberación de CO<sub>2</sub> mediante la determinación de la pérdida de peso. La fermentación se consideró finalizada cuando la pérdida de peso alcanzó un valor constante. El blanco del ensayo se realizó en las mismas condiciones para símil mosto y mosto Tannat, sin inóculo de células.

Al finalizar la fermentación, las muestras se centrifugaron a 5000 rpm durante 4 minutos a 4°C y se recolectó el sobrenadante, los cuales se conservaron en freezer (temperatura -20°C) hasta su análisis.

### *Estudio de liberación de células desde las perlas de alginato*

La liberación de células ("*leakage*") desde las perlas de alginato al medio de cultivo (mosto o símil mosto) se determinó mediante recuento en cámara de Neubauer. Se tomó 1 mL del medio de cultivo y se procedió a realizar el recuento en cámara. Para calcular el *leakage* total en el ensayo se multiplicó por el volumen total del medio (25 mL). Este procedimiento se realizó por duplicado.

El porcentaje estimativo de *leakage* se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ de } leakage = \frac{\text{células liberadas desde las 20 perlas al medio} \times 100}{\text{células inmovilizadas en 20 perlas}}$$

### *Balance de masa luego de la fermentación*

Finalizada la fermentación, se realizó el balance de masas en base a la determinación de la cantidad de células remanentes en las 20 perlas de alginato y así como, la cantidad de células liberadas desde las

mismas al medio (*leakage*), en relación a la cantidad inicial de células aplicadas. Para esto, se seleccionó de forme representativa una perla de alginato luego de finalizada la fermentación, se solubilizó y se procedió a realizar el recuento según las condiciones descritas anteriormente. Este procedimiento se realizó por duplicado para cada muestra. El porcentaje de balance de masa se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ Balance de masa} = \frac{(\text{células remanentes en 20 perlas} + \text{células liberadas al medio}) \times 100}{\text{células inmovilizadas en 20 perlas}}$$

Este procedimiento se realizó para cada muestra por duplicado.

Para los sobrenadantes de mosto Tannat correspondientes al ensayo con perlas de alginato, el *leakage* se estimó adicionalmente mediante recuento en placa en medio Wallerstein Nutriente, (WLN - Acumedia Lab – NEOGEN). Para ello, las placas con diferentes diluciones en suero fisiológico de las perlas recubiertas (diluciones  $10^{-1}$  y  $10^{-2}$ ) y de las perlas de alginato sin recubrir y mosto Tannat (diluciones  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ ) se incubaron a 28°C por 48 hs.

### *Análisis de Metabolitos de Microvinificación*

Los azúcares fermentables (fructosa y glucosa), y los metabolitos de fermentación ácido acético, etanol y glicerol se cuantificaron por cromatografía líquida de alta presión (HPLC Waters 510). Las muestras resultantes de la fermentación en medio símil mosto y mosto Tannat, se diluyeron al décimo para ser analizadas por HPLC, mientras que los correspondientes controles sin inóculo se diluyeron 1/100. Un volumen de 20  $\mu$ L de la muestra diluida se inyectó en la columna ROA-Organic Acid H+ (8%) de dimensiones 300 x 7.8 mm (Phenomenex) con un flujo de 0,5 mL de fase móvil (Ácido Sulfúrico 1,5 mM) por minuto y una temperatura de 25°C. El detector acoplado utilizado fue el infrarrojo (IR) (WATERS R401) y el procesamiento de datos se realizó mediante Software Empower. La concentración de cada metabolito se determinó a partir de estándares puros: ácido acético (800 mg/L), etanol 1,2%, glicerol 1g/L, fructosa 1 g/L cada una. Para la glucosa se realizó una curva de calibración con diferentes concentraciones de glucosa (1, 2,5 y 5 g/L).

El cálculo de la concentración de cada metabolito se realizó a partir del área correspondiente al pico de cada uno:

$$\text{Concentracion del analito} = \left[ \frac{\text{area del pico} \times \text{concentracion del estandar del analito}}{\text{area correspondiente al pico del estandar}} \right] \times FD$$

FD: factor de dilución (10 para las muestras resultantes de la fermentación y 100 para los controles sin inóculo).

El cálculo del rendimiento para cada metabolito se realizó a partir de la concentración obtenida de cada uno sobre los azúcares consumidos.

### *Liofilización*

La biomasa de cultivo (obtenida en las condiciones antes mencionadas) se resuspendió en diferentes condiciones: leche descremada UHT (sola o suplementada con 5% m/v de glucosa<sup>71</sup>) o 20% v/v de glicerol. Las muestras se congelaron por 24 hs en posición horizontal en freezer (-20°C), y a continuación se procedió a su liofilización (liofilizador LABOTEC) por 24 horas. El estudio se realizó en las mismas condiciones para las células inmovilizadas en perlas de alginato (sin uso y usadas luego de la fermentación en mosto Tannat).

### *Sistema concentrador de vacío*

La biomasa obtenida en las condiciones ya descritas, se repartió de la siguiente manera: 1g de biomasa se resuspendió en 3 mL, en leche descremada UHT suplementada con 5% m/v de glucosa o en glicerol 20% (v/v). Para cada condición, se repartieron alícuotas de 200 µL en tubos eppendorf de 1.5 mL. El estudio también se realizó para las perlas de alginato (sin uso y usadas) donde en un tubo eppendorf de 1,5 mL, se colocó una perla de alginato y 200 µL de leche descremada UHT suplementada con 5% m/v de glucosa o glicerol 20% v/v). El procedimiento fue realizado en el concentrador de vacío (Thermo Scientific Savant SPD1010) a una presión de 6,8 torr y 46°C de temperatura.

Adicionalmente, la cantidad de células viables se analizaron mediante recuento en placa en medio YPD agar (YPD suplementado con 15 g/L de agar bacteriológico). El ensayo se realizó inoculando una concentración 10<sup>8</sup> cel/mL (control), liofilizadas y deshidratadas mediante concentrador de vacío. Las placas se incubaron a 28°C por 48 hs.

# Resultados y discusión

---

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Optimización de condiciones para la inmovilización de *S. cerevisiae*

Se estudiaron diferentes relaciones de carga (biomasa) y concentraciones de alginato de sodio de manera de determinar aquellas que sean más óptimas para su uso en procesos, tales como fermentaciones. Para ello, una cantidad de 0,5 y 1 g de biomasa se inmovilizó en soluciones de alginato<sup>67</sup> de 1,5, 2,5 y 3,5% m/v. Era deseable que las células inmovilizadas presentaran al menos tres características: favorecer la difusión tanto de sustratos como de productos manteniendo la actividad celular, evitar la pérdida de células y promover la estabilidad estructural del preparado inmovilizado.

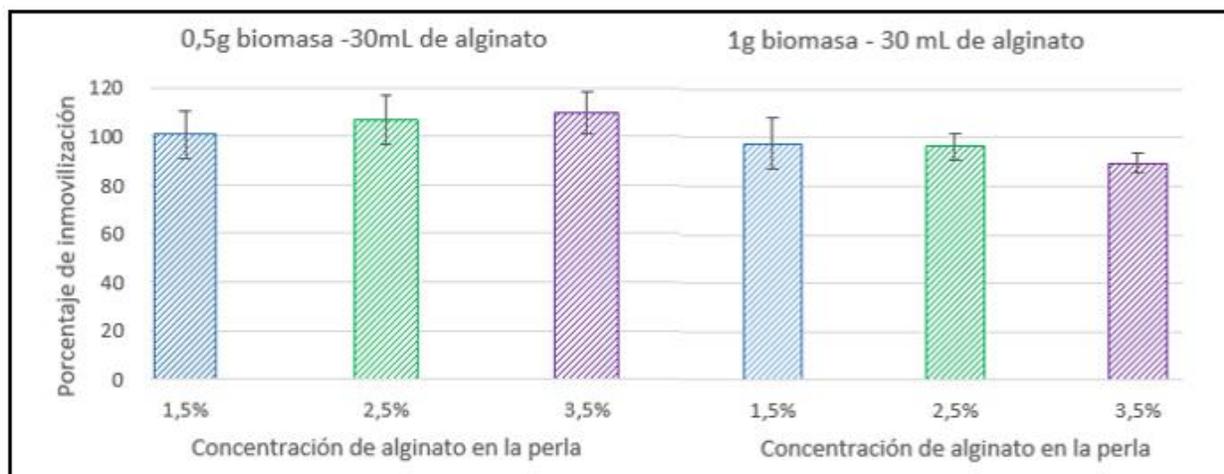


Figura 6. Porcentaje de inmovilización en función de la concentración de alginato utilizada.

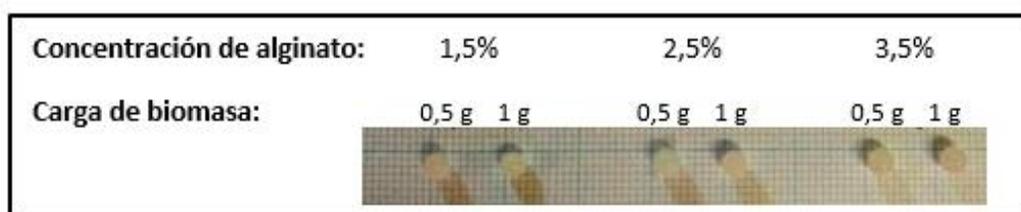
En la **Figura 6** se muestran los porcentajes de inmovilización obtenidos en las diferentes condiciones ensayadas. Para una carga de 0,5g cuando se utilizan las concentraciones de alginato 1,5, 2,5, 3,5% m/v el porcentaje de inmovilización es de  $100 \pm 10$ ,  $106 \pm 10$  y  $109 \pm 9$ , respectivamente. Cuando se carga 1g de biomasa se obtuvo un porcentaje de inmovilización de  $98 \pm 10$ ,  $97 \pm 5$  y  $90 \pm 4$ , respectivamente. Cuando la concentración de alginato fue de 3,5% m/v, se observaron diferencias significativas en el porcentaje de inmovilización dependiendo de la carga de biomasa ofrecida. Para 0,5g de biomasa, el porcentaje de inmovilización fue de  $109 \pm 9$  %, mientras que, para 1 g de biomasa, fue de  $90 \pm 4$  %. Si consideramos que el tamaño de las perlas es el mismo para todos los ensayos, esta diferencia podría estar relacionada a una posible saturación de las perlas. Cuando la concentración de alginato aumenta, el

tamaño del poro de la matriz es más pequeño<sup>72</sup> y menor es el espacio disponible para que las células se inmovilicen. A diferencia de lo observado cuando se utiliza la mitad de carga de biomasa, la perla no se satura, permitiendo alcanzar un mayor porcentaje de inmovilización. Sin embargo, esto último podría dar lugar al crecimiento celular dentro de la misma, lo cual no es favorable, ya que, se ha reportado que el crecimiento celular dentro de la perla (formación de agregados celulares) puede aumentar las limitaciones difusionales propias del sistema de inmovilización<sup>35</sup>. Por lo tanto, alcanzando un mayor grado de saturación de la perla, se asegura que el crecimiento de las levaduras dentro de la misma sea menor.

### Caracterización de las perlas

- **Tamaño de las perlas**

En la **Figura 7** se muestran las perlas de alginato obtenidas a partir de las diferentes concentraciones ensayadas del mismo (1,5, 2,5 y 3,5% m/v). Puede observarse que, todas las perlas son esféricas con un diámetro aproximado de 3,5 mm, presentando apariencia compacta. Visto que, se utilizó un único dispositivo de goteo (diámetro 2,8 mm) era de esperarse que todas las perlas tuvieran el mismo tamaño. En general, se ha observado que cuanto mayor es el tamaño de las perlas, el área superficial disponible para la transferencia de masa de sustrato dentro y a través de la perla disminuye. En perlas más pequeñas, en cambio, se mejoran las propiedades de transferencia de masa (de nutrientes y productos metabólicos)<sup>43</sup>.



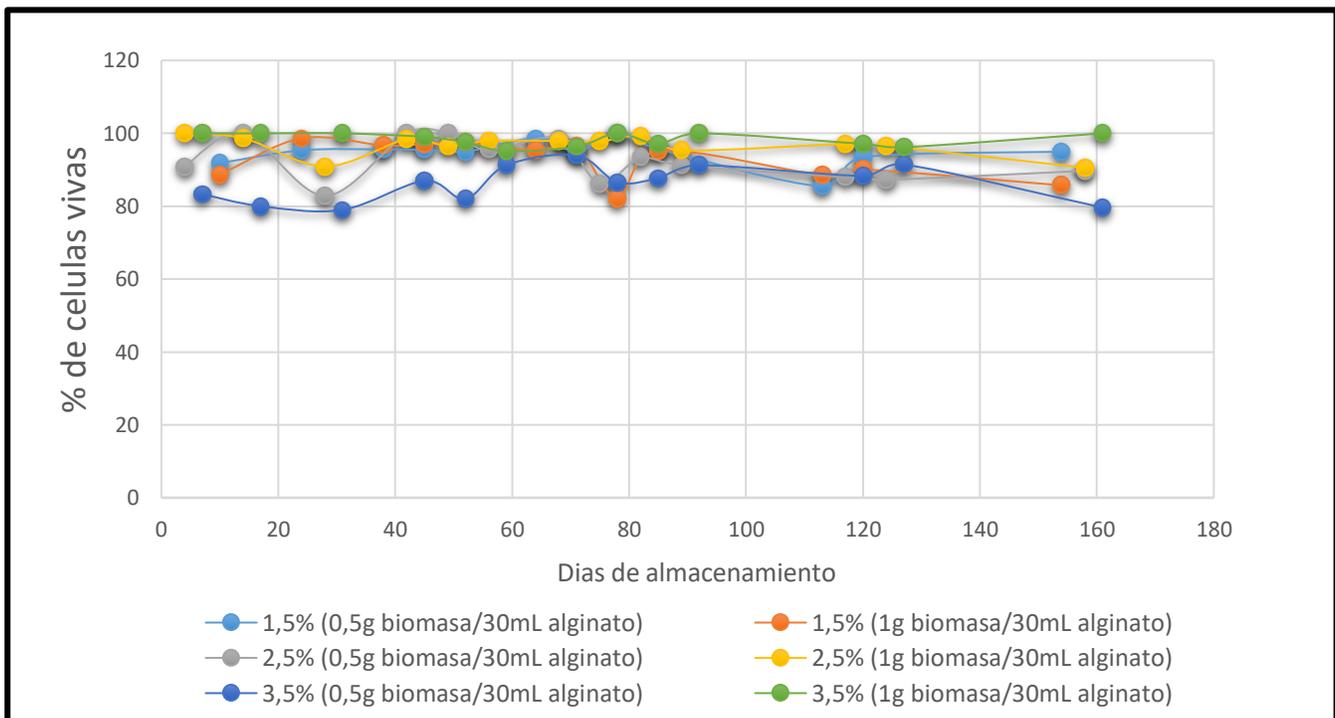
**Figura 7.** Tamaño de las perlas en función de la concentración de alginato utilizada y la biomasa cargada.

- **Estabilidad de las perlas de alginato en heladera**

Para la evaluación de la estabilidad celular se estudió el porcentaje de células vivas en las perlas durante su almacenamiento en heladera a 4°C mediante la técnica de reducción de azul de metileno, método que se basa en la reducción del colorante azul de metileno a azul de leucometileno por parte de las células vivas, tornándose incoloras. Las células muertas no presentan esa capacidad y continúan azules

cuando son observadas al microscopio<sup>73</sup>. En las células muertas el colorante también ingresa, pero no es reducido, por lo que, al observar al microscopio se verán de color azul mientras que las viables no se teñirán<sup>74</sup>. Otros autores, sugieren que el método se basa simplemente en el ingreso del colorante sólo en las células muertas, las cuales presentan su membrana dañada<sup>75</sup>. La viabilidad de las levaduras es el porcentaje de células vivas, mientras que la vitalidad se relaciona con su calidad fisiológica<sup>76</sup>. Por tanto, esta técnica permite distinguir células muertas y células vivas, pero no distingue claramente entre la calidad fisiológica de las células de levadura vivas (estado metabólico). De esta manera, aun cuando el método de tinción tiene la ventaja de ser rápido, solo proporciona un indicio de la viabilidad más que un valor absoluto.

En la **Figura 8** puede observarse que las células inmovilizadas y almacenadas en suero fisiológico en heladera mostraron buena estabilidad, manteniendo en su mayoría, un porcentaje de viabilidad celular entre el 80-100% al cabo de 160 días. Dash y Barik, et al. (2015), han reportado que las células de *S. cerevisiae* inmovilizadas en perlas de alginato almacenadas a 4°C durante 45 días mantienen una viabilidad del 99%, por lo que nuestro resultado se destaca ya que al cabo de 160 días los porcentajes de viabilidad eran muy altos ( $\geq 80\%$ ). Esto representa una ventaja para la conservación de las perlas para su posterior uso, ya que, mantienen gran parte de su estabilidad durante su almacenamiento<sup>77</sup>.



**Figura 8.** Porcentaje de células vivas en las perlas de alginato en función de los días de almacenamiento a 4°C.

- Estabilidad mecánica de las perlas de alginato

La estabilidad mecánica de las perlas de alginato se determinó mediante el uso de tampón citrato de sodio pH 5.0 0,1 M, que actúa como agente quelante del calcio de las perlas permitiendo su disolución. Se observó una relación entre la concentración de alginato en las perlas y el tiempo necesario para disolver la perla completamente. Aquellas con concentración de alginato 3,5% m/v requerían 25 minutos, mientras que las de 2,5% y 1,5% m/v se disolvían completamente en tiempos menores de 20 y 10 minutos, respectivamente. Este resultado demuestra que a mayor % de entrecruzamiento (mayor concentración de alginato) las perlas son más resistentes requiriendo un mayor tiempo de disolución. Este resultado coincide con lo reportado por varios autores que han observado que el incremento de la concentración de alginato conlleva a la obtención de perlas más resistentes<sup>48,78</sup>.

### Caracterización de las perlas de alginato luego del uso en fermentación en símil mosto

En función de los resultados previos obtenidos de estabilidad, se observó que todas las perlas de alginato preparadas, eran estables operacionalmente, por lo que las mismas podrían ser utilizadas en fermentaciones. Sin embargo, pensando en una posible aplicación enológica de las perlas y según los resultados obtenidos previamente en porcentajes de inmovilización, según la relación carga de biomasa-concentración de alginato, se seleccionan para los siguientes estudios de fermentación las perlas de alginato 1,5, 2,5 y 3,5% m/v inmovilizadas con una relación de 1g biomasa/30 mL de alginato.

- Estabilidad operacional de las perlas de alginato

Se realizaron ensayos de fermentación en medio símil mosto, utilizando las perlas de alginato seleccionadas. Al final de la fermentación, se calculó el % de *leakage* y el balance de masa, obteniendo los resultados que se muestran en la **Tabla 2**.

**Tabla 2.** Balance de masa y *leakage* al final de la fermentación utilizando perlas de alginato

Concentración de alginato utilizada (m/v)	<i>Leakage</i> (%)	Balance de masa (%)
1,5%	40 ± 13	140 ± 15
2,5%	1.2 ± 0,7	119 ± 11
3,5%	4.1 ± 1,9	124 ± 17

En la **Tabla 2** se observa un porcentaje de *leakage* de  $40 \pm 13$  % correspondiente a la inmovilización con 1,5% m/v de alginato. Este resultado coincide con lo reportado por varios autores, donde mencionan que a bajas concentraciones de alginato, se obtiene una red con poros muy grandes, permitiendo la difusión de nutrientes y oxígeno a través de la perla de alginato<sup>72,79</sup>. A su vez, se observó que las perlas de 1,5% m/v de alginato son muy frágiles y se rompen con facilidad, generando un proceso de expansión de las mismas con la consecuente liberación de las células al medio. En ese sentido, los porcentajes de *leakage* obtenidos para las concentraciones más altas de alginato fueron considerablemente menores, siendo de  $1,2 \pm 0,7$  y  $4,1 \pm 1,9$  % para 2,5 y 3,5% m/v de alginato, respectivamente.

La cantidad de células y de alginato, la porosidad (dependiente de la concentración de alginato), la concentración de cloruro de calcio y el tiempo de polimerización tienen un rol fundamental en la estabilidad operacional y eficiencia de las perlas<sup>72</sup>. De los resultados obtenidos en este estudio se observó que las perlas con concentración de alginato 1,5% m/v no presentaron la estabilidad operacional requerida para el proceso, mientras que las perlas con concentración de alginato 2,5% m/v se observaron flexibles y resistentes, manteniendo la integridad durante todo el ensayo. Las perlas con concentración de alginato 3,5 % m/v son estables, pero más rígidas, pudiendo dificultar la transferencia de nutrientes a través de las mismas<sup>72</sup>, en comparación con las perlas de 2,5 % m/v de alginato.

Los balances de masa para 1,5, 2,5 y 3,5% m/v fueron de  $140 \pm 15$ ,  $119 \pm 11$  y  $124 \pm 17$  %, respectivamente. Estos resultados indican que hubo crecimiento celular a lo largo del proceso para todas las condiciones de inmovilización ensayadas, siendo mayor en las perlas con la menor concentración de alginato (1,5% m/v). Esto coincide con lo mencionado anteriormente, a menor concentración de alginato, el tamaño de poro es mayor, permitiendo el crecimiento celular. No se observaron diferencias significativas entre las perlas con concentración de alginato 2,5 y 3,5% m/v.

Por lo tanto, en base a los resultados obtenidos, se descartó el uso de las perlas con concentración de alginato 1,5% m/v y se continuó con el estudio de las perlas 2,5 y 3,5% m/v de alginato.

- **Recubrimiento de las perlas de alginato**

Si bien el porcentaje de *leakage* observado para los inmovilizados de 2,5 y 3,5 % m/v ( $1,2 \pm 0,7$  y  $4,1 \pm 1,9$  %, respectivamente) fue bajo (**Tabla 2**), varios reportes sugieren el recubrimiento de las perlas de

alginate considerando que además de disminuir el *leakage* podría mejorar aún más la estabilidad de las mismas<sup>80</sup>.

Se ha reportado que el uso de quitosano como agente de recubrimiento permite la disminución de *leakage*, actuando como barrera para la liberación celular desde las perlas debido a que es un polielectrolito catiónico que interactúa con el alginato polianiónico para dar lugar a una capa que rodea un “núcleo” de alginato<sup>69,81</sup>. En este sentido, como primera alternativa se realizó un recubrimiento con quitosano, obteniéndose perlas operacionalmente estables. Sin embargo, al final del proceso se observó a simple vista que las perlas estaban desintegradas y las células se encontraban en suspensión, sedimentadas en el fondo del tubo, por lo que, pudo deducirse que hubo una excesiva liberación de las mismas al medio, resultado que no concuerda con la finalidad del recubrimiento de las perlas de alginato. Una posible causa del resultado obtenido, podría deberse a la baja pureza del quitosano que disponíamos en el laboratorio. Considerando que dicho procedimiento de recubrimiento no fue exitoso, y existen reportes previos del uso de alginato como agente de recubrimiento se ensayaron recubrimientos de las perlas de alginato con diferentes concentraciones de alginato, de 0,17 % (R1) y de 0,5 % (R2) m/v. De esta forma se generarían perlas con una capa externa de alginato de calcio libre de células con un núcleo interno conteniendo las células, impidiendo que las mismas escapen de las perlas<sup>52,53</sup>.

**Tabla 3.** Evaluación del recubrimiento R1 y R2 de las perlas de alginato

Concentración de alginato utilizada (m/v)	<i>Leakage</i> (%)	Balance de masa (%)
2,5%	1,2 ± 0,7	119 ± 11
2,5% R1	28 ± 4	113 ± 9
2,5% R2	1,9 ± 1	105 ± 9
3,5%	4,1 ± 1,9	124 ± 17
3,5% R1	9,5 ± 1,5	124 ± 10
3,5% R2	5 ± 1	113 ± 1

En la **Tabla 3**, se observa que, para las perlas de alginato 2,5 y 3,5% m/v R1, se observó un aumento significativo del *leakage* de 28±4 y 9,5±1,5 %, respectivamente, en comparación con las perlas de alginato 2,5 y 3,5% m/v sin recubrir (1,2±0,7 y 4,1±1,9 %, respectivamente). El porcentaje de *leakage* observado para las perlas de alginato 2,5 y 3,5% m/v R2 fueron muy similares entre sí (1,9 ± 1 y 5±1 %, respectivamente)

y también con las perlas de alginato 2,5 y 3,5% m/v sin recubrir. Reportes previos coinciden que el recubrimiento de las perlas con una capa de alginato 0,5% m/v, reduce la liberación de células desde las perlas al medio de fermentación. Las diferencias observadas entre los valores de leakage obtenidos para R1 y R2 podrían deberse a que el proceso de recubrimiento se realizó de forma diferente. El recubrimiento R1 se realizó partir de perlas lavadas con agua destilada, las cuales se mezclaron con una solución 0,17% m/v de alginato, mientras que, el recubrimiento R2 se realizó a partir de perlas sumergidas en una solución de  $\text{CaCl}_2$  0,05M y NaCl 0,2M, las cuales se transfirieron a una solución 0,5% m/v de alginato. Este último recubrimiento, permite mayor grado de entrecruzamiento entre el alginato y el calcio, ya que la superficie de las perlas estaba embebida en la solución de  $\text{CaCl}_2$  cuando se transfirieron a la solución de alginato.

El balance de masas realizado luego de finalizada la fermentación en símil mosto con las diferentes perlas de alginato 2,5 y 3,5% m/v tanto recubiertas (R1 y R2) como sin recubrir muestran porcentajes muy similares que van desde  $105 \pm 9$  a  $124 \pm 10$  %.

Estos resultados, indican que, entre las condiciones de recubrimiento ensayadas (R1 y R2), no hay diferencias significativas en cuanto al posible crecimiento celular dentro de la perla. Se destaca que, cuando se recuperaron las perlas al final de la fermentación (**Figura 9**), se observó que las perlas 2,5 y 3,5% R1 quedaban más gelatinosas y muy blandas. Por lo tanto, teniendo en cuenta el aumento significativo de *leakage* en comparación con las perlas de alginato sin recubrir y la falta de estabilidad operacional para un posible reúso, se descarta el uso de las perlas recubiertas R1.



**Figura 9.** Recuperación de las perlas de alginato al final de la fermentación (sin recubrir y recubiertas R1 y R2).

### Evaluación de fermentaciones con células libres vs. células inmovilizadas

Para llevar a cabo estos ensayos se seleccionaron las perlas de alginato 2,5 y 2,5% m/v R2 en base al porcentaje de *leakage* levemente menor de éstas y por reportes previos, en los cuales se ha observado que las perlas con concentraciones de alginato superiores al 3% m/v presentan problemas de difusión de nutrientes<sup>43,72, 82</sup>. Esto es debido a que, a medida que la concentración de alginato aumenta, la velocidad de difusión de la glucosa y etanol disminuye<sup>83</sup>.

- Seguimiento de pérdida de peso durante el proceso de fermentación

El transcurso de la fermentación en símil mosto y mosto Tannat se monitoreó mediante seguimiento de la pérdida de peso, debida a la producción de CO<sub>2</sub> durante el proceso (Figura 10).

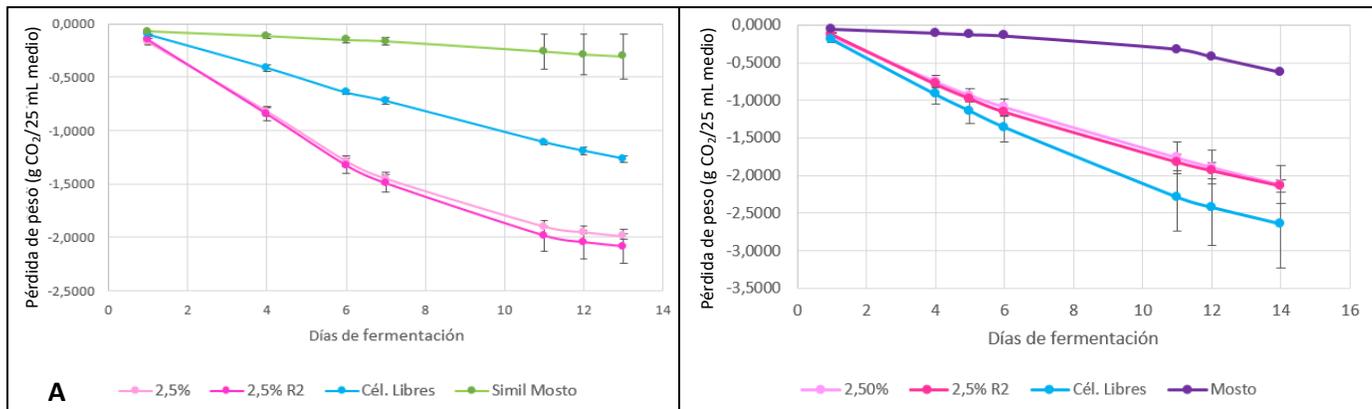


Figura 10. Pérdida de peso en gramos en función de los días de fermentación. A) en símil mosto. B) en mosto Tannat.

En la Figura 10A, se observa que, en símil mosto, las propiedades cinéticas de *S. cerevisiae* inmovilizadas son diferentes a la de las células libres. La pérdida de peso fue más rápida en el ensayo con las perlas de alginato en comparación con las células libres, lo que podría deberse a que las células inmovilizadas presentan un flujo elevado de glucosa, es decir, consumen glucosa a mayor velocidad que las células libres, por ende, más sustrato se convierte en etanol. Se ha observado que las células por interacción con el soporte de alginato, se vuelven metabólicamente más activas y la fermentación ocurre a mayor velocidad respecto a los casos en los que se emplean células libres<sup>45</sup>. Al cabo de 13 días, las células libres alcanzaron una pérdida de peso de 1,3 g mientras que para las inmovilizadas la pérdida de peso fue casi el doble (2,2 g) en la misma condición. En cambio, en mosto Tannat (Figura 10B) no se observaron diferencias significativas de pérdida de peso entre células libres e inmovilizadas. Esto podría deberse a la

complejidad en la composición del medio mosto natural, que además de los nutrientes, contiene gran cantidad de compuestos orgánicos, que comprometen la transferencia de nutrientes a las células inmovilizadas. Es de destacar que las inmovilizadas contienen una barrera de limitación difusional que es la propia matriz de inmovilización, por lo que, sumado a la complejidad del mosto, es esperable que la velocidad en el consumo de nutrientes como la glucosa, en esta condición, esté más limitado.

- **Análisis de metabolitos de microvinificación**

Además de evaluar los parámetros de estabilidad del uso de perlas de alginato y *leakage*, es importante evaluar la performance de la fermentación en relación a los metabolitos de microvinificación principales (etanol, glicerol y ácido acético) generados al utilizar tanto perlas de alginato como células libres.

**Tabla 4.** Producción y rendimiento de metabolitos de microvinificación. (ND: no detectado)

	SIMIL MOSTO			MOSTO TANNAT		
	Células libres	Células inmovilizadas		Células libres	Células inmovilizadas	
		2,5%	2,5% R2		2,5%	2,5% R2
Producción de etanol (g/L)	57±1,4	79±8	75±5	76±18	55±11	61±7
Rendimiento etanol (g/g)	0,5±0,0	0,5±0,0	0,5±0,0	0,5±0,1	0,4±0,1	0,4±0,0
Producción de etanol (%)	7±0	10±1	9±1	10±2	7±1	8±1
Producción de glicerol (g/L)	7±0	10±1	10±1	14±2	9±2	9±1
Rendimiento de glicerol (g/g)	0,06±0,00	0,06±0,01	0,06±0,01	0,09±0,01	0,06±0,01	0,06±0,00
Producción de ácido acético (mg/L)	548±320	1287±175	1320±164	260 ± 40	ND	ND
Rendimiento de ácido acético (mg/g)	5±3	8±1	8±1	1,75 ± 0,27	ND	ND

## Producción y rendimiento de etanol

En la **Tabla 4**, se observa que, para la fermentación transcurrida en símil mosto, la producción de etanol obtenida en el ensayo con las células inmovilizadas fue mayor ( $79\pm 8$  y  $75\pm 5$  g/L para 2,5 y 2,5% m/v R2, respectivamente) en comparación con las células libres ( $57\pm 1$  g/L). Este resultado coincide con lo observado en el monitoreo de pérdida de peso en el cual las células libres fueron menos eficientes, lo que se ve reflejado en la producción de etanol. Por HPLC pudo comprobarse entonces que, las células inmovilizadas fueron más eficientes en la producción de este compuesto, en comparación con las células libres. En cuanto al rendimiento de etanol por gramo de azúcar consumido, no se observaron diferencias significativas entre células libres e inmovilizadas, siendo de  $0,5\pm 0,0$  g/g. Esto último indica que, tanto las células libres como inmovilizadas son capaces de producir la misma cantidad de etanol por gramo de azúcar consumido y la diferencia en las cantidades alcanzadas de etanol se debe a un mayor consumo de azúcares por parte de las células inmovilizadas, en esa condición, como se puede ver más adelante (**Figura 11**). Una posible causa de esta eficiencia en el consumo de azúcares, podría deberse a que las células libres podrían estar bajo efecto inhibitorio del etanol. La sensibilidad hacia el etanol es una característica variable entre las cepas de *Saccharomyces*<sup>13,20</sup>. El efecto protector en las células inmovilizadas se podría deber a que estas contienen porcentajes significativamente más altos de ácidos grasos saturados en comparación con las células libres, lo cual conduce gradualmente a una mayor tolerancia al etanol en las células inmovilizadas y, por lo tanto, a mejores tasas de fermentación, en comparación con las células libres. El aumento de saturación de los ácidos grasos se debe a las condiciones osmóticas alteradas en el microambiente de las células. Sin embargo, Norton y D'Amore sugieren en su estudio, que este aumento en la tolerancia al etanol se puede atribuir ya sea a la capa protectora de gel o a la modificación en la concentración de ácidos grasos en las membranas debido a la limitación difusional del oxígeno<sup>35</sup>. Norton et al., observaron que cuando la matriz polimérica que rodea las células se debilita o se destruye por calor o rotura mecánica, las células liberadas no presentan protección contra el etanol o el estrés por calor, lo que determina que es la propia matriz quién proporciona un entorno protector contra la toxicidad del etanol<sup>84</sup>. Estos resultados coinciden con lo reportado por otros autores, donde se ha observado un aumento en la producción de etanol por parte de las células inmovilizadas<sup>32,85,86</sup>. Galazzo y Bailey, et al., reportaron una producción de etanol y consumo de glucosa más rápidos por parte de las células inmovilizadas en comparación con las células libres<sup>45</sup>.

En mosto Tannat, en cambio, no se observaron diferencias significativas en la producción y el rendimiento de etanol entre células libres e inmovilizadas. En el ensayo donde se utilizaron células libres para llevar a cabo la fermentación, se produjo  $76 \pm 18$  g/L de etanol con un rendimiento del mismo de  $0,5 \pm 0,1$  (g/g), mientras que para las perlas de alginato 2,5 y 2,5% m/v R2 se obtuvieron  $55 \pm 11$  y  $61 \pm 7$  g/L de etanol con un rendimiento de  $0,4 \pm 0,1$  y  $0,4 \pm 0,0$  (g/g), respectivamente. Esto concuerda con lo observado en la pérdida de peso (**Figura 10B**), en donde, en mosto Tannat no se observaron diferencias significativas entre células libres e inmovilizadas. Este resultado puede deberse a un efecto propio del medio de fermentación utilizado, ya que el mosto Tannat es más complejo, en comparación al medio similar mosto. El mosto natural además de contener agua, azúcares reductores, nitrógeno asimilable y factores de crecimiento contiene también polifenoles, como antocianos y taninos, ácidos orgánicos (tartárico, málico, cítrico), levaduras, bacterias y sustancias formadas por restos de pulpa, hollejos, semillas (las cuales confieren al mosto nutrientes y vitaminas)<sup>17,87</sup> que pueden ingresar por difusión a través de las perlas de alginato. En otras palabras, la compleja composición del mosto natural, conteniendo elevada concentración de compuestos no metabolizables, podría conllevar a problemas de difusión de nutrientes en la perla. A modo de ejemplo, se ha reportado que, cuando en el medio se encuentra gran cantidad de partículas sólidas, éstas podrían obstruir los poros de las perlas de alginato, imposibilitando el contacto entre las levaduras y los nutrientes, por lo que, disminuye la difusión desde y hacia las perlas, provocando que el rendimiento de etanol por parte de las células inmovilizadas sea menor<sup>88</sup>. En concordancia con nuestros resultados, Bokkhim y Neupane, et al., observaron que tanto el consumo de glucosa como la producción de etanol en un mosto tinto es similar entre las células libres e inmovilizadas<sup>90</sup>. A su vez, se han reportado diversas estrategias para minimizar las limitaciones de transferencia de masa impuestas por el propio sistema de inmovilización, entre ellas se destacan una agitación suficiente durante la fermentación y una reducción en el diámetro de la perla, manteniendo las características operativas de las mismas. Ésta última estrategia se debe a que la inmovilización conduce a la reducción de la productividad de las células inmovilizadas debido a que el núcleo de la perla es más deficiente en nutrientes, siendo las células de la periferia las más activas metabólicamente<sup>82</sup>. Al disminuir el tamaño de las perlas aumenta el área superficial disponible para la transferencia de masa de sustrato dentro y a través de la perla. Göksungur, et al. han reportado un diámetro óptimo entre 2.0 - 2.4 mm para las perlas de alginato<sup>91</sup>.

### Producción y rendimiento de glicerol

En la **Tabla 4**, se observa que, para la fermentación en símil mosto, hubo una mayor producción de glicerol por parte de las células inmovilizadas recubiertas y sin recubrir ( $10 \pm 1$  g/L) en comparación con las células libres ( $7 \pm 0$  g/L), lo cual coincide con lo reportado por diferentes autores<sup>40, 92</sup>. Este resultado es una ventaja para el inmovilizado, ya que el glicerol presenta diferentes cualidades sensoriales, aportando un sabor ligeramente dulce y, debido a su naturaleza viscosa, contribuye a la suavidad, consistencia y cuerpo de los vinos. Adicionalmente, tanto las células libres como inmovilizadas 2,5 y 2,5% m/v R2, son capaces de producir la misma cantidad de glicerol por gramo de azúcar consumido,  $0,06 \pm 0,01$ ,  $0,07 \pm 0,01$  g/g respectivamente, y para las células libres el rendimiento fue similar ( $0,06 \pm 0,00$  g/g). Esto concuerda con el resultado obtenido en la producción de etanol, las células inmovilizadas consumen más azúcares, produciendo mayor cantidad de glicerol en comparación con las libres.

Sin embargo, cuando la fermentación transcurrió en mosto Tannat, se observó mayor producción y rendimiento de glicerol por parte de las células libres ( $14 \pm 2$  g/L y  $0,09 \pm 0,01$  g/g respectivamente) en comparación con las células inmovilizadas ( $9 \pm 2$  g/L y  $0,06 \pm 0,01$  g/g). Estos resultados podrían ser nuevamente atribuidos a las limitaciones difusionales ocasionadas por la propia complejidad en nutrientes del mosto, como también a las impuestas por el propio sistema de inmovilización. Si bien, como se mencionó anteriormente, varios autores observan un aumento en la producción de glicerol por parte de las células inmovilizadas, Norton, et al.<sup>35</sup> y Taipa y Cabral, et al.<sup>93</sup>, reportaron un menor rendimiento de metabolitos secundarios de fermentación por parte de éstas. Una de las hipótesis que plantean para este resultado es que el menor pH intracelular en las células libres durante la fermentación, podría ser responsable del cambio metabólico que conduce a una mayor producción de metabolitos secundarios (glicerol, ácido acético acetaldehído) por parte de éstas, en comparación con las células inmovilizadas<sup>35,93</sup>.

Visto que, en vinos, el glicerol se encuentra a concentraciones de 5-15 g/L, las concentraciones alcanzadas en este estudio son adecuadas para un vino finalizado, tanto para las células libres como inmovilizadas.

### Producción y rendimiento de ácido acético

Se observó que durante el transcurso de la fermentación en medio símil mosto (**Tabla 4**), los valores de producción de ácido acético por parte de las células inmovilizadas son elevados, siendo de  $1287 \pm 175$

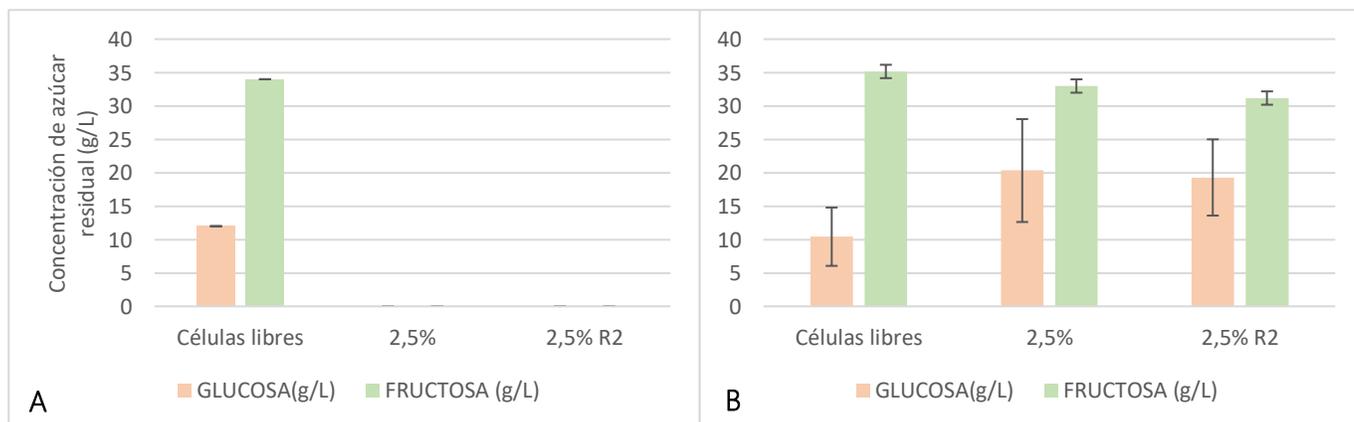
mg/L en perlas sin recubrir y  $1320 \pm 164$  mg/L en perlas recubiertas, en comparación con las células libres ( $548 \pm 320$  mg/L). El valor alto del desvío estándar se debe a que el pico cromatográfico del ácido acético es casi despreciable, por lo que el error que se puede generar al medir el área del mismo es más grande.

Cuando la fermentación se desarrolló en mosto Tannat, no se detectó producción de ácido acético por parte de las células inmobilizadas 2,5% y 2,5% R2. En cambio, se observó producción del mismo, por parte de las células libres, de  $260 \pm 40$  mg/L (**Tabla 4**). Varios autores han reportado que la inmobilización de levaduras, tiende a disminuir los valores de acidez volátil<sup>93,94</sup>. Esto presenta una ventaja del inmobilizado frente a células libres, ya que es deseable la obtención de valores mínimos de acidez volátil, ya que, si bien es un producto natural de la fermentación, en exceso deja un aroma a vinagre y barniz en el vino. En vinos, la concentración de ácido acético se considera defecto a partir de 600 mg/L<sup>23</sup>, por lo que los resultados obtenidos se encuentran dentro de los valores de ácido acético aceptables en vino.

- Consumo de azúcares en medio similar mosto y mosto Tannat

En la **Figura 11**, se muestra la concentración de azúcares residuales (glucosa y fructosa) luego de la fermentación para células inmobilizadas y libres.

En similar mosto, las células inmobilizadas (2,5% y 2,5% m/v R2) consumieron la totalidad de glucosa y fructosa presente en el mismo ( $86 \pm 1,4$  y  $74 \pm 1,4$  g/L, respectivamente), mientras que, cuando se utilizaron células libres, la glucosa y fructosa remanente es de 12 g/L y 34 g/L respectivamente (**Figura 11A**). Esto refleja el resultado obtenido en cuanto a producción de etanol (y glicerol) en similar mosto, siendo mayor por parte de las células inmobilizadas en comparación con las libres, más azúcar consumido (en anaerobiosis) más producción de etanol.



**Figura 11.** Concentración de azúcares residuales (glucosa y fructosa) luego de la fermentación en similar mosto (A) y mosto Tannat (B). Concentración inicial de glucosa y fructosa presente en similar mosto es de  $86 \pm 1,4$  y  $74 \pm 1,4$  g/L, respectivamente, mientras que en mosto Tannat es de  $95 \pm 4$  y  $101 \pm 5$  g/L, respectivamente (determinado por HPLC).

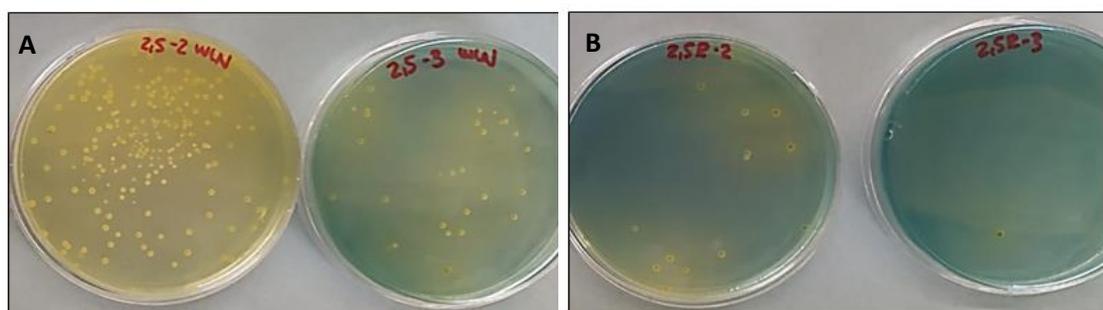
En mosto Tannat (**Figura 11B**), conteniendo inicialmente  $95\pm 4$  g/L de glucosa y  $101\pm 5$  g/L de fructosa, la glucosa remanente luego de la fermentación fue de  $10\pm 4$  g/L para las células libres y  $20\pm 7$  y  $19\pm 5$  g/L para las células inmovilizadas 2,5% y 2,5% m/v R2, respectivamente. La fructosa remanente fue de  $35\pm 4$  g/L para las células libres y  $32\pm 7$  y  $31\pm 5$  g/L para las células inmovilizadas 2,5% y 2,5% m/v R2, respectivamente. Por lo que, puede observarse que los azúcares residuales son similares (teniendo en cuenta el desvío estándar) tanto para las células libres como inmovilizadas, lo que coincide con la cantidad de etanol alcanzada en estas condiciones (**Tabla 4**).

En todas las condiciones, el azúcar residual minoritario es la glucosa, esto se debe a que *S. cerevisiae* es glucofílica, es decir consume glucosa a mayor velocidad que la fructosa. Esta preferencia se debe a que los transportadores celulares de estas hexosas presentan una mayor afinidad por la glucosa que por la fructosa<sup>95</sup>. En la elaboración de vinos tintos, una fermentación alcohólica finalizada da como resultado un agotamiento casi total de los azúcares, lo cual es esencial para obtener un buen equilibrio del vino. Generalmente, cuando los valores de azúcares reductores están por debajo a 2 g/L, se considera que la fermentación ha finalizado<sup>96</sup>. Los valores de azúcar residuales obtenidos en mosto Tannat son elevados para considerar un final de fermentación exitoso. Una posible causa a esta parada de fermentación observada podría ser la falta de nitrógeno. El nitrógeno es un factor clave cuyo impacto es determinante en la fermentación del vino, ya que es el nutriente más importante y, por consiguiente, influye tanto en la cinética de la fermentación como en la calidad del mismo. Es esencial para el crecimiento y metabolismo de las levaduras durante el proceso de vinificación. El nitrógeno fácilmente asimilable constituye un importante factor nutricional para las levaduras durante la fermentación alcohólica por permitir la síntesis de proteínas que van a asegurar el transporte de los azúcares hacia el interior celular, donde serán fermentados<sup>97,98,99</sup>. En nuestro estudio, se observó que, sin el agregado inicial de fuente de nitrógeno al mosto, las levaduras no crecían, por lo que, se adicionó 150 mg/L de fuente de nitrógeno (THIAZOTE® PH - LAFFORT®) al inicio de la fermentación lo que favoreció el crecimiento y metabolismo de las mismas. Por lo tanto, como forma de optimizar este proceso, se podría adicionar nitrógeno tanto al inicio de la fermentación y avanzado 1/3 de la misma, de modo que el uso de nitrógeno sea paulatino y la fermentación constante, evitando entonces paradas de fermentación<sup>97</sup>. Hoy en día, también existen otros métodos de reactivación de la fermentación que consisten en la limpieza del propio mosto. La uva puede contener componentes tóxicos que inhiben la fermentación (ácidos grasos de cadena corta y

media). En el mercado actual, se encuentran disponibles productos en base a paredes celulares de levadura con buena capacidad de absorción y afinidad por estos componentes<sup>100</sup>.

### Caracterización de las perlas de alginato luego del uso en fermentación de mosto Tannat

Luego de finalizada la fermentación en mosto Tannat, se realizó el estudio de *leakage* y balance de masas. Debido a la complejidad del medio mosto natural, al tratarse de uvas tintas, en lugar del recuento en microscopio, se realizó recuento en placa en medio WLN para realizar un cálculo estimativo de *leakage* en las fermentaciones realizadas con células inmovilizadas (Figura 12).



**Figura 12.** Siembra en placa en medio WLN. Sobrenadante de ensayo utilizando: A) perlas de alginato 2,5% (m/v) B) perlas de alginato 2,5% (m/v) R2

Se obtuvo un recuento de  $2,5 \times 10^5$  ufc/mL para el sobrenadante del ensayo donde se utilizaron las células inmovilizadas en alginato 2,5% m/v y  $1,5 \times 10^4$  ufc/mL para las perlas 2,5% m/v R2. Estos valores corresponden a un % de *leakage* de 2 y 0,1%, respectivamente. Si bien, para las perlas de alginato sin recubrir se obtuvo un *leakage* bajo, se demuestra que el recubrimiento con 0,5% m/v de alginato, previene aún más, la liberación de células al medio. El balance de masas luego de la fermentación fue de  $118 \pm 10$  y  $129 \pm 4$  % para las perlas de alginato sin recubrir y recubiertas R2 respectivamente, similar a lo observado en símil mosto, lo que refleja un leve crecimiento celular dentro de la perla de alginato durante el proceso.

### Viabilidad de células inmovilizadas luego de su uso en fermentación

Luego del proceso de fermentación (en símil mosto y mosto Tannat), se estudió el porcentaje de células vivas contenidas en las perlas de alginato a través del recuento en cámara de Neubauer mediante tinción con azul de metileno. Adicionalmente, luego del proceso de fermentación en mosto Tannat, se realizó un recuento en placa en medio YPD agar de dichas células (Tabla 5).

Tabla 5. Viabilidad de células inmovilizadas finalizada la fermentación.

	% VIABILIDAD		
	SIMIL MOSTO	MOSTO TANNAT	
	Microscopio	Microscopio	Placa
2,5%	71±4	33±8	13±4
2,5% R2	76±1	31±6	9±2

En la **Tabla 5**, se observa que luego de la fermentación en símil mosto el porcentaje de viabilidad de las células inmovilizadas 2,5% y 2,5% R2 fue de 71±4 y 76±1 %, respectivamente. En mosto Tannat, el porcentaje de viabilidad fue significativamente menor, siendo de 33±8 y 31±6% para las células inmovilizadas 2,5% y 2,5% R2, respectivamente, mediante recuento en el microscopio, y de 13±4 y 9±2%, respectivamente, mediante recuento en placa. Esta diferencia obtenida entre ambos métodos, podría deberse a que la técnica de recuento en microscopio con azul de metileno si bien permite distinguir células muertas y células vivas, no distingue la calidad fisiológica (estado metabólico) de las células de levadura vivas. Por lo que, las células pueden no teñirse (siendo contadas como vivas) pero incapaces de reproducirse y estar metabólicamente activas (por lo que no crecerán en un medio de cultivo). Se ha demostrado que la confiabilidad del procedimiento con azul de metileno disminuye cuando una muestra comienza a perder viabilidad, lo que puede conducir a una sobreestimación del número de células viables en una población<sup>101,102,103</sup>. En general, puede concluirse que ambos métodos resultaron ser adecuados para el recuento, siendo el azul de metileno un recuento estimativo y el recuento en placa más exacto.

Durante la fermentación alcohólica, las células de levadura son expuestas a varios tipos de estrés a medida que las condiciones del medio cambian (por ejemplo, la disminución del pH externo y la creciente acumulación de etanol). Hacia el final de la misma, estos cambios se ven acompañados con el agotamiento de nutrientes, lo que genera un ambiente que conduce a la reducción de la viabilidad celular (alteraciones de la membrana plasmática, que inhiben el desarrollo de las levaduras)<sup>104</sup>. Por lo que es de esperar que

en un final de fermentación las células de levadura libres presenten un % de viabilidad casi nulo. Una de las ventajas en el uso de la inmovilización celular, es que la matriz de inmovilización actúa como agente protector frente a efectos fisicoquímicos como pH, agentes tóxicos (etanol) y estrés ambiental. Dash y Barik, et al.<sup>77</sup>, han reportado que el porcentaje de viabilidad de células *S. cerevisiae* inmovilizadas luego de la fermentación, en una solución conteniendo glucosa, es de 56%<sup>77</sup>. En nuestro estudio, al final de la fermentación tanto en medio similar mosto, como mosto Tannat, un 99% de las células libres estaban muertas. En medio similar mosto (**Tabla 5**), se observa al final de la fermentación un porcentaje de viabilidad alto (67-77%) de las células inmovilizadas en comparación con las células libres, demostrando el efecto protector de la inmovilización. Sin embargo, en mosto Tannat la viabilidad de las células inmovilizadas al final de la fermentación es muy baja (entre 7-17 %). Esto podría deberse a la posible falta de nitrógeno fácilmente asimilable, esencial para el crecimiento y metabolismo de las levaduras, y a las limitaciones difusionales mencionadas anteriormente, tanto debido a la compleja composición del mosto Tannat como a las limitaciones propias del sistema de inmovilización.

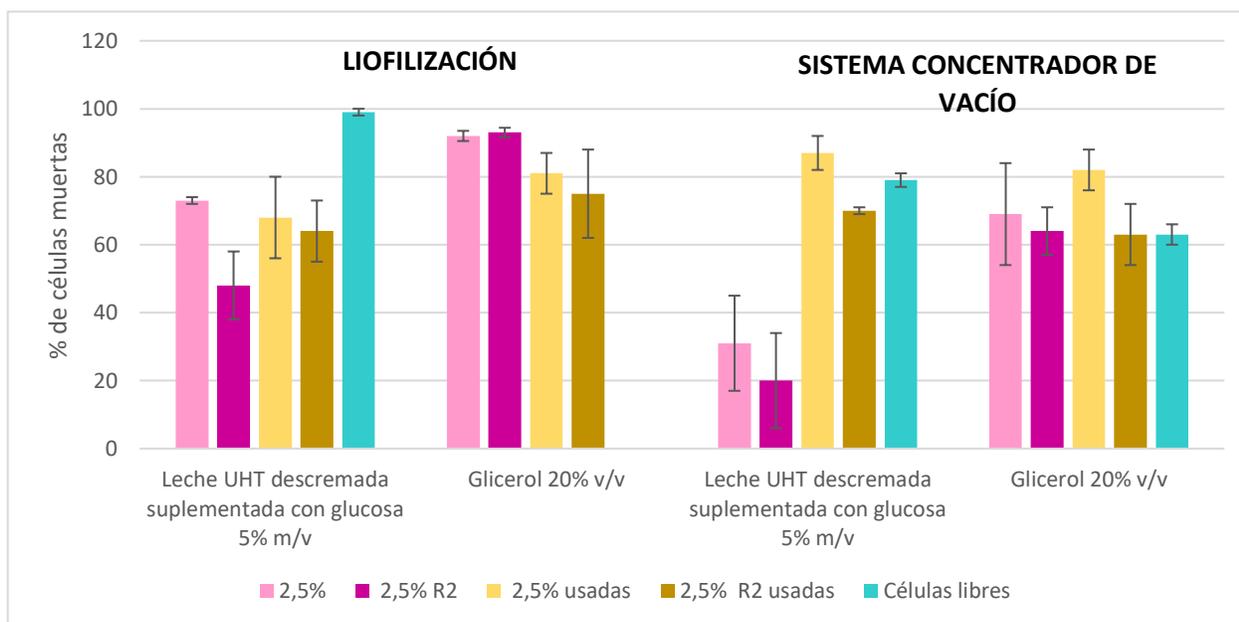
### *Evaluación de métodos de deshidratación de las perlas para posible reúso*

Con la finalidad de un posterior reúso de las perlas de alginato, es recomendable el secado parcial o total de las mismas de forma de detener el crecimiento de las células contenidas en éstas. Adicionalmente se disminuye el riesgo de una posible contaminación. A partir de las condiciones de trabajo posibles en el laboratorio, los métodos de deshidratación estudiados fueron la liofilización y el sistema concentrador de vacío.

En la **Figura 13**, se pueden observar los resultados de porcentaje de células muertas inmovilizadas en 2,5 y 2,5% R2 m/v de alginato (sin uso y usadas en fermentación) luego de los procesos de deshidratación, obtenidos mediante recuento en placa. Se optó por elegir recuento en placa por tratarse de un método más exacto que el azul de metileno, ya que éste último, como se mencionó anteriormente, no distingue la vitalidad de la célula. Luego de los procesos de fermentación y de estrés causado por la deshidratación, es de esperar que el estado metabólico de las células no sea igual a su estado inicial, por lo que, su vitalidad puede verse afectada. Las condiciones adversas a las que se enfrentan las levaduras afectan principalmente a las estructuras celulares (por ejemplo, las membranas) y a las diferentes macromoléculas, especialmente lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, las cuales sufren modificaciones estructurales que dañan su función. En otras palabras, los efectos tóxicos de los productos (por ejemplo,

etanol) y / o factores físicos (por ejemplo, temperatura y estrés mecánico osmótico) pueden conllevar una serie de alteraciones morfológicas, intracelulares o metabólicas que darán como resultado la incapacidad de la célula para dividirse<sup>76,105</sup>.

Como se observa en la **Figura 13**, a través de la liofilización de células libres de *S. cerevisiae* T73-4 utilizando leche UHT suplementada con glucosa 5% m/v se obtuvo un 99% de células muertas al finalizar el proceso. En cambio, el porcentaje de células muertas para las células inmovilizadas es menor en la misma condición (entre 38-80%). Este resultado destaca el efecto protector de la inmovilización sobre la viabilidad celular en estas condiciones. Se ha reportado muy baja viabilidad de *S. cerevisiae* (libre) tras el proceso de liofilización utilizando como lioprotector leche descremada suplementada con glucosa 5% (inferior a 0,5%)<sup>71</sup>, lo cual coincide con el resultado obtenido.



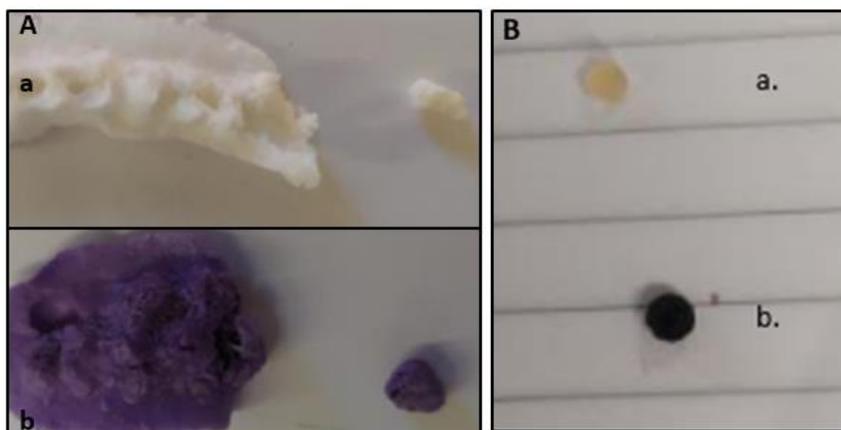
**Figura 13.** Porcentaje de células muertas al finalizar los procesos de deshidratación.

En el caso de las células inmovilizadas sin uso, luego del proceso de liofilización se observó una mayor protección a los daños cuando se trabaja con Leche UHT descremada suplementada con glucosa 5 % m/v en comparación a cuando se utilizó glicerol 20% v/v como lioprotector, siendo el porcentaje de células muertas obtenido 38-74% y 90-94 %, respectivamente (**Figura 13**). A su vez, se observa un efecto protector del recubrimiento (en el caso de las células inmovilizadas sin uso utilizando como lioprotector

leche UHT descremada suplementada con glucosa) ya que luego del proceso, el porcentaje de células muertas fue menor en comparación al obtenido para las perlas sin recubrir,  $48\pm 10$  y  $73\pm 1$  %, respectivamente.

En el caso de células inmobilizadas usadas, cuando se utilizó glicerol 20% v/v como protector, se observó menor porcentaje de células muertas en comparación con las sin uso. A su vez, no se observaron diferencias entre los porcentajes de células muertas obtenidas luego de la liofilización utilizando leche descremada suplementada con glucosa o glicerol.

Luego del proceso de liofilización con leche descremada UHT suplementada con glucosa como lioprotector, la recuperación de las perlas se dificultó, ya que quedaban inmersas en una red de leche deshidratada (**Figura 14A**). En cambio, cuando el medio es glicerol 20% v/v, las perlas quedan bien diferenciadas entre sí, fácilmente recuperables (**Figura 14B**).



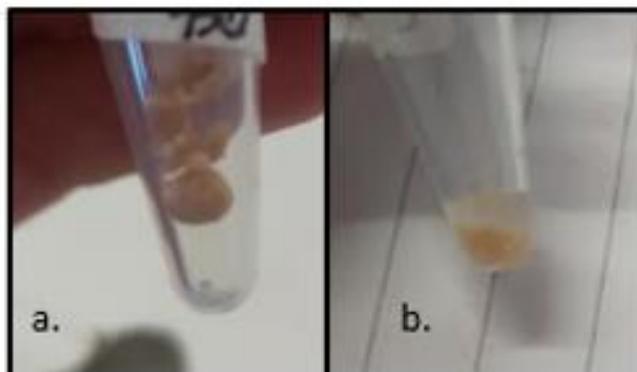
**Figura 14.** Perlas luego de la liofilización utilizando como lioprotector leche UHT suplementada con glucosa (A) (a. perlas sin uso, b. perlas usadas) y glicerol 20% (v/v) (B) (a. perlas sin uso, b. perla usada).

En base a los resultados obtenidos luego del proceso de liofilización, se observó que cuando el agente protector fue leche descremada suplementada con glucosa, se corroboró el efecto protector debido a la inmovilización celular.

Luego de la deshidratación mediante el sistema concentrador de vacío, cuando se utilizó como agente protector leche descremada suplementada con glucosa (**Figura 13**) las células libres mostraron un porcentaje de muertas del 79%. En estas mismas condiciones, el porcentaje de células muertas inmobilizadas en 2,5 y 2,5 % m/v R2 de alginato (sin uso en fermentaciones) fue de  $31\pm 14$  y  $20\pm 14$  %

respectivamente, y de  $87\pm 5$  y  $70\pm 1$  % en perlas usadas, respectivamente. Mediante el sistema de concentración de vacío, utilizando leche descremada UHT suplementada con glucosa, se observó un mayor porcentaje de células muertas para las células inmovilizadas usadas en fermentación, en comparación con las células sin uso, lo que podría deberse a la baja vitalidad de las mismas luego de la fermentación. A su vez, una vez más, el efecto protector de la inmovilización de células sin uso, en comparación con las células libres quedó evidenciado. Cuando se utilizó glicerol como protector, en cambio, los porcentajes de células muertas inmovilizadas en 2,5 y 2,5 % m/v R2 (sin uso) es de  $69\pm 16$  y  $64\pm 7\%$ , respectivamente y en perlas usadas  $82\pm 6$  y  $63\pm 9$  %, respectivamente, no encontrándose diferencias significativas entre perlas usadas y sin usar, ni con las células libres (63%). Luego del sistema concentrador de vacío de las células inmovilizadas usadas, utilizando leche descremada o glicerol, se observó un efecto protector del recubrimiento, siendo menor el porcentaje de células muertas en comparación al obtenido en las perlas sin recubrir.

En cuanto a la estabilidad operacional, las perlas de alginato sometidas al proceso de secado mediante el sistema concentrador de vacío utilizando como protector leche descremada UHT suplementada con glucosa, se fraccionaban con facilidad (**Figura 15a**). Sin embargo, los menores porcentajes de células muertas obtenidos ( $31\pm 14$  y  $20\pm 14$  % en 2,5 y 2,5 % m/v R2, respectivamente) sugieren que podrían optimizarse las condiciones utilizadas en el proceso de deshidratación para mejorar el manejo de las perlas al finalizar el mismo, En ese sentido, algunos autores proponen el secado de perlas a través de la utilización de un secador en lecho fluido a baja temperatura para evitar la pérdida de viabilidad celular, optimizando tiempos y temperatura de trabajo, obteniendo una pérdida de viabilidad de apenas un 3,2 % para perlas con concentración de alginato 2% m/v. A su vez, se propone la conservación de las levaduras en atmósfera inerte, ya que observaron descensos en la viabilidad de las mismas en las perlas de alginato conservadas en atmósferas oxidantes<sup>6</sup>.



**Figura 15.** Perlas luego del sistema concentrador de vacío a. en leche descremada UHT suplementada con glucosa 5% m/v, b. en glicerol 20% v/v

En la **Figura 14(A-B)b** se observan las perlas usadas para la fermentación en mosto Tannat teñidas de color violeta, debido a la adsorción por parte de éstas, de pigmentos provenientes del mosto. Los polifenoles presentes en el mosto de uva Tannat son los responsables del mismo. Estos compuestos influyen también en la astringencia y en la complejidad del producto obtenido luego del proceso de fermentación del mosto. Los antocianos son compuestos fenólicos, presentes normalmente sólo en el hollejo de la uva, responsables de la coloración característica de un vino tinto<sup>106</sup>. La cantidad de antocianos extraídos durante la maceración y fermentación dependen de la levadura utilizada. Los flavonoles (otros compuestos fenólicos) son los principales pigmentos amarillos de los hollejos de las uvas negras y blancas y juegan un rol importante como co-pigmentos de los antocianos en los mostos y los vinos tintos jóvenes. Los taninos, son otro grupo de polifenoles, que participan en reacciones de estabilización del color<sup>107</sup>.

# Conclusiones y perspectivas

---

## CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Las perlas de alginato obtenidas a través del proceso de inmovilización de *Saccharomyces cerevisiae* T74-3 son compactas con un diámetro de 3,5 mm. Las mismas presentan una buena estabilidad durante su almacenamiento en heladera (4°C), manteniendo en su mayoría un porcentaje de viabilidad celular entre el 80-100% al cabo de 160 días. De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente trabajo, las perlas de alginato 2,5% y 2,5% R2 muestran la mayor estabilidad operativa en el proceso de fermentación.

Los estudios de fermentación realizados a escala de laboratorio, muestran un comportamiento de las perlas de alginato diferente según el medio de fermentación utilizado (símil mosto o mosto Tannat). En medio símil mosto, se observó tanto una mayor producción de etanol y glicerol como consumo de azúcares por parte de las células inmovilizadas en comparación con las células libres. En mosto Tannat se observó una producción de etanol y consumo de azúcares similar por parte de células libres e inmovilizadas, mientras que, la producción de glicerol fue levemente mayor por parte de las células libres. Adicionalmente, en símil mosto, la producción de ácido acético fue excesiva por parte de las células inmovilizadas, mientras que, las mismas no produjeron ácido acético en mosto Tannat. Si bien en mosto Tannat, las concentraciones alcanzadas de metabolitos por las células inmovilizadas no presentaron diferencias significativas en comparación con las alcanzadas por las células libres, las primeras tienen la ventaja de ser fáciles de recuperar al finalizar el proceso, permitiendo un posible reúso de las mismas, para lo cual deberían optimizarse las condiciones ya que la viabilidad obtenida en mosto Tannat de las células inmovilizadas al final de la fermentación fue muy baja (entre 7-17 %).

Debido a que la inmovilización celular por atrapamiento presenta limitaciones difusionales, como perspectiva, se podría optimizar dicho proceso, reduciendo el diámetro de las perlas de alginato al menor tamaño posible, manteniendo las características operativas de las mismas. De forma adicional, para minimizar las limitaciones de transferencia de masa externa (del medio a las perlas de alginato), se podría evaluar una agitación suficiente durante el proceso de fermentación. De este modo, como perspectiva para lograr una fermentación exitosa (completa), se podría agregar fuente de nitrógeno adicional tanto al inicio de la fermentación como a 1/3 de avanzada la misma. Por lo que, optimizando de esta manera las condiciones de fermentación y evaluando a su vez diferentes tamaños de perlas, se podría obtener, al

finalizar una fermentación, porcentajes de viabilidad de células inmovilizadas más altos a los obtenidos, permitiendo un posible reuso de las mismas.

Como perspectiva para evaluar el rendimiento de las perlas de alginato en procesos de fermentación se podrían evaluar para otros objetivos como, por ejemplo, en la clarificación de vinos blancos o para la segunda fermentación o toma de espuma en vinos espumosos.

En relación a las células inmovilizadas usadas en el proceso de fermentación no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de células muertas obtenido luego de los tratamientos de deshidratación utilizados. Mientras que, en el caso de células inmovilizadas sin uso en fermentaciones, el tratamiento óptimo de deshidratación, con la obtención de la menor cantidad de células muertas, fue el sistema concentrador de vacío, utilizando como agente protector leche descremada suplementada con glucosa. A su vez, se evidenció un efecto protector de la inmovilización celular luego de la liofilización utilizando leche UHT descremada suplementada con glucosa 5 % m/v como agente protector. Se podría optimizar las condiciones de los procesos, por ejemplo, suplementar la leche descremada con otros agentes protectores adicionales que puedan potenciar el efecto protector, por ejemplo, leche descremada suplementada con trehalosa.

Este trabajo constituye un acercamiento a la inmovilización de células de *Saccharomyces cerevisiae* en un material no tóxico y económico como el alginato para su uso en procesos fermentativos. Sin embargo, se requieren estudios adicionales de caracterización de las perlas para mejorar los problemas difusionales. En este sentido, en lo referente a los aspectos cinéticos, se requiere el desarrollo de estudios minuciosos de los fenómenos de transferencia y de los aspectos cinéticos que rigen el consumo y generación de metabolitos de fermentación en los sistemas inmovilizados.

Por último, son pocos los estudios de aplicación de los microorganismos inmovilizados en vinificación, debido probablemente a las complicaciones que podrían encontrarse al llevar los procesos a un tratamiento a gran escala. Por lo que sería necesario realizar pruebas a escala piloto que permitan establecer la factibilidad técnica y económica del uso de los mismos en fermentación, así como en elaboración de espumosos donde el uso de la estrategia de inmovilización podría tener un gran potencial para tal fin.

# Bibliografía

---

**BIBLIOGRAFIA**

1. <https://bodegagarzon.com/es/blog/uruguay-la-historia-del-vino-en-el-pais>
2. Beretta, A., Baptista, B., Bentancor, A., Bonfanti, D., Polakof, A., Sanz, V., Viera, M. (2013). Historia de la viña y el vino de Uruguay. El viñedo y su gente (1870-1930) Tomo I. Capítulo 3: La temprana vitivinicultura en el Uruguay: surgimiento y consolidación: 69-92. Biblioteca plural.
3. <https://www.catadelvino.com/blog-del-vino-uruguay>
4. <https://www.empresastips.com/vinos-uruguayos-con-el-mejor-buque-internacional/>
5. <https://www.cenicafe.org/es/publications/avt0402.pdf>
6. Marañon, I., Elejalde, E., Chavarri, M., Lopez de Armentia, I., Villaran, M. (2008). Inmovilización de levaduras por microencapsulación para la fermentación de mostos. II Congreso Iberoamericano sobre Seguridad Alimentaria. V Congreso de Ingeniería y tecnología de alimentos. Barcelona, España.
7. [http://www.acenologia.com/cienciaytecnologia/estructura\\_composicion\\_vino\\_cienc1013.htm](http://www.acenologia.com/cienciaytecnologia/estructura_composicion_vino_cienc1013.htm)
8. Walker, G., Stewart, G. (2016). *Saccharomyces cerevisiae* in the production of fermented beverages. *Beverages* 2(4): 30-42
9. <https://www.agrovin.com/agrv/pdf/documentacion/articulos/>
10. <https://www.vitivinicultura.net/mosto-de-uva.html>.
11. <https://www.vinetur.com/2020062260785/composicion-quimica-de-las-uvas-maduras-y-del-mosto.htm>
12. Epifanio, S. (2005). Influencia de la tecnología de vinificación en la microbiología y desarrollo de la fermentación alcohólica. Tesis doctoral. Universidad de la Rioja, España.
13. Gutierrez, J. (2018). El papel de la selección de levaduras en la elaboración del vino. Cuadernos del Tomas 10: 169-198.
14. Bordeu, E., González, A. (2001). Levaduras en mostos chilenos. Niveles de Nitrógeno Fácilmente Aprovechable. *Agronomía y forestal* 3(10): 4-7.

15. [http://www.acenologia.com/cienciaytecnologia/metabolismo\\_nitrogenado\\_scerevisiae\\_cienc1013.htm](http://www.acenologia.com/cienciaytecnologia/metabolismo_nitrogenado_scerevisiae_cienc1013.htm)
16. Lopez, R., Santamaria, P., Epifanio, S., Garijo, P., Gutierrez, A. (2004-2005). La adición de materia nitrogenada al mosto de uva. *Zubia monográfico* 16: 83-92.
17. Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Doneche, B., Lonvaud, A. (2006). *Handbook of Enology Volume 1. The Microbiology of Wine and Vinifications 2<sup>nd</sup> Edition*. Chapter 3: Conditions of Yeast Development: 79-114. John Wiley & Sons Ltd
18. <https://www.catadelvino.com/blog-cata-vino/>
19. <https://extension.psu.edu/an-introduction-on-low-temperature-fermentation-in-wine-production>
20. <https://ciatej.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/>
21. Suárez, C., Garrido, N., Guevara, C. (2016). Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de alcohol. *Revisión bibliográfica ICIDCA Sobre los derivados de la caña de azúcar* 50 (1): 20-28.
22. <https://www.catadelvino.com/blog-cata-vino/que-graduacion-alcoholica-tienen-los-vinos>
23. Sancho, J., Bota, E., de Castro, J. (1999). *Introducción al análisis sensorial de los alimentos*. Capítulo 9: La degustación de los vinos por E. Puig Vayreda: 151-180. Universidad de Barcelona, España.
24. <https://www.lallemandwine.com/wp-content/uploads/2016>
25. Querol, A., Pérez, R., Alonso, J., Minebois, R., Stribny, J., Oliveira, B., Barrio, E. (2018). New trends in the uses of yeasts in oenology. *Advances in food and nutrition Research* 85: 177–210.
26. <https://www.lallemandwine.com/wp-content/uploads/2015>
27. <https://ciatej.repositorioinstitucional.mx/jspui/>
28. [http://www.acenologia.com/correspondencia/levaduras\\_vinicas\\_cor0214.htm](http://www.acenologia.com/correspondencia/levaduras_vinicas_cor0214.htm)
29. Quiñones, A. (2013). *Influencia de las levaduras no-Saccharomyces en la generación de compuestos aromáticos durante la fermentación alcohólica*. Tesis para obtención de título Ingeniero Agrónomo. Universidad de Chile, Chile.

30. Gonzalez, P. (2010). Purificación y caracterización de B-glucosidasas de cepas nativas de levadura. Diseño de un biocatalizador inmovilizados para la mejora de la calidad de vinos. Tesis doctoral en Química. Universidad de la República, Uruguay.
31. <http://www.acenologia.com/ciencia86.htm>
32. Kourkoutas, Y., Bekatorou A., Banat, I., Marchant, R., Koutinas, A. (2004). Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. *Food Microbiology* 21: 377-397.
33. Genisheva, Z., Teixeira, J., Oliveira, J. (2014). Immobilized cell systems for batch and continuous winemaking. *Trends in Food Science & Technology* 40 (1): 33-47.
34. Cassidy, M., Lee, H., Trevors, J. (1996). Environmental applications of immobilized microbial cells: A review. *Journal of Industrial Microbiology* 16:79-101.
35. Norton, S., D'Amore, T. (1994). Physiological effects of yeast cell immobilization: Applications for brewing. *Enzyme and Microbial Technology* 16(5): 365-375.
36. Hernandez, S. (2011). Inmovilización de microorganismos en esferas de alginato como protección contra condiciones adversas en un tratamiento de agua residual. Tesis de maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, México.
37. Pilkington, P., Margaritis, A., Mensour, N., Russell, I. (1998). Fundamentals of immobilized yeast cells for continuous beer fermentation: a review. *Journal of the Institute of Brewing* 104(1): 19-31.
38. <https://www.infowine.com/intranet/libretti/libretto922-01-1.pdf>
39. Garcia, J., Puig, A., Garcia, T., Peinado R. Lopez, M., Moreno, J. (2012). Utilización de biocápsulas de levadura como agentes fermentativos en la segunda fermentación alcohólica en botella y su aplicación para la elaboración de vino espumoso y bebidas alcohólicas espumosas. *Boletín TR-UCO* 4.
40. Moreno, J., Garcia, T. Mauricio, J., Moreno, J. (2018). Yeast immobilization systems for alcoholic wine fermentations: actual trends and future perspectives. *Frontiers in Microbiology* 9(241).
41. Garcia, M. (2012). Uso de levaduras seleccionadas osmotolerantes, libres y coinmovilizadas, para la producción de vinos dulces. Tesis doctoral. Universidad de Córdoba, España.

42. Nedovic, V., Manojlovic, V., Bugarski, B., Willaert, R. (2011). State of the art in immobilized/encapsulated cell technology in fermentation processes. *Food Engineering Interfaces* 6: 119-146.
43. Jimenez, M., Zarkovic, G., Villena, G., Gutierrez-Correa, M. (2011). Efecto del diámetro de la esfera y densidad celular en la producción de etanol con levadura inmovilizada en alginato. *Revista Colombiana de Biotecnología* 13(1): 8-15
44. Arias, N. (2017). Microesferas de biopolímeros mediante microfluídica para aplicación biomédica. Tesis para título Ingeniera Civil Química. Universidad de Chile, Chile.
45. Galazzo, J., Bailey, J. (1990). Growing *Saccharomyces cerevisiae* in calcium-alginate beads induces cell alterations which accelerate glucose conversion to ethanol. *Biotechnology and Bioengineering* 36(4): 417-426.
46. Barik, J. (2014) Effect of immobilization on production of ethanol using yeast cells. Thesis of Master of Science. National Institute of Technologies Rourkela, India.
47. Pawar, S., Edgar, K. (2012). Alginate derivatization: A review of chemistry, properties and applications. *Biomaterials* 33(11): 3279-3305.
48. Nervi, E. (2017). Aplicaciones de inmovilización e ingeniería genética en la producción de cerveza. Tesis para obtención de título de Ingeniera en Biotecnología. Universidad ORT, Uruguay.
49. Wilson, J., McDevitt, T. (2013). Stem cell microencapsulation for phenotypic control, bioprocessing, and transplantation. *Biotechnology and Bioengineering* 110(3): 667-682
50. <https://www.iroalginate.com/sp/property.htm>:
51. Irusta, I. (2018). Caracterización del magnesio en el desempeño organoléptico de una levadura vínica. Tesis de maestría en bebidas fermentadas. Universidad Rovira I Virgili, España.
52. Tanaka, H., Irie, S., Ochi, H. (1989). A Novel immobilization method for prevention of cell leakage from the gel matrix. *Fermentation and Bioengineering* 68(3): 216-219.
53. Uemura, Y., Hamakawa, N., Yoshizawa H., Ando, H., Ijichi, K., Hatate, Y. (2000). Effect of calcium alginate coating on the performance of immobilized yeast cells in calcium alginate beads. *Chemical Engineering Communications* 177(1): 1-14.

54. Simó, G., Fernandez, E., Vila, J., Ruipérez, V., Rodriguez, J. (2017). Research progress in coating techniques of alginate gel polymer for cell encapsulation. *Carbohydrate Polymers* 170: 1-14.
55. De Arruda, G., Grochoski, M., Felkl, G., Aparecida, T., Wosiacki, G., Nogueira, A. (2015). Viability of *Hanseniaspora uvarum* yeast preserved by lyophilization and cryopreservation. *Yeast* 32(8): 559-565.
56. Santagapita, P., Mazzobre, M., Buera, M. (2011). Formulation and Drying of Alginate Beads for Controlled Release and Stabilization of Invertase. *Biomacromolecules* 12: 3147–3155.
57. Kim, D., Lee, S., Park, H. (2016). Effect of air-blast drying and the presence of protectants on the viability of yeast entrapped in calcium alginate beads with an aim to improve the survival rate. *Applied Microbiology and Biotechnology* 101(1): 93–102
58. <https://www.vaisala.com/es/industries-applications/>
59. Santivarangkna, C., Kulozik, U., Foerst, P. (2007). Alternative Drying Processes for the Industrial Preservation of Lactic Acid Starter Cultures. *Biotechnology Progress*, 23(2): 302–315.
60. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LED/brochures/BRLESPEDV-SP-0212.pdf>
61. Cerrutti, P., Segovia de Huergo, M., Galvagno, M., Schebor, C., del Pilar Buera, M. (2000). Commercial baker's yeast stability as affected by intracellular content of trehalose, dehydration procedure and the physical properties of external matrices. *Applied Microbiology and Biotechnology* 54(4): 575–580.
62. Avila, L., Naranjo, J., Higuera, J. (2015). Viabilidad de levaduras y bacterias conservadas por liofilización: efecto de agentes lioprotectores. *Vector* 10: 7-13.
63. <https://proceedings.science/slaca/slaca-2017/>
64. Berny, J., Hennebert, G. (1991). Viability and stability of yeast cells and filamentous fungus spores during freeze-drying: effects of protectants and cooling rates. *Mycologia* 83(6): 805–815.
65. Martín, M., Muñoz, F., Morata de Ambrosini, V. (2017) Levaduras secas activas (LSA) autóctonas de la DOC San Rafael Mendoza: Resistencia al proceso de liofilización. Universidad Nacional de Cuyo, Argentina.

66. Martos, M., Zubreski, E. Trabajo práctico conservación de microorganismos. Facultad de Ciencias Exactas Químicas Y Naturales, Universidad Nacional Autónoma, México.
67. Sree, N., Sridhar, M., Suresh, K., Banat, I., Rao, L. (2000). High alcohol production by repeated batch fermentation using an immobilized osmotolerant *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology* 24(3): 222- 226.
68. Klinkenberg, G., Lystad, K., Levine, D., Dyrset, N. (2001). Cell release from alginate immobilized *Lactococcus lactis ssp. lactis* in chitosan and alginate coated beads. *Journal of Dairy Science* 84(5): 1118–1127.
69. Zhou, Y., Martins, E., Groboillot, A., Champagne, C., Neufeld, R. (2002). Spectrophotometric quantification of lactic bacteria in alginate and control of cell release with chitosan coating. *Journal of Applied Microbiology* 84(3): 342–348
70. Krasaekoopt, W., Bhandari, B., Deeth, H. (2004). The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. *International Dairy Journal* 14(8): 737–743.
71. Polo, L., Ferrer, S., Pardo, I. (2009). Efecto de la temperatura de congelación en la conservación de levaduras vínicas mediante la técnica de liofilización. Congreso Nacional de Investigación Enológica Ourense, España.
72. Sossa-Urrego, D., Navarro-Acevedo, M., Matiz, A. Mercado-Reyes, M., Quevedo-Hidalgo, B., Pedroza, A. (2008). Inmovilización de *Bacillus licheniformis* y *Saccharomyces cerevisiae* para la producción de etanol a partir de almidón de papa. *Universitas Scientiarum* 13(2): 149-161.
73. Guevara, C., Acevedo, J., Pelaez, C. (2014). Aislamiento y caracterización de una levadura floculante para producir etanol del banano de rechazo. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial* 12(2): 151-159.
74. Li, W., Guo, Z., Zhang, L., Ding, Z., Wang, Z., Shi, G. (2011). A Novel and rapid method for yeast vitality evaluation based on the methylene blue dye reduction. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 69(1): 44-49.

75. Bonora, A., Mares, D. (1982). A simple colorimetric method for detecting cell viability in cultures of eukaryotic microorganisms. *Current Microbiology* 7(4): 217–221.
76. Stewart, G. G. (2018). *Brewing and distilling yeasts*. Chapter 8: Yeast viability and vitality: 147–161. Springer.
77. Dash, I., Barik, J., Nayak, A., Sahoo, M. (2015). Comparative studies of ethanol production and cell viability: free cells versus immobilized cells. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences* 6(2):1708-1714.
78. Shoichet, M., Li, R., White, M., Winn, S. (1996). Stability of hydrogels used in cell encapsulation: An in vitro comparison of alginate and agarose. *Biotechnology and Bioengineering* 50(4): 374–381.
79. Konsoula, Z., Liakopoulou, M. (2006). Thermostable  $\alpha$ -amylase production by *Bacillus subtilis* entrapped in calcium alginate gel capsules. *Enzyme and Microbial Technology* 39(4): 690–696.
80. Li, X. (1996). The use of chitosan to increase the stability of calcium alginate beads with entrapped yeast cells. *Biotechnology Applied Biochemistry* 23(3): 269-272.
81. Duarte, J., Rodrigues, J., Moran, P. (2013). Effect of immobilized cells in calcium alginate beads in alcoholic fermentation. *AMB Express* 3(31).
82. Najafpour, G., Habibollah, Y., Syahidah, K. (2004). Ethanol fermentation in an immobilized cell reactor using *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology* 92(3): 251-260.
83. Hannoun, B., Stephanopoulos, G. (1986). Diffusion coefficients of glucose and ethanol in cell-free and cell-occupied calcium alginate membranes. *Biotechnology and Bioengineering* 28(6): 829–835.
84. Norton, S., Watson, K., D'Amore, T. (1995). Ethanol tolerance of immobilized brewer's yeast cells. *Applied Microbiology and Biotechnology* 43(1): 18–24.
85. Nedovic, V., Gibson, B., Mantzouridou, T., Bugarski, B., Djordjevic, V., Kalusevic, A., Paraskevopoulou, A., Sandell, M., Smogrovicova, D., Yilmaztekin, M. (2014). Aroma formation by immobilized yeast cells in fermentation processes. *Yeast* 32: 173-216.

86. Doran, P., Bailey, J. (1986). Effects of immobilization on growth, fermentation properties, and macromolecular composition of *Saccharomyces cerevisiae* attached to gelatin. *Biotechnology and Bioengineering* 28(1): 73–87.
87. Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Doneche, B., Lonvaud, A. (2006). *Handbook of Enology Volume 1. The Microbiology of Wine and Vinifications 2<sup>nd</sup> Edition*. Chapter 12: Red Winemaking: 327-396. John Wiley & Sons Ltd.
88. Novotny, V. (1996). *Inmovilización de levaduras y fermentación de sustratos concentrados de melaza*. Tesis para la obtención de título Ingeniero Químico. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
89. Bakoyianis, V., Koutinas, A., Agelopoulos, K., Kanellaki, M. (1997). Comparative study of Kissiris,  $\gamma$ -Alumina, and Calcium Alginate as supports of cells for batch and continuous winemaking at low temperatures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45: 4884–4888.
90. Bokkhim, H., Neupane, P. (2018). Encapsulation of *Saccharomyces cerevisiae* in alginate beads and its application for wine making. *Journal of Food Science and Technology Nepal* 10: 18-23.
91. Göksungur, Y., Orlu, N. (2001). Production of ethanol from beet molasses by Ca-Alginate immobilized yeast cells in a packed-bed bioreactor. *Turkish Journal of Biology* 25: 265-275
92. Galazzo, J., Bailey, J. (1989). In vivo nuclear magnetic resonance analysis of immobilization effects on glucose metabolism of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering* 33(10): 1283–1289.
93. Taipa, M., Cabral, J., Santos, H. (1993). Comparison of glucose fermentation by suspended and gel-entrapped yeast cells: An in vivo nuclear magnetic resonance study. *Biotechnology and Bioengineering* 41(6): 647–653.
94. Sroka, P., Satora, P., Tarko, T., Duda-Chodak, A. (2017). The influence of yeast immobilization on selected parameters of young meads. *Journal of Institute of Brewing & Distilling* 123(2): 289-295.
95. Zumárraga, M., Barvero, F. (2014). *Saccharomyces cerevisiae*: Contribución organoléptica en la vinificación. *Revista Oficial de la Asociación de Bodegas de Rioja Alavesa* 4: 42–45.
96. <http://urbinavinos.blogspot.com/2017/02/conduccion-de-la-fermentacion.html>.

97. <https://www.lallemandwine.com/wp-content/uploads/2017>
98. Diaz, I., Gutierrez, G. (2020). Rol del nitrógeno en la fermentación alcohólica y su manejo. Informativo INIA Raihuén N° 68.
99. <https://www.infowine.com/intranet/libretti/libretto5593-02-1.pdf>
100. <https://www.lallemandwine.com/wp-content/uploads/2017/02>
101. Fugelsang, K., Charles, E. (2007). Wine Microbiology: Practical Applications and Procedures. Estimation of Population Density: 231. Springer.
102. Painting, K., Kirsop, B. (1990). A quick method for estimating the percentage of viable cells in a yeast population, using methylene blue staining. World Journal of Microbiology & Biotechnology 6(3): 346–347.
103. Layfield, J., Sheppard, J. (2015). What brewers should know about viability, vitality, and overall brewing fitness: A Mini-Review. Master Brewers Association of the Americas 52(3): 132-140.
104. <https://www.infowine.com/intranet/libretti/libretto5799-01-1.pdf>
105. Folch, J., Garay, A., Lledias, F., Covarrubias, A. (2004). La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Revista Latinoamericana de microbiología 46(1-2): 24-46.
106. Blasco, David. (2019). Coinoculación de levaduras No *Saccharomyces* y *Saccharomyces* en vinos de las variedades Merlot, Garnacha y Cabernet Sauvignon. Efecto sobre la composición polifenólica. Tesis de grado en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Politécnica de Valencia, España.
107. Favre, Guzmán. (2008). Efecto de distintas técnicas de vinificación sobre la extracción de polifenoles y la composición de los vinos tintos del cv. Tannat. Tesis para la obtención del título de Ingeniero Agrónomo. Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Uruguay.