

Inmovilización de levaduras autóctonas para la obtención de vinos regionales

Carina Alejandra Soldá^{1*}, Cristina Verónica Davies¹, Liliana Mabel Gerard¹,
 María Gabriela Dalzotto^{1,2}, María Belén Corrado¹, María Verónica Fernández Martínez¹,
 Mónica Inés Villalba¹, Franco Damián Irigoyen¹

1. Laboratorio de Microbiología y Biotecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias de la Alimentación, Universidad Nacional de Entre Ríos, Mons. Tavella 1450, Concordia, Entre Ríos, Argentina.
2. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

*E-mail: carina.solda@uner.edu.ar

PALABRAS CLAVES	RESUMEN
Vinos regionales Levaduras inmovilizadas Tannat Marselan	La vitivinicultura experimenta un desarrollo creciente en Entre Ríos y, el uso de levaduras autóctonas se extiende para obtener vinos diferenciados. El objetivo principal de este trabajo fue analizar dos procesos de vinificación con levaduras autóctonas (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , cepa GenBank: OQ520880.1) aisladas previamente: uno de ellos inoculado con células libres y el otro con células inmovilizadas en matriz de alginato, sobre mostos de uvas regionales (Tannat y Marselan). El experimento consistió en un diseño experimental 2 ² . El seguimiento del proceso se realizó mediante la determinación del porcentaje de sólidos solubles, el cálculo de la densidad y la velocidad global de consumo de sustrato para cada sistema. Los ensayos realizados en la variedad Tannat evidenciaron que las levaduras en estado inmovilizado presentaron una mayor capacidad de metabolizar los azúcares ($7,90 \pm 0,19 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$), frente a la misma variedad con levaduras en estado libre ($6,59 \pm 0,13 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$). Sin embargo, no se registraron diferencias estadísticamente significativas entre el sistema libre ($6,75 \pm 0,16 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) y el inmovilizado ($6,75 \pm 0,11 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) en los ensayos realizados con la variedad Marselan. En conclusión, la inmovilización de levaduras nativas podría aportar ventajas tecnológicas al proceso de vinificación.

Immobilization of native yeasts for producing regional wines

KEYWORDS	ABSTRACT
Native yeasts Immobilized cells Tannat Marselan	Viticulture and enology are undergoing rapid growth in Entre Ríos, and the use of indigenous yeasts is becoming more widespread to obtain distinctive wines. The main objective was to analyze two winemaking processes with regional grape varieties (Tannat and Marselan) using indigenous yeasts (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , GenBank OQ520880.1) previously isolated. One system was inoculated with free cells and the other with cells immobilized in an alginate matrix. The experiment consisted of a 2 ² experimental design. Process monitoring was performed by soluble solids determination, density by an empirical formula and the overall rate of substrate consumption for each system. Assays carried out on Tannat variety showed that immobilized cells exhibited a greater capacity to metabolize sugars ($7.90 \pm 0.19 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) compared with the same variety using free cells ($6.59 \pm 0.13 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$). However, no statistically significant differences were observed between the free system ($6.75 \pm 0.16 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) and the immobilized cells ($6.75 \pm 0.11 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) when compared with Marselan variety. In conclusion, immobilization of indigenous yeasts could provide technological advantages to the winemaking process.

1. Introducción

El actual escenario vitivinícola se caracteriza por la creciente competitividad de los mercados nacionales e internacionales y por las demandas de consumidores que exigen productos innovadores. Por este motivo, los elaboradores de vinos se ven obligados a optimizar sus procesos de producción e implementar estrategias de diferenciación. Una alternativa que ha ganado relevancia en los últimos años es el empleo de levaduras autóctonas seleccionadas en función de su adaptación a las condiciones ecológicas y tecnológicas específicas de cada región. Esta práctica no solo favorece la obtención de vinos con propiedades organolépticas distintivas, asociadas a su terroir, sino que también contribuye a la conservación de la biodiversidad microbiana local (Miranda Castillejo et al., 2015; Alonso González & Parga Dans, 2019; Lappa et al., 2020; Zabukovec et al., 2020). La diversidad de levaduras autóctonas confiere a los vinos una mayor complejidad sensorial y una identidad regional más acentuada en comparación con aquellos fermentados con cepas comerciales estandarizadas (Bougreau et al., 2019).

En los últimos diez años, la superficie de vides plantadas en la provincia de Entre Ríos aumentó un 67,5%. La variedad de uvas tintas Tannat se ha instaurado en esta provincia, debido no solo a las condiciones climáticas y calidad de los suelos, sino también a la tipicidad de los vinos obtenidos y, junto con el varietal Marselan, representan el 60 % de las uvas destinadas a la producción de vinos en la provincia (INV, 2024).

La vinificación en tinto se ha basado históricamente en sistemas de fermentación sumergida utilizando células libres de *Saccharomyces cerevisiae* como cultivo iniciador (Moreno García et al., 2018). Por otra parte, en años recientes, la técnica de inmovilización celular ha surgido como área de investigación en enología, debido a posibles ventajas tecnológicas y económicas frente a los sistemas convencionales. Esta metodología, cuya aplicación se ha consolidado exitosamente en procesos industriales como la producción de alcoholes, ácidos orgánicos y enzimas (Liouni et al., 2008; Reddy et al., 2018; López-Menchero et al., 2021), puede ser adaptada al contexto vitivinícola mediante el empleo de diversos sustratos gelificantes, destacando entre ellos el alginato de calcio como matriz preferencial. Las ventajas comparativas de este sistema, particularmente cuando se emplea la técnica de atrapamiento en matrices de alginato, son el incremento en la productividad fermentativa (Djordjević et al., 2015; Bokkham et al., 2018), la

optimización de la eficiencia metabólica mediante altas densidades celulares en biorreactores, la facilitación de la separación celular en fase de sedimentación, la reducción del período de latencia microbiana y la estabilización del proceso fermentativo (López-Menchero et al., 2021). También se ha observado una elevada tasa de supervivencia y buenas condiciones para el almacenamiento, lo que permitiría reducir costos relacionados con el uso de levaduras liofilizadas (Kim et al., 2017; Kim et al., 2018).

El objetivo principal de este trabajo fue analizar dos procesos de vinificación con levaduras autóctonas aisladas previamente por este grupo de investigación: uno de ellos inoculado con células libres y el otro con células inmovilizadas en matriz de alginato, sobre mostos de dos variedades de uvas regionales, Tannat y Marselan.

2. Materiales y métodos

Diseño experimental

El ensayo se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología y Biotecnología de Alimentos (MIBIAL) de la Facultad de Ciencias de la Alimentación, de la Universidad Nacional de Entre Ríos.

Para alcanzar el objetivo propuesto se confeccionó un diseño factorial 2², donde se evaluaron los siguientes factores: variedad de uva (Tannat y Marselan) y método de fermentación (tradicional y células inmovilizadas), por medio de microvinificaciones. Se utilizaron dos réplicas biológicas de cada ensayo.

Materia prima

Se dispuso de uvas de las variedades Tannat y Marselan de la vendimia 2022, provenientes de un viñedo de la zona (-31.24842418240885, -58.117994400881244). Las uvas se cosecharon en el estado óptimo de maduración de acuerdo al enólogo del viñedo y fueron mantenidas en conservación a -18°C hasta el momento de su uso para evitar su deterioro microbiano, sensorial y nutricional.

Levadura autóctona *Saccharomyces cerevisiae* (cepa Genbank QO520880.1)

Esta cepa fue aislada de uvas de la variedad Tannat de la región de Concordia por el equipo de

investigación del laboratorio antes mencionado. Fue seleccionada por sus características biotecnológicas, como el poder fermentativo, la tolerancia al etanol y al dióxido de azufre, capacidad de floculación y factor killer (Davies et al, 2023) y su identificación se llevó a cabo por métodos moleculares (Gerard et al, 2023). La cepa *Saccharomyces cerevisiae* OQ520880.1, conservada en congelación, se activó en caldo YPD (extracto de levadura - peptona - dextrosa) a 30°C, 24 h antes de su utilización. Al finalizar esta etapa, un tubo de 5 mL de medio con la levadura, fue usado de inóculo en 45 mL de caldo YPD, a 30°C durante 48 h en agitación, para lograr su propagación.

Inmovilización de levadura autóctona

La combinación de sustancias inmovilizantes fue 0,5% de alginato de sodio y 0,5% de cloruro de calcio (Soldá et al., 2025). Para ello se prepararon concentraciones de alginato de manera tal que, al mezclarse con el inóculo, permitieran obtener la concentración final deseada. Tanto las soluciones de alginato como las de cloruro se esterilizaron previamente a 121 °C 15 min-1.

Para inmovilizar las células, un volumen de 10 mL de inóculo se mezcló con la cantidad requerida de alginato mediante agitador magnético para obtener una suspensión uniforme. Usando una jeringa hipodérmica estéril 22G 1", la suspensión de levaduras se dejó caer gota a gota sobre 50 mL de solución de cloruro de calcio. Las esferas formadas se dejaron en reposo 30 min y luego se filtraron para usarse como inóculo (Kim et al., 2017; Kim et al., 2018; Utami et al., 2022).

Ensayos de microvinificaciones

Se llevaron a cabo microvinificaciones (100 mL) en mostos de uvas de las variedades Tannat y Marselan con la levadura autóctona en condiciones de inmovilización y libre. Las uvas se despalillaron y trituraron, se agregó metabisulfito de potasio a razón de 200 mg L⁻¹, según las prácticas enológicas habituales (Stockley et al., 2021) y luego de 30 min se inocularon con *S. cerevisiae* OQ520880.1 tanto inmovilizadas en la condición preestablecida, como en sistema libre. Para el inóculo se tuvo en cuenta contar 106 UFC/mL al inicio de fermentación. El seguimiento del proceso fue mediante la determinación de pH, densidad y el porcentaje de sólidos solubles. Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado.

Sólidos solubles

Se determinaron por método refractométrico, con refractómetro termocompensable (Hanna Instruments modelo HI 96801, Rumania).

Densidad

Fue calculada a partir de lecturas refractométricas corregidas según el modelo empírico propuesto por Plugatar el al. (2023).

pH

Se determinaron por método potenciométrico, con peachímetro Boeco modelo BT-500, Germany, según AOAC, 2019, 21st Ed., Official Method 960.19.

Velocidad global de consumo de sustrato

Con los datos de la variación de los sólidos solubles, se calculó la velocidad global de consumo de sustrato, de acuerdo a la ecuación 1:

$$r_s = \frac{S_i - S_f}{t} \quad (1)$$

Donde Si es el sustrato inicial expresado como g S.L⁻¹, Sf el sustrato final (g S.L⁻¹) y t el tiempo expresado en días.

Análisis estadístico de los datos

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA), con el software Statgraphics Centurion XV, empleando un nivel de significancia de p<0,05. Cuando se observaron diferencias estadísticamente significativas entre medias se aplicó el test LSD.

3. Resultados y Discusión

Seguimiento de los procesos fermentativos: Los procesos [CM6.1] la cinética fermentativa se llevaron a cabo durante 16 días, de acuerdo al diseño propuesto. El seguimiento de los mismos se muestra en la Figura 1.

Los valores iniciales de sólidos solubles en la vendimia analizada en este estudio (21,20 y 19,40 °Brix para Tannat; 18,50 y 18,57 para Marselan) son similares a los reportados en uvas tintas. En particular, para 2017 y 2018, las uvas Cabernet Franc mostraron valores de 23,00 y 20,90 °Brix, respectivamente; Cabernet Sauvignon presentó

21,56 y 19,40 °Brix en esos mismos años (Biniari et al., 2020). La variedad Merlot registró 25,00 °Brix en 2017 y 18,53 °Brix en 2018. En cuanto a la variedad Tannat, Piccardo y sus colaboradores (2019) reportaron un valor de 24,30, 19,30 y 26,30 °Brix en las vendimias de 2016, 2017 y 2018 respectivamente

en Uruguay. Otros estudios que analizaron ambas variedades en las vendimias de 2015 y 2016 también reflejan valores similares: Tannat con 25,00, 22,10 y 24,50 °Brix en 2015, y 20,80 °Brix en 2016; y Marselan con 23,20 °Brix en 2015 y entre 24,90 y 25,30 °Brix en 2016 (Favre et al., 2020).

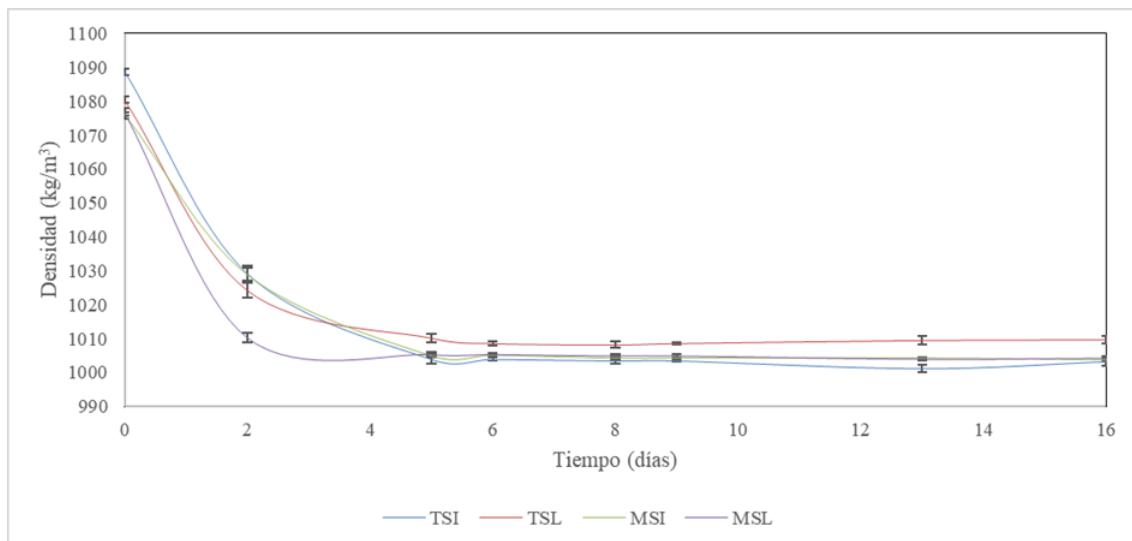


Figura 1. Seguimiento de las fermentaciones [CM11.1] para las variedades Tannat y Marselan en sistema libre (TSL y MSL) e inmovilizado (TSI y MSI), respectivamente.

Tabla 1: Comparación de velocidades de consumo de sustrato en microvinificaciones para las variedades de uva Tannat y Marselan en estado libre e inmovilizado.

Sistemas	Velocidad de consumo de sustrato ($\text{g.L}^{-1}\text{d}^{-1}$)	
	Tannat	Marselan
Levadura autóctona libre	$6,59 \pm 0,13^{\text{b}}$	$6,75 \pm 0,16^{\text{b}}$
Levadura autóctona inmovilizada	$7,90 \pm 0,19^{\text{a}}$	$6,75 \pm 0,11^{\text{b}}$

Letras diferentes en una columna indican diferencias estadísticamente significativas (LSD; $p \leq 0,05$)

En los cuatro sistemas ensayados, se observó la detención del proceso fermentativo, aproximadamente a los 5 días del inicio de las fermentaciones. En fermentaciones espontáneas, se ha reportado para las mismas variedades de uva y en tres vendimias, la detención de la fermentación alrededor de los 8 días (Davies et al, 2023).

Velocidad global de consumo de sustrato

Las velocidades globales de consumo de sustrato se indican en la Tabla 1. Se evidenció una mayor capacidad de metabolizar los azúcares por parte de la levadura autóctona en estado inmovilizado en la variedad Tannat ($7,90 \pm 0,19 \text{ g.L}^{-1}\text{d}^{-1}$), frente a la misma variedad de uva con las levaduras en estado libre ($6,59 \pm 0,13 \text{ g.L}^{-1}\text{d}^{-1}$). Resultados similares

fueron encontrados por Kim (2018) en fermentaciones vínicas usando levaduras inmovilizadas. En cuanto a la variedad Marselan, no exhibió diferencias estadísticamente significativas entre el sistema libre ($6,75 \pm 0,16 \text{ g.L}^{-1}\text{d}^{-1}$) y el inmovilizado ($6,75 \pm 0,11 \text{ g.L}^{-1}\text{d}^{-1}$).

Al analizar las pendientes de las velocidades en la etapa lineal ($t=2\text{días}[CM1.1]$) de los sistemas ensayados, se puso en evidencia la mayor velocidad de consumo de sustrato en esta etapa por parte de *S. cerevisiae* OQ520880.1 en el sistema libre [gd2.1] en la variedad Marselan, mientras que en Tannat no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (Tabla 2). }Sin embargo, esta tendencia inicial no se

ve reflejada en el resultado final de las VGC. Esto podría atribuirse a las diferencias fisiológicas de los varietales estudiados, y la necesidad de adaptación

de la levadura al medio (Ribéreau Gayon et al., 2003).

Tabla 2: Comparación de las pendientes en las etapas lineales en microvinificaciones para las variedades de uva Tannat y Marselan en estado libre e inmovilizado

Variedad	Sistema	Pendiente
Tannat	Inmovilizado	-29,8±1,5 b
	Libre	-28,1±0,7b
Marselan	Inmovilizado	-23,6±1,2 c
	Libre	-33,1±1,2 a

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas para cada variedad (LSD; $p \leq 0,05$)

4. Conclusiones

Al observar las velocidades globales de consumo de sustrato, *S. cerevisiae* OQ520880.1 demostró una mayor eficiencia para metabolizar azúcares en uvas Tannat en sistema inmovilizado en comparación con el sistema libre y con la variedad Marselan en ambos tratamientos. Estos hallazgos sugieren que la inmovilización de levaduras para vinificación puede representar una alternativa tecnológicamente viable, cuyas ventajas potenciales (como la mejora en la eficiencia fermentativa) serán exploradas en profundidad en investigaciones posteriores.

Los resultados obtenidos posicionan a la variedad Tannat como relevante para estudios enológicos en la región, destacándose como material de partida para futuros ensayos a mayor escala y bajo condiciones de añejamiento controladas.

5. Agradecimientos

Al equipo de docentes y becarios de MIBIAL que hacen posible que podamos llevar a cabo nuestros proyectos. Este trabajo fue financiado por el proyecto de investigación PID Novel UNER 8127 “Técnicas de fermentación alcohólica para vinificación con levaduras autóctonas utilizando uvas de viñedos de Concordia, Entre Ríos.”.

La cepa *A. pullulans* m11-2 fue conservada mediante liofilización utilizando glutamato de sodio al 2,4% como agente lioprotector, manteniendo tanto su viabilidad como su actividad pectinolítica durante al menos 18 meses de almacenamiento a 4 °C. Estos resultados demuestran la eficacia de este protocolo de conservación para obtener levaduras secas activas viables y funcionales, y refuerzan su potencial

como fuente enzimática para aplicaciones enológicas específicas.

6. Referencias

- Alonso González P. y Parga Dans E. (2019) La vuelta al terroir: el despertar de la cultura del vino en España. Rivar, 6 (17): 62-89. ISSN 0719-4994.
- Biniari, K., Xenaki, M., Daskalakis, I., Rusjan, D., Bouza, D. y Stavrakaki, M. (2020). Polyphenolic compounds and antioxidants of skin and berry grapes of Greek *Vitis vinifera* cultivars in relation to climate conditions. Food Chemistry, 307, 125518.
- Bokkhim, H., Neupane, P., Gurung, S. y Shrestha, R. (2018). Encapsulation of *Saccharomyces cerevisiae* in alginate beads and its application for wine making. Journal of Food Science and Technology Nepal, 10, 18-23.
- Bougreau, M., Ascencio, K., Bugarel, M., Nightingale, K. y Loneragan, G. (2019). Yeast species isolated from Texas High Plains vineyards and dynamics during spontaneous fermentations of Tempranillo grapes. PloS one, 14(5), e0216246.
- Davies, C., Gerard, L., Corrado, M. B., Soldá, C. A., Fernández, M. V., Dalzotto, M. G. y Esteche, S. (2023). Aislamiento, caracterización e identificación de levaduras de frutos de la vid (*Vitis vinifera*) de la región de Concordia. Ciencia, Docencia y Tecnología Suplemento, 13(15).
- Djordjević, R., Gibson, B., Sandell, M., Billerbeck, M., Bugarski, B., Leskošek-Čukalović, I., Vunduk, J., Nikićević, N. y Nedović, V. (2015). Raspberry wine fermentation with suspended and immobilized yeast cells of two strains of *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast, 32, 271-279.

- Favre, G., Piccardo, D., Sergio, G. A., Pérez-Navarro, J., García-Romero, E., Mena-Morales, A. y González-Neves, G. (2020). Stilbenes in grapes and wines of Tannat, Marselan and Syrah from Uruguay: This article is published in cooperation with the 11th OenolVAS International Symposium, June 25–28 2019, Bordeaux, France. *OENO One*, 54(1), 27-36.
- Gerard, L. M., Corrado, M. B., Davies, C. V., Soldá, C. A., Dalzotto, M. G. y Esteche, S. (2023). Isolation and identification of native yeasts from the spontaneous fermentation of grape musts. *Archives of Microbiology*, 205(9), 302.
- INV (2024): Informe anual de cosecha y elaboración 2024. Disponible en <https://www.argentina.gob.ar/inv/estadisticas-vitivinicas/cosecha/anuarios>
- Kim, D., Lee, S. y Park, H. (2017). 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.
- Kim, D., Lee, S. y Park, H. (2018). Fermentation characteristics of Campbell Early grape wine inoculated with indigenous Korean wine yeasts encapsulated in Ca-alginate beads after air-blast drying. *Italian Journal of Food Science*, 30: 535-552.
- Lappa, I. K., Kachrimanidou, V., Pateraki, C., Koulougliotis, D., Eriotou, E. y Kopsahelis, N. (2020). Indigenous yeasts: Emerging trends and challenges in winemaking. *Current Opinion in Food Science*, 32, 133-143.
- Liouni, M., Drichoutis, P. y Nerantzis, E. T. (2008). Studies of the mechanical properties and the fermentation behavior of double layer alginate-chitosan beads, using *Saccharomyces cerevisiae* entrapped cells. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(2):281-288.
- López-Menchero, J. R., Ogawa, M., Mauricio, J. C., Moreno, J. y Moreno-García, J. (2021). Effect of calcium alginate coating on the cell retention and fermentation of a fungus-yeast immobilization system. *LWT*, 144, 111250.
- Miranda-Castilleja, D. E., Ortiz-Barrera, E., Arvizu-Medrano, S. M., Ramiro-Pacheco, J., Aldrete-Tapia, J. A. y Martínez-Peniche, R. Á. (2015). Aislamiento, selección e identificación de levaduras *Saccharomyces* spp. nativas de viñedos en Querétaro, México. *Agrociencia*, 49(7): 759-773.
- Moreno-García, J., García-Martínez, T., Mauricio, J. C. y Moreno, J. (2018). Yeast immobilization systems for alcoholic wine fermentations: actual trends and future perspectives. *Frontiers in Microbiology*, 9:241.
- Piccardo, D., Favre, G., Pascual, O., Canals, J. M., Zamora, F. y González-Neves, G. (2019). Influence of the use of unripe grapes to reduce ethanol content and pH on the color, polyphenol and polysaccharide composition of conventional and hot macerated Pinot Noir and Tannat wines. *European Food Research and Technology*, 245(6), 1321-1335.
- Plugatar, Y., Johnson, J. B., Timofeev, R., Korzin, V., Kazak, A., Nekhaychuk, D. y Rotanov, G. (2023). Prediction of ethanol content and total extract using densimetry and refractometry. *Beverages*, 9(2), 31.
- Reddy, L. V., Reddy, Y. H. K., Reddy, L. P. A. y, & Reddy, O. V. S. (2008). Wine production by novel yeast biocatalyst prepared by immobilization on watermelon (*Citrullus vulgaris*) rind pieces and characterization of volatile compounds. *Process Biochemistry*, 43(7): 748-752.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., & Lonvaud, A. (2003). Tratado de enología. Volumen II: Química del vino, estabilización y tratamientos. Madrid: Mundi-Prensa.
- Soldá, C. A., Davies, C. V., Dalzotto, M. G., Martínez, M. V. F., Corrado, M. B., & Gerard, L. M. (2025). Vinificación de uvas Tannat y Marselan con levaduras autóctonas libres e inmovilizadas. *Revista argentina de ingeniería*, 25(13), 58-71.
- Stockley, C., Paschke-Kratzin, A., Teissedre, P. L., Restani, P., Tejedor, N. G., & Quini, C. (2021). OIV collective expertise document SO2 and wine: a review.