

FERMENTACIÓN DE *V. LABRUSCA* CON *S. CEREVISIAE* INMOVILIZADA

Impacto de diferentes variables de proceso en la producción de vino tinto a partir de la uva *Vitis*
labrusca

Dania Alejandra Holguin Espejo y Denis Paola Muñoz Machacón

Trabajo de grado para optar el título de Ingeniera Química

Modalidad Trabajo de Investigación

Director

Mauricio Ramírez Castrillón

Doctor en Ciencias: Biología Celular y Molecular

Codirectora

Lilia Carolina Rojas Pérez

Doctora en Ingeniería

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ingenierías Fisicoquímicas

Escuela de Ingeniería Química

Bucaramanga

2026

Dedicatoria

A mis padres, Adriana y Fredy, gracias por acompañarme en cada etapa de este proceso, por siempre estar a mi lado y apoyar cada uno de mis sueños. Mami, tu amor, fortaleza y entrega han sido el ejemplo que ha guiado mi vida. Siempre serás mi amor incondicional.

A mi familia, mi abue Marina, mi tía Rosita, Isa y Emi. Los amo infinitamente. A Oscared, porque la vida te puso en nuestro camino y no podría estar más agradecida por ello. A Jaco, por tus ocurrencias y tu inmensa alegría. Nunca dejes de perseguir tus sueños

- Alejandra

A mi mamá, mi más grande motivación. Tu amor me mueve y me impulsa cada día. No lo hubiera logrado sin ti. Te amo más que nada.

- Denis

Agradecimientos

En primer lugar, agradezco a Dios por permitirme vivir este proceso y por darme la fortaleza, sabiduría y perseverancia necesarias para culminar esta etapa.

A la Universidad Industrial de Santander, por brindarme una formación académica que me permitió crecer no solo como profesional, sino también como persona. A las Escuelas de Ingeniería Química y de Microbiología, por contribuir a mi formación desde distintas disciplinas y por facilitar la infraestructura y los equipos necesarios para el desarrollo de este trabajo. Al Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología (GIBIM) y todos sus integrantes, por abrirme sus puertas y ofrecerme un espacio de aprendizaje.

A mi director, el profesor Mauricio, por confiar en mí desde el primer momento, por su orientación, enseñanzas y el apoyo brindado durante el desarrollo de este trabajo. A la profe Carolina, por aceptar acompañarme en este proyecto, su disposición, compromiso y confianza significaron mucho para mí. Al profesor Drochss Petri, por su colaboración, orientación y sus críticas constructivas.

A Denis, por su paciencia, sus conocimientos y su permanente disposición para trabajar conmigo, su apoyo fue fundamental.

A mi familia, por amor y apoyo incondicional. A mi mamá, a mi abue y mi tía Rosi, porque haber tenido la fortuna de crecer rodeada de mujeres fuertes, amorosas y resilientes ha sido uno de los mayores privilegios de mi vida. Ustedes son mi ejemplo y mi inspiración.

A Jireth, gracias por estar siempre presente, por creer en mí incluso cuando yo dudaba de mí misma. Agradezco profundamente a la vida por haberte puesto en mi camino.

Finalmente, gracias a todas las personas que, de una u otra manera, hicieron parte de este camino. Cada palabra de aliento, cada enseñanza y cada gesto de apoyo hicieron posible la culminación de este logro. Este trabajo también les pertenece.

-Alejandra Holguin

Deseo expresar mi más profundo agradecimiento, en primer lugar, a Dios, por darme las fuerzas necesarias para llegar hasta acá. A mis padres, Sandra y Pedro, mi hermano Andrés, mi familia que siempre me dieron su amor y apoyo incondicional.

Agradezco profundamente a mi director de tesis, el profesor Mauricio, por su compromiso, guía y enseñanzas, y por impulsarnos siempre a dar lo mejor de nosotras; a la profesora Carolina, por su cercano y constante acompañamiento; al profesor Drochss Petri, por su valiosa ayuda y orientación.

A Alejandra, por todo lo que aprendí junto a ella, por confiar en mí y caminar cada parte de este proceso a mi lado con disposición e infinita paciencia.

Asimismo, expreso mi gratitud a la Universidad Industrial de Santander y a cada uno de sus profesores, quienes me formaron no solo en el ámbito académico, sino también en el personal, ayudándome a ser la persona que soy hoy. A las escuelas de Ingeniería Química y Microbiología, por permitirme aprender desde distintas disciplinas, y por disponer toda la infraestructura y equipos que hicieron posible mi educación y el desarrollo de este trabajo. Al Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología (GIBIM), por brindarme un espacio de crecimiento y por el apoyo fundamental de mis compañeros de laboratorio en cada etapa. Agradezco también la educación pública por abrirme las puertas y darme la oportunidad de salir adelante.

A Sofía, Angie, Cathalina, Sergio y Carolina, amistades que me dejó la universidad y que ahora son parte fundamental de mi vida: infinitas gracias porque su amor y palabras de aliento me dieron fuerza cada día. A Laura y Camilo, los amigos y futuros colegas que me dejó la carrera, gracias por ser siempre las personas que me acompañaron en cada momento de tristeza y felicidad.

A Macondo UIS, por enseñarme a amar la cultura de mi país y por darme un escape durante mi vida universitaria. Gracias también a los amigos que me dejó, como Fernanda, Juan, Danna, Sharon y Luis, porque junto a ellos pude crecer como persona.

Y a todos aquellos que no mencioné, gracias, porque de alguna u otra forma me ayudaron a culminar este proceso.

Finalmente, gracias a mí, por perseverar, por no rendirme. Lo logré.

-Denis Muñoz

Este proyecto fue financiado por la Vicerrectoría de Investigación y Extensión de la Universidad Industrial de Santander (Código: 4266).

Tabla de contenido

Introducción.....	13
1. Objetivos.....	15
1.1 Objetivo general	15
1.2 Objetivos específicos	15
2. Estado del arte	15
3. Metodología	19
3.1 Fase 1: Diseño experimental.....	20
3.2 Fase 2: Preparación del mosto de uva	21
3.3 Fase 3: Preparación de los sistemas de fermentación	23
3.3.1 Fermentación libre	23
3.3.2 Fermentación con inmovilización celular	24
3.3.2.1 Preparación de las soluciones	24
3.3.2.2 Preparación del inóculo.....	25
3.3.2.3 Formación de perlas por gelificación	25
3.3.2.4 Caracterización de las perlas	27
3.4 Fase 4: Seguimiento del proceso fermentativo y medición de variables.....	28
3.4.1 Determinación de la concentración celular	28
3.4.1.1 Preparación de muestras.....	28
3.4.1.2 Conteo celular	28
3.4.2 Evaluación de viabilidad celular	28

3.4.3 Medición de grados Brix	29
3.5 Fase 5: Caracterización fisicoquímica de los vinos	29
4. Resultados y discusión	30
4.1 Caracterización inicial del mosto y del sistema de inmovilización	30
4.2 Perfil de consumo de sustrato	32
4.2.1 Porcentajes de consumo de sustrato.....	34
4.3 Perfil de crecimiento celular	36
4.3.1 Tasa específica de crecimiento (μ)	39
4.5 Análisis fisicoquímico del vino.....	46
4.5.1 pH	46
4.5.2 Parámetros colorimétricos CIELab.....	47
5. Conclusiones	49
6. Recomendaciones	50
Referencias bibliográficas.....	51
Apéndices	59

Lista de tablas

Tabla 1	Tasas promedio de consumo de sustrato en los períodos 0-120 h y 120-240 h	33
Tabla 2	Tasas específicas de crecimiento en el proceso de fermentación	39
Tabla 3	Parámetros de desempeño obtenidos para cada uno de los tratamientos	43
Tabla 4	pH final de los vinos obtenidos para cada tratamiento	46
Tabla 5	Coordenadas y parámetros colorimétricos CIELAB	47
Tabla 6	Representación de los colores calculados a partir de las coordenadas CIELAB	47

Lista de figuras

Figura 1	Fases experimentales del trabajo de investigación	20
Figura 2	Representación jerárquica del diseño experimental	21
Figura 3	Unidad experimental de fermentación equipada con tapón de silicona y airlock	24
Figura 4	Montaje experimental para la formación de perlas de alginato mediante bomba peristáltica.....	26
Figura 5	Perlas de alginato de calcio utilizadas para la inmovilización de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	31
Figura 6	Perfil de evolución de los °Brix durante la fermentación	32
Figura 7	Porcentaje de consumo de sustrato durante la fermentación (0-240 h).....	35
Figura 8	Perfil de crecimiento de células viables en los tratamientos evaluados	37
Figura 9.	Contenido de etanol (v/v) teórico y experimental para los tratamientos evaluados....	41

Lista de apéndices

Apéndice A. Parámetros colorímetros CIELAB.....	59
Apéndice B. Cromatogramas y cálculos para la cuantificación de etanol mediante CG-EM	60
Apéndice C. Análisis de varianza ANOVA	62

Resumen

Título: Impacto de diferentes variables de proceso en la producción de vino tinto a partir de la uva *Vitis labrusca*^{1*}

Autor: Dania Alejandra Holguin Espejo, Denis Paola Muñoz Machacón^{2**}

Palabras Clave: *Vitis labrusca*; vino tinto; *Saccharomyces cerevisiae*; fermentación alcohólica; inmovilización celular; etanol.

Descripción: La elaboración de vino a partir de uvas de la especie *Vitis labrusca* (variedad Isabella) representa una alternativa para el aprovechamiento agroindustrial de esta materia prima mediante el desarrollo de un producto biotecnológico diferenciado y autóctono. No obstante, los procesos tradicionales de fermentación presentan limitaciones asociadas a la recuperación de la biomasa, la necesidad de etapas de clarificación y el posible deterioro de la eficiencia fermentativa bajo diferentes condiciones de operación. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la concentración inicial de sólidos solubles y del sistema de fermentación sobre el desempeño fermentativo y las características fisicoquímicas de vinos tintos elaborados a partir de mosto de *Vitis labrusca* utilizando una cepa comercial de *Saccharomyces cerevisiae* marca Premier Rouge Red Star. Se empleó un diseño factorial con dos concentraciones iniciales de sólidos solubles (18 y 25 °Brix) y dos sistemas de fermentación (células libres e inmovilizadas en alginato de calcio). Durante diez días de fermentación se monitoreó el consumo de sustrato y el crecimiento celular, y al finalizar el proceso se determinó el pH, los parámetros colorimétricos CIELab, el rendimiento, la productividad y la concentración de etanol mediante cromatografía de gases (CG-EM). Los resultados evidenciaron una disminución progresiva de los sólidos solubles en todos los tratamientos, registrándose las mayores tasas de consumo de sustrato durante las primeras 120 horas de fermentación. La eficiencia de consumo de sustrato osciló entre 63 y 69%. La inmovilización favoreció el consumo inicial de sustrato, mientras que la mayor concentración inicial de sólidos solubles mostró una reducción de la actividad fermentativa atribuida al estrés osmótico. Los vinos obtenidos presentaron valores de pH entre 2,93 y 2,98, y el análisis colorimétrico mostró una mayor luminosidad en los tratamientos con células inmovilizadas. La concentración de etanol varió entre 5,16 y 6,39 %(v/v), obteniéndose los mayores rendimientos y productividades en las fermentaciones con células libres, particularmente en el tratamiento con 25 °Brix. Finalmente, se concluye que la concentración inicial de azúcar y el sistema de fermentación influyen en la dinámica fermentativa y en las características finales del vino, siendo las fermentaciones con células libres las que presentaron el mejor desempeño en la producción de etanol bajo las condiciones evaluadas.

^{1*} Trabajo de Grado

^{2**} Facultad de Ingenierías fisicoquímicas. Escuela de Ingeniería química. Director: Mauricio Ramírez Castrillón. Doctor en Ciencias: Biología Celular y Molecular. Codirector: Lilia Carolina Rojas Pérez. Doctora en Ingeniería.

Abstract

Title: Impact of different process variables on red wine production from *Vitis labrusca* grapes*

Author: Dania Alejandra Holguin Espejo, Denis Paola Muñoz Machacón^{3**}

Key Words: *Vitis labrusca*; red wine; *Saccharomyces cerevisiae*; alcoholic fermentation; cell immobilization; ethanol.

Description: Wine production from *Vitis labrusca* grapes (Isabella variety) represents an alternative for the agro-industrial utilization of this raw material through the development of a differentiated and indigenous biotechnological product. However, conventional fermentation processes present limitations related to biomass recovery, the need for clarification steps, and the potential reduction of fermentation efficiency under different operating conditions. The objective of this study was to evaluate the effect of the initial sugar concentration and the fermentation system on the fermentative performance and physicochemical characteristics of red wines produced from *Vitis labrusca* must using *Saccharomyces cerevisiae*. A factorial experimental design was employed, considering two initial sugar concentrations (18 and 25 °Brix) and two fermentation systems (free cells and cells immobilized in calcium alginate). During the ten-day fermentation process, substrate consumption and cell growth were monitored. At the end of the process, pH, CIELAB colorimetric parameters, ethanol yield, productivity, and ethanol concentration were determined using gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS). The results showed a progressive decrease in soluble solids in all treatments, with the highest substrate consumption rates occurring during the first 120 hours of fermentation. Substrate consumption efficiency ranged from 63% to 69%. Cell immobilization enhanced the initial substrate consumption, whereas the higher initial soluble solids concentration reduced fermentative activity due to osmotic stress. The wines obtained exhibited pH values between 2.93 and 2.98, and colorimetric analysis revealed higher lightness in wines produced with immobilized cells. Ethanol concentration ranged from 5.16 to 6.39% (v/v), with the highest ethanol yields and productivities obtained in fermentations with free cells, particularly in the treatment with 25 °Brix. It is concluded that both the initial sugar concentration and the fermentation system influence fermentation dynamics and the final characteristics of the wine, with free-cell fermentations showing the best performance for ethanol production under the evaluated conditions.

* Degree Work

^{2**} Faculty of Physicochemical Engineering. School of Chemical Engineering. Advisor: Mauricio Ramírez Castrillón. Ph.D. in Cellular and Molecular Biology. Co-advisor: Lilia Carolina Rojas Pérez. Ph.D. in Engineering.

Introducción

El vino es una de las bebidas alcohólicas de mayor consumo a nivel mundial y su producción representa una actividad de gran importancia para la industria agroalimentaria. Según Vlahović & Antić (2025), el consumo mundial promedio de vino entre 2018 y 2023 fue de 2,9 litros per cápita, con una disminución anual promedio de 5,2%. No obstante, a pesar de esta tendencia decreciente en el consumo global, la producción vitivinícola sigue siendo una actividad relevante desde el punto de vista económico y tecnológico.

Una de las etapas más importantes en la elaboración del vino es la fermentación alcohólica, etapa en la cual las levaduras transforman los azúcares fermentables presentes en el mosto de uva, principalmente en etanol y dióxido de carbono (Mouret et al, 2021). Sin embargo, al finalizar la fermentación es común encontrar una elevada turbidez en el mosto debido a la presencia de suspensión de células de levadura, sólidos provenientes de la uva y otros compuestos no solubles. Esta condición hace que se requiera el uso de operaciones de clarificación y filtración, las cuales incrementan los costos operativos, generan pérdidas de producto y prolongan los tiempos de operación (Otarola et al, 2025). Asimismo, el contacto prologado del vino con células muertas puede afectar negativamente el perfil sensorial del producto y a esto se suma el riesgo de contaminación por microorganismos no deseados durante el proceso fermentativo (Malfeito & Silva, 2019).

Frente a estas limitaciones, en los últimos años ha aumentado el interés en el desarrollo de estrategias biotecnológicas que permitan mejorar la eficiencia de los procesos fermentativos. Una de estas alternativas es el uso de células de levadura inmovilizadas (Benucci & Esti, 2020; Fernández et al., 2022; Prokes et al., 2022; Shah et al., 2024).

Esta técnica consiste en encapsular las células dentro de una matriz que les permita actuar como biocatalizadores durante la fermentación, este método facilita la separación de las células del medio fermentativo y permite su reutilización en varios ciclos de fermentación (Moreno et al, 2018). Entre las principales ventajas reportadas del uso de esta tecnología se encuentran el aumento de la productividad del proceso, mayor control operacional y la reducción de costos asociados a la recuperación de biomasa y a los volúmenes de los equipos utilizados (Bleve et al, 2016).

En este contexto, la aplicación de tecnologías de inmovilización celular y la optimización de variables operacionales, tales como la concentración inicial de sólidos solubles en el mosto, busca evaluar su influencia en el rendimiento y la productividad de la etapa de fermentación en la elaboración de vino tinto a partir de la uva *Vitis labrusca* variedad Isabella.

1. Objetivos

1.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la concentración inicial de sólidos solubles del mosto y de la inmovilización de la levadura comercial *Saccharomyces cerevisiae* Premier Rouge (Red Star) sobre el proceso fermentativo para la producción de vino tinto a partir de la uva *Vitis labrusca* (variedad Isabella).

1.2 Objetivos específicos

- Determinar la concentración inicial de sólidos solubles del mosto de uva *Vitis labrusca* que favorece la mayor productividad y el mayor rendimiento de etanol durante la producción de vino tinto.
- Comparar el desempeño fermentativo de la levadura comercial *Saccharomyces cerevisiae* Premier Rouge (Red Star) en estado libre e inmovilizado, en términos de productividad y rendimiento de etanol.

2. Estado del arte

La fermentación alcohólica del mosto de uva es un proceso biotecnológico clave en la elaboración de vino, en el cual los azúcares fermentables, principalmente fructosa y glucosa son metabolizados por levaduras del género *Saccharomyces*, transformándolos en etanol, dióxido de carbono y una amplia gama de metabolitos secundarios (glicerol, ácidos orgánicos y ésteres) que determinan el perfil sensorial del producto final (Martínez et al, 2016).

Históricamente, la industria vitivinícola, particularmente en la elaboración de vino tinto, se ha sustentado principalmente en la especie *Vitis vinífera*, destacándose variedades como *Cabernet Sauvignon* debido a su elevada concentración de compuestos fenólicos, especialmente

antocianinas y taninos, responsables de la coloración y potencial envejecimiento del vino (Jackson, 2014). No obstante, en regiones tropicales y subtropicales, la especie *Vitis labrusca* (variedad Isabella) ha cobrado relevancia por su resistencia a enfermedades, adaptabilidad climática y perfil aromático característico (Sánchez et al, 2025). En Colombia, el cultivo de esta variedad presenta una participación importante en departamentos como Valle del Cauca y Huila. Según datos del Observatorio de Información Rural y Agropecuaria (AGRONET), para el año 2024 se registraron producciones entre 14 y 20 mil toneladas, evidenciando la importancia agrícola y el potencial productivo de esta especie en el ámbito nacional (Unidad de Planificación Rural Agropecuaria - UPRA, 2024).

Estudios de microvinificaciones realizados por Orosco Condori et al. (2009) reportan que mostos a partir de la variedad Isabella fermentados bajo condiciones controladas (25-29 °C) alcanzan concentraciones de etanol entre 8,8–11% v/v, niveles de glicerol de 3–5 g/L y acidez volátil por debajo de los límites legales establecidos. Estos resultados confirman la viabilidad de *Vitis labrusca* para producir vinos con características sensoriales propias.

En el proceso tradicional de fermentación se utilizan células libres, donde la biomasa permanece suspendida en el mosto, lo que implica la necesidad de etapas posteriores de clarificación y filtración para remover las levaduras, lo que incrementa los costos operativos y riesgos de contaminación secundaria (Brunet et al, 2025). En este contexto, la inmovilización celular surge como una alternativa prometedora. Esta estrategia permite aumentar la densidad celular en el sistema, mejorar la productividad y reducir la contaminación microbiológica al retener la biomasa dentro de la matriz de inmovilización, limitando la proliferación de células libres en el medio (Moreno et al, 2018; Shah et al, 2024). Como resultado, se favorece la obtención de vinos más limpios y estables (Fernández et al, 2022), además de facilitar la implementación de procesos

continuos con un mayor control operacional y menores costos asociados a la recuperación de biomasa (Moreno et al, 2018).

Entre los sistemas más utilizados en fermentaciones enológicas a escala laboratorio se encuentran las matrices de alginato de calcio, gracias a su gelificación bajo condiciones moderadas y a su facilidad de preparación (Brunet et al., 2025; Shah et al., 2024). El alginato de sodio es un polisacárido aniónico natural derivado de algas pardas, compuesto por dos monómeros, el ácido α -L-gulurónico (G) y el ácido α -D-manurónico (M) (Colin et al, 2024). La formación del hidrogel ocurre mediante gelificación iónica: al entrar en contacto con cationes divalentes como el Ca^{2+} , dos hebras helicoidales enfrentadas de secuencias G se asocian al catión mediante un mecanismo de tipo quelato, dando lugar a una red porosa tridimensional que permite encapsular células vivas mientras facilita la transferencia de sustratos y metabolitos (Colin et al, 2024).

Duarte et al. (2013) reportaron la reutilización de perlas inmovilizadas en múltiples ciclos (en algunos casos hasta ocho), manteniendo una producción estable de etanol y reduciendo la proliferación celular en el mosto; un desempeño que se optimiza al emplear alginato de sodio al 2% (p/v), concentración que favorece la esfericidad, integridad y homogeneidad textural de las perlas (Damayanti et al, 2021). Esta capacidad de retención efectiva se evidencia en tecnologías como el sistema MLC®, donde las células permanecen activas pero confinadas en el alginato sin ingresar al vino durante la fermentación ni el almacenamiento (Prokes et al, 2022), así como en las microcápsulas de doble capa alginato-quitosano (aprox. 110 μm) desarrolladas por Benucci & Esti (2020) para la segunda fermentación en botellas de vino espumoso, sin comprometer las propiedades sensoriales del producto.

A pesar de estas ventajas, también se han documentado desafíos relacionados con la ruptura estructural de las perlas y la liberación de compuestos derivados de la matriz, los cuales pueden

actuar como contaminantes y comprometer la estabilidad del producto final (Gódia et al, 1991) (Voulgaris & Nerantzis, 2005). Adicionalmente, la inmovilización celular altera la fisiología microbiana, incrementando la tolerancia al etanol, modificando la permeabilidad de membrana y activando vías de captación de sustrato, lo que se traduce en cambios en el perfil de metabolitos secundarios y, en muchos casos, en un mayor rendimiento de etanol respecto a sistemas de fermentación con células libres (Djordjević et al, 2016).

Junto a la estrategia de inmovilización, la concentración inicial de azúcares en el mosto representa una segunda variable de proceso con influencia determinante en la cinética fermentativa y en el grado alcohólico final. Concentraciones elevadas de azúcares generan una mayor presión osmótica sobre la célula, activando mecanismos de respuesta al estrés que pueden afectar la tasa de fermentación y la producción de metabolitos como el glicerol (Frohman & Mira, 2013) y (Lleixà et al, 2016). Zhang et al. (2024) en un estudio con mosto de uva Vidal, demostraron que la concentración inicial de azúcar presentó una correlación negativa significativa con el número de levaduras viables, el consumo total de azúcares y nitrógeno, y la producción de etanol, mientras que se correlacionó positivamente con la formación de ácido acético y acetaldehído; hallazgos que evidencian el deterioro progresivo del desempeño fermentativo bajo condiciones de estrés osmótico elevado. En este contexto, la disponibilidad de nitrógeno asimilable por la levadura también emerge como un factor complementario importante ya que su deficiencia bajo condiciones de alta concentración de sustrato incrementa el riesgo de fermentaciones lentas o incompletas (Rojo et al, 2023).

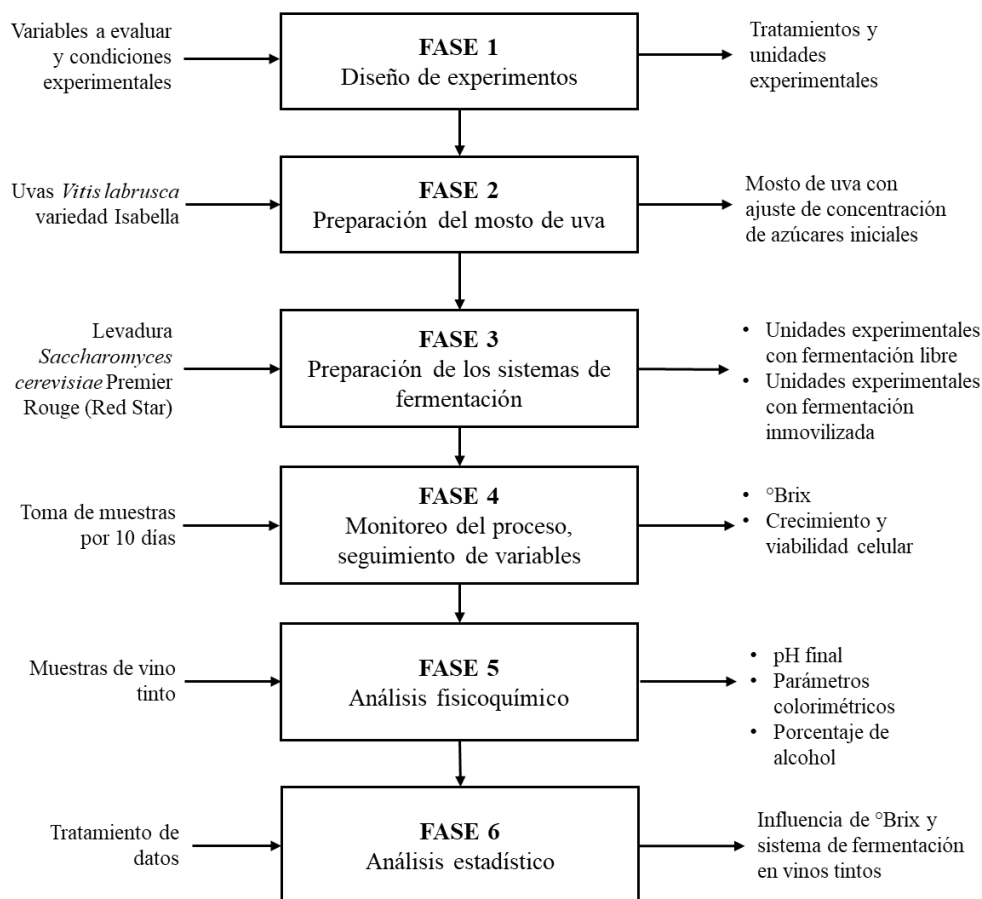
Asimismo, Falcón y Asnate (2021), mediante un diseño de superficie de respuesta aplicado a bebidas fermentadas de capulí, demostraron que la optimización simultánea de los grados °Brix iniciales y la suplementación nutricional influye significativamente en el rendimiento alcohólico.

Este enfoque experimental constituye un referente metodológico aplicable a procesos fermentativos en *Vitis labrusca*, donde el ajuste de estas variables operativas puede impactar la eficiencia y calidad del producto final.

En conjunto, la literatura evidencia que tanto la estrategia de inmovilización celular como la modulación de la concentración inicial de sólidos solubles constituyen variables que afectan la productividad fermentativa, la estabilidad microbiológica y la calidad del vino. Estos antecedentes sustentan el enfoque experimental adoptado en el presente proyecto, orientado a evaluar el efecto de dichas variables sobre parámetros como el rendimiento y la productividad del vino tinto producido a partir de *Vitis labrusca*, variedad Isabella.

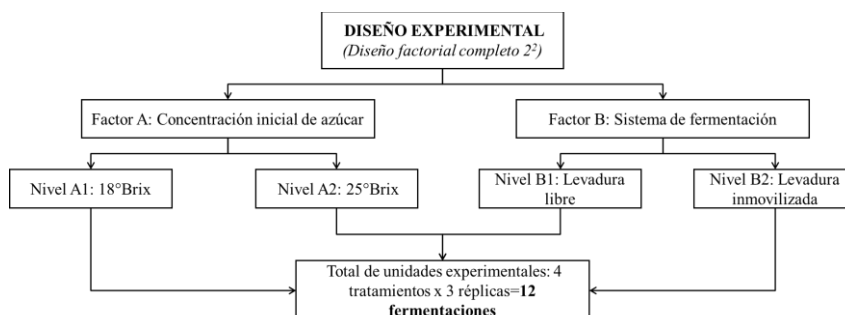
3. Metodología

En la Figura 1 se presenta el esquema general de la metodología empleada en el presente estudio. La investigación se desarrolló en seis fases experimentales, que abarcaron desde el diseño de experimentos y la preparación del mosto hasta el análisis estadístico de los resultados. En cada etapa se establecieron las condiciones experimentales y las variables de respuesta, proporcionando una visión integral del desarrollo experimental.

Figura 1*Fases experimentales del trabajo de investigación*

3.1 Fase 1: Diseño experimental

Se empleó un diseño factorial completo 2^2 , en el cual se evaluaron dos factores: (i) la concentración inicial de sólidos solubles totales, expresada como °Brix, equivalente a la concentración de sacáridos presentes en el mosto y (ii) la inmovilización o no inmovilización de la levadura comercial *Saccharomyces cerevisiae* marca Premier Rouge (Red Star). En la Figura 2 se representa el esquema del diseño de experimentos empleado.

Figura 2*Representación jerárquica del diseño experimental*

La concentración de sólidos solubles se evaluó en dos niveles: 18 y 25 °Brix, mientras que el sistema de fermentación consideró dos modalidades: levadura inmovilizada (células atrapadas) y levadura libre (células no atrapadas). La concentración de inóculo se mantuvo constante en todos los tratamientos, las fermentaciones se realizaron a temperatura ambiente del laboratorio (20-22 °C) sin control específico de temperatura.

Se obtuvieron cuatro combinaciones experimentales, cada una realizada por triplicado, para un total de 12 corridas experimentales.

Para el análisis estadístico, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia de $\alpha=0,05$. Finalmente, los resultados obtenidos fueron comparados e interpretados con base en literatura reportada.

3.2 Fase 2: Preparación del mosto de uva

Las uvas de la especie *Vitis labrusca* variedad Isabella fueron adquiridas en la plaza de mercado San Francisco de la ciudad de Bucaramanga. De acuerdo con la información consignada en el empaque, su procedencia correspondía al departamento de Huila, Colombia. Posteriormente, se realizó una selección manual de las uvas de manera individual, descartando aquellas que presentaban magulladuras, ruptura de la piel o que presentaran un estado de madurez insuficiente,

FERMENTACIÓN DE *V. LABRUSCA* CON *S. CEREVISIAE* INMOVILIZADA

evidenciado por su coloración verde. Las uvas seleccionadas fueron sometidas a lavado, despalillado y estrujado para obtener el mosto.

Con el fin de reducir la carga microbiana inicial y favorecer el predominio de la levadura comercial *Saccharomyces cerevisiae*, el mosto fue sometido a un tratamiento térmico de pasteurización. Este consistió en el calentamiento del mosto hasta una temperatura entre 60 y 65 °C durante 10 minutos, seguido de un rápido enfriamiento mediante baño de hielo.

El mosto de uva presentó una concentración inicial de 12 °Brix, sin embargo, para iniciar el proceso de fermentación, este valor fue ajustado mediante la adición de sacarosa refinada hasta valores de 18 y 25 °Brix, utilizando la Ec. 1:

$$m = ({}^{\circ}\text{Brix}_{\text{deseados}} - {}^{\circ}\text{Brix}_{\text{iniciales}}) * \left(\frac{10 \frac{\text{g}}{\text{L}}}{1^{\circ}\text{Brix}} \right) \times V_f \quad \text{Ec. 1}$$

Donde:

V_f = Volumen total del mosto para cada uno de los tratamientos (1.2 L)

m = Masa de sacarosa a añadir (g)

La medición de °Brix se realizó utilizando un refractómetro óptico (DBM IMPOTERS RHB-32ATC) previamente calibrado.

Adicionalmente, el mosto se suplementó con extracto de levadura (Fluka Analytical-70161) a una concentración de 0,1 g/L como fuente de nitrógeno y micronutrientes. Asimismo, se adicionó metabisulfito de sodio (MERCK- 106357) a una concentración de 0,1 g/L como agente antimicrobiano para inhibir el crecimiento de hongos filamentosos y de esta forma favorecer el crecimiento de la levadura inoculada.

3.3 Fase 3: Preparación de los sistemas de fermentación

3.3.1 Fermentación libre

Para los tratamientos correspondientes a la fermentación con levadura libre, el mosto previamente ajustado a 18 y 25 °Brix fue distribuido en las unidades experimentales de 200 ml en frascos de vidrio estériles.

La inoculación se realizó mediante la adición directa de la levadura comercial *Saccharomyces cerevisiae* Premier Rouge (Red Star), con el fin de alcanzar una concentración celular inicial de 1×10^7 cel/ml en cada unidad experimental. La cantidad de levadura adicionada se calculó de acuerdo con la Ec. 2:

$$m = \frac{C_f \times V}{C_s} \quad \text{Ec. 2}$$

Donde:

C_f = Concentración celular objetivo (1×10^7 cel/mL)

C_s = Concentración específica de la levadura seca (1×10^{10} cel/g)

V = Volumen de mosto por unidad experimental [mL]

m = Masa de levadura a inocular [g]

Los sistemas fueron sellados con tapones de silicona y equipados con trampas de aire tipo airlock, permitiendo la liberación controlada de CO₂ generado durante la fermentación y asimismo evitando la entrada de oxígeno y contaminantes externos. En la Figura 3 se presenta el montaje de cada unidad experimental.

Figura 3

Unidad experimental de fermentación equipada con tapón de silicona y airlock



La fermentación alcohólica se llevó a cabo durante un período de diez días a temperatura ambiente del laboratorio ($22\pm 0,8$ °C), con una agitación manual una vez al día para favorecer la homogeneización del medio.

3.3.2 Fermentación con inmovilización celular

La inmovilización celular de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se realizó mediante el método de encapsulación en perlas de alginato de calcio, empleando gelificación iónica con cloruro de calcio (CaCl_2) como agente reticulante (Duarte et al., 2013; Hidalgo, 2010).

3.3.2.1 Preparación de las soluciones.

Se prepararon dos soluciones de alginato de sodio (PanReac-AppliChem, A3249,0250): 100 ml a una concentración de 3% (p/v) y 200 ml a una concentración de 0,2% (p/v). Ambas soluciones se disolvieron en agua destilada bajo agitación constante hasta alcanzar una mezcla homogénea. Luego, se dejaron en reposo para eliminar burbujas de aire y facilitar la formación uniforme de las perlas. Finalmente, ambas soluciones fueron esterilizadas en autoclave (Pinglobal JPA23LH) (121 °C, 1,5 psi durante 15 min) previo a su uso.

De manera paralela, se prepararon dos soluciones de cloruro de calcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Sigma-Aldrich, C7902-500G) a una concentración de 2,73% (p/v): una de 150 ml, utilizada durante la formación inicial de las perlas, y otra de 200 ml, empleada en el proceso del segundo recubrimiento. Ambas soluciones fueron esterilizadas en autoclave antes de su uso.

3.3.2.2 Preparación del inóculo.

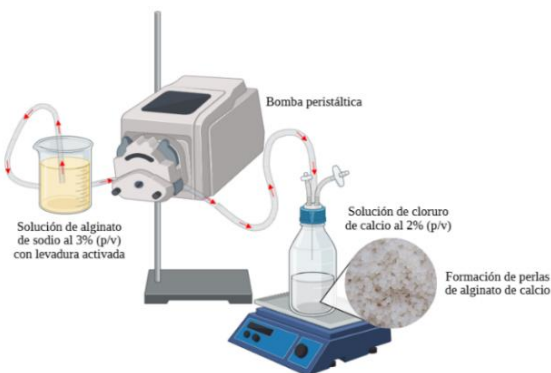
La cantidad de levadura a incorporar se calculó de acuerdo con la Ec. 2, considerando un volumen total de 1200 ml para los tratamientos con inmovilización. Posteriormente, la levadura comercial *Saccharomyces cerevisiae* Premier Rouge (Red Star) fue rehidratada e incorporada a la solución de alginato de sodio al 3% (p/v), asegurando una distribución homogénea de las células antes del proceso de encapsulación.

3.3.2.3 Formación de perlas por gelificación.

Una vez preparada la mezcla de alginato de sodio al 3% (p/v) con el inóculo, ésta fue transferida a un sistema de dosificación acoplado a una bomba peristáltica de flujo variable (Daigger Scientific, EEUU). Como se muestra en la Figura 4, la solución fue dispensada gota a gota hacia la solución de 150 ml de cloruro de calcio, la cual se mantuvo bajo agitación constante de 50 rpm. Las condiciones de operación de la bomba peristáltica se ajustaron para controlar el tamaño de las perlas, estableciendo un flujo constante de 90 ml/min lo que permitió la formación uniforme de las gotas.

Figura 4

Montaje experimental para la formación de perlas de alginato mediante bomba peristáltica



Created in BioRender.com

Las perlas formadas se dejaron en contacto con la solución de cloruro de calcio durante 1 hora con el fin de garantizar su estabilidad estructural. Finalizado este tiempo, las perlas fueron recuperadas mediante filtración por gravedad y lavadas con agua destilada estéril para eliminar el exceso de cloruro de calcio.

Posteriormente, se realizó un segundo recubrimiento para reforzar la integridad estructural de las perlas y reducir la liberación de células al medio. Para ello, las perlas se sumergieron en una solución de 200 ml de alginato de sodio al 0,2% (p/v) durante 5 minutos. A continuación, fueron filtradas e introducidas en la solución de 200 ml de cloruro de calcio, donde permanecieron durante 40 minutos para completar el endurecimiento.

Finalmente, las perlas se filtraron, se lavaron con agua estéril y se almacenaron en 500 ml de solución salina estéril compuesto por cloruro de sodio (NaCl) (Merck) 0,9% (p/v) y cloruro de calcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0,02 M. Este medio de almacenamiento se empleó con el fin de evitar el choque osmótico, evitar que las perlas se desintegraran o deformaran y mantuvieran la viabilidad de la levadura. Las perlas se conservaron a 4 °C hasta su uso en los ensayos de fermentación.

3.3.2.4 Caracterización de las perlas.

Para determinar la concentración celular encapsulada, se tomaron tres perlas individuales, cada una constituyendo una réplica independiente. Las perlas fueron suspendidas en 1 ml de solución de citrato de sodio (SUQUIN S.A.S) a una concentración de 0,1 M, luego se agitaron en vórtex durante 10 minutos, favoreciendo la disolución de la matriz de alginato y la liberación de las células inmovilizadas.

El recuento celular se realizó en cámara de Neubauer tomando 10 μL de cada suspensión, contabilizando los cinco cuadrantes centrales: esquina superior izquierda, esquina superior derecha, esquina inferior izquierda, esquina inferior derecha y cuadro central. La concentración celular, se expresó en células/ml mediante la Ec. 3:

$$[Cel] = \frac{\sum \#cel \times 5 \times 10^4 \times f_d}{ml} \quad \text{Ec. 3}$$

Donde:

$[Cel]$ = concentración celular (células/mL)

$\sum \#cel$ = Sumatoria de células contadas por cuadrante

10^4 = factor volumétrico de la cámara de Neubauer (mL^{-1})

f_d = factor de dilución aplicado a la muestra

Con base en estos valores, se determinó la masa de perlas a inocular en cada unidad experimental, con el fin de garantizar una concentración celular inicial equivalente a la empleada en los tratamientos con células libres. Para ello se empleó la Ec. 4:

$$m_p = \frac{C_f * V * P_p}{C_{cel}} \quad \text{Ec. 4}$$

Donde:

C_f = Concentración celular objetivo (1×10^7 cel/mL)

C_{cel} = Concentración celular promedio por perla ($5,54 \times 10^6$ cel/perla)

V = Volumen de mosto por unidad experimental (200 mL)

P_p = Peso promedio de una perla (0,0083g)

m_p = Masa de perlas a inocular[g]

3.4 Fase 4: Seguimiento del proceso fermentativo y medición de variables

3.4.1 Determinación de la concentración celular

3.4.1.1 Preparación de muestras.

En el caso de la fermentación con células libres, se tomó 1 ml de muestra del cultivo, el cual se centrifugó (Thermo Scientific SL 8R) a 8000 rpm durante 8 minutos. Tras retirar el sobrenadante, el *pellet* celular fue resuspendido en 1 ml de solución PBS (solución salina tamponada con fosfato) (BIO BASIC) y homogenizado en vórtex. Para la recuperación de las células a partir de las perlas de alginato durante el seguimiento del proceso, se siguió la metodología de disolución en citrato de sodio descrita en la sección 3.3.2.4.

3.4.1.2 Conteo celular. El conteo celular se realizó mediante cámara de Neubauer siguiendo la metodología y la Ec. 4 descritas en la sección 3.3.2.4.

3.4.2 Evaluación de viabilidad celular

Paralelamente al recuento total, se evaluó la viabilidad celular mediante la técnica de exclusión con azul de metileno. Este colorante es reducido por la actividad metabólica de las células viables, las cuales permanecen incoloras, mientras que las células muertas o con membrana comprometida lo retienen, visualizándose de color azul (Sami et al, 1994). Para ello se tomaron 50 μ L de la muestra preparada según la metodología descrita en la sección 3.4.1.1 y se mezclaron con 50 μ L de una solución de azul de metileno (CHEMI S.A.S.) previamente filtrada. Tras 2 minutos de contacto, se tomaron 10 μ L de la mezcla y se cargaron en la cámara de Neubauer. Las células muertas o con membrana comprometida fueron identificadas por la retención del colorante, visualizándose de color azul, mientras que las células viables permanecieron incoloras. Posteriormente, se realizó el recuento simultáneo de células totales y células no viables en los

cinco cuadrantes centrales de la cámara. El porcentaje de viabilidad se calculó aplicando la Ecuación 7.

Reescribiendo la Ec. 3 para los dos casos contemplados, se tiene:

$$[Cel_{total}] = \frac{\sum \#Cel_{total} \times 5 \times 10^4 \times f_d}{ml}$$

$$[Cel_{no\ viables}] = \frac{\sum Cel_{no\ viables} \times 5 \times 10^4 \times f_d}{ml}$$

Finalmente, el porcentaje de viabilidad celular se estimó mediante la Ecuación 7:

$$\%Viabilidad = \frac{[Cel_{viables}]}{[Cel_{total}]} \times 100 \quad \text{Ec. 7}$$

3.4.3 Medición de grados Brix

La determinación de sólidos solubles (°Brix) se realizó utilizando un refractómetro digital (Hanna instruments HI96801-Rumania), previamente calibrado con agua destilada. Para cada medición, se colocaron 2 gotas de la muestra (100 µL) sobre el prisma del equipo y se efectuó la lectura directa.

3.5 Fase 5: Caracterización fisicoquímica de los vinos

Al finalizar el proceso fermentativo, los vinos obtenidos fueron caracterizados mediante la determinación del pH final, parámetros colorimétricos del sistema CIELab y la concentración final de etanol.

El pH final se determinó mediante un pH-metro digital (Hanna Instruments HI 6221-Rumania), previamente calibrado. Las mediciones se realizaron asegurando la limpieza del electrodo entre cada análisis para evitar contaminación.

La caracterización colorimétrica se realizó mediante el sistema CIELab, empleando un sistema de adquisición digital de imágenes compuesto por una caja de iluminación y una cámara de teléfono inteligente, siguiendo la metodología propuesta por Peng et al. (2019). Las imágenes

fueron obtenidas bajo condiciones controladas y procesadas para determinar las coordenadas L^* , a^* y b^* , correspondientes a luminosidad y a los ejes cromáticos verde-rojo y azul-amarillo, respectivamente. A partir de estas coordenadas se calcularon la cromaticidad (C^*) y el ángulo de tono (h°), cuyas ecuaciones se encuentran en el Apéndice A.

La concentración final de etanol se determinó mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM), análisis realizado por el Laboratorio Instrumental de Análisis Químico de la Escuela de Química de la Universidad Industrial de Santander. Las condiciones seleccionadas para el análisis se enumeran en el Apéndice B.

La cuantificación del etanol se realizó mediante un método de estándar externo, utilizando dos soluciones estándar de etanol de concentración conocida analizadas a las mismas condiciones cromatográficas empleadas para las muestras. A partir de las áreas de los picos cromatográficos de los estándares se calculó un factor de respuesta promedio (k), el cual se empleó para determinar la concentración de etanol en las muestras relacionando sus respectivas áreas cromatográficas. Los cromatogramas de los estándares y de las muestras, así como los cálculos realizados para la determinación de la concentración de etanol, se presentan en el Apéndice B.

4. Resultados y discusión

4.1 Caracterización inicial del mosto y del sistema de inmovilización

El mosto presentó un contenido inicial de sólidos solubles de 12 °Brix. Debido a que esta concentración se encontraba por debajo de los niveles seleccionados para evaluar el efecto de la disponibilidad inicial de sustrato sobre el proceso fermentativo, se realizó el ajuste hasta 18 y 25 °Brix, correspondientes a los niveles establecidos en el diseño experimental. La selección de estos valores permitió evaluar el comportamiento de la levadura frente a una concentración inicial

moderada y una concentración elevada de sólidos solubles, respectivamente, así como su posible efecto sobre la cinética de fermentación y la producción de etanol.

Las perlas obtenidas mediante gelificación iónica se presentan en la Figura 5. La formación de estas estructuras fue resultado de la reticulación iónica entre los grupos carboxilo del alginato y los iones de calcio (Ca^{2+}) presentes en la solución de cloruro de calcio (Colin et al., 2024), dando lugar a perlas con geometría aproximadamente esférica y tamaño uniforme. La caracterización física evidenció un diámetro promedio de 2 mm, un peso medio de 0,0083 g por perla y una concentración celular promedio $5,54 \times 10^6$ cel /perla. Con base en esta concentración celular, se estableció una masa de 3 g de perlas para inocular cada unidad experimental, con el fin de equiparar la concentración celular inicial empleada en los tratamientos con levadura libre.

Figura 5

Perlas de alginato de calcio utilizadas para la inmovilización de Saccharomyces cerevisiae



El tamaño y la uniformidad de las perlas constituyen características relevantes en los sistemas de inmovilización, ya que influyen sobre la transferencia de masa entre el medio de fermentación y las células encapsuladas. Perlas de diámetro reducido favorecen la difusión de sustratos, nutrientes y metabolitos, disminuyendo las limitaciones difusionales (Partovinia et al, 2023). Sin embargo, un tamaño excesivamente pequeño puede comprometer la resistencia

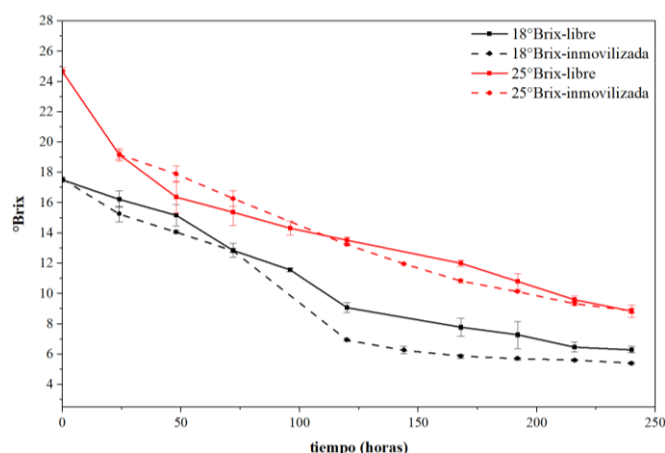
mecánica de la perla y aumentar el riesgo de liberación celular durante la fermentación (Abimbola et al, 2024). En este sentido, el diámetro obtenido se encuentra dentro del intervalo reportado para obtener un equilibrio entre estabilidad estructural y transferencia de masa (0.5 mm a 2 mm) (Sousa et al, 2021).

4.2 Perfil de consumo de sustrato

En la Figura 6 se presenta el comportamiento del consumo de sustrato presente en el mosto, a través de la medición de los grados Brix en función del tiempo para los cuatro tratamientos evaluados en el diseño experimental.

Figura 6

Perfil de evolución de los °Brix durante la fermentación



La Figura 6 presenta dos comportamientos de consumo de sustrato diferenciados según la concentración inicial de sólidos solubles. Los tratamientos con 18 °Brix presentaron un descenso acelerado durante las primeras 120 horas, seguido de una desaceleración marcada hasta el final de la fermentación. En contraste, los tratamientos con 25 °Brix exhibieron una disminución más gradual y sostenida durante todo el proceso, manteniendo mayores concentraciones residuales de sustrato al finalizar la fermentación. Este comportamiento sugiere que el incremento de la

concentración inicial de sólidos solubles generó un mayor estrés osmótico, retrasando la actividad fermentativa (Binati et al, 2020; Chen et al, 2024).

Con el fin de evaluar el perfil del consumo de sustrato durante la fermentación, se analizó la evolución de los sólidos solubles totales (°Brix) en función del tiempo. Adicionalmente, se calcularon las pendientes de las curvas en los diferentes intervalos de la fermentación, las cuales fueron utilizadas como indicador de la tasa de consumo de sustrato y permitieron comparar la actividad fermentativa entre los tratamientos evaluados. Los valores se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1

Tasas promedio de consumo de sustrato en los periodos 0-120 h y 120-240 h

Tratamiento	Tasa de consumo de sustrato (°Brix/h)	
	0-120 h	120-240 h
18 °Brix-libre	0,066	0,0033
18 °Brix-inmovilizada	0,088	0,0142
25 °Brix-libre	0,0360	0,0190
25 °Brix-inmovilizada	0,0526	0,0179

Al comparar los sistemas de fermentación, se observó que los tratamientos con células inmovilizadas presentaron las mayores tasas de consumo de sustrato durante las primeras 120 h del proceso fermentativo. Este resultado sugiere que la inmovilización en alginato de calcio favoreció la capacidad de consumo de sustrato, permitiendo mantener una actividad fermentativa más elevada durante la fase de crecimiento de la fermentación.

Una posible explicación de este comportamiento es la elevada densidad celular dentro de las perlas de alginato. Aunque la matriz de inmovilización introduce resistencias a la transferencia de masa, la proximidad entre las células genera microambientes metabólicamente activos que compensan parcialmente estas limitaciones y mantienen las tasas de consumo de sustrato (Nedovic et al. 2011). Este efecto fue más evidente en el tratamiento de 18 °Brix, mientras que a 25 °Brix el estrés osmótico pudo reducir esta ventaja (Chen et al., 2024).

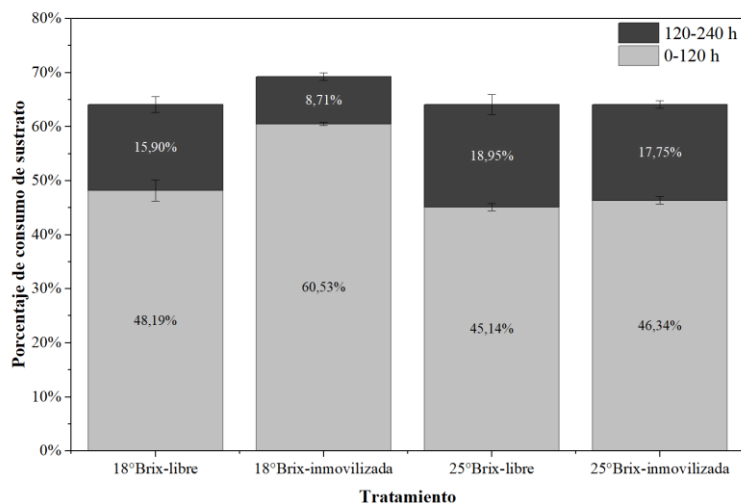
Respecto al efecto de la concentración inicial de sólidos solubles, los tratamientos con 25 °Brix iniciales mostraron una menor tasa de consumo en comparación con aquellos que comenzaron a 18 °Brix. Aunque una mayor concentración de azúcar incrementa la disponibilidad de sustrato para la fermentación, también genera un aumento de la presión osmótica del medio (Binati et al., 2020). Las células responden ante estas condiciones mediante mecanismos de adaptación fisiológica que demandan energía adicional y reducen la velocidad de crecimiento y consumo de sustrato (Chen et al, 2024). En consecuencia, las fermentaciones desarrolladas a 25 °Brix presentaron tasas de consumo menores a las observadas en los tratamientos a 18 °Brix, especialmente durante las etapas iniciales de la fermentación, como se observa en la Tabla 1.

4.2.1 Porcentajes de consumo de sustrato

El análisis de los porcentajes de consumo de sustrato permitió evaluar la distribución temporal del consumo de cada tratamiento a lo largo del período fermentativo. En la Figura 7 se presentan los porcentajes de consumo correspondientes a los intervalos de 0 a 120 h y de 120 a 240 h.

Figura 7

Porcentaje de consumo de sustrato durante la fermentación (0-240 h)



El análisis de varianza mostró que tanto la concentración inicial de sólidos solubles ($p < 0,0001$) como el sistema de fermentación ($p < 0,0001$) ejercieron un efecto significativo sobre el porcentaje de consumo de sustrato durante el intervalo comprendido entre 0 y 120 h. Además, se encontró una interacción significativa entre ambos factores ($p = 1,01 \times 10^{-4}$).

El análisis de comparación de medidas mediante la prueba de Tukey mostró que el tratamiento de 18 °Brix con inmovilización presentó un porcentaje de consumo de sustrato superior (60,5%) al de los demás tratamientos durante este intervalo ($p < 0,005$).

Este comportamiento sugiere que, bajo la concentración inicial de 18 °Brix, la inmovilización favoreció el consumo de sustrato durante la fase de crecimiento de la fermentación. En cambio, cuando la concentración inicial se incrementó hasta 25 °Brix, este efecto no se manifestó, posiblemente debido al estrés osmótico que ocasiona la alta concentración inicial de sustrato sobre la actividad metabólica y la viabilidad celular de *S. cerevisiae* discutido anteriormente, fenómeno reportado por (Binati et al, 2020; Chen et al, 2024).

Finalmente, al evaluar el consumo global acumulado (hora 0-240), los cuatro tratamientos presentaron porcentajes similares, representados por la suma de ambos intervalos en cada barra de la Figura 7. Los tratamientos presentaron porcentajes de consumo comprendidos entre 63 y 69%, lo que indica un aprovechamiento similar del sustrato independientemente de la concentración inicial de sólidos solubles y del sistema de fermentación empleado.

No obstante, estos valores deben interpretarse considerando que el seguimiento de la fermentación se realizó mediante mediciones de sólidos solubles; sin embargo, a medida que avanza la fermentación, la producción de etanol modifica el índice de refracción del medio, por lo que las lecturas de °Brix dejan de representar exclusivamente la concentración de azúcares fermentables. Por esta razón, los °Brix residuales no deben interpretarse como azúcar residual, sino como una medida aparente de los sólidos solubles presentes en el medio.

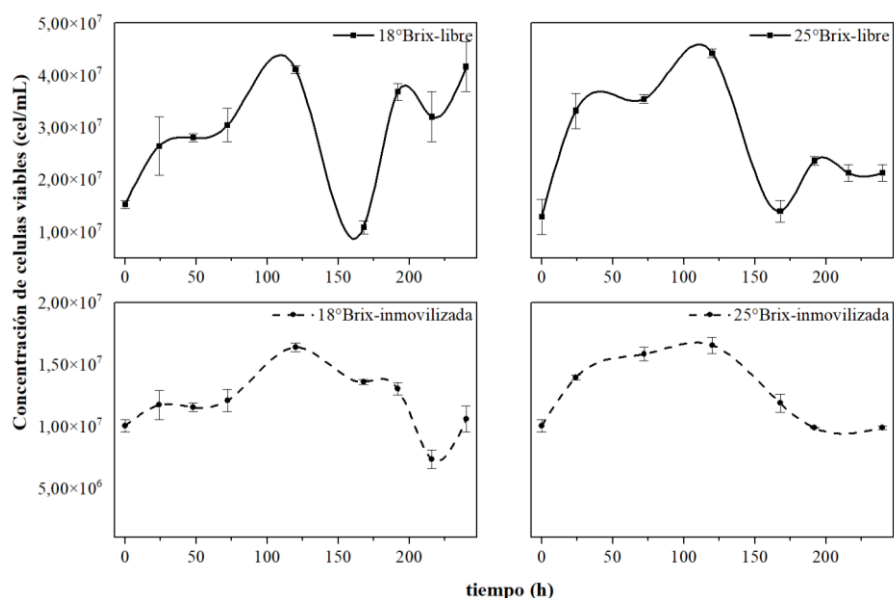
A pesar de esta limitación, la evolución de los °Brix permitió evidenciar el comportamiento general del proceso fermentativo. Asimismo, una mayor proporción de consumo de sustrato no implica necesariamente una mayor producción de etanol, ya que parte del sustrato también se destina a procesos de mantenimiento celular o la formación de metabolitos secundarios (Van Aalst et al, 2022) como posteriormente se discutirá.

4.3 Perfil de crecimiento celular

En la Figura 8 se presenta el perfil de la evolución de la concentración celular durante el proceso fermentativo para los diferentes tratamientos evaluados.

Figura 8

Perfil de crecimiento de células viables en los tratamientos evaluados



De manera general, se observa en la Figura 8 que la levadura presentó un crecimiento inmediato desde el inicio de la fermentación, sin evidenciar una fase de adaptación pronunciada. Este comportamiento puede atribuirse principalmente a la elevada concentración de inóculo empelada en el estudio (1×10^7 cel/ml).

En la fermentación de mosto de uva, la levadura *S. cerevisiae* forma parte de un ecosistema microbiano complejo en el que interactúa y compite con levaduras no-*Saccharomyces* y bacterias ácido-lácticas endógenas del mosto, por nutrientes esenciales, como fuentes de carbono y nitrógeno (Comitini et al, 2021). En este contexto, el uso de un inóculo elevado de la cepa seleccionada favorece su predominio, mejora el control biológico y reduce el riesgo de proliferación de microorganismos indeseables (Mas & Portillo, 2022).

En fermentaciones a nivel industrial, es habitual emplear concentraciones elevadas de inóculo para favorecer el rápido inicio de la fermentación y reducir la duración de la fase lag, lo que

contribuye a mejorar la productividad global del proceso y disminuye el riesgo de fermentaciones lentas (Mas & Portillo, 2022). Sin embargo, el empleo de altas concentraciones celulares genera una rápida demanda de nutrientes y oxígeno disuelto en las etapas iniciales, lo que genera su rápido agotamiento y limita el crecimiento de las células durante la fermentación (Carrau et al, 2010).

En todos los tratamientos se observó un incremento progresivo de la concentración celular durante los primeros días de fermentación, alcanzando valores máximos alrededor de la hora 120. El tratamiento con una concentración inicial de 18 °Brix registró una concentración máxima de aproximadamente $4,11 \times 10^7$ cel/ml, mientras que el tratamiento a 25 °Brix alcanzó aproximadamente $4,80 \times 10^7$ cel/ml. Por su parte, las concentraciones máximas dentro de las perlas fueron aproximadamente $1,64 \times 10^7$ cel/ml para el tratamiento con 18 °Brix y $1,65 \times 10^7$ cel/ml para el tratamiento con 25 °Brix.

Las diferencias observadas entre tratamientos podrían estar relacionadas a la disponibilidad inicial de sustrato y al efecto de la inmovilización celular. El confinamiento físico de las células dentro de la matriz polimérica restringe la expansión poblacional, promoviendo una cinética de crecimiento más controlada y estable. Este comportamiento ha sido reportado en sistemas de inmovilización, debido a las limitaciones difusionales y las restricciones espaciales dentro del soporte inmovilizador (García, 2021).

Posteriormente, a partir de la hora 120, las curvas de crecimiento tendieron a estabilizarse, observándose una disminución en la concentración celular para todos los tratamientos. Este comportamiento no necesariamente indica una fase de muerte celular masiva, sino el inicio de una fase estacionaria, en la cual la tasa de división celular se aproxima a la tasa de muerte celular. La disminución progresiva del nitrógeno y otros nutrientes restringe la formación de nuevas células, lo que favorece la transición hacia una fase estacionaria.

4.3.1 Tasa específica de crecimiento (μ)

La velocidad específica de crecimiento (μ) fue calculada para cada período de tiempo en todos los tratamientos evaluados. En la Tabla 2 se presentan los valores obtenidos.

Tabla 2

Tasas específicas de crecimiento en el proceso de fermentación

Intervalo (horas)	Tratamientos			
	18 °Brix-libre μ (h^{-1})	18 °Brix-inmovilizada μ (h^{-1})	25 °Brix-libre μ (h^{-1})	25 °Brix-inmovilizada μ (h^{-1})
0-24	0,010 $\pm$ 0,011	0,007 $\pm$ 0,006	0,011 $\pm$ 0,003	0,011 $\pm$ 0,002
24-48	0,001 $\pm$ 0,004	0,000 $\pm$ 0,005	-	-
48-72	0,001 $\pm$ 0,004	0,001 $\pm$ 0,004	0,000 $\pm$ 0,001	0,001 $\pm$ 0,006
96-120	0,003 $\pm$ 0,010	0,004 $\pm$ 0,004	0,002 $\pm$ 0,002	0,002 $\pm$ 0,008

Nota. El símbolo (-) indica que no se reportó un valor de velocidad específica de crecimiento para ese intervalo de tiempo debido a que los datos obtenidos fueron inconsistentes y no permitieron una estimación confiable del parámetro.

De manera general, los mayores valores de μ se registraron durante las primeras 24 horas de fermentación, con valores comprendidos entre 0,007 y 0,011 h^{-1} . Este comportamiento es consistente con la fase de mayor actividad metabólica observada durante el proceso y con los valores de las tasas de consumo de sustrato presentados en la Tabla 1, evidenciando que durante las etapas iniciales existió una mayor disponibilidad de azúcares fermentables, mientras que la concentración de etanol aún no alcanza niveles capaces de generar efectos inhibitorios sobre la actividad metabólica de la levadura (Liu et al, 2020).

No obstante, los mayores valores de μ obtenidos fueron inferiores a la tasa específica máxima de crecimiento reportada para *S. cerevisiae* bajo condiciones óptimas de laboratorio (0,230-0,45 h^{-1}), determinadas a temperaturas entre 30 y 33 °C, pH entre 4 y 5 y en ausencias de represiones cinéticas (Lin et al, 2012). Esta diferencia puede explicarse por las condiciones bajo las cuales se desarrolló la fermentación, pues el mosto es un medio de composición complejo, en los que la levadura está expuesta a diferentes factores que afectan su velocidad de crecimiento,

entre ellos la limitada disponibilidad de nitrógeno asimilable y el incremento progresivo de etanol, los cuales pueden afectar la actividad metabólica y reducir la tasa de crecimiento respecto a la observada en medios sintéticos (Van Aalst et al, 2022; Walker & Stewart, 2016).

Por otro lado, se observó que los tratamientos con células inmovilizadas presentaron tasas de consumo de sustrato superiores a las obtenidas en las fermentaciones libres. Sin embargo, el análisis de varianza realizado para μ durante el intervalo de 0-24 h mostró que el sistema de fermentación no tuvo un impacto significativo sobre este parámetro ($p=0,1885$). Lo anterior sugiere que el mayor consumo de sustrato registrado en los tratamientos con inmovilización no estuvo acompañado por incrementos en la tasa específica de crecimiento, ya que una fracción importante del sustrato consumido no fue destinado exclusivamente a la formación de nueva biomasa, sino también al mantenimiento celular y a la producción de metabolitos primarios y secundarios (Van Aalst et al, 2022).

Posteriormente, los valores de las velocidades de crecimiento específica disminuyeron progresivamente, incluso en algunos intervalos los valores fueron cercanos a cero o ligeramente negativos (de la hora 144 hasta la 240). Esta tendencia refleja la transición desde una fase de crecimiento hacia una fase de estabilización, como se discutió anteriormente. Como plantean Nelson & Boulton (2024) la reducción de este parámetro puede atribuirse a la disminución gradual de los nutrientes presentes en el medio, el consumo progresivo de los azúcares y la acumulación de etanol en el medio, lo que limita la capacidad de división celular y promueven respuestas fisiológicas asociadas al estrés metabólico. Finalmente, respecto al efecto de la concentración inicial de sólidos solubles, el análisis estadístico indicó que la concentración de azúcar no afectó significativamente la tasa específica de crecimiento durante las primeras 24 h ($p=0,6058$). Aunque

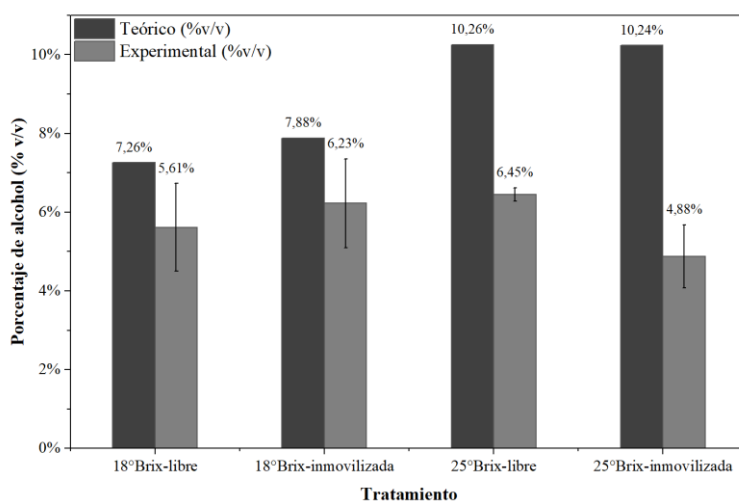
los tratamientos con 25 °Brix disponían de una mayor cantidad de azúcares disponibles, este incremento no se tradujo en aumentos significativos en la tasa de crecimiento.

4.4 Rendimiento y productividad

En la Figura 9 se compara el contenido de etanol obtenido experimentalmente con el esperado teóricamente (si todo el azúcar se hubiera consumido solamente para producir etanol).

Figura 9.

Contenido de etanol %(v/v) teórico y experimental para los tratamientos evaluados



Como se observa en la Figura 9, en ninguno de los tratamientos el contenido experimental de etanol alcanzó el valor teórico estimado a partir del consumo de azúcares fermentables. Este comportamiento es consistente ya que el rendimiento teórico máximo (0,511 g de etanol por g de glucosa) supone que la totalidad el carbono proveniente de los azúcares fermentables se convierte en etanol y dióxido de carbono. No obstante, durante el metabolismo de *S. cerevisiae*, el carbono asimilado se distribuye entre diferentes rutas metabólicas, destinando no solo a la producción de etanol, sino también a la formación de biomasa y otros metabolitos (Van Aalst et al, 2022).

Este comportamiento ha sido ampliamente documentado, por ejemplo en la revisión sobre estrategias de ingeniería metabólica para incrementar la producción industrial de etanol (Van Aalst et al, 2022), los autores señalan que en algunas cepas de *S. cerevisiae* una fracción del carbono es desviada de forma natural hacia la síntesis de glicerol y biomasa, lo que disminuye el rendimiento de etanol. Además, indican que la formación de glicerol es necesaria para mantener el balance redox intracelular durante el proceso fermentativo, por lo que su formación hace parte del metabolismo normal de la levadura.

Al comparar ambos sistemas fermentativos, las diferencias entre el contenido experimental de etanol no fueron considerables. Este comportamiento coincide con lo reportado por López et al. (2018), quienes observaron que la inmovilización de *S. cerevisiae* en perlas de alginato de calcio permitió obtener concentraciones finales de etanol comparables a las alcanzadas con células libres durante la fermentación de mostos con *Vitis vinífera*, con contenidos alcohólicos entre 11 y 12% (v/v). Estos resultados sugieren que la inmovilización no necesariamente limita la producción final de etanol, aunque si puede modificar la cinética del proceso y la eficiencia.

En contraste, se esperaba que el incremento de la concentración inicial de sólidos solubles favoreciera una mayor producción de etanol, debido a la mayor disponibilidad de sustrato para el metabolismo fermentativo. Sin embargo, los resultados experimentales mostraron porcentajes de etanol similares entre ambos niveles de °Brix. Este comportamiento puede atribuirse al efecto del estrés osmótico generado por las elevadas concentraciones iniciales de azúcar, condición que induce a respuestas fisiológicas en la levadura, como la activación de mecanismos de mantenimiento celular, reduciendo la velocidad de fermentación y desviándose de rutas metabólicas diferentes a la producción de etanol. Esto es consistente con la menor tasa de consumo de azúcares (0,0360 °Brix/h) observada para los tratamientos con 25 °Brix iniciales.

FERMENTACIÓN DE *V. LABRUSCA* CON *S. CEREVISIAE* INMOVILIZADA

Los parámetros de desempeño fermentativo calculados para los tratamientos evaluados se presentan en la Tabla 3. El rendimiento de producto respecto al sustrato consumido (Y_{ps}) se utilizó como indicador de la eficiencia de conversión de los azúcares fermentables en etanol, mientras que la productividad (q_p) permitió evaluar la velocidad de producción de etanol durante el proceso fermentativo.

Tabla 3

Parámetros de desempeño obtenidos para cada uno de los tratamientos

Tratamiento	Rendimiento Y_{ps} (g/g)	Eficiencia	Productividad q_p (g/L h)
18 °Brix-libre	0,40±0,067	77,01%	0,18±0,036
18 °Brix-inmovilizada	0,31±0,059	60,88%	0,20±0,037
25 °Brix-libre	0,41±0,011	81,02%	0,21±0,005
25 °Brix-inmovilizada	0,26±0,042	50,51%	0,17±0,026

Los valores de rendimiento evidenciaron diferencias entre los sistemas de fermentación. Los tratamientos con células libres presentaron mayores rendimientos de etanol, independientemente de la concentración inicial de sólidos solubles. El mayor rendimiento se obtuvo en el tratamiento de 25 °Brix con fermentación libre y el menor rendimiento se obtuvo con el tratamiento de 25 °Brix con inmovilización. Esto demuestra que, bajo las condiciones evaluadas, el sistema de inmovilización redujo la eficiencia de la conversión de azúcares fermentables en etanol.

La disminución del rendimiento observado en los tratamientos con células inmovilizadas puede atribuirse, en parte, a las limitaciones de transferencia de masa propias del sistema de inmovilización. En estos casos, el sustrato debe difundirse desde el medio líquido hacia el interior de la matriz para alcanzar a las células, mientras que los productos metabólicos deben difundirse en sentido contrario. Esto puede generar gradientes de concentración y microambientes con

diferentes condiciones metabólicas, afectando la actividad metabólica de las células y con ello, la conversión de sustrato en etanol (García, 2021).

Además de las limitaciones difusionales, la inmovilización puede generar una diferencia fisiológica dentro de las perlas, no todas las células experimentan las mismas condiciones metabólicas, disminuyendo la eficiencia el proceso. Se ha reportado que estos gradientes se hacen más evidentes cuando se emplean altas concentraciones iniciales de azúcares o elevadas densidades celulares dentro de la matriz (Mehrotra et al, 2021).

Lo anterior resulta consistente con los resultados obtenidos de crecimiento celular, donde los tratamientos con el sistema de inmovilización presentaron menores concentraciones celulares que los tratamientos con células libres. Una menor actividad fisiológica, sumada a las limitaciones de transferencia de masa, explican la menor eficiencia en la conversión de los azúcares fermentables.

De igual manera el análisis de varianza (ANOVA) confirmó la influencia del sistema de fermentación sobre el rendimiento de etanol, evidenciando un efecto significativo entre los tratamientos ($p=0,0098$). Por el contrario, la concentración inicial de sólidos solubles ($p=0,6588$) y la interacción entre ambos factores ($p=0,3298$) no presentaron efectos significativos sobre esta variable.

En términos de la eficiencia fermentativa, los rendimientos obtenidos representaron entre el 80 % y el 50 % del rendimiento teórico máximo de la fermentación alcohólica (0,511 g etanol/g glucosa consumida). El tratamiento de 25 °Brix con fermentación libre presentó la mayor eficiencia (81,02%), en contraste, la menor eficiencia se obtuvo en el tratamiento de 25 °Brix con células inmovilizadas (50,51%).

Respecto a la productividad, el valor mayor se registró en el tratamiento de 25 °Brix con células libres (0,2099 g/L h), mientras que el menor valor correspondió al tratamiento de 25 °Brix con células inmovilizadas (0,1697 g/L h). Sin embargo, el análisis de varianza (ANOVA) indicó que ni la concentración de sólidos solubles ($p=0,8216$), ni el sistema de fermentación ($p=0,6436$), ni la interacción entre ambos factores ($p=0,1836$) ejercieron un efecto significativo sobre este parámetro.

Este comportamiento coincide con lo reportado por Chacón et al. (2021), quienes reportan que el efecto de la inmovilización sobre la productividad del etanol depende de varios factores, entre ellos el material de la inmovilización, la resistencia de la transferencia de masa y las condiciones de operación. Por ello destacan que este tipo de inmovilización no siempre incrementan la productividad respecto a las células libres, ya que estos factores pueden restringir el transporte de sustratos y metabolitos, afectando la velocidad global de la fermentación.

Al analizar conjuntamente los resultados obtenidos en las diferentes etapas del proceso fermentativo, se observa que las diferencias entre tratamientos se manifestaron principalmente en la eficiencia de conversión del sustrato y no en la velocidad global de producción de etanol. Aunque los tratamientos con células inmovilizadas presentaron variaciones en el consumo de azúcares, menores concentraciones celulares y menores rendimientos de etanol, estas diferencias no fueron suficientes para generar cambios estadísticamente significativos en la productividad.

Esto sugiere que, bajo las condiciones evaluadas, la inmovilización modificó la distribución del carbono y la eficiencia metabólica de *Saccharomyces cerevisiae*, pero no alteró de manera significativa la capacidad global del sistema para producir etanol por unidad de tiempo. En consecuencia, la fermentación llevada a cabo con células libres y a 25 °Brix iniciales constituyó la

condición que permitió el mejor desempeño fermentativo, al combinar la mayor eficiencia de conversión de los azúcares con la mayor productividad de etanol obtenida en este estudio.

4.5 Análisis fisicoquímico del vino

4.5.1 pH

Los valores de pH obtenidos después del proceso de fermentación para cada uno de los tratamientos se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4

pH final de los vinos obtenidos para cada tratamiento

Tratamiento	pH
18 °Brix-libre	$2,98 \pm 0,031$
18 °Brix-inmovilizada	$2,930 \pm 0,000$
25 °Brix-libre	$2,97 \pm 0,017$
25 °Brix-inmovilizada	$2,973 \pm 0,070$

Los valores de pH obtenidos son más bajos que el rango típico reportado para vinos tintos elaborados a partir *Vitis vinífera*, que oscilan entre 3,3 y 3,6 (Lago et al, 2026). Sin embargo, este comportamiento es característico en vinos elaborados con uvas *Vitis labrusca*, debido a que esta variedad se caracteriza por producir mostos con elevada acidez titulable y, en consecuencia, menores valores de pH (Hernández et al, 2011).

Desde el punto de vista enológico, el pH ácido favorece la estabilidad microbiológica del vino, contribuye a la conservación del color y reduce la necesidad de adición de sulfitos como conservantes. No obstante, valores de pH inferiores a 3 pueden generar percepciones sensoriales de acidez excesiva que afectan la calidad organoléptica del producto final (Forino et al, 2020).

4.5.2 Parámetros colorimétricos CIELab

En la Tabla 5 se presentan las coordenadas colorimétricas del sistema CIELab (L^* , a^* y b^*) obtenidas para cada uno de los tratamientos evaluados, así como los parámetros derivados calculados a partir de dichas coordenadas. Los colores correspondientes a cada tratamiento se muestran en la Tabla 6, mientras que las imágenes obtenidas durante el análisis colorimétrico se incluyen en el Apéndice 1 como complemento visual.

Tabla 5

Coordenadas y parámetros colorimétricos CIELAB

Tratamiento	L^*	a^*	b^*	C^*	h°
18 °Brix-libre	27,2	49,9	40,1	64,02	51,21
18 °Brix-inmovilizada	49,8	72	7,4	72,38	84,13
25 °Brix-libre	29,1	52,3	36,1	63,55	55,38
25 °Brix-inmovilizada	52,5	64,1	-2,6	64,15	92,32

Tabla 6

Representación de los colores calculados a partir de las coordenadas CIELAB

Tratamiento	Color
18 °Brix-libre	
18 °Brix-inmovilizada	
25 °Brix-libre	
25 °Brix-inmovilizada	

El parámetro L^* (luminosidad) reveló una diferencia marcada entre los sistemas de fermentación. Los tratamientos con sistema de fermentación libre presentaron menores valores, lo que indica menor luminosidad y por tanto una apariencia visual más oscura. En contraste, los tratamientos con el sistema de fermentación de la inmovilización mostraron valores notablemente superiores, indicando vinos más claros, sugiriendo una menor concentración de pigmentos.

La causa de este fenómeno puede residir en la adsorción de las antocianinas por la matriz de alginato de calcio durante el tiempo de fermentación y por ende el mayor contacto entre las perlas y el mosto. Se ha reportado que los hidrogeles de alginato poseen la capacidad de adsorción sobre compuestos fenólicos debido a interacciones electrostáticas, puentes de hidrógeno y otros mecanismos fisicoquímicos (Liudvinaviciute et al., 2020). Esta retención de pigmentos durante la fermentación habría resultado en una menor concentración de antocianinas en el vino final, explicando los mayores valores de L^* .

Respecto a la coordenada a^* , todos los tratamientos presentaron valores positivos, indicando el predominio de la componente roja. Por su parte, la coordenada b^* mostró un comportamiento diferente entre los sistemas de fermentación. Los tratamientos con fermentación libre presentaron valores positivos más altos, lo que indica una mayor contribución de tonalidades amarillas. En contraste, los tratamientos con células inmovilizadas presentaron desplazamientos hacia componentes azules-violeta. Este comportamiento podría estar relacionado con la modificación en el equilibrio de los pigmentos presentes en el vino descrito anteriormente.

En cuanto al indicador de saturación o intensidad del color (C^*), los valores obtenidos fueron similares entre los tratamientos, lo que sugiere que, a pesar de las diferencias observadas en la luminosidad y tonalidad, todos los vinos conservaron colores visualmente intensos y bien definidos. Por último, al ángulo de tono (h°) presentó valores superiores en los tratamientos con células inmovilizadas respecto a los tratamientos con fermentación libre, evidenciando diferencias en la tonalidad global de los vinos. Estos resultados, en conjunto con las variaciones observadas en las coordenadas a^* y b^* , confirman que el sistema de fermentación influyó en las características cromáticas finales de los vinos obtenidos bajos los diferentes tratamientos de inmovilización o no.

5. Conclusiones

La concentración inicial de sólidos solubles influyó en la dinámica de la fermentación, aunque no modificó significativamente el desempeño fermentativo final. Los tratamientos con 18 °Brix presentaron mayores tasas iniciales de consumo de sustrato, mientras que aquellos con 25 °Brix evidenciaron una cinética más lenta, atribuida al estrés osmótico generado por la elevada concentración de azúcares.

El sistema de inmovilización favoreció una mayor velocidad de consumo de sustrato durante la fase activa de la fermentación, sin embargo, este comportamiento no se tradujo en un incremento del crecimiento celular ni en una mayor eficiencia de conversión de sustrato. Los tratamientos con células inmovilizadas presentaron menores concentraciones celulares y rendimientos de etanol, lo que sugiere que las limitaciones de transferencia de masa y los gradientes metabólicos dentro de las perlas de alginato afectaron el desempeño fermentativo.

Bajo las condiciones experimentales evaluadas, el tratamiento con células libres y una concentración inicial de 25 °Brix fue el que obtuvo el mejor desempeño para la producción de vino tinto a partir de *Vitis labrusca*, al combinar la mayor eficiencia de conversión de sustrato con la mayor productividad de etanol. En consecuencia, la inmovilización en perlas de alginato de calcio no representó una ventaja tecnológica para incrementar el desempeño fermentativo en las condiciones estudiadas.

6. Recomendaciones

Mejorar las condiciones del sistema de inmovilización mediante la evaluación de variables como la concentración de alginato, el diámetro de las perlas y la densidad celular encapsulada, con el propósito de disminuir las limitaciones de transferencia de masa y mejorar la eficiencia de conversión de los azúcares fermentables en etanol.

Evaluar la reutilización de las perlas de alginato de calcio en ciclos sucesivos de fermentación para determinar su estabilidad mecánica, la viabilidad celular y el desempeño fermentativo a lo largo del tiempo, considerando que esta constituye una de las principales ventajas potenciales de los sistemas de inmovilización.

Complementar la caracterización del vino mediante la cuantificación de compuestos fenólicos, antocianinas y otros metabolitos de interés enológico, con el fin de establecer la influencia del sistema de inmovilización sobre la composición química y calidad del producto final.

Referencias bibliográficas

- Abimbola, T., Christodoulatos, C., & Lawal, A. (2024). Anaerobic digestion of whole cells and post-extracted algae residues of *Scenedesmus obliquus* in immobilized batch reactor. *Renewable Energy*, 221, 119749. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2023.119749>
- Benucci, I., & Esti, M. (2020). *NOVEL MICROENCAPSULATED YEAST FOR THE PRODUCTION OF SPARKLING WINE BY TRADITIONAL METHOD*. (3).
- Binati, R., Lemos, W., Luzzini, G., Slaghenaufi, D., Ugliano, M., & Torriani, S. (2020). Contribution of non-Saccharomyces yeasts to wine volatile and sensory diversity: A study on Lachancea thermotolerans, Metschnikowia spp. And Starmerella bacillaris strains isolated in Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 318, 108470. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108470>
- Bleve, G., Tufariello, M., Vetrano, C., Mita, G., & Grieco, F. (2016). Simultaneous Alcoholic and Malolactic Fermentations by Saccharomyces cerevisiae and Oenococcus oeni Cells Co-immobilized in Alginate Beads. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00943>
- Brunet, S., Erceg, T., Janjušević, L., Birgermajer, S., Odanović, M., Puškaš, V., & Miljić, U. (2025). Materials for Yeast Immobilization in Alcoholic Fermentation: Bridging Conventional Techniques and 3D Bioprinting. *Polymers*, 17(23), 3094. <https://doi.org/10.3390/polym17233094>
- Carrau, F., Medina, K., Fariña, L., Boido, E., & Dellacassa, E. (2010). Effect of *Saccharomyces cerevisiae* inoculum size on wine fermentation aroma compounds and its relation with assimilable nitrogen content. *International Journal of Food Microbiology*, 143(1), 81-85. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.07.024>

- Chacón, H., Martín, C., & Moreno, J. (2021). Yeast immobilization systems for second-generation ethanol production: Actual trends and future perspectives. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 15(5), 1549-1565. <https://doi.org/10.1002/bbb.2250>
- Chen, A., Qu, T., Smith, J., Li, J., Du, G., & Chen, J. (2024). Osmotic tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: Implications for food and bioethanol industries. *Food Bioscience*, 60, 104451. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2024.104451>
- Colin, C., Akpo, E., Perrin, A., Cornu, D., & Cambedouzou, J. (2024). Encapsulation in Alginates Hydrogels and Controlled Release: An Overview. *Molecules*, 29(11), 2515. <https://doi.org/10.3390/molecules29112515>
- Comitini, F., Agarbati, A., Canonico, L., & Ciani, M. (2021). Yeast Interactions and Molecular Mechanisms in Wine Fermentation: A Comprehensive Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(14), 7754. <https://doi.org/10.3390/ijms22147754>
- Damayanti, A., Kumoro, A., & Bahlawan, Z. (2021). Review Calcium Alginate Beads as Immobilizing Matrix of Functional Cells: Extrusion Dripping Method, Characteristics, and Application—IOPscience. 1053. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/1053/1/012017>
- Djordjević, V., Willaert, R., Gibson, B., & Nedović, V. (2016). Immobilized Yeast Cells and Secondary Metabolites. En J. Mérillon & K. Ramawat (Eds.), *Fungal Metabolites* (pp. 1-40). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-19456-1_33-1
- Duarte, J., Rodrigues, A., Moran, P., Valença, G., & Nunhez, J. (2013). Effect of immobilized cells in calcium alginate beads in alcoholic fermentation. *AMB Express*, 3(1), 31. <https://doi.org/10.1186/2191-0855-3-31>

- Falcón, P., & Asnate, E. (2021). Influencia de la concentración de nutrientes y azúcares en la maceración fermentativa de una bebida elaborada con Capulí (*Prunus serotina*). *Polo del Conocimiento*, 6(5), Article 5. <https://doi.org/10.23857/pc.v6i5.2720>
- Fernández, E., Rodríguez, J., Vila, J., & Falqué, E. (2022). Application of Immobilized Yeasts for Improved Production of Sparkling Wines. *Fermentation*, 8(10), 559. <https://doi.org/10.3390/fermentation8100559>
- Forino, M., Picariello, L., Rinaldi, A., Moio, L., & Gambuti, A. (2020). How must pH affects the level of red wine phenols. *LWT*, 129, 109546. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109546>
- Frohman, C. A., & Mira de Orduña, R. (2013). Cellular viability and kinetics of osmotic stress associated metabolites of *Saccharomyces cerevisiae* during traditional batch and fed-batch alcoholic fermentations at constant sugar concentrations. *Food Research International*, 53(1), 551-555. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.05.020>
- García, C. (2021). *INMOVILIZACIÓN DE LEVADURAS POR ATRAPAMIENTO PARA LA FERMENTACIÓN DE MOSTOS* [Universidad de la Republica de Uruguay]. <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/30638/1/uy24-20218.pdf>
- Gódia, F., Casas, C., & Solàg, C. (1991). Application of Immobilized Yeast Cells to Sparkling Wine Fermentation. *Biotechnology Progress*, 7(5), 468-470. <https://doi.org/10.1021/bp00011a013>
- Hernández, J. D., Trujillo, Y. Y., & Osorio, D. (2011). PHENOLIC POTENTIAL DETERMINATION AND YEASTS IDENTIFICATION WITH SIGNIFICANT LEAVENS IN ISABELLA GRAPE (*Vitis labrusca*) FROM VILLA DEL ROSARIO (Norte de Santander) FOR WINE MAKING. *Vitae*, 18(1), 17-25. <https://doi.org/10.17533/udea.vitae.8773>

Hidalgo, J. (2010). *Tratado de Enología Vol. II* (2.^a ed., Vol. 2). Mundi-Prensa.

Jackson, R. (2014). *Wine Science: Principles and Applications* (4.^a ed.). Elsevier Science & Technology. <http://ebookcentral.proquest.com/lib/bibliouis-ebooks/detail.action?docID=1710531>

Lago, L. O., Silveira, R. D., da Rosa, V. T., Mallmann, L. P., da Silva, M. M., Biasoto, A. C. T., & Welke, J. E. (2026). Targeted metabolomics reveals the optimal harvest time of Cabernet Sauvignon grapes in an emerging high-altitude tropical region. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 106(9), 5614-5628. <https://doi.org/10.1002/jsfa.70631>

Lin, Y., Zhang, W., Li, C., Sakakibara, K., Tanaka, S., & Kong, H. (2012). Factors affecting ethanol fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* BY4742. *Biomass and Bioenergy*, 47, 395-401. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.09.019>

Liu, P., Zheng, X., Duan, C., Chen, B., & Yan, G. (2020). A Review of the Effect of Unsaturated Fatty Acids on the Cell Growth and Aroma Production of *Saccharomyces cerevisiae* during Fermentation. *Shipin Kexue/Food Science*, 41(15), 314-322. <https://doi.org/10.7506/spkx1002-6630-20190729-397>

Liudvinaviciute, D., Rutkaite, R., Bendoraitiene, J., Klimaviciute, R., & Dagys, L. (2020). Formation and characteristics of alginate and anthocyanin complexes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 726-734. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.157>

Lleixà, J., Manzano, M., Mas, A., & Portillo, M. del C. (2016). *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* Competition during Microvinification under Different Sugar and Nitrogen Conditions. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01959>

- López, N., Peinado, R., Puig, A., Mauricio, J., Moreno, J., & García, T. (2018). Influence of two yeast strains in free, bioimmobilized or immobilized with alginate forms on the aromatic profile of long aged sparkling wines. *Food Chemistry*, 250, 22-29. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.036>
- Malfeito, M., & Silva, A. (2019). Spoilage Yeasts in Wine Production. En P. Romano, M. Ciani, & G. Fleet (Eds.), *Yeasts in the Production of Wine* (pp. 375-394). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9782-4_12
- Martínez, M. del C., Carrascosa, S., Alfonso, V., & Blanco, S. (2016). *La vid, el vino y el CSIC: dos siglos de investigación = Vines, wines and the CSIC: two centuries of research* (J. L. Santiago, Ed.). CSIC. Digitalia. <https://www.digitaliapublishing.com/a/49511>
- Mas, A., & Portillo, C. (2022). Strategies for microbiological control of the alcoholic fermentation in wines by exploiting the microbial *terroir* complexity: A mini-review. *International Journal of Food Microbiology*, 367, 109592. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109592>
- Mehrotra, T., Dev, S., Banerjee, A., Chatterjee, A., Singh, R., & Aggarwal, S. (2021). Use of immobilized bacteria for environmental bioremediation: A review. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(5), 105920. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.105920>
- Moreno, J., García, T., Mauricio, J. C., & Moreno, J. (2018). Yeast Immobilization Systems for Alcoholic Wine Fermentations: Actual Trends and Future Perspectives. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00241>

- Mouret, J., Aguera, E., Perez, M., Farines, V., & Sablayrolles, J. (2021). Study of Oenological Fermentation: Which Strategy and Which Tools? *Fermentation*, 7(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/fermentation7030155>
- Nedovic, V., Kalusevic, A., Manojlovic, V., Levic, S., & Bugarski, B. (2011). An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science*, 11th International Congress on Engineering and Food (ICEF11), 1, 1806-1815. <https://doi.org/10.1016/j.profoo.2011.09.265>
- Nelson, J., & Boulton, R. (2024). Models for Wine Fermentation and Their Suitability for Commercial Applications. *Fermentation*, 10(6), 269. <https://doi.org/10.3390/fermentation10060269>
- Orosco, E., Loviso, C., Condés, M., Sepúlveda, C., Ávila, G., Velarde, I., & Voget, C. (2009). *Vinificación de Vitis labrusca (syn. V. labruscana Bailey, Fox grape) variedad Isabella: El vino de la costa de Berisso*. XII Congreso Argentino CYTAL-AATA (Entre Ríos, 7 al 9 de octubre de 2009). <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/163067>
- Otarola, L., de la Fuente, H., & Ceroni, J. (2025). Use of Comprehensive Indicators in Final Wine Filtration in Chile: Development of a Predictive Model Based on Physicochemical Parameters. En D. Šormaz, B. Bidanda, O. Alhawari, & Z. Geng (Eds.), *Intelligent Production and Industry 5.0 with Human Touch, Resilience, and Circular Economy* (pp. 529-543). Springer Nature Switzerland. https://doi.org/10.1007/978-3-031-77723-3_48
- Partovinia, A., Khanpour-Alikelayeh, E., Talebi, A., & Kermanian, H. (2023). Improving mass transfer rates in microbial cell immobilization system for environmental applications: Synergistic interaction of cells on crude oil biodegradation. *Journal of Environmental Management*, 326, 116729. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.116729>

- Peng, B., Zhou, J., Xu, J., Fan, M., Ma, Y., Zhou, M., Li, T., & Zhao, S. (2019). A smartphone-based colorimetry after dispersive liquid–liquid microextraction for rapid quantification of calcium in water and food samples. *Microchemical Journal*, 149, 104072. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104072>
- Prokes, K., Baron, M., Mlcek, J., Jurikova, T., Adamkova, A., Ercisli, S., & Sochor, J. (2022). The Influence of Traditional and Immobilized Yeast on the Amino-Acid Content of Sparkling Wine. *Fermentation*, 8(1), 36. <https://doi.org/10.3390/fermentation8010036>
- Rojo, M., Talia, P., Lerena, M., Ponsone, M., Gonzalez, M., Becerra, L., Mercado, L., Martín, V., Rodríguez, F., Arroyo, F., & Combina, M. (2023). Evaluation of different nitrogen sources on growth and fermentation performance for enhancing ethanol production by wine yeasts. *Heliyon*, 9(12), e22608. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e22608>
- Sami, M., Ikeda, M., & Yabuuchi, S. (1994). Evaluation of the alkaline methylene blue staining method for yeast activity determination. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 78(3), 212-216. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(94\)90292-5](https://doi.org/10.1016/0922-338X(94)90292-5)
- Sánchez, J., Parada, F., & Castro, H. (2025). Valorization of Isabella Grape (*Vitis labrusca* L.) Pomace Through the Recovery of Nutraceuticals by Sequential Green Extraction Technologies. *Foods*, 15(1), 54. <https://doi.org/10.3390/foods15010054>
- Shah, S. S., Naeem, I., Naeem, A., Bhutta, N., & Noor, F. (2024). Immobilization techniques for beverage production using yeast cell systems: Challenges, types, and future perspectives – a mini review. *Food and Health*, 6(4), 19. <https://doi.org/10.53388/FH2024019>
- Sousa, M., Paula, V., Dias, L., & Estevinho, L. (2021). Mead Production Using Immobilized Cells of *Saccharomyces cerevisiae*: Reuse of Sodium Alginate Beads. *Processes*, 9(4), 724. <https://doi.org/10.3390/pr9040724>

Unidad de Planificación Rural Agropecuaria - UPRA. (s. f.). *Agrícola | Observatorio de Información Rural y Agropecuaria—AgroNET*. Recuperado 19 de mayo de 2026, de <https://agronet.gov.co/estadisticas/agricola>

Van Aalst, A., De Valk, S., Van Gulik, W., Jansen, M., Pronk, J. T., & Mans, R. (2022). Pathway engineering strategies for improved product yield in yeast-based industrial ethanol production. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 7(1), 554-566. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2021.12.010>

Vlahović, B., & Antić, K. (2025). Wine consumption in the world's largest wine consuming countries. *Acta Agriculturae Serbica*, 30(59), 43-52. <https://doi.org/10.5937/AASer2559043V>

Voulgaris, I., & Nerantzis, E. (2005). *PRODUCTION OF SPARKLING WINE WITH IMMOBILIZED YEAST FERMENTATION*. <https://www.semanticscholar.org/paper/PRODUCTION-OF-SPARKLING-WINE-WITH-IMMOBILIZED-YEAST-Voulgaris-Nerantzis/61b0dc0307d409ce7ba1a783ec2a96dea56049e1>

Walker, G. M., & Stewart, G. G. (2016). *Saccharomyces cerevisiae* in the Production of Fermented Beverages. *Beverages*, 2(4), 30. <https://doi.org/10.3390/beverages2040030>

Zhang, Y., Chang, C., Xue, F., Zuo, T., & Jiao, Z. (2024). Effect of the initial glucose concentration on the performance of ice wine fermentation of Vidal grape juice | Scientific Reports. *Scientific Reports*, (14). <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/s41598-024-82721-z>

Apéndices

Apéndice A. Parámetros colorímetros CIELAB

A continuación, se adjuntas las ecuaciones empleadas para hallar los parámetros colorímetros empleados bajo la metodología CIELAB.

Croma o intensidad del color (C^*)

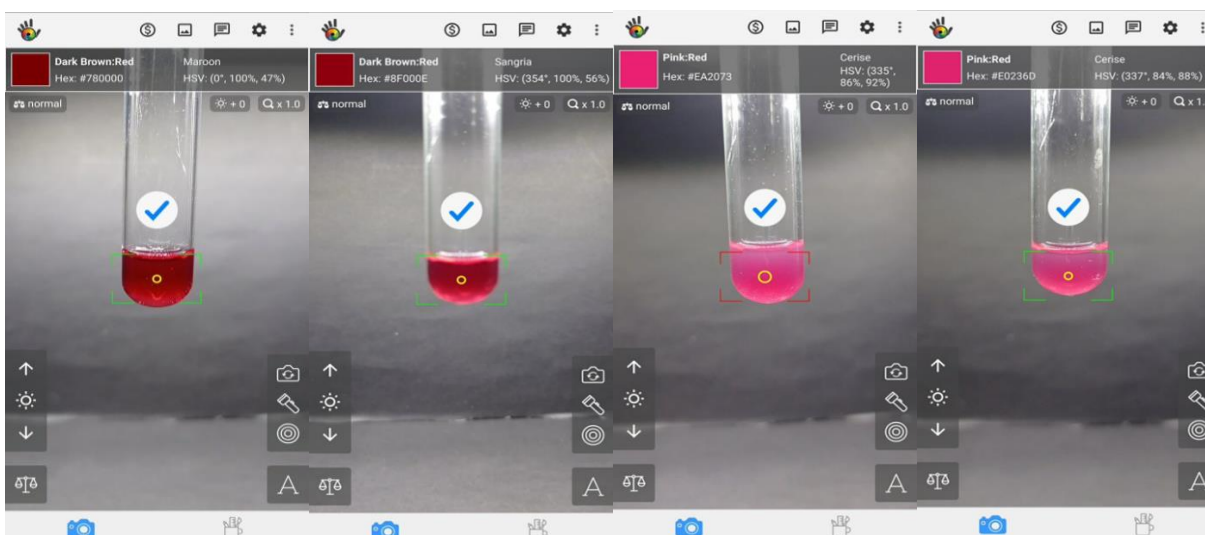
$$C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad \text{Ec. A1}$$

Ángulo de tono (h°)

$$h^\circ = \tan^{-1}\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \quad \text{Ec. A2}$$

Figura A1

Imágenes colorimétricas obtenidas mediante la aplicación Color Graph



Nota. De izquierda a derecha: 18 °Brix-libre; 25 °Brix-libre; 18 °Brix-inmovilizada; 25 °Brix-inmovilizada

Apéndice B. Cromatogramas y cálculos para la cuantificación de etanol mediante CG-EM

La separación cromatográfica se realizó en una columna capilar HP-5ms Ultra Inert (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m), empleando helio como gas de arrastre a un flujo de 1 ml/min e inyección en modo *split* con un volumen de 0,2 μ L. Las condiciones seleccionadas para el análisis se enumeran en la Tabla B1.

Tabla B1

Condiciones seleccionadas para el análisis de cromatografía de gases (CG-EM)

Parámetro	Sistema (nombre del equipo)
Temperatura del inyector	120 °C
Temperatura de la línea de transferencia	280 °C
Temperatura inicial del horno	35 °C
Rampa 1	3 °C/min hasta 60 °C
Rampa 2	20 °C /min hasta 150 °C
Tiempo total de corrida	21,83 min
Modo de adquisición	Scan
Rango de masas	29-80 m/z
Temperatura de fuente	230 °C
Temperatura de cuadrupolo	150 °C

La concentración de etanol presente en las muestras se determinó mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) empleando el método de estándar externo. Para ello, se analizaron soluciones estándar de etanol de concentración conocida bajo las mismas condiciones cromatográficas utilizadas para las muestras.

A partir de los cromatogramas obtenidos, se identificó el pico correspondiente al etanol y se determinó su área. Posteriormente, se calculó un factor de respuesta para cada estándar utilizando la relación entre la concentración conocida y el área cromatográfica obtenida.

$$K = \frac{C_{C_2H_6O}}{A} \quad \text{Ec. B1}$$

Donde:

K = Factor de respuesta

$C_{C_2H_6O}$ = Concentración conocida del estándar (v/v)

A = Área del pico cromatográfico del estándar

Los factores de respuesta calculados para los estándares analizados se presentan en la Tabla B2.

Tabla B2

Factores de respuesta obtenidos a partir de los estándares de etanol

Estándar	Concentración (v/v)	Área cromatográfica	Factor de respuesta (g/L área)
1	0,05	445587,65	$1,12211 \times 10^{-7}$
2	0,10	908924,58	$1,1002 \times 10^{-7}$

La concentración de etanol de cada muestra se determinó utilizando el factor de respuesta promedio y el área cromatográfica correspondiente al pico de etanol mediante la Ecuación B2.

$$C_{C_2H_6O} = K \times A \quad \text{Ec. B2}$$

Donde:

$C_{C_2H_6O}$ = Concentración de etanol en la muestra (v/v)

K = Factor de respuesta promedio

A = Área del pico cromatográfico de la muestra

A continuación se anexan los cromatogramas obtenidos de los estándares y de las muestras procesadas.

Figura B1

Cromatogramas de los estándares de etanol

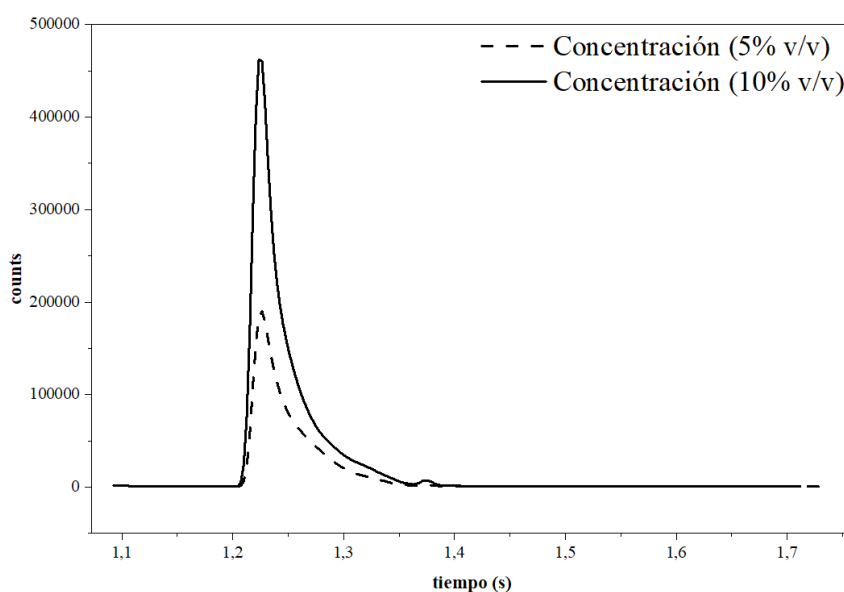
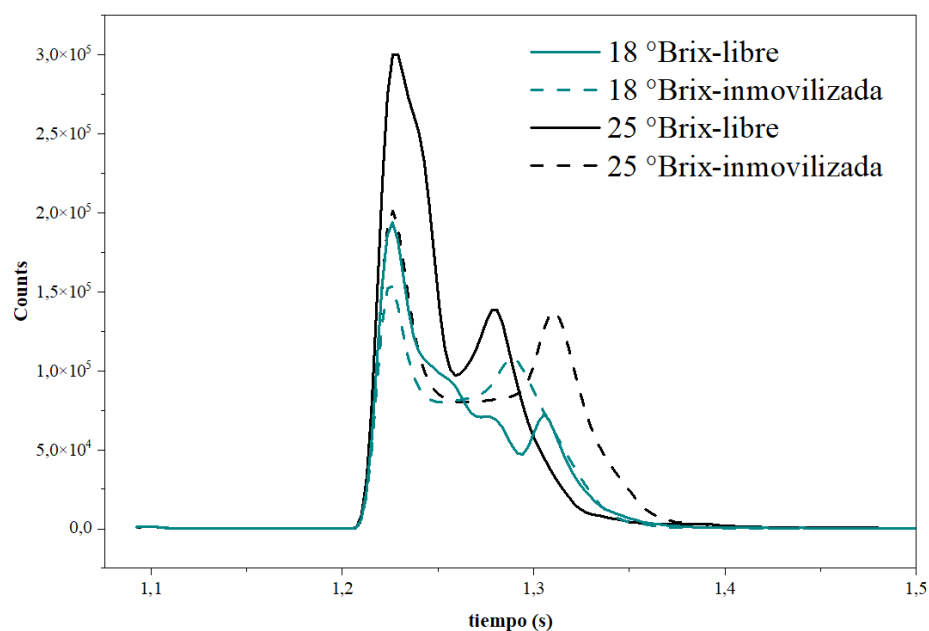


Figura B2*Cromatogramas de los tratamientos evaluados***Apéndice C. Análisis de varianza ANOVA****Tabla C1***Análisis de varianza para el consumo de sustrato (0-120 h)*

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	P Value
°Brix	1	0,02228	0,02228	120,87002	<0,0001
Sistema de fermentación	1	0,01378	0,01378	74,73279	<0,0001
Interaction	1	0,00931	0,00931	50,48003	1,01498E-4
Model	3	0,04537	0,01512	82,02761	<0,0001
Error	8	0,00147	1,84368E-4		
Corrected Total	11	0,04684			

Tabla C2*Prueba Tukey para el consumo de sustrato (0-120 h)*

°Brix	Sistema de fermentación	Mean	Groups
18	Inmovilizada	0,60533	A
18	Libre	0,48186	B
25	Inmovilizada	0,46344	B
25	Libre	0,45137	B

FERMENTACIÓN DE *V. LABRUSCA* CON *S. CEREVISIAE* INMOVILIZADA

Tabla C3

Análisis de varianza para la tasa específica de crecimiento celular (0-24 h)

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	P Value
°Brix	1	1,91233E-5	1,91233E-5	0,28849	0,6058
Sistema de fermentación	1	1,36957E-4	1,36957E-4	2,0661	0,18854
Interaction	1	1,69001E-5	1,69001E-5	0,25495	0,62722
Model	3	1,7298E-4	5,76601E-5	0,86985	0,4956
Error	8	5,303E-4	6,62876E-5		
Corrected Total	11	7,03281E-4			

Tabla C4

Análisis de varianza para el rendimiento

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	P Value
°Brix	1	7,90876E-4	7,90876E-4	0,21015	0,65885
Sistema de fermentación	1	0,04262	0,04262	11,32547	0,00985
Interaction	1	0,00405	0,00405	1,07625	0,32988
Model	3	0,04746	0,01582	4,20396	0,04633
Error	8	0,03011	0,00376		
Corrected Total	11	0,07757			

Tabla C5

Análisis de varianza para la productividad

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	P Value
°Brix	1	7,03657E-5	7,03657E-5	0,05426	0,82166
Sistema de fermentación	1	2,9965E-4	2,9965E-4	0,23106	0,64361
Interaction	1	0,00275	0,00275	2,11788	0,18368
Model	3	0,00312	0,00104	0,80107	0,52735
Error	8	0,01037	0,0013		
Corrected Total	11	0,01349			