

Validación de un método de cuantificación de etanol utilizando el reactivo permanganato de potasio

Validation of an ethanol quantification method using the potassium permanganate reagent

José Escurra^{1,*}, Diego Noseda² & Francisco Ferreira¹

¹Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, San Lorenzo, Paraguay.

²Universidad Nacional de San Martín, Buenos Aires, Argentina.

*Autor correspondiente: jose.escurra@hotmail.com.

Resumen: La determinación de la concentración de etanol es un paso esencial en los procesos de fermentación, debido a que, dependiendo del progreso del mismo, dependen pasos específicos en la optimización del proceso. Se han desarrollado muchas técnicas para este fin, pero son demandantes en costo y tiempo. El método de permanganato de potasio es una opción rápida, eficiente y de bajo costo que permitirá seguir el progreso de la producción de etanol. En este trabajo se realizó la validación de este método de cuantificación de etanol aplicando los ensayos de Linealidad, Precisión y Veracidad. Para los primeros dos ensayos se prepararon estándares de glucosa y etanol, los cuales se sometieron a la reacción con DNS y Permanganato de potasio respectivamente. Para el ensayo de Veracidad se adicionó una concentración conocida de etanol al medio YPD y se sometió a un pretratamiento seguido de los ensayos con DNS y Permanganato de Potasio. Los resultados obtenidos indican que este método arroja resultados certeros y confiables, convirtiéndolo en una alternativa viable para la determinación de la concentración de etanol durante un proceso fermentativo.

Palabras clave: alcoholimetría, colorimetría, fermentación industrial, permanganato de potasio.

Abstract: The determination of the ethanol concentration is an essential step in the fermentation processes, because depending on the progress of the fermentation process, they depend on specific steps in the optimization of the process. The potassium permanganate method is a quick, efficient and low-cost option that will allow monitoring the progress of ethanol production. In this work, the validation of this method of quantification of ethanol was carried out applying the Linearity, Precision and Veracity tests. For the first two trials glucose and ethanol standards were prepared, which were subjected to the reaction with DNS and potassium permanganate respectively. For the Veracity test, a known ethanol concentration was added to the YPD medium and pre-treated followed by DNS and Potassium Permanganate tests. The results indicate that this method yields accurate and reliable results, making it a viable alternative for the determination of ethanol concentration during a fermentation process.

Key words: alcoholometry, colorimetry, industrial fermentation, potassium permanganate.

Introducción

Existen dos parámetros importantes a tener en cuenta durante el proceso de fermentación industrial para la producción de vino, cerveza y bioetanol (Dasari *et al.*, 2011; Morales *et al.*, 2015) Estos proveen información sobre la del proceso de fermentación, los cuales son importantes para la optimización para mejorar el rendimiento y la calidad de los productos (Zhang *et al.*, 2019).

Es importante determinar el incremento de etanol a lo largo de la fermentación. Para este fin han sido desarrollados varios métodos, entre los que se encuentran: las diferentes técnicas cromatográficas,

incluyendo cromatografías de gases, cromatografía de gases-espectrometría de masas, cromatografía líquida cuya principal desventaja es la utilización de equipos de costo elevado, consumen mucho tiempo y no pueden ser utilizadas para monitorear el progreso de la fermentación (García-Martínez *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2015)

También se encuentran los métodos gravimétricos, que requieren la destilación como paso previo a la cuantificación, siendo el volumen mínimo de destilación 100 ml del cultivo fermentativo, asimismo, consume mucho tiempo impidiendo que la cuantificación de etanol sea de alto rendimiento. Junto con

Recibido: 31/06/2021 Aceptado: 16/08/2021



los métodos mencionados anteriormente, se han desarrollado métodos químicos, los cuales están basados en los cambios colorimétricos, que son causados por la reacción de reactivos específicos con el etanol. Entre estos métodos se encuentran el método de dicromato de potasio. A pesar de la ventaja que presenta este método de cuantificación, presenta algunos problemas que están haciendo que su uso sea dejado de lado (Nascimento *et al.*, 2008; Neves *et al.*, 2015; Zhang *et al.* 2013).

El primer problema consiste en que el dicromato es altamente carcinógeno debido al Cr (VI). El segundo, la presencia de los azúcares reductores y otros subproductos en el caldo de fermentación, interfieren en la determinación de la concentración de etanol con dicromato de potasio. Zhang *et al.*, 2019, desarrolló un método de cuantificación de etanol en el caldo de fermentación utilizando el reactivo permanganato de potasio, con la ventaja de que este reactivo evita el problema de interferencia debido a la presencia de los azúcares reductores y otros compuestos orgánicos (Cabañero *et al.* 2010; Li *et al.*, 2013).

En este trabajo se realizó una validación del método de cuantificación de etanol propuesta por Zhang *et al.*, 2019, con modificaciones, realizando los ensayos de linealidad, precisión y veracidad (Latimer, 2012; Duffau *et al.*, 2010; Morillas, 2016), para utilizarlo en métodos de cuantificación de etanol en laboratorio.

Materiales y métodos

Preparación de soluciones y reactivos

Reactivo de DNS: En 26,2 ml de NaOH 2M se disolvió lentamente 18,5 g de tartrato de sodio y potasio en agitación constante. Asimismo, se disolvieron 0,5 g de fenol cristalino y 0,5 g de sulfito de sodio. Se agregó agua destilada hasta completar 60 ml. Se agregaron lentamente 0,63 g de ácido 3,5 dinitrosalicílico y se dejó en agitación *overnight* a 70 rpm. Luego de conseguir la disolución total, se llevó a 100 ml de volumen en un matraz aforado. Se filtró con papel de filtro cualitativo y se refrigeró hasta su uso.

Permanganato de potasio: La preparación del

reactivo de permanganato de potasio se realizó de la siguiente manera: se pesaron 0,395 g de permanganato de potasio y 10 g de tetraborato de sodio y se disolvieron en 250 ml de ácido sulfúrico concentrado, se enfrió a temperatura ambiente y se llevó a volumen de 1000 ml.

Soluciones estándares

Para el ensayo con el reactivo de DNS se prepararon por duplicado soluciones estándar de glucosa a partir de una solución madre de dextrosa anhidra (Anedra lote 28910-1) de 1 g/L, obteniendo las siguientes concentraciones de trabajo: 0,0625 g/L, 0,125 g/L, 0,25 g/L, 0,5 g/L y 1 g/L. También se preparó una solución testigo de glucosa de 0,4 g/L, utilizando Dextrosa anhidra, PANREAC Química S. A. Como blanco se empleó una mezcla de agua destilada con el reactivo de DNS para los estándares, para las muestras en medio YPD se utilizó como blanco una matriz YP (Extracto de levadura 10 g/L, Peptona de carne 20 g/L).

Asimismo para el ensayo con permanganato de potasio se prepararon soluciones estándar de etanol y glucosa. Para realizar una curva de calibración se prepararon por duplicado soluciones estándar de glucosa a partir de una solución *stock* de 0,125 g/L de dextrosa anhidra (Anedra lote 28910-1), realizando diluciones seriadas para obtener las siguientes concentraciones de trabajo: 0,0625 g/L, 0,0312 g/L, 0,0156 g/L, 0,0078 g/L, 0,0039 g/L, 0,00195 g/L. Asimismo se preparó por duplicado un testigo de 0,04 g/L de glucosa utilizando dextrosa anhidra (PANREAC Química S. A). Además, para realizar una curva de calibración se prepararon por duplicado soluciones de etanol estándar a partir de una solución *stock* de 0,0625 ml/L de etanol absoluto (Merck, lote 1.00983.1000) realizando diluciones seriadas para obtener las siguientes concentraciones de trabajo: 0,0625 ml/L, 0,0312 ml/L, 0,0156 ml/L, 0,0078 ml/L, 0,0039 ml/L, 0,0019 ml/L. Además, se preparó por duplicado una solución testigo de 0,025 ml/L de etanol utilizando etanol absoluto (Cicarelli Laboratorios, Lote 64714). Como blanco de las soluciones estándares se utilizó agua destilada y

para las muestras en YPD se utilizó como blanco una matriz YP (Extracto de levadura 10 g/L, Pep-tona de carne 20 g/L).

Pretratamiento de las muestras

Para el ensayo de veracidad, se preparó por duplicado, medio YPD con una concentración conocida de etanol (4,76 ml etanol/L). Se tomó una alícuota de cada medio y se centrifugaron a 13800 rpm y 4°C, durante 5 min. Luego se recuperaron los sobrenadantes y se mezclaron con ácido tricloroacético (TCA) en una relación 1:1, manteniendo la mezcla a temperatura ambiente por 5 min. Luego, las mezclas se centrifugaron a 13800 rpm y 4°C, durante 5 min, se recuperaron los sobrenadantes y se mezclaron con 1/5 volumen de Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB, por sus siglas en inglés). Las mezclas se incubaron en un termobloque a 65°C durante 10 min, se centrifugaron a 13800 rpm y 4°C por 10 min y se recuperaron los sobrenadantes, denominándolos muestras pretratadas. A partir de estas muestras pretratadas se procedió a realizar las reacciones con DNS y con permanganato de potasio para la cuantificación de etanol.

Ensayo con el reactivo de DNS

La reacción de determinación de la concentración de azúcares reductores se realizó de la siguiente manera: en sendos tubos de ensayo de vidrio se adicionó 300 µl de las soluciones preparadas (estándares, testigos, blancos y muestras) y 900 µl del reactivo de DNS. Luego los tubos se incubaron a 100°C durante 10 min y se enfriaron en hielo. Se realizó la medición de la absorbancia por espectrofotometría a 550 nm. Se construyó la curva de calibración a partir de los valores obtenidos con las soluciones estándar para la posterior determinación de la concentración de azúcares reductores en las muestras.

Ensayo con el reactivo permanganato de potasio

La reacción de cuantificación de etanol se realizó de la siguiente manera: En tubos de ensayo de vidrio se adicionaron 0,6 ml de las soluciones preparadas

(estándares, testigos, blancos, muestras) y 0,6 ml del reactivo de permanganato de potasio. Se determinó la absorbancia inicial a 526 nm (absorbancia antes de la reacción) de las soluciones preparadas (estándares, testigos, blancos y muestras) por espectrofotometría. Seguidamente, las mezclas se incubaron a 40°C por 90 min en un baño termostático. Luego se enfriaron hasta alcanzar temperatura ambiente y se determinó la absorbancia final a 526 nm (absorbancia después de la reacción). Se construyó la curva de calibración a partir de los valores obtenidos con las soluciones estándar para la posterior determinación de la concentración de etanol en las muestras.

Cálculo de la concentración de etanol

A continuación, se describen los pasos para realizar el cálculo de la concentración de etanol:

- 1: Se realizó la sustracción de los valores de absorbancia de las muestras medidas a 526 nm antes y después de la reacción de oxidación con el reactivo de permanganato de potasio. Los valores finales de absorbancia a 526 nm de las muestras se denominan "A".
- 2: la concentración de azúcares reductores presentes en las muestras se calcula reemplazando el valor de absorbancia a 550 nm de las muestras en la ecuación de la recta de la curva de calibración obtenida a partir de la reacción del reactivo de DNS con las soluciones estándares de glucosa.
- 3: Una vez cuantificada la concentración de azúcares reductores en la muestra, se extrapola el valor de concentración de azúcares reductores de las muestras en la curva de calibración obtenida a partir de la reacción del permanganato de potasio con las soluciones estándares de glucosa, con el fin de obtener el valor de absorbancia de los azúcares reductores a 526 nm. A este valor se lo denominamos "B".

- 4: La absorbancia a 526 nm correspondiente al etanol presente en la muestra se calcula realizando la sustracción $A - B$.
- 5: La concentración de etanol en las muestras se calcula introduciendo el valor resultante de absorbancia a 526 nm correspondiente al etanol ($A - B$), en la ecuación de la recta de la curva de calibración obtenida a partir de la reacción del permanganato de potasio con las soluciones estándares de etanol.

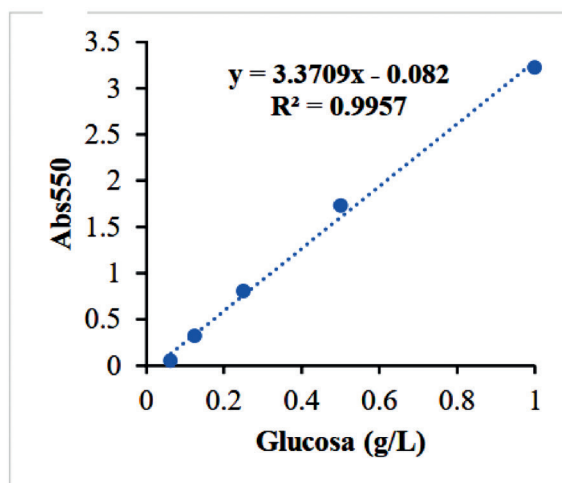
Resultados

Ensayo con el reactivo DNS

Aplicando el ensayo de Linealidad al método de cuantificación de azúcares reductores se obtuvo la curva de calibración a partir de 5 concentraciones diferentes de la solución *stock*, evaluadas por duplicado. La ecuación de la recta obtenida mediante un ajuste lineal fue $y = 3,3709x - 0,082$ con un valor de R^2 igual a 0,9957 (Figura 1 A), por lo que se infiere que el ensayo se ajusta correctamente al modelo lineal (R^2 mayor o igual a 0,995) en el rango de los valores de absorbancia de trabajo. Asimismo, se calculó para las réplicas de cada nivel analizado el valor residual construyendo el gráfico de distribución de residuos (Figura 1 B), en el cual no se observa tendencia de los residuos a través del cambio de concentración del analito.

Asimismo, por medio del ensayo de Precisión se analizaron 20 réplicas de un testigo de glucosa (0,4 g/L), obteniendo como promedio de las mediciones un valor de 0,41 g/L de glucosa con un desvío estándar de 0,01 y un RSD% de 3,07%. Con estos resultados se construyó el gráfico de control de valor medio para otorgar validez a cada ensayo realizado (Figura 2). Como se observa en dicho gráfico todos los valores obtenidos a lo largo del trabajo se ubicaron dentro de la región normal esperada, es decir entre el límite de alarma inferior (LAI) y el límite de alarma superior (LAS), lo cual indica que los resultados de los ensayos realizados fueron confiables.

A



B

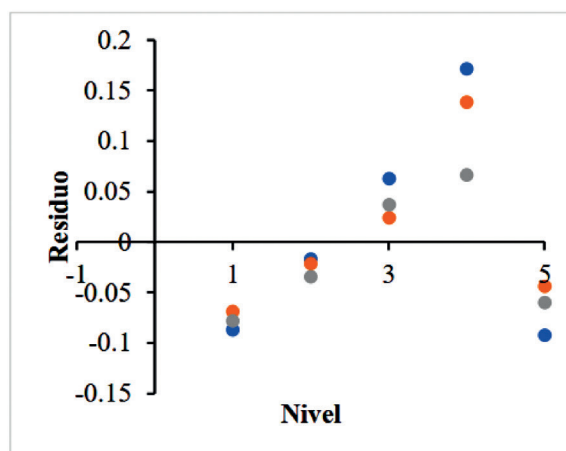


Figura 1. Ensayo de Linealidad aplicado a la reacción con el reactivo de DNS del método de cuantificación de etanol. **A)** Curva de calibración obtenida a partir del ensayo de Linealidad aplicado al método de cuantificación de azúcares reductores del método de cuantificación de etanol. A la curva se le aplicó un ajuste lineal obteniendo la ecuación de la recta $y = 3,37095x - 0,082$ con un $R^2 = 0,9961$. **B)** Gráfico de distribución de los residuos para las réplicas de cada nivel.

Reacción de oxidación total de los estándares glucosa con el reactivo permanganato de potasio

Aplicando el ensayo de Linealidad a la reacción de oxidación de las soluciones estándares de glucosa con el reactivo de permanganato de potasio, se obtuvo la curva de calibración a partir de 5 concentraciones diferentes de la solución

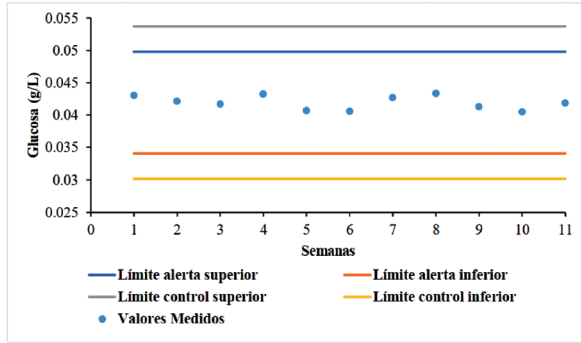
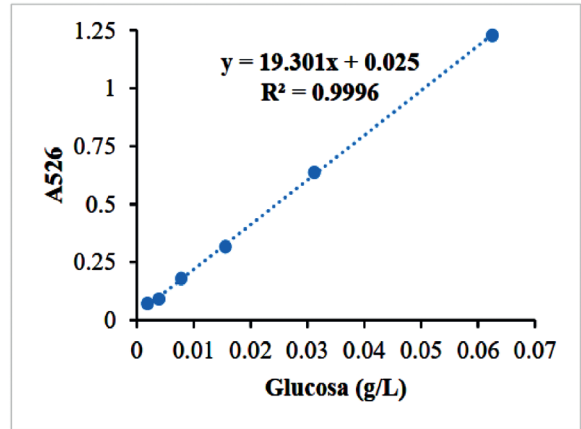


Figura 2. Gráfico de control de valor medio correspondiente al ensayo de la reacción de los estándares glucosa con el reactivo de permanganato de potasio del método de cuantificación de etanol. En el gráfico se indican los resultados a partir del análisis de la muestra control (solución testigo de glucosa de 0,04 g/L) para cada semana en que se realizó el ensayo de la reacción de los estándares glucosa con el reactivo de permanganato de potasio del método de cuantificación de etanol.

stock evaluadas por duplicado. La ecuación de la recta obtenida mediante un ajuste lineal fue $y = 19,301x + 0,025$ con un valor de R^2 igual a 0,9996 (Figura 3 A), por lo que se infiere que el ensayo se ajusta correctamente al modelo lineal (R^2 mayor o igual a 0,995) en el rango de los valores de absorbancia de trabajo. Asimismo, se calculó para las réplicas de cada nivel analizado el valor residual construyendo el gráfico de distribución de residuos (Figura 3 B), en el cual no se observa tendencia de los residuos a través del cambio de concentración del analito.

Asimismo, por medio del ensayo de Precisión se analizaron 20 réplicas de un testigo de glucosa (0,04 g/L), obteniendo como promedio de las mediciones un valor de 0,042 g/L de glucosa con un desvío estándar de 0,001 y un RSD% de 2.56%. Con estos resultados se construyó el gráfico de control de valor medio para otorgar validez a cada ensayo realizado (Figura 4). Como se observa en dicho gráfico todos los valores obtenidos a lo largo del trabajo se ubicaron dentro de la región normal esperada, es decir entre el límite de alarma inferior (LAI) y el límite de alarma superior (LAS), lo cual indica que los resultados de los ensayos realizados fueron confiables.

A



B

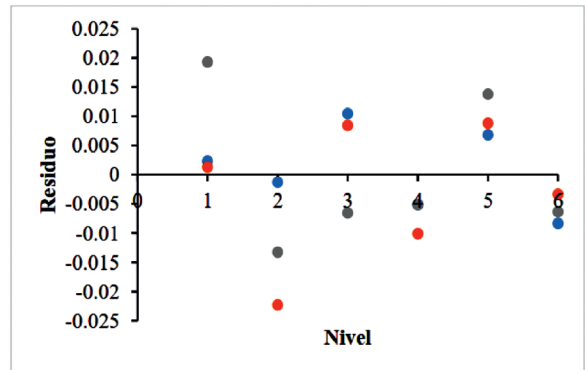


Figura 3. Ensayo de Linealidad aplicado a la reacción de oxidación de las soluciones estándar de glucosa con el reactivo de permanganato de potasio del método de cuantificación de etanol. **A)** Curva de calibración obtenida a partir del ensayo de Linealidad aplicado a la reacción de glucosa con el reactivo de permanganato de potasio del método de cuantificación de etanol. A la curva se le aplicó un ajuste lineal obteniendo la ecuación de la recta $y = 19,301x + 0,025$ con un $R^2 = 0,9996$. **B)** Gráfico de distribución de los residuos para las réplicas de cada nivel.

Reacción de oxidación total de los estándares etanol con el reactivo permanganato de potasio

Aplicando el ensayo de Linealidad a la reacción de oxidación de las soluciones estándares de etanol con el reactivo de permanganato de potasio se obtuvo la curva de calibración a partir de 5 concentraciones diferentes de la solución *stock*, evaluadas por duplicado. La ecuación de la recta obtenida mediante un ajuste lineal fue $y = 14,89x$

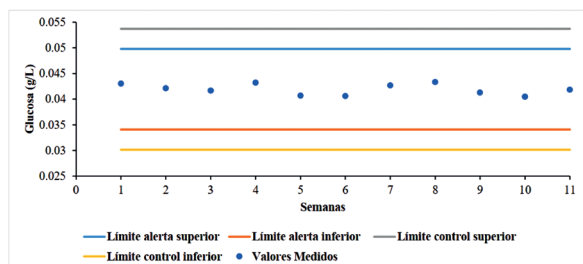


Figura 4. Gráfico de control de valor medio correspondiente al ensayo de la reacción de los estándares glucosa con el reactivo de permanganato de potasio del método de cuantificación de etanol. En el gráfico se indican los resultados a partir del análisis de la muestra control (solución testigo de glucosa de 0,04 g/L) para cada semana en que se realizó el ensayo de la reacción de los estándares glucosa con el reactivo de permanganato de potasio del método de cuantificación de etanol.

+ 0,1563 con un valor de R^2 igual a 0,9907 (Figura 5 A), por lo que se infiere que el ensayo se ajusta correctamente al modelo lineal (R^2 mayor o igual a 0,995) en el rango de los valores de absorbancia de trabajo. Asimismo, se calculó para las réplicas de cada nivel analizado el valor residual construyendo el gráfico de distribución de residuos (Figura 5 B), en el cual no se observa tendencia de los residuos a través del cambio de concentración del analito.

Asimismo, por medio del ensayo de Precisión se analizaron 20 réplicas de un testigo de etanol (0,025 ml/L), obteniendo como promedio de las mediciones un valor de 0,023 ml/L de etanol con un desvío estándar de 0,001 y un RSD% de 5,04%. Con estos resultados se construyó el gráfico de control de valor medio para otorgar validez a cada ensayo realizado (Figura 6). Como se observa en dicho gráfico todos los valores obtenidos a lo largo del trabajo se ubicaron dentro de la región normal esperada, es decir entre el límite de alarma inferior (LAI) y el límite de alarma superior (LAS), lo cual indica que los resultados de los ensayos realizados fueron confiables.

Para el ensayo de veracidad del método de cuantificación de etanol se realizó por duplicado un análisis de la técnica en medio complejo YPD con un valor teórico de etanol en las muestras de 4,76 ml etanol/L. Se logró determinar que el porcentaje de recuperación del testigo de etanol preparado en medio complejo YPD fue 99,76%. Así, se obtuvo

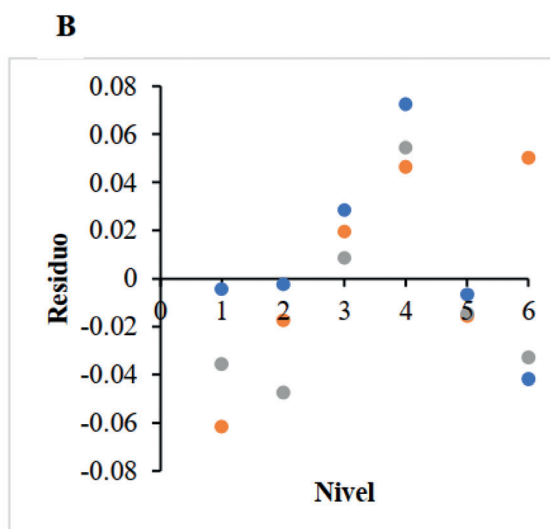
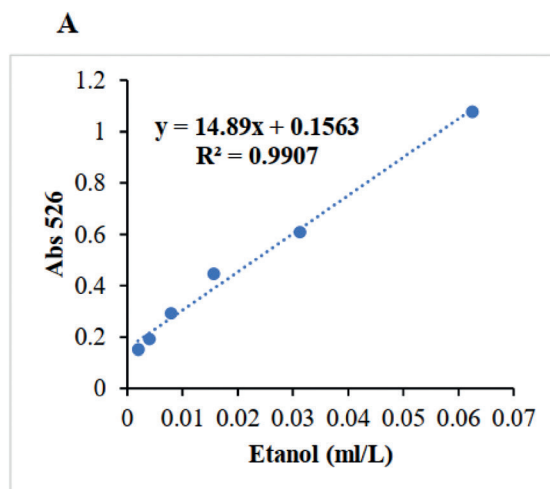


Figura 5. Ensayo de Linealidad aplicado a la reacción de oxidación de las soluciones estándar de etanol con el reactivo de permanganato de potasio. **A)** Curva de calibración obtenida a partir del ensayo de Linealidad aplicado a la reacción de etanol con el reactivo de permanganato de potasio del método de cuantificación de etanol. A la curva se le aplicó un ajuste lineal obteniendo la ecuación de la recta $y = 14,89x + 0,1563$ con un $R^2 = 0,9907$. **B)** Gráfico de distribución de los residuos para las réplicas de cada nivel.

un valor de recuperación del analito en la matriz dentro del rango esperado, lo que sugiere que el método de cuantificación de etanol no presenta sesgo significativo.

En la Tabla 1 se presenta un resumen de los resultados obtenidos en la validación del método

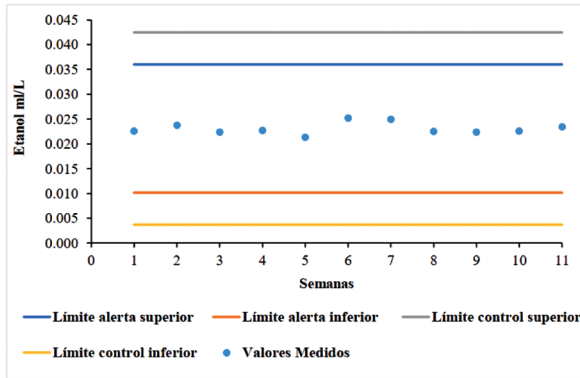


Figura 6. Gráfico de control de valor medio correspondiente al ensayo de la reacción de los estándares etanol con el reactivo de permanganato de potasio del método de cuantificación de etanol. En el gráfico se indican los resultados a partir del análisis de la muestra control (solución testigo de etanol de 0,025 ml/L) para cada semana en que se realizó el ensayo de la reacción de los estándares etanol con el reactivo de permanganato de potasio del método de cuantificación de etanol.

de cuantificación de etanol utilizando el reactivo de permanganato de potasio, como también los rangos de aceptación para cada ensayo.

Discusión

Se ha realizado el ensayo de validación del método de cuantificación de etanol propuesto por Zhang *et al.*, 2019, con modificaciones, aplicando los ensayos de Linealidad, Precisión y Veracidad. Para el ensayo de Linealidad se analizó por triplicado cinco concentraciones diferentes de cada solución estándar, y se estableció un valor de rango de aceptación un coeficiente de correlación (R^2) superior o igual a 0,995. Como se observa en la Tabla 1, tanto el ensayo de reacción con DNS, como el de la reacción de los estándares glucosa con permanganato de potasio (Figuras 1 y 3), se encuentran dentro del rango de aceptación, presentando un R^2

de 0,9957 y 0,9996 respectivamente, asimismo, en sus respectivos gráficos de distribución se observa que los ensayos presentan distribución aleatoria en sus residuos, lo que indica que no hay tendencia en los resultados obtenidos por los mismos.

En el ensayo de Linealidad de la reacción de los estándares etanol con el reactivo permanganato de potasio se observa que el valor de R^2 es de 0,9907 (Figura 1 A), inferior al rango de aceptación, esta diferencia puede deberse a que el reactivo de permanganato de potasio se oxida rápidamente con el etanol, por lo que no se obtuvo un valor similar o superior al 0,995. No obstante en los demás ensayos de validación, este método se encontró dentro de los rangos de aceptación, lo que indica que el resultado obtenido es certero y confiable. Asimismo, se observa que los residuos presentan distribución aleatoria (Figura 1 B), lo que indica que los resultados obtenidos no presentan tendencia.

En los ensayos de precisión, se observa que las tres reacciones del método de cuantificación se encuentran en el rango de aceptación, así como también, puede observarse en las respectivas gráficas de control que los valores obtenidos en este ensayo se encuentran dentro de los límites de alarma superior e inferior (Figuras 2, 4, y 6). Finalmente en el ensayo de veracidad, se obtuvo que el valor de concentración de etanol fue de 99,76%, encontrándose dentro del rango de aceptación para este ensayo. El ensayo de veracidad se realizó aplicando los tres ensayos en simultáneo, tal y como se haría en un proceso de fermentación.

Con los datos obtenidos, se infiere que el método de cuantificación de etanol con el reactivo de permanganato de potasio brinda resultados certeros y confiables para la determinación de la concentra-

Tabla 1. Resultados de los ensayos de validación del método de cuantificación de etanol.

Ensayo	Cuantificación de Etanol		
	Ensayo con DNS	Glucosa con Permanganato	Etanol con permanganato
Linealidad ($R^2 \geq 0,995$)	0,9957	0,9996	0,9907
Precisión (RSD% < 5%)	3,07%	2,56%	5,04%
Veracidad (95% < Recuperación < 105%)	99,76%		

ción de etanol durante el proceso de fermentación, siendo una de sus ventajas que al utilizar pequeños volúmenes de muestra, y no requerir procedimientos demandantes en costo y tiempo, permite evaluar la evolución del proceso de fermentación.

Conclusión

Se ha realizado la validación del método de cuantificación de etanol propuesto por Zhang *et al.*, 2019, con modificaciones, aplicando los ensayos de Linealidad, Precisión y Veracidad. Los valores obtenidos indican que los resultados obtenidos por el mismo son certeros y confiables, lo que permitiría su utilización en la determinación de la concentración de etanol durante el proceso de fermentación alcohólica, ya sea en la producción de bebidas alcohólicas, como en la producción de biocombustibles como el bioetanol y/o el biobutanol, así como también en cultivos de microorganismos fermentadores como bacterias, hongos y levaduras.

Agradecimientos

Agradecemos principalmente al CONACyT por la financiación del proyecto de tesis de José Escurra, llevado a cabo en el Departamento de Biotecnología de la FACEN-UNA.

El autor principal también agradece a su madre por guiarle al amor a la ciencia desde pequeño y de manera muy especial agradece, con amor incondicional por siempre, a Esmilce Apuril por su apoyo en todos sus proyectos y metas científicas.

Contribución de los autores

El presente trabajo es resultado parcial del proyecto de tesis de Maestría en Biotecnología Industrial, realizado por José Escurra. Diego Nosedá dio tutoría y orientación al autor principal durante la elaboración de la tesis. Francisco Ferreira dio orientación y apoyo en procedimientos químicos y experimentales.

Conflictos de interés

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

Bibliografía

- Latimer, G.W. (Ed.). (2012). *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 19th edition. Gaithersburg: AOAC International. 3612 pp.
- Cabañero, A.I., Recio, J.L. & Ruperez, M. (2010). Simultaneous stable carbon isotopic analysis of wine glycerol and ethanol by liquid chromatography coupled to isotope ratio mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 58(2): 722–728.
- Dasari, S. & Kölling, R. (2011). Cytosolic localization of acetoacetyl synthase Ilv2 and its impact on diacetyl formation during beer fermentation. *Applied and environmental microbiology*, 77(3): 727–731.
- Duffau, B., Rojas, F., Guerrero, I., Roa, L., Rodríguez, L., Soto, M. & Sandoval, S. (2010). Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: Aspectos generales sobre la validación de métodos. *Guías Técnicas del Instituto de Salud Pública de Chile*, 1: 1–66.
- García-Martínez, T., Bellincontro, A., Peinado, R.A., Mauricio, J.C., Mencarelli, F. & Moreno, J.J. (2011). Discrimination of sweet wines partially fermented by two osmo-ethanol-tolerant yeasts by gas chromatographic analysis and electronic nose. *Food chemistry*, 127(3): 1391–1396.
- Li, H., Chai, X.S., Deng, Y., Zhan, H. & Fu, S. (2009). Rapid determination of ethanol in fermentation liquor by full evaporation headspace gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1216(1): 169–172.
- Li, X., Jia, G., Cao, Y., Zhang, J., Wang, L. & Sun, H. (2013). Simultaneous determination of delta13C values of glycerol and ethanol in wine by liquid chromatography coupled with isotope ratio mass spectrometry. *Se Pu = Chinese journal of chromatography*, 31(12): 1201–1205.
- Morales, P., Rojas, V., Quirós, M. & Gonzalez, R. (2015). The impact of oxygen on the final alcohol content of wine fermented by a mi-

- xed starter culture. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(9): 3993–4003.
- Nascimento, E.S., Cardoso, D.R. & Franco, D.W. (2008). Quantitative ester analysis in cachaça and distilled spirits by gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS). *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(14): 5488–5493.
- Neves, L.A., Rodrigues, J.M., Daroda, R.J., Silva, P.R., Ferreira, A.A., Aranda, D.A., Eberlin, M.N. & Fasciotti, M. (2015). The influence of different referencing methods on the accuracy of $\delta^{13}\text{C}$ value measurement of ethanol fuel by gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 29(21): 1938–1946.
- Zhang, C.Y., Lin, N.B., Chai, X.S. & Barnes, D.G. (2015). A rapid method for simultaneously determining ethanol and methanol content in wines by full evaporation headspace gas chromatography. *Food chemistry*, 183: 169–172.
- Zhang, P., Chen, C., Shen, Y., Ding, T., Ma, D., Hua, Z. & Sun, D. (2013). Starch saccharification and fermentation of uncooked sweet potato roots for fuel ethanol production. *Bioresource technology*, 128: 835–838.
- Zhang, P., Hai, H., Sun, D., Yuan, W., Liu, W., Ding, R. & Chen, C. (2019). A high throughput method for total alcohol determination in fermentation broths. *BMC biotechnology*, 19(30): 1–8.