

PERFIL FISICOQUÍMICO DE VINO BLANCO PRODUCIDO CON CEPAS RESULTANTES DE LA FUSIÓN DE PROTOPLASTOS DE LEVADURAS (*SACCHAROMYCES CEREVISIAE* Y *HANSENIASPORA GUILLIERMONDII*)

Dra. Karelen Araujo^{1*}, Dra. Ana Cáceres², Dra. María Berradre³, MSc. Zulay Mármol¹, MSc. Johanna Raga¹, MSc. Marisela Rincón¹.

¹Laboratorio de Tecnología de Alimentos y Fermentaciones Industriales. Escuela de Ingeniería Química. Facultad de Ingeniería. Universidad del Zulia. Venezuela.

²Laboratorio de Desarrollo de Métodos de Análisis. Departamento de Química. Facultad Experimental de Ciencias. Universidad del Zulia. Venezuela.

³Laboratorio de Alimentos. Departamento de Química. Facultad Experimental de Ciencias. Universidad del Zulia. Venezuela.

*Autor para correspondencia: karelenaraujo@gmail.com

Recibido: 16-01-2019 / Aceptado: 20-05-2019 / Publicación: 30-05-2019

Editor Académico: Dr. Máximo Aurelio Galignani Bernardi

RESUMEN

El sector vitivinícola mundial se encuentra inmerso en un importante proceso de actualización y renovación. En este contexto es interesante resaltar la actividad y la innovación de muchas bodegas que experimentan con nuevas variedades de uva, la utilización de uvas y levaduras autóctonas, así como con nuevas tecnologías para producir vinos más adaptados al gusto del consumidor. Todos estos cambios conllevan al desarrollo de nuevos productos con propiedades únicas que requieren de un estricto control de calidad. El objetivo del presente trabajo es determinar el perfil fisicoquímico de un vino blanco producido mediante fermentación alcohólica de cepas resultantes de la fusión intergénica de protoplastos de la levadura autóctona *Saccharomyces cerevisiae* SCVMLUZ 2008 y la levadura comercial *Hanseniaspora guilliermondii* CECT 11102 (Colección Española de Cultivos Tipo). Se realizaron vinificaciones en blanco con mosto de uva de la variedad Malvasía. Se realizaron los siguientes análisis físico-químicos como sólidos solubles, azúcares, pH, densidad relativa, acidez titulable y volátil, dióxido de azufre total, dióxido de azufre libre y etanol. La cinética de consumo de los azúcares fue más rápida en los bioprocesos realizados con *S. cerevisiae* y la levadura híbrida (SCHLUZ2014). Todas las levaduras de estudio consumieron glucosa a mayor velocidad que fructosa. Los resultados obtenidos indican que el vino obtenido con la cepa híbrida cumple con los estándares establecidos por las Organizaciones Nacionales e Internacionales.

Palabras clave: vino blanco, levadura híbrida, consumo de azúcares, características fisicoquímicas.

PHYSICOCHEMICAL PROFILE OF WHITE WINE PRODUCED WITH STRAINS RESULTING FROM THE FUSION OF YEAST PROTOPLASTS (*SACCHAROMYCES CEREVISIAE* AND *HANSENIASPORA GUILLIERMONDII*)



ABSTRACT

The world wine sector is immersed in an important process of updating and renewal. In this context, it is interesting to highlight the activity and innovation of many wineries experimenting with new grape varieties, the use of native grapes and yeasts, as well as new technologies to produce wines more adapted to the taste of the consumer. All these changes lead to the development of new products with unique properties that require a strict quality control. The objective of this work is to determine the physicochemical profile of white wine produced by alcoholic fermentation of strains resulting from the intergenic fusion of protoplasts of the indigenous yeast *Saccharomyces cerevisiae* SCVMLUZ 2008 and the commercial yeast *Hanseniaspora guilliermondii* CECT 11102 (Colección Española de Cultivos Tipo) White vinifications were made with grape must of the Malvasia variety. The following physical-chemical analyzes were carried out: soluble solids, sugars, pH, relative density, titratable and volatile acidity, total and free sulfur dioxide and ethanol. The kinetics of sugar consumption was faster in the bioprocesses performed with *S. cerevisiae* and the hybrid yeast (SCHLUZ2014). All the study yeasts consumed glucose at a faster rate than fructose. The results obtained indicate that the wine obtained with the hybrid strain complies with the standards established by the National and International Organizations.

Key words: Key words: white wine, hybrid yeast, consumption of sugars, physicochemical characteristics.

PERFIL FÍSICO-QUÍMICO DO VINHO BRANCO PRODUZIDO COM STRAINS RESULTANTES DA FUSÃO DE PROTOPLASTOS DE LEVEDURA (*SACCHAROMYCES CEREVISIAE* AND *HANSENIASPORA GUILLIERMONDII*)

RESUMO

O setor vitivinícola mundial está imerso em um importante processo de atualização e renovação. Neste contexto, é interessante observar a atividade e inovação de muitas adegas que experimentam com novas variedades de uva, a partir de uvas e leveduras, bem como novas tecnologias para produzir melhor adaptado aos vinhos gosto do consumidor. Todas essas mudanças levam ao desenvolvimento de novos produtos com propriedades únicas que exigem um rigoroso controle de qualidade. O objectivo deste estudo é determinar o perfil físico-química de um vinho branco produzido por fermentação alcoólica de estirpes resultantes da fusão de protoplastos intergénica da levedura *Saccharomyces cerevisiae* SCVMLUZ 2008 nativas e levedura *Hanseniaspora guilliermondii* CECT comercial 11102 (Colección Española de Cultivos Tipo) . Vinificações brancas foram feitas com mosto de uva da variedade Malvasia. o seguinte teor de sólidos solúveis de análise físico-química, açúcares, pH, a gravidade específica, a acidez titulável e de dióxido de enxofre volátil, total e livre e de etanol foram feitas. A cinética de consumo de açúcar foi mais rápido em bioprocessos realizados com *S. cerevisiae* e leveduras híbrido (SCHLUZ2014). Todas as leveduras do estudo consumiram glicose a uma taxa mais rápida do que a frutose. Os resultados obtidos indicam que o vinho obtido com a cepa híbrida está em conformidade com os padrões estabelecidos pelas Organizações Nacionais e Internacionais.

Palavras chave: vinho branco, levedura híbrida, consumo de açúcares, características físico-químicas.

Citación sugerida: Araujo, K., Cáceres, A., Berradre, M., Mármol, Z., Raga, J., Rincón, M. (2019). Perfil físicoquímico de vino blanco producido con cepas resultantes de la fusión de protoplastos de levaduras (*saccharomyces cerevisiae* y *hanseniaspora guilliermondii*). Revista Bases de la Ciencia, 4(2), 1-20. DOI: https://doi.org/10.33936/rev_bas_de_la_ciencia.v4i2.1599 Recuperado de: <https://revistas.utm.edu.ec/index.php/Basedelaciencia/article/view/1599>

Orcid IDs:

Karelén Araujo: <https://orcid.org/0000-0002-6505-8348>

Máximo Aurelio Gallinani Bernardi: <https://orcid.org/0000-0002-1662-8156>

1. INTRODUCCIÓN

La biotecnología enológica busca la obtención de vinos más atractivos y complejos desde el punto de vista organoléptico con el objetivo de obtener vinos de alta calidad, cuyas propiedades coincidan con las preferencias sensoriales de los consumidores. Las principales características de un buen vino están determinadas por el color, la densidad, el sabor y el aroma (Berbegal *et al.*, 2017).

La especie predominante para la elaboración de vino es *Saccharomyces cerevisiae*, debido a que fermenta casi en su totalidad a los azúcares del medio y produce altas concentraciones de etanol. Sin embargo, sus características son simples y comunes, mientras que las levaduras del género no-*Saccharomyces* poseen características enológicas que pueden tener influencia sobre las propiedades sensoriales de los vinos. No obstante, estas cepas no fermentan eficientemente el mosto de la uva debido a que son poco tolerantes al etanol, son sensibles al dióxido de azufre y producen concentraciones elevadas de ácido acético. Por estas razones no son empleadas como cultivos iniciadores en las fermentaciones, pero pueden ser utilizadas exitosamente como una cepa parental en los procesos de mejoramiento de una levadura (Raineiri & Pretorius, 2000; Mateo & Maicas, 2016).

Los enólogos reconocen el importante papel de *S. cerevisiae*. Existe una creciente demanda de nuevas cepas de levaduras que se adapten mejor a las diferentes regiones vitícolas, a las variedades de la uva, a las prácticas culturales y a las condiciones de vinificación (Van Rensburg, 2006). Es por ello que centenares de cepas de esta especie se han generado mediante procesos de mutación y selección, los cuales se adaptan a diferentes mostos.

En este orden de ideas, durante los últimos años se han llevado a cabo modificaciones dirigidas al estudio del genoma de cepas vínicas mediante experimentos de mutagénesis y selección, hibridación, electroporación, tratamiento con sales de litio, citoducción o fusión de protoplastos (Pretorius, 2000; Carrascosa *et al.*, 2005). La fusión de protoplastos se basa en el rompimiento de la pared celular para producir la fusión de las membranas de dos o más células, dando lugar a un híbrido somático. Esta técnica es versátil, económica y tiene un gran potencial para procesos de mejora de cepas debido a que puede ser utilizada para producir híbridos interespecíficos e intergénicos (Murlidhar & Panda, 2000).

En un trabajo previo realizado por los autores se obtuvo mediante la técnica de fusión de protoplastos una cepa híbrida intergénica con potencialidades enológicas (Araujo *et al.*, 2016).

La levadura autóctona *Saccharomyces cerevisiae* SCVMLUZ 2008 aislada del mosto en fermentación espontánea de la variedad Malvasía de la cosecha del Centro de Desarrollo Vitícola Socialista de Mara y la levadura comercial *Hanseniaspora guilliermondii* CECT 11102 actuaron como cepas parentales para generar una nueva levadura híbrida (SCHLUZ2014) capaz no solo de terminar la fermentación consumiendo la mayoría de los azúcares, sino también de formar etanol a concentraciones deseadas. Dicha cepa se empleó como cultivo iniciador para llevar a cabo el proceso de fermentación del mosto y de esta forma se obtuvo un vino con características propias y únicas de la Región Zuliana.

El objetivo principal de esta investigación fue obtener el perfil fisicoquímico de vino blanco en términos de pH, acidez, grado alcohólico, concentración de azúcares, dióxido de azufre libre y total producido mediante fermentación alcohólica por la cepa híbrida (SCHLUZ2014).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Vinificaciones de mosto de uva

El mosto de uva de la Variedad Malvasía se obtuvo del Centro de Desarrollo Agrícola "El Condado" ubicado en el Municipio Mara, estado Zulia, Venezuela.

Proceso de Fermentación

Se llevó a cabo de acuerdo al proceso corriente de vinificación en blanco a una temperatura entre 17-18°C, con adición de carbonato de etilo al inicio de la fermentación. Se realizaron cuatro bioprocesos en botellones de 5L por duplicado con los siguientes inóculos: a) *S. cerevisiae* SCMCVLUZ 2008, b) *H. guilliermondii* CECT 11102, c) levadura obtenida en la fusión de protoplastos y d) mezcla de cultivos *S. cerevisiae* y *H. guilliermondii* (10% / 90%). El proceso de elaboración de vino blanco se realizó con algunas modificaciones de acuerdo al esquema planteado por Hidalgo, (2011).

Análisis físico-químicos

Acidez titulable: Se determinó como ácido tartárico de acuerdo a las Normas COVENIN 3287, (1997), al inicio y al final de las vinificaciones.

Sólidos solubles: Se siguió el método que establece la Organización Internacional de la Viña y el Vino OIV-MA-AS2-02 2009. Se empleó un refractómetro marca Vee Gee, (Alemania), modelo BTX-1.

Densidad relativa: Se utilizó el método OIV-MA-AS2-01-A propuesto por la Organización Internacional de la Viña y el Vino. Se comparó la densidad del mosto o vino respecto a la

densidad del agua pura a una temperatura de 20°C, por lo que al dividir la masa de la muestra dentro del picnómetro respecto de la masa correspondiente de agua, se obtuvo la densidad relativa de la muestra.

Azúcares: Se empleó el método OIV-MA-AS311-03 indicado por la Organización Internacional de la Viña y el Vino. Los azúcares fructosa y glucosa se midieron con un cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC), marca Agilent Technologies (Palo Alto, USA), modelo Serie 1100 (desgasificador G1379A y bomba cuaternaria G1311A). Se empleó una columna Zorbax Carbohidratos (4.6 x 150 mm 5µm) a un caudal de 1,4 mL.min⁻¹, modo isocrático, y la fase móvil Acetonitrilo/Agua (85:15, v/v). Se trabajó a temperatura ambiente (23 °C) y a una presión de 45 bar. Se utilizó un volumen de inyección de 20 µL. Se analizaron los azúcares mediante el detector de índice de refracción.

Los patrones y las muestras de mosto y vino se almacenaron bajo congelación a -20 °C y se filtraron con una membrana de Nylon (0,2 µm). Se desgasificaron con un baño de ultrasonidos antes de su análisis por duplicado de cada réplica. Se optimizó la resolución de los azúcares variando la relación de solventes y se procedió a validar el método en términos de sensibilidad instrumental, precisión, estudio de interferencias químicas y exactitud (Quattrocchi *et al.*, 1992). Se utilizaron patrones de alta pureza (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

pH: se utilizó el método propuesto la Organización Internacional de la Viña y el Vino OIV-MA-BS-13, (2009), empleando un pHmetro (Oakton, 35634-40, Singapore).

Etanol: se midió por cromatografía de gases aplicando el método propuesto por Rodríguez & Suárez, (2007). Se utilizó un equipo marca Agilent Technologies (Palo Alto, USA) modelo 19091J-413, equipado con un detector de ionización a la llama (FID), un automuesteador 7673 y un sistema de inyección Split/Splitless. Se empleó helio como gas de arrastre y aire e hidrógeno para la ignición de la llama del detector. Las separaciones se llevaron a cabo en una columna empacada HP-5 (5% fenil metil siloxano) de 30 m de longitud, diámetro interno de 250 µm y 0,25 µm nominal.

El detector libre FID operó a una temperatura de 250°C mientras que el puerto de inyección se mantuvo a 230°C. La temperatura del horno estuvo en 40°C isotérmico durante 1 minuto y luego se incrementó a una tasa de 10°C por minuto hasta 100°C. El etanol y metanol se identificaron comparando su tiempo de retención con el de los patrones. La cuantificación se llevó a cabo de acuerdo al método del estándar externo. El metanol se determinó solo en los vinos como medida de control de calidad.

Dióxido de Azufre libre y total: Se empleó el método indicado por las Normas COVENIN 3284, (1997). Para la determinación de dióxido de azufre libre se adicionó almidón como

indicador, ácido sulfúrico y unas trazas de bicarbonato sódico para expulsar el aire. Rápidamente se valoró el ácido sulfuroso usando una solución de yodo 0,02N. Para el ensayo de dióxido de azufre total se agregó NaOH 0,1N para conseguir la hidrólisis del acetaldehído-ácido sulfuroso. Luego se siguió el procedimiento descrito para la obtención del dióxido de azufre libre.

Acidez Volátil: Se determinó de acuerdo al método recomendado por las Normas COVENIN 3284, (1997). Consistió en una destilación previa de la fracción acética presente en el vino y una posterior valoración con solución de NaOH.

2.2. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos para la caracterización de los vinos, se analizaron según un análisis de varianza de un solo factor. Este análisis permite contrastar la hipótesis nula de que las medias de K poblaciones ($K > 2$) son iguales, frente a la hipótesis alternativa de que por lo menos una de las poblaciones difiere de las demás en cuanto a su valor agregado (Montgomery & Runger, 2005). Pruebas de comparaciones de media se llevaron a cabo con los test de Índice de Tukey. Se fijó el nivel de significancia o nivel crítico en $P \leq 0,05$. Los datos se analizaron utilizando el programa estadístico SPSS 20.0 para Windows (SPSS Inc., Chigago, IL).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Validación analítica del método de determinación de azúcares

El método propuesto por la Organización Internacional del Vino OIV-MA-AS311-03, (2009), establece para la fase móvil una relación 80:20 acetonitrilo agua. Sin embargo, bajo estas condiciones no se obtuvo una buena resolución y el pico de glucosa presentaba una cola importante. Se procedió a cambiar la relación de la fase móvil hasta encontrar una óptima para la representación de picos definidos y con buena resolución. Siguiendo las recomendaciones publicadas se evaluó el desempeño de la metodología analítica utilizada para la determinación de fructosa y glucosa en mosto de uva.

Se seleccionó como método de calibración el patrón interno. Parar ello se prepararon curvas de calibración independientes para los dos analitos de interés (glucosa y fructosa) en el intervalo comprendido entre 0 y 20 mg ml⁻¹ (0, 1, 2, 4, 10 y 20 mg.mL⁻¹), incorporando en todas las disoluciones de trabajo (patrones y muestras) el estándar interno (maltosa) a una concentración fija y constante de 10 mg⁻¹. La selección de este azúcar como patrón interno se justifica ya que

su naturaleza es similar a la de los azúcares que se estudian y, además, no se encuentra presente en las muestras.

El cromatograma típico al inyectar el mismo volumen de los patrones que contienen el estándar interno se muestra en la **Figura 1**. Una vez realizadas las diferentes lecturas de las señales analíticas se procedió a graficar las curvas de calibración que contienen la relación de las áreas de los picos de cada uno de los estándares con respecto al estándar interno en función de la relación de las concentraciones, como se muestra en las **Figuras 2 y 3**. Se obtuvieron coeficientes de correlación lineal de Pearson (r) superiores a 0,995. Se observó comportamiento lineal hasta el estándar de mayor concentración utilizado en la calibración de ambos azúcares.

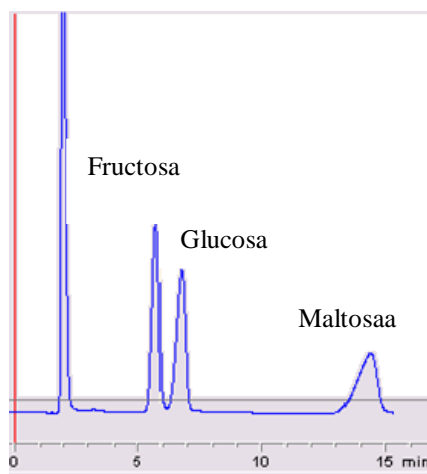


Figura 1. Cromatograma típico de una muestra de mosto de uva del día 0 de la fermentación. Flujo: 1,4 mL.min⁻¹. Fase móvil: (85/15; ACN-H₂O). P=46 bar. Columna Zorbax Carbohidratos (4.6 x 150 mm 5µm). Volumen de inyección: 20 µL.

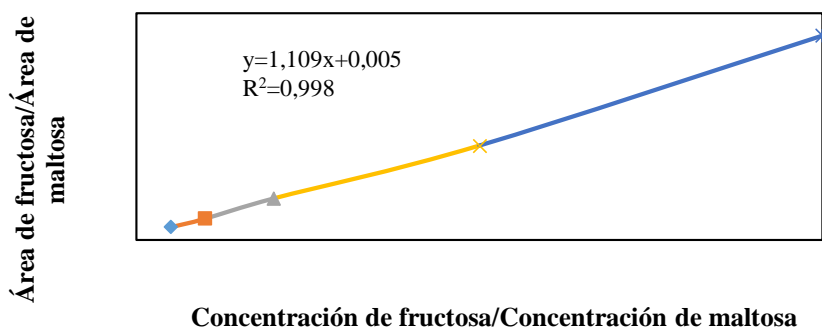
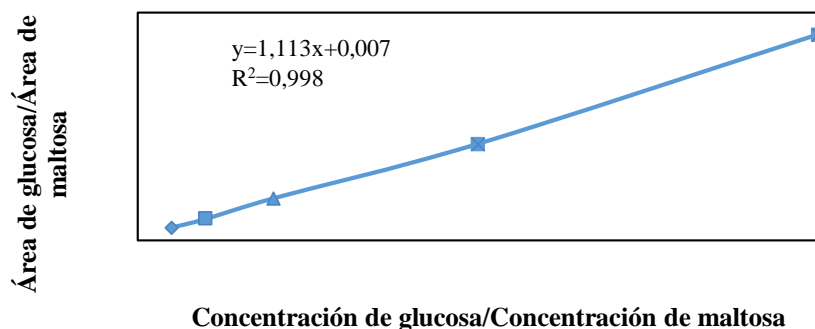


Figura 2. Curva de calibración de fructosa para fructosa.

**Figura 3.** Curva de calibración de glucosa

En la **Tabla 1** se observan los valores de límite de detección, de cuantificación y de sensibilidad analítica.

Tabla 1. Límites de detección y cuantificación para fructosa y glucosa.

Analito	LOD (mg.mL ⁻¹)	LOQ (mg.mL ⁻¹)	Sensibilidad instrumental
Fructosa	1,484	4,325	1,109
Glucosa	1,085	3,617	1,113

3.2. Precisión

El estudio de precisión se evaluó para cada azúcar, a través de la repetibilidad (las soluciones se inyectaron en el mismo equipo por el mismo analista y el mismo día) y reproducibilidad (las soluciones se inyectaron en el mismo equipo por otro analista en días distintos). En ambos casos, se utilizó para su evaluación la desviación estándar relativa (DER, en %).

Las muestras de fructosa y glucosa del primer día de la fermentación con la especie *S. cerevisiae* se inyectaron por pentaplicado (n=5). La **Tabla 2** muestra que los valores de repetibilidad para cada azúcar expresados como DER es menor al 5%. Sin embargo, para la reproducibilidad se obtuvo una DER ente 5 y 6%. Internacionalmente, se considera adecuado variaciones menores al 5%. No obstante, para concentraciones comprendidas entre 100 ppb y 1 ppm se aceptan DER entre 11 y 15% (AOAC, 2005), debido a que las concentraciones de estudio son superiores, el criterio puede emplearse para este caso y de esta forma considerar adecuados los valores obtenidos de precisión para los análisis de los azúcares realizados, estableciendo de este modo que el método es preciso.

Tabla 2. Estudio de precisión para la determinación de fructosa y glucosa en muestras de mosto de uva en el primer día de fermentación.

Analito	(mg.mL ⁻¹)*	Repetibilidad	Reproducibilidad
		DER (%)	DER (%)
Fructosa	108,35	3,53	5,27
Glucosa	125,76	2,36	6,07

DER Desviación estándar relativa; * Muestras inyectadas por pentaplicado

3.3. Estudio de interferencias químicas

Se evaluaron las posibles interferencias químicas que pueden afectar el desempeño del método de determinación de azúcares, comparando las pendientes de las curvas de calibración con aquellas obtenidas por el método de adición estándar (Gary, 2010). Para la elaboración de las curvas por el método de adición estándar se emplearon las concentraciones de: 5, 10 y 15 mg.L⁻¹ para fructosa y glucosa, utilizando como blanco una muestra de mosto fermentado con la *S. cerevisiae* en el día cuatro del proceso y leídas cinco veces. Al graficar el promedio de la relación de áreas de los picos en función de la relación de las concentraciones se obtuvieron, para ambas curvas, coeficientes de correlación lineal de Pearson $r \geq 0,995$, tal como se observa en la **Figura 4**.

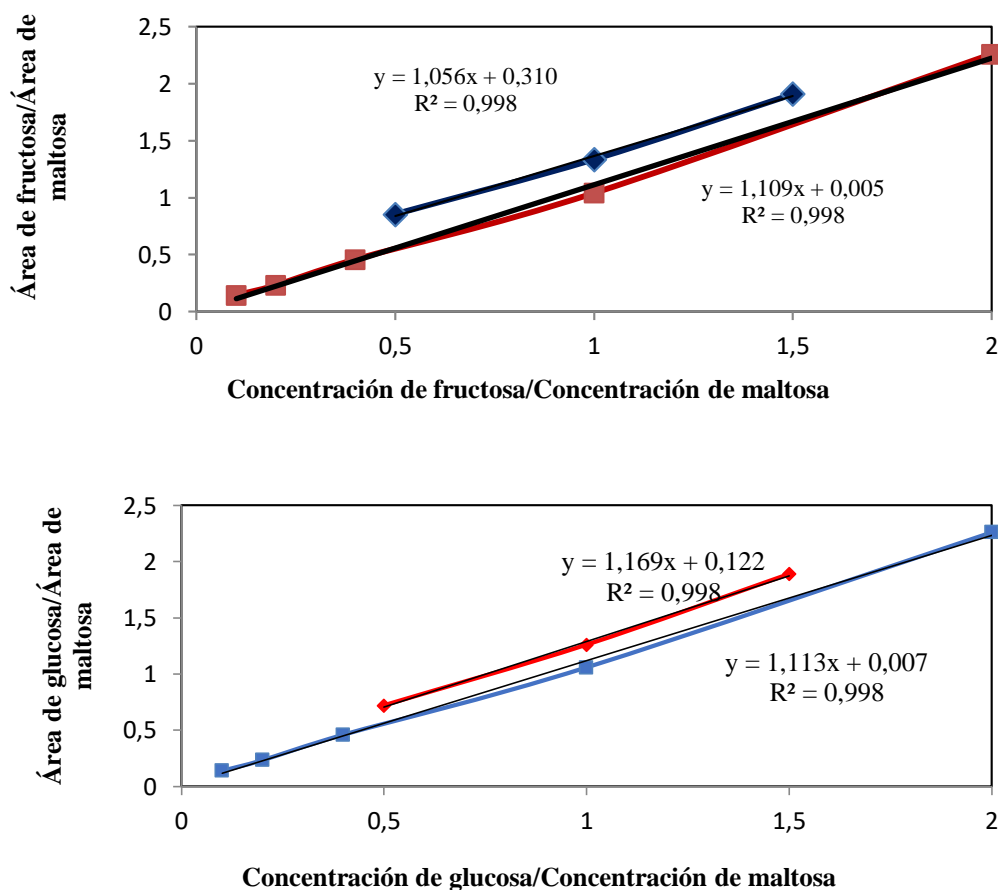


Figura 4. Evaluación de las interferencias en la determinación de azúcares.

Se observa un paralelismo entre las pendientes de las curvas de calibrado y la de adición estándar. El error que existe entre las pendientes de estas curvas es menor al 5 %, tal como se aprecia en las ecuaciones de las rectas (curva de calibración glucosa: 1,113/ adición estándar:

1,169; curva de calibración fructosa: 1,109/ adición estándar: 1,056). Estos resultados indican que no existe en ninguno de los casos estudiados un efecto interferente por parte de la matriz que pueda ser considerado como significativo. En consecuencia, se procedió a realizar la cuantificación de los azúcares presentes en las muestras de mosto y vinos mediante el método de calibración del patrón interno.

3.4. Exactitud

El estudio de recuperación se realizó a partir de los valores obtenidos al inyectar por pentaplicado réplicas del mosto de uva del día cuatro de la fermentación realizada con el cultivo puro *S. cerevisiae*. Las muestras se enriquecieron con patrones de fructosa y glucosa a tres niveles de concentración (5, 10 y 15 mg.mL⁻¹). La **Tabla 3** presenta los porcentajes de recuperación. Para las concentraciones de estudio, las recuperaciones deben oscilar entre 80 y 110% (AOAC, 2005), por lo tanto, se encuentran dentro de los valores propuestos por esta organización. Para corroborar la aceptación de los porcentajes promedio obtenidos y de que no existen diferencias estadísticamente significativas, se utilizó el 100% de recuperación como criterio de aceptabilidad en la prueba t de student. Para un nivel de significancia de $\alpha=0,01$ con (n-1) grados de libertad y n=5, el valor de t_{cri} (valor teórico de t) es 4,60. Los valores calculados de t_r se muestran en la **Tabla 1**. Al comparar los valores de t_r con el valor t_{cri} , se observa que en todos los niveles de recuperaciones t_r es menor a t_{cri} , por lo tanto no existen diferencias significativas entre los porcentajes de recuperación evaluados a un nivel de confianza del 99%. De esta manera se concluye que los valores de recuperación pueden aceptarse y el método se consideró exacto.

Tabla 3. Estudio de recuperación como evaluación de exactitud para la determinación simultánea de fructosa y glucosa en mosto de uva.

Analito	Adición (mg.mL ⁻¹)	Esperada (mg.mL ⁻¹)	Encontrada (mg.mL ⁻¹)	Recuperación (%)	t_r (n=5) ($\alpha=0,01$); (n-1))
Fructosa	5	38,762	38,303	90,82	0,52
	10	43,762	43,039	92,77	0,31
	15	48,762	46,634	87,81	1,67
Glucosa	5	15,690	15,170	96,28	0,26
	10	20,690	20,814	101,24	0,12
	15	25,690	23,734	86,96	1,18

3.5. Perfiles de Fermentación

Dado que se utilizaron diferentes levaduras en este estudio que pueden generar niveles diferentes de metabolitos, se monitoreó durante la fermentación el consumo de los azúcares

hexosas y la formación de etanol. Los perfiles de fermentación se muestran en las **Figuras 5, 6, 7 y 8**. Al comienzo de la fermentación el mosto sin fermentar contiene cantidades similares de las dos hexosas: fructosa y glucosa. Se observa que ambos azúcares son fermentados por las levaduras de estudio para la producción principalmente de etanol, sin embargo, éstas consumen glucosa más rápido que fructosa, confirmando de este modo el carácter glucofílico de las levaduras (Mocke, 2013). En todas las fermentaciones se consumieron en su totalidad los azúcares presentes. *S. cerevisiae* consumió más rápidamente los azúcares (144 horas), en comparación con el resto de las cepas (192 horas).

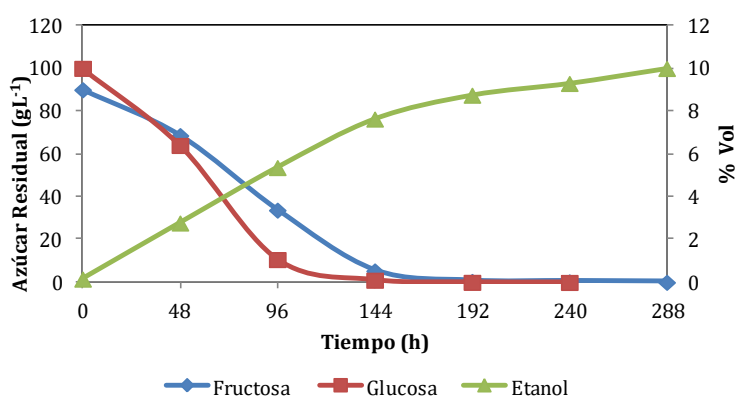


Figura 5. Consumo de azúcares y producción de etanol por *S. cerevisiae* autóctona SCMCVLUZ 2008.

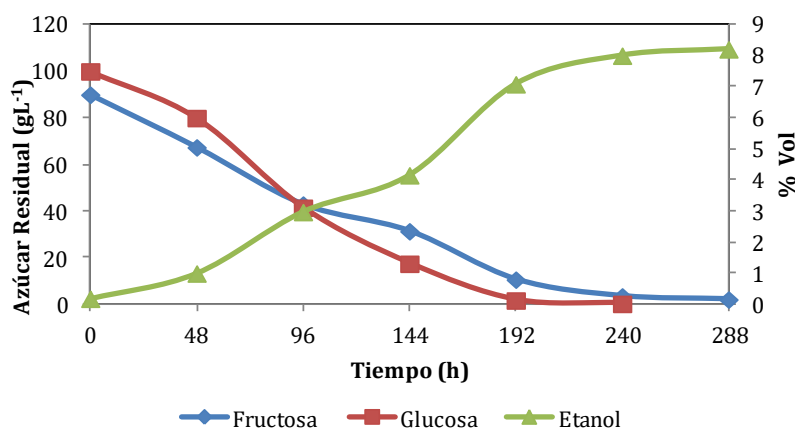


Figura 6. Consumo de azúcares y producción de etanol por *H. guilliermondii* CECT 11102.

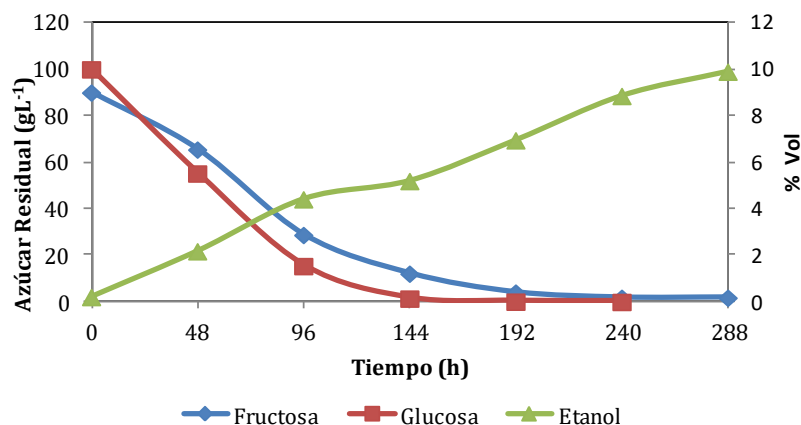


Figura 7. Consumo de azúcares y producción de etanol por la levadura obtenida de la fusión de protoplastos (SCHLUZ2014).

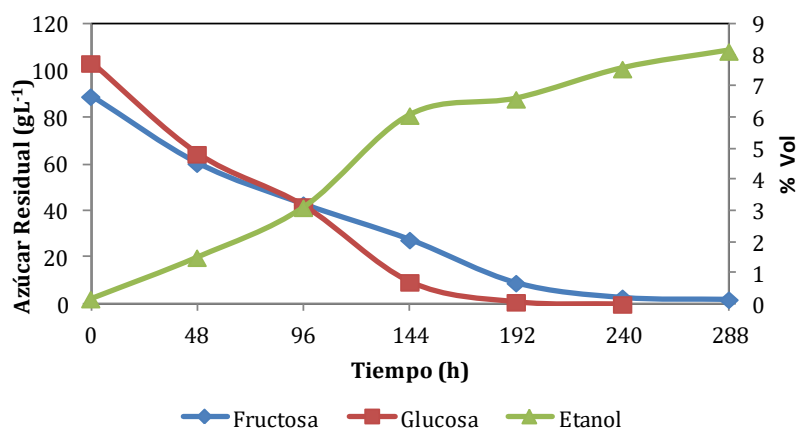


Figura 8. Consumo de azúcares y producción de etanol por el cultivo mixto de *S. cerevisiae* y *H. guilliermondii*.

Para todos los casos se toma más tiempo para asimilar la fructosa disponible. Ambas hexosas pueden ser consumidas al mismo tiempo por las levaduras, pero la preferencia de ésta por la glucosa hace que los perfiles de consumo sean diferentes. En consecuencia, el azúcar residual luego de haber culminado la fermentación contiene más fructosa que glucosa.

La fructosa es más dulce que la glucosa, por lo tanto, su presencia en el vino puede ocasionar un indeseable dulzor (Berthels *et al.*, 2004). Las levaduras alcohólicas prefieren metabolizar la glucosa en lugar de la fructosa. Este mecanismo lo describió Zinnay *et al.*, (2013). En este estudio, se realizó un modelo matemático con parámetros físico-químicos, llegando a la conclusión de que la acumulación de etanol en el medio de reacción justifica las diferencias entre las velocidades de consumo de los dos azúcares involucrados en la fermentación alcohólica.

En las **Figuras 5, 6, 7 y 8** el comportamiento de los azúcares durante las primeras horas es similar, pero a medida que aumenta la concentración de etanol comienza la preferencia marcada por la glucosa. De acuerdo a Mocke (2013), a bajas concentraciones de etanol, las velocidades de conversión de la glucosa y fructosa no difieren significativamente. No obstante, cuando se incrementa dicha concentración la velocidad de consumo de glucosa es mayor que la de fructosa. Bajo estas condiciones, la transformación enzimática de la fructosa a etanol es más sensible que la de la glucosa, afectando principalmente el transporte activo del azúcar a través de la membrana celular. Las variaciones en las velocidades de fermentación pueden ser debidas a alteraciones en el transporte de los azúcares o a diferencias en la fosforilación que ocurre dentro de las células (Mocke, 2013).

La cinética de producción del fue más rápida para la fermentación llevada a cabo con *S. cerevisiae*. Se realizó un análisis estadístico de medidas repetidas en el tiempo en un factor para la glucosa y fructosa. Estas arrojaron que para ambos azúcares el tiempo es un factor significativo, es decir; éstos van cambiando significativamente durante el transcurso de la fermentación. También resultó significativo el efecto de los tratamientos, es decir; el consumo de azúcares varía significativamente durante las vinificaciones de acuerdo a la levadura empleada. Con los resultados de las pruebas de comparaciones de medias se puede concluir que la levadura híbrida tiene un comportamiento distinto en relación al perfil de azúcares con respecto del resto de las cepas *H. guilliermondii* y el cultivo mixto pero no difiere significativamente de la cinética desarrollada por *S. cerevisiae*.

La cinética de producción de etanol analizada también se analizó con el mismo modelo. Los resultados indican que el tiempo y los tratamientos son significativos. Al estudiar los datos de las diferencias de medias, se observa que los niveles de etanol generados por la levadura *S. cerevisiae* son significativamente superiores al resto de los tratamientos aplicados.

3.6. Caracterización fisicoquímica de los vinos elaborados

La densidad es uno de los parámetros medidos con el propósito de llevar un control de la fermentación y también es uno de los factores que indica la culminación del proceso. En la **Tabla 4** se observan que todos los valores de densidad relativa de los vinos elaborados con las levaduras de estudio presentan un valor igual a 0,99. Según Hidalgo, (2011) la vinificación termina en la elaboración en blanco cuando se alcanzan densidades relativas alrededor de 0,99, quedando el vino resultante con menos de 1 g.L⁻¹ de azúcares residuales (Hidalgo, 2011). De acuerdo al criterio se evidenció que efectivamente culminó el proceso de fermentación. Los

resultados encontrados son similares a los reportados por Falguera *et al.*, 2013 y Herrera & Miño (2011) para las variedades Xarello e Isabella, respectivamente.

Tabla 4. Principales características enológicas de los vinos elaborados.

Parámetro	<i>S. cerevisiae</i>	<i>H. guilliermondii</i>	Híbrido	<i>S. cerevisiae</i> / <i>H. guilliermondii</i>
Densidad relativa	0,99±0,00 ^a	0,99±0,00 ^a	0,99±0,00 ^a	0,99±0,00 ^a
pH	3,48±0,02 ^a	3,53±0,00 ^a	3,50±0,02 ^a	3,41±0,02 ^a
Acidez Titulable (g ácido tartárico.L ⁻¹)	6,55 ^a ±0,00	6,78 ^b ±0,01	6,85 ^c ±0,02	7,30 ^d ±0,01
Etanol (%v/v)	11,31±0,90 ^a	10,91±0,59 ^b	10,45±0,69 ^c	9,88±0,49 ^d
Rendimiento EtOH (%)	100,08 ^a	96,55 ^b	92,47 ^c	87,43 ^d
Glucosa (g.L ⁻¹)*	ND	ND	ND	ND
Fructosa (g.L ⁻¹)**	ND	ND	ND	ND
Acidez volátil (g ácido acético.L ⁻¹)	0,06 ^a ±0,000	0,06 ^a ±0,000	0,06 ^a ±0,000	0,06 ^a ±0,000
Dióxido de azufre libre (g.L ⁻¹)	0,03 ^a ±1,96	0,03 ^a ±0,60	0,03 ^a ±1,36	0,02 ^a ±1,53
Dióxido de azufre total (g.L ⁻¹)	0,04 ^a ±1,26	0,04 ^a ±1,24	0,04 ^a ±0,53	0,05 ^b ±0,75

^{a,b,c,d} Índices de Tukey (P<0,05). Letras diferentes evidencian diferencias significativas; ND: No detectable. Valores promedios de tres mediciones; *LOD:1,08 g.L⁻¹; **LOQ: 3,62 g.L⁻¹; **LOD:1,30 g.L⁻¹; **LOQ: 4,33 g.L⁻¹

El pH es importante por su efecto sobre los microorganismos, en relación a la resistencia a enfermedades, color, sabor, potencial redox y sobre la producción de dióxido de azufre libre y combinado. Los valores promedios de pH obtenidos en los vinos elaborados con las distintas levaduras de estudio, se presentan en la **Tabla 4**. Estos varían entre 3,41 y 3,53 pero no hubo diferencia significativa entre los valores de pH.

Según Amerine & Ough, (1976) los vinos de mesa deben tener un pH inferior a 3,6. Los valores obtenidos se encuentran dentro de los rangos reportados por (Hidalgo, 2011 y Falguera *et al.*, 2013). Sin embargo, son ligeramente superiores a los reportados en los estudios de Fernández *et al.*, (2009) y García-Martín *et al.*, (2010). El primero caracterizó vinos blancos comerciales venezolanos, y los valores estuvieron alrededor de 3,25 y en el segundo se expusieron valores entre 3,05 y 3,14 para los vinos blancos de la variedad Verdejo. La Norma Venezolana (COVENIN, 1997) no toma en cuenta este parámetro.

Entre los principales ácidos presentes en el vino, el más fuerte es el ácido tartárico. Es el primero en convertirse en sal de potasio, por tal razón la acidez titulable se expresa como ácido tartárico. En la **Tabla 4** se aprecia los valores promedios difieren significativamente entre sí, sin embargo, se encuentran dentro de lo reportado por la Norma Venezolana (COVENIN, 1997) que establece que tengan una acidez titulable mayor a 4 g.L⁻¹.

Los valores encontrados son ligeramente inferiores a los obtenidos por García-Martín (2010) que reportaron valores de acidez titulable entre 7,42 y 8,17 g.L⁻¹ para vinos blancos de la variedad Verdejo. Por su parte, Fernández *et al.*, (2009) reportaron valores bajos de acidez

titulable para los vinos venezolanos (4 g ácido tartárico.L⁻¹), establecido por la Norma venezolana COVENIN.

La acidez titulable en los vinos es superior a la de los mostos. Esto se atribuye a que durante la vinificación aparecen ácidos procedentes del metabolismo de las levaduras, principalmente ácido succínico y en menores proporciones ácido láctico y acético (Bernardi, 2013).

De acuerdo a Moreno & Peinado (2009), el contenido de ácido tartárico disminuye durante la vinificación a medida que el contenido de etanol aumenta. Esta relación explica la razón por la que con *S. cerevisiae* se obtiene el vino de mayor grado alcohólico (11,30 %v/v) y a la vez con menor acidez titulable, 6,55 g ácido tartárico.L⁻¹, la tendencia se impone para el resto de los vinos y de esta manera el preparado con el cultivo mixto *S. cerevisiae/H. guilliermondii* presentó la mayor acidez titulable, 7,30 g ácido tartárico.L⁻¹, y por ende el menor grado alcohólico (9,88 %v/v).

La aparición de etanol durante la fermentación alcohólica produce una disminución de las sales del ácido tartárico, principalmente tartrato de potásico y tartrato de calcio, que precipitan en el fondo del recipiente debido a que con el alcohol disminuye la solubilidad de la sal. A pesar de las precipitaciones se mantiene una sobresaturación de estas dos sales, es decir; en solución hay cantidades superiores a las que se esperaría de acuerdo a su solubilidad. Esto hace que el vino sea sensible a la aparición de turbideces cuando disminuye la temperatura (Moreno & Peinado, 2009).

La concentración de alcohol obtenida en los vinos elaborados con las diferentes levaduras difiere significativamente entre sí y se encuentran dentro del rango indicado por COVENIN 3342, (1997) (7-14 %v/v) para vinos de uva. *S. cerevisiae* produjo mayor cantidad de alcohol (11,30%v/v) con respecto al resto de las levaduras estudiadas. Es importante destacar que la cepa resultante de la fusión de protoplastos fue mayor productora de etanol (10,45%v/v) que el cultivo de *S. cerevisiae/H. guilliermondii*. (9,88%v/v) y su valor es comparable con los reportados por García-Martín et al., 2010 y con los expuestos en el trabajo de Sener *et al.*, (2007) para vinos blancos de la variedad Emir, los cuales estuvieron entre 10,13 y 11,40% v/v empleando diferentes tipos de levaduras comerciales *S. cerevisiae*.

Los grados alcohólicos obtenidos estuvieron por debajo de los expresados por Fernández *et al.*, (2009) y por Ciani *et al.*, (2006), los cuales fueron 12,26 %v/v y en el otro estudio oscilaron entre 13,6 y 15,9% utilizando mosto sintético y cultivos puros de *S.cerevisiae* y mixtos de *S. cerevisiae*, *H. uvarum*, *Kluyveromyces thermotolerans* y *Torulaspora delbrueckii*. Sin embargo, los valores encontrados en esta investigación superaron al contenido de alcohol reportado para el vino elaborado con *H. uvarum* en el trabajo realizado por Ciani *et al.*, 2006.

La cantidad final de etanol es función del contenido de azúcares del mosto y de la capacidad fermentativa de las levaduras. Dado que se utilizó el mismo mosto para todos los bioprocesos, se considera que los resultados obtenidos se deben específicamente a la levadura utilizada. A nivel comercial éste parámetro es de gran importancia ya que los vinos y otras bebidas alcohólicas se comercializan y cotizan según su grado alcohólico (Carazola & Xirau, 2005).

En la práctica, una fermentación se considera correcta cuando por cada 17 gramos de azúcar, aproximadamente, se consigue un grado de alcohol (1%v/v) (Moreno y Peinado, 2009). Partiendo de esta premisa fue posible calcular el grado alcohólico teórico a partir de la concentración inicial de azúcares y de esta forma obtener el rendimiento de etanol, tal como se aprecia en la **Tabla 4**. Este parámetro, como era de esperarse, se comportó igual que el grado alcohólico.

Todos los vinos presentaron valores de rendimiento en etanol que difieren significativamente entre sí. El mayor porcentaje se obtuvo en el vino elaborado con *S. cerevisiae* (100,08%). El vino fermentado con la levadura híbrida producto de la fusión de protoplastos presentó un rendimiento igual a (93,55% v/v) y superior al cultivo mixto de *S. cerevisiae* y *H. guilliermondii* (87,43 % v/v). Estos resultados se consideran aceptables debido a que se encuentran próximos al 100%, a excepción del rendimiento obtenido para el vino realizado con el cultivo mixto.

Los valores de rendimiento son inferiores a los reportados por García-Martín *et al.*, (2010), los cuales varían entre 88,45 y 186,8%. Los altos contenidos de azúcar, así como los altos rendimiento son una de los aspectos que preocupan a la industria vitícola actualmente. De acuerdo con González *et al.*, (2007) las especies de *S. cerevisiae* se han adaptado a lo largo de su evolución para optimizar su crecimiento en ambientes ricos en azúcares y aminoácidos y de esta forma ser capaces de metabolizar la glucosa y fructosa por vía respirativa, fermentativa y de crecer en condiciones aerobias y anaerobias.

La determinación de glucosa y fructosa es fundamental en vinos ya que altos contenidos de azúcares residuales son susceptibles a la contaminación microbiana y son inaceptables para el mercado por el dulzor del vino. Excesiva cantidad de fructosa puede comprometer la calidad del producto debido a que la fructosa es dos veces más dulce que la glucosa y le añade un sabor indeseado. Esto puede ser ocasionado por paradas de fermentación o fermentaciones muy lentas.

En la **Tabla 4** también se observa que el contenido de glucosa y fructosa en los vinos de estudio no pudo ser detectado con el método cromatográfico desarrollado. Los valores de estos azúcares estuvieron por debajo de los límites de detección calculados para la glucosa y fructosa,

los cuales fueron 1,08 y 1,3 g.L⁻¹ respectivamente. Una fermentación completa se logra solo si se alcanzan niveles de azúcares por debajo de 4 g.L⁻¹, con concentraciones típicas promedios de 2 g.L⁻¹. (Mocke, 2013).

La cantidad de azúcares residuales en los vinos preparados se encontraron son similares a los presentados por Ciani *et al.*, (2006) y estuvieron por debajo de los reportados en el trabajo de García-Martín *et al.*, (2010), los cuales oscilaron entre 1,64 y 2,12 g.L⁻¹. Todos los vinos obtenidos según el contenido de azúcar se clasifican como "secos" por presentar contenidos de azúcares inferiores a los 5 g.L⁻¹ (Moreno & Peinado, 2009).

La acidez volátil corresponde esencialmente a ácidos grasos de la serie acética. Debido a que dichos ácidos son de bajo punto de ebullición, los hace fácilmente destilables (Vilela-Moura *et al.*, 2010). Este análisis es muy importante para la calidad del vino, debido a que permite apreciar el grado de conservación y si ha sufrido alguna alteración (Cazarola & Xirau, 2005). Los resultados obtenidos (0,06 g ácido acético.L⁻¹) mostrados en la **Tabla 4** fueron iguales para los vinos fermentados con las distintas levaduras y estuvieron dentro de los límites establecidos por COVENIN 3342 (1997), cuyo valor de referencia es una concentración menor a 1,0 g.L⁻¹. Los valores encontrados resultaron inferiores a los reportados por García-Martín *et al.*, (2010) y Ciani *et al.*, (2006), los cuales estuvieron entre 1,64-2,12 g.L⁻¹ y 0,13-0,35 g.L⁻¹, respectivamente.

En otro orden de ideas, tradicionalmente el dióxido de azufre se utiliza para controlar el crecimiento de microorganismos indeseados y la actividad de la polifenoloxidasas durante la vinificación. Esta enzima es la principal responsable de la oxidación del vino (Oliveira *et al.*, 2011). La industria vitícola desde hace poco tiempo se encuentra preocupada por reducir los niveles de dióxido de azufre debido a que este compuesto es considerado por sus efectos sobre la fisiología de los seres humanos como una sustancia ligeramente tóxica (Hidalgo, 2011). De allí radica la importancia de la medición de este parámetro.

Este compuesto cuando es incorporado a los vinos se encuentra como anhídrido sulfuroso gaseoso, sulfito o bisulfito. Este último reacciona con el acetaldehído para formar el acetaldehído- α -hidroxi sulfonato, además reacciona con la glucosa, con el ácido pirúvico, α -cetoglutarico y galacturónico y con compuestos fenólicos como el *p*-cumárico. Todo el dióxido de azufre que reacciona de este modo se llama dióxido de azufre combinado, mientras que el resto es el dióxido de azufre libre

El dióxido de azufre libre es la fracción activa que posee la mayor parte de las propiedades antisépticas y antioxidantes. En la **Tabla 4** se presentan los resultados obtenidos y se observa que existe diferencia significativa entre los valores reportados para el dióxido de azufre libre y

entre los resultados expresados para el dióxido de azufre total. La concentración de dióxido de azufre total en todos los casos estudiados ($0,04 \text{ g.L}^{-1}$ para los vinos elaborados con *S. cerevisiae*, *H. guilliermondii*, híbridos y $0,05 \text{ g.L}^{-1}$ para el cultivo mixto), estuvieron por debajo de los límites legales establecidos por parte de la Norma Venezolana COVENIN, 3342:1997 y del Reglamento de la Unión Europea nº 606/2009, los cuales son $0,25$ y $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ respectivamente. Los resultados son similares a los expuestos por Fernández *et al.*, (2009) para el dióxido de azufre total pero son ligeramente superiores en el caso del dióxido de azufre libre ($0,02 \text{ g.L}^{-1}$).

4. CONCLUSIONES

El perfil obtenido del vino elaborado con la levadura producto de la fusión de protoplastos, entre los que se incluyen los análisis de pH, acidez, grado alcohólico, concentración de azúcares, dióxido de azufre libre y total refleja que se encuentran dentro de los parámetros establecidos por las normas nacionales e internacionales. Durante las vinificaciones las levaduras *S. cerevisiae*, *H. guilliermondii*, la levadura híbrida y el cultivo mixto de *S. cerevisiae/H. guilliermondii*, consumieron glucosa más rápidamente que fructosa lo que indica el carácter glucofílico de las levaduras. La cinética de consumo de los azúcares fue más rápida en los bioprocesos realizados con *S. cerevisiae* y la levadura producto de la fusión de protoplastos. La cinética de producción de etanol también fue más rápida con la cepa autóctona *S. cerevisiae*.

5. REFERENCIAS

- Araujo, K., Berradre, M., Rivera, J., Cáceres, A., Páez, G., Aiello, C. & Perez, D. (2016). Fusión intergénica de protoplastos de *Saccharomyces cerevisiae* y *Hanseniaspora guilliermondii*. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 36, 51-57.
- AOAC. (2005). Official methods of analysis. Arlington VA, USA. Association of Official Analytical Chemists. Official Method. Method Number 994.04.
- Berbegal, C., Spano, G., Tristezza, M., Grieco, F. & Capozzi, V. (2017). Microbial Resources and Innovation in the Wine Production Sector. *South African Journal for Enology and Viticulture*, 38 (2), 156-166.
- Bernardi, A. (2013). Selección de levaduras vínicas provenientes de la provincia de Mendoza. Tesina de grado de Licenciatura en Bromatología. Universidad Nacional de Cuyo - Facultad de Ciencias Agrarias. Argentina.
- Berthels, N., Cordero, R., Bauer, F., Thevelein, J. & Pretorius, I. (2004). Discrepancy in glucose and fructose utilization during fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains. *FEMS Yeast Research*, 4, 683-689.
- Carazola, J & M. Xirau. (2005). *Técnicas usuales de análisis en enología*. Barcelona, España: Panreac Química.

- Carrascosa, A., Muñoz, R. & González, R. (1^{era} edición). (2005). *Microbiología del vino*. Madrid, España: AMV Ediciones.
- Ciani, M. & Comitini, F. (2006). Influence of temperature and oxygen concentration on the fermentation behaviour of *Candida stellata* in mixed fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. *World Journal Microbiology and Biotechnology*, 22, 619-623.
- Comisión venezolana de normas industriales (COVENIN). 1997. Norma 3342. Vinos y sus derivados. Requisitos.
- Comisión venezolana de normas industriales (COVENIN). 1997. Norma 3286. Vinos y sus derivados. Determinación de acidez total y acidez volátil.
- Comisión venezolana de normas industriales (COVENIN). 1997. Norma 3284. Vinos y sus derivados. Determinación de anhídrido sulfuroso libre y total.
- Falguera, V., Forns, M. & Ibarz, A. (2013). UV-vis irradiation: An alternative to reduce SO₂ in white wines?. *Food Science and Technology*, 51, 59-64.
- Fernández, V., Berradre, M., Sulbarán, B., Ojeda, G. & Peña, J. (2009). Caracterización química y contenido mineral en vinos comerciales venezolanos. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 26 (3), 1-13.
- García-Martin, N., Perez-Magarino, S., Ortega-Heras, M., Gonzalez-Huerta, C., Mihnea, M., Gonzalez-Sanjose, M.L., Palacio, L., Pradanos, P. & Hernandez, A. (2010). Sugar reduction in musts with nanofiltration mem-branes to obtain low alcohol-content wines. *Separation and Purification Technology* 76, 158–170.
- Herrera, J. & Miño, J. Microvinificación en blanco a 18°C de uva *isabella* cultivada en misiones (NE Argentina). (2011). *Revista de Ciencia y Tecnología*, 13 (15), 11-16.
- Hidalgo, T. (2011). *Tratado de Enología. Tomo I*. Madrid, España: Ediciones Mundi-Prensa.
- Mateo, J. & Maicas S. (2016). Application of Non-*Saccharomyces* Yeasts to Wine-Making Process. *Fermentation*, 21(4), 1-13.
- Miller, J. & Miller, J. (4^{ta} edición). (2000). *Estadística y Quimiometría para química analítica*. Madrid, España: Editorial Prentice Hall.
- Mocke, L. (2013). *Kinetic Modelling of wine fermentations: why does yeast prefer glucose to fructose?*. Tesis doctoral. University of Stellenbosch. South Africa.
- Montgomery, D. & Runger, P. (2005). *Probabilidad y estadística aplicadas a la Ingeniería*. Arizona, Estados Unidos: Editorial McGraw-Hill.
- Moreno, J. & Peinados, R. (2009). *Química enológica*. Madrid, España: AMV Ediciones y Ediciones Mundi Prensa.
- Murlidhar, R. & Panda T. (2000). Fungal protoplast fusion a revisit. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 22(5), 429-431.
- OIV. International Methods of Analysis of Wines and Musts. (2009). Evaluation of Sugar by Refractometry. Method OIV-MA-AS2-020.
- OIV. International Methods of Analysis of Wines and Musts. (2009). Density and Specific Gravity Method OIV-MA-AS2-01-A.
- OIV. International Methods of Analysis of Wines and Musts. (2003). Dosificación de azúcares por HPLC. OIV-MA-AS311-03.
- Oliveira, C., Ferreira, A., De Freitas, V. & Silva, A. (2011). Oxidation mechanisms occurring in wines. *Food Research International*, 44, 1115-1126.

- Pretorius, I. (2000). Tailoring wine yeast for the new millenium: novel approache to the ancient art of winemaking. *Yeast*, 16, 675-729.
- Quattrocchi, O., Abelaira, S. & Laba, R. (1992). *Introducción a la HPLC. Aplicación y práctica*. Buenos Aires, Argentina: Artes Gráficas Farro, S.A.
- Raineri, S. & Pretorius, I. (2000). Selection and improvement of wine yeasts. *Annals of Microbiology*, 50, 15-31.
- Rodríguez, R. & Suárez, B. (2007). Determination of Volatile Compounds in Cider Spirits by Gas Chromatography with Direct Injection. *Journal of Chromatographic Science*, 45, 428-434.
- Sener, A., Canbas, A., Umit Unal, M. (2007). The effect of fermentation on the growth kinetics of wine yeast species. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 31, 349-354.
- Van Rensburg, P. (2006). Las levaduras híbridas, una herramienta excepcional para las fermentaciones. *Viticultura/Enología Profesional*, 105, 9-43.
- Vilela-Moura, A., Schuller, D., Falco, V., Mendes-Faia, A. & Côrte-Real, M. (2010). Effect of fermentation conditions and micro-oxygenation on the reduction of volatile acidity by commercial *S. cerevisiae* strains and their impact on the aromatic profile of wines. *International Journal of Food Microbiology*, 141, 165-172.
- Zinnai, A., Venturi, F., Sanmartin, C., Quartacci, M. & Andrich, G. 2013. Kinetics of D-glucose and D-fructose conversion during the alcoholic fermentation promoted by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bioscience Bioengineering*, 115 (1), 43-49.