



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS

CINÉTICA DEL CRECIMIENTO DE LEVADURAS SACCHAROMYCES
CEREVISIAE EN DIFERENTES SUSTRATOS

SALINAS QUITO DANIEL FERNANDO
INGENIERO EN ALIMENTOS

MACHALA
2022



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS

CINÉTICA DEL CRECIMIENTO DE LEVADURAS
SACCHAROMYCES CEREVISIAE EN DIFERENTES SUSTRATOS

SALINAS QUITO DANIEL FERNANDO
INGENIERO EN ALIMENTOS

MACHALA
2022



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS

EXAMEN COMPLEXIVO

CINÉTICA DEL CRECIMIENTO DE LEVADURAS SACCHAROMYCES CEREVISIAE
EN DIFERENTES SUSTRATOS

SALINAS QUITO DANIEL FERNANDO
INGENIERO EN ALIMENTOS

AYALA ARMIJOS JOSE HUMBERTO

MACHALA, 17 DE FEBRERO DE 2022

MACHALA
17 de febrero de 2022

Cinética del crecimiento de levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) en diferentes sustratos.

por Daniel Fernando Salinas Quito

Fecha de entrega: 02-mar-2022 01:29p.m. (UTC-0500)

Identificador de la entrega: 1755167116

Nombre del archivo: trabajo_de_titulacion.pdf (650.31K)

Total de palabras: 7189

Total de caracteres: 41180

CLÁUSULA DE CESIÓN DE DERECHO DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO DIGITAL INSTITUCIONAL

El que suscribe, SALINAS QUITO DANIEL FERNANDO, en calidad de autor del siguiente trabajo escrito titulado Cinética del crecimiento de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* en diferentes sustratos, otorga a la Universidad Técnica de Machala, de forma gratuita y no exclusiva, los derechos de reproducción, distribución y comunicación pública de la obra, que constituye un trabajo de autoría propia, sobre la cual tiene potestad para otorgar los derechos contenidos en esta licencia.

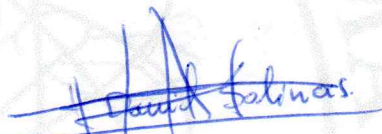
El autor declara que el contenido que se publicará es de carácter académico y se enmarca en las disposiciones definidas por la Universidad Técnica de Machala.

Se autoriza a transformar la obra, únicamente cuando sea necesario, y a realizar las adaptaciones pertinentes para permitir su preservación, distribución y publicación en el Repositorio Digital Institucional de la Universidad Técnica de Machala.

El autor como garante de la autoría de la obra y en relación a la misma, declara que la universidad se encuentra libre de todo tipo de responsabilidad sobre el contenido de la obra y que asume la responsabilidad frente a cualquier reclamo o demanda por parte de terceros de manera exclusiva.

Aceptando esta licencia, se cede a la Universidad Técnica de Machala el derecho exclusivo de archivar, reproducir, convertir, comunicar y/o distribuir la obra mundialmente en formato electrónico y digital a través de su Repositorio Digital Institucional, siempre y cuando no se lo haga para obtener beneficio económico.

Machala, 17 de febrero de 2022


SALINAS QUITO DANIEL FERNANDO
0703192971

Dedicatoria:

El presente trabajo de grado está dedicada a la memoria de mi madre Georgina Quito Vásquez (+), quien desde que estaba en vida me animo en este campo de estudio y que durante varios años me instó a no rendirme en el camino, la fuerza, fe, amor y confianza que ella me proporcionó fue lo suficiente para llegar hasta donde estoy y poder culminar mi carrera profesional que es lo que más quería ella.

Agradecimiento:

Primeramente agradezco a Dios por todas las bendiciones dadas y por haberme permitido culminar mi carrera universitaria, también deseo expresare mi profundo agradecimiento a mi padre Pervis Salinas, que con su ejemplo de trabajo, dedicación y honradez supo llevarme por el camino correcto y por ultimo a mi esposa Génesis Loor y mi hijo Alejandro por todo el apoyo que me brindaron y a todos aquellos que de una u otra manera supieron ayudarme todo este tiempo.

Título

Cinética del crecimiento de levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) en diferentes sustratos.

Resumen

El crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* ha servido como una herramienta para identificar docenas de mecanismos fisiológicos y moleculares y para el dimensionamiento de biorreactores destinados a la producción de biomasa. El crecimiento de manera experimental, se mide principalmente mediante curvas de crecimiento. En el presente trabajo se estudió el crecimiento de levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) en diferentes sustratos; sacarosa, jugo de caña, jugo de uva, la inoculación se desarrolló a temperatura ambiente de 27°C, mediante curvas de crecimiento en función de consumo de sustrato por las levaduras. Se inoculo 4 g/L de levadura y se incubo a 25°C, cada 15 minutos del proceso de fermentación se recolectaron muestras para medir, los azúcares fermentables, CO₂ y volumen de gas producido. Se concluye que el crecimiento de *S. cerevisiae*, es dos veces más rápido en el medio de cultivo a base de sacarosa (26%) que en los sustratos reales como jugo de caña (16%) y jugo de uva (18%).

Palabras clave: *Saccharomyces cerevisiae*, levaduras, fermentación alcohólica, dióxido de carbono, sacarosa

Abstract

The growth of *Saccharomyces cerevisiae* has served as a tool to identify dozens of physiological and molecular mechanisms and for the dimensioning of bioreactors destined for biomass production. Growth experimentally is measured mainly by growth curves. In the present work, the growth of yeasts (*Saccharomyces cerevisiae*) in different substrates was studied; sucrose, cane juice, grape juice, the inoculation was carried out at room temperature of 27°C, using growth curves as a function of substrate consumption by the yeasts. 4 g/L of yeast was inoculated and incubated at 25°C, every 15 minutes of the fermentation process samples were collected to measure fermentable sugars, CO₂ and volume of gas produced. It is concluded that the growth of *S. cerevisiae* is twice as fast in the sucrose-based culture medium (26%) than in real substrates such as cane juice (16%) and grape juice (18%).

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, yeasts, alcoholic fermentation, carbon dioxide, sucrose

ÍNDICE

Dedicatoria

Agradecimiento

Abstract. 7

1. Introducción. 8

1.2. Objetivos. 9

1.2.1. Objetivo General 9

1.2.2. Objetivos Específicos. 9

2. MARCO TEÓRICO.. 10

2.1. Crecimiento microbiano. 10

2.2.1. Cinética de Monod. 11

2.3. Fases del crecimiento de levaduras. 12

2.3.2. Segunda Fase. 12

2.3.3. Tercera Fase. 13

2.3.4. Cuarta Fase. 13

2.4. Fermentación alcohólica. 13

2.4.1. Levaduras. 14

2.4.2. *Saccharomyces cerevisiae*. 15

2.4.2.1. Nutrientes de las levaduras. 15

2.4.2.2. Metabolismo. 15

2.5. Azúcares fermentables. 18

2.6. Biomasa. 19

2.7. Etanol 20

3.	Metodología.	22
3.2.	Lugar de la investigación.	22
3.3.	Diseño del experimento.	22
3.4.	Fermentación alcohólica.	22
3.4.1.	Determinación de la Cinética de crecimiento.	22
3.5.	Medición de ° brix.	23
3.6.	Azúcares reductores.	23
3.7.	Cinética de la fermentación alcohólica.	23
3.8.	Medición de CO₂ producido.	24
3.9.	Cuantificación de etanol producido.	24
3.10.	Cuantificación de biomasa producida.	24
4.	Resultados.	25
4.2.	Crecimiento de biomasa.	25
4.3.	Producción de dióxido de carbono.	26
4.4.	Producción volumétrica de CO₂.	27
5.	Conclusiones.	28
6.	Bibliografía.	29

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Curva típica de crecimiento microbiano. 10

Figura 2: Ciclo de división celular de una levadura típica, *Saccharomyces cerevisiae*. 17

Figura 3: Producción de biomasa (*Saccharomyces cerevisiae*) en tres sustratos estudiados. 25

Figura 4: Producción de dióxido de carbono en la fermentación de los tres sustratos estudiados. 26

Figura 5: volúmenes de dióxido de carbono producido en la fermentación alcohólica de los tres sustratos estudiados. 27

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1: Valores de consumo de sustrato y crecimiento de biomasa y producción de etanol durante el tiempo de fermentación. 17

Tabla 2: Concentraciones, temperatura y concentración de inóculo del experimento. 22

1. Introducción

El crecimiento microbiano se considera la principal actividad de las células vivas. Es importante monitorear el crecimiento celular y las actividades biológicas y biocatalíticas en el metabolismo celular. Hay una variedad de métodos disponibles para predecir el crecimiento celular mediante mediciones directas o indirectas. El peso seco celular, la densidad óptica celular, la turbidez celular, la respiración celular, la tasa metabólica y los metabolitos son muy adecuados para analizar el crecimiento celular, la utilización de sustratos y la formación de productos. Las levaduras son microhongos unicelulares eucariotas que se encuentran ampliamente distribuidos en el medio natural. Se conocen alrededor de 1000 especies de levaduras, pero esto representa solo una fracción de la biodiversidad de levaduras en la Tierra. Los seres humanos han explotado las actividades fermentativas de las levaduras durante milenios en la producción de cerveza, vino y pan. La especie de levadura más explotada y estudiada es *Saccharomyces cerevisiae*, comúnmente conocida como "levadura de panadería" (Walker & Dundee, 2009). La levadura es la parte más importante del proceso de fermentación alcohólica. La levadura convierte el azúcar en alcohol, dióxido de carbono, biomasa y otros compuestos que influyen en el sabor y el aroma de la cerveza. La levadura de cerveza es un eucariota y pertenece al reino Fungi (Speers & Forbes, 2015).

La levadura para la fermentación debe estar en óptimas condiciones. Tiene que tener una alta viabilidad y vitalidad. La viabilidad es la tasa de vida-muerte de las células de levadura. La vitalidad caracteriza la condición fisiológica de las células vivas. En las cerveceras se utilizan diferentes estrategias para asegurar una condición óptima de la levadura. Los cerveceros tienen que decidir si se utiliza levadura de cultivo puro o (también) levadura reconstituida. La levadura reactivada caracteriza a la levadura que ha tenido una exposición previa a la fermentación del mosto (a veces repetidamente). También existen diferentes métodos para la propagación de la levadura antes de iniciar la fermentación y tiene como fin obtener a partir de una pequeña cantidad de células una masa celular suficientemente alta que sirva de inóculo a la fermentación final (Wunderlich & Back, 2009). El objetivo de la presente investigación fue la cuantificación de la biomasa crecida en tres diferentes sustratos (sacarosa al 26%, jugo de caña y jugo de uva)

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo General

Comprobar experimentalmente el crecimiento de levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) en tres diferentes sustratos (Sacarosa, jugo de caña y jugo de uva).

1.2.2. Objetivos Específicos

- Comprender la cinética de crecimiento de levaduras según el sustrato al que se está inoculando.
- calcular la velocidad específica de crecimiento de levaduras
- calcular el número de levaduras que fueron inoculadas.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Crecimiento microbiano

El crecimiento microbiano se considera para la observación de las actividades de las células vivas. Es importante monitorear el crecimiento celular y las actividades biológicas y biocatalíticas en el metabolismo celular. Hay una variedad de métodos disponibles para predecir el crecimiento celular mediante mediciones directas o indirectas. El peso seco celular, la densidad óptica celular, la turbidez celular, la respiración celular, la tasa metabólica y los metabolitos son muy adecuados para analizar el crecimiento celular, la utilización de sustratos y la formación de productos. La tasa de crecimiento celular se describe en este capítulo. Se modelan varios bioprocesos para la utilización de sustratos y la formación de productos. La cinética de crecimiento en cultivo por lotes y continuo se examina en detalle.

El crecimiento microbiano está determinado por el peso celular seco (g l^{-1}) y la densidad óptica de la celda (absorbancia a una longitud de onda definida, λnm) (Uwaha, 2015). La curva de crecimiento celular se divide en cuatro fases, como se muestra en la Figura 1.

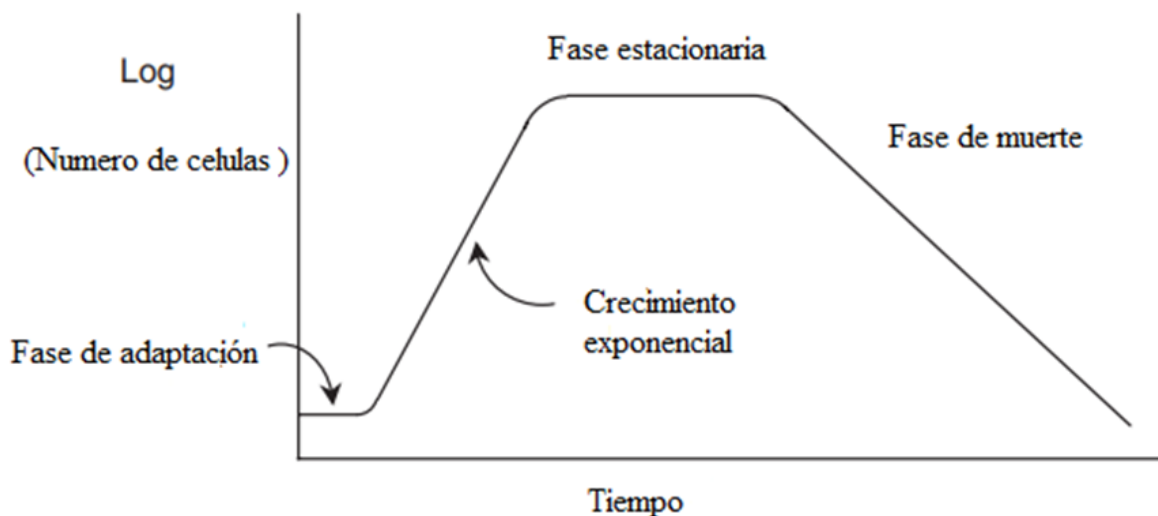


Figura 1: Curva típica de crecimiento microbiano

El crecimiento exponencial de la levadura se puede describir mediante la ecuación:

$$N = N_0$$

Ecuación 1

Donde:

N representa el número de celdas en cualquier momento (t) y N_0 representa el número de celdas al comienzo del intervalo que se analiza. Los científicos a menudo encuentran conveniente pensar en la constante de crecimiento k en términos del tiempo de duplicación del cultivo. En esta representación, $k = \ln 2/T$ (T = el tiempo de duplicación del cultivo). La tasa de crecimiento de la levadura varía con la temperatura. La levadura crece bien a temperatura ambiente, pero crece más rápidamente a 30 °C. Los cultivos bien aireados crecen más rápidamente que los que no lo están, por lo que los cultivos líquidos generalmente se cultivan en un agitador giratorio o en una rueda giratoria. A 30 °C, las cepas de levadura de tipo salvaje tienen un tiempo de duplicación de ~90 minutos en extracto de levadura peptona dextrosa (YPD) (O'Conor, 2019).

2.2.1. Cinética de Monod

El modelo Monod fue introducido por primera vez por Jacques Monod en 1942 para describir la relación entre la tasa de crecimiento específico y la tasa de utilización del sustrato en un biorreactor. El modelo puede definirse de dos formas: basado sólo en la concentración de sustrato, y basado en la concentración de sustrato y de biomasa (Muloiwa et al., 2020).

$$\mu = \mu_m \frac{S}{K_s + S} ; \mu = \frac{u_{max} * X S}{K_s + S} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde:

μ = Velocidad específica de crecimiento

μ_m = Velocidad específica media

S = Sustrato

K_s = Constante de saturación

X = Biomasa

El modelo de Monod podría dilucidar el comportamiento del crecimiento celular, la concentración de sustratos y productos, así como sus relaciones (Harmand et al., 2019).

Para obtener los parámetros cinéticos de Monod K_s y μ_{max} . se realizan por duplicado cinco experimentos con diferentes concentraciones iniciales. Los procesos se muestrean cada 2 h, y se monitoriza el consumo de azúcar y el crecimiento celular. Las tasas específicas de crecimiento (μ) se estiman a partir de los datos experimentales obtenidos durante la fase exponencial por regresión lineal a partir de la pendiente del logaritmo natural de la biomasa frente al tiempo (Moodley & Gueguim Kana, 2019).

2.3. Fases del crecimiento de levaduras

El crecimiento de levaduras está compuesto por tres fases importantes:

- La fase de latencia (o adaptación), que dura unas 15 horas.
- La fase de crecimiento, donde tiene lugar un crecimiento exponencial de la levadura, y que dura entre 1 y 4 días.
- La fase de acondicionamiento, de entre 3 y 10 días.

2.3.1. Primera fase

La levadura empieza a usar minerales y aminoácidos (nitrógeno) que hay en el mosto para construir proteínas. Si la levadura no encuentra en el mosto los aminoácidos que necesita, va a tener que fabricarlos por su cuenta. Al igual que los humanos necesitan de una cantidad de vitaminas y minerales esenciales para pasar el día, las células de levadura necesitan de una cierta cantidad de vitaminas y minerales (conocidos coloquialmente en el mundillo como “nutrientes”) para que la fermentación se efectúe de la manera adecuada.

Otro elemento a tener en cuenta y del que no hemos hablado todavía es el oxígeno, el cual es rápidamente absorbido por la levadura en esta primera fase. Es cierto que siempre hablamos de las levaduras o de la fermentación respecto a un ambiente anaeróbico (es decir, que no requiere aire, o más concretamente, oxígeno), pero no es cierto del todo: las levaduras necesitan oxígeno para reproducirse. La fermentación tiene sus fases aeróbicas y otras anaeróbicas.

2.3.2. Segunda Fase

La segunda fase de la fermentación, conocida como fase de crecimiento comienza, siempre de manera orientativa, pasado un día desde la siembra de levadura hasta el cuarto día de fermentación. Al salir de la fase de latencia, la levadura comienza a consumir los azúcares del mosto. Se produce CO_2 , el cual empieza a salir de la solución (y es el que provoca el tan esperado burbujeo del airlock), y que además es el culpable de formar una capa de espuma

(también conocido como “krausen”) sobre la cerveza. La levadura comienza a reproducirse de manera exponencial, o logarítmica, por lo que el recuento de células aumentará rápidamente, y se producirán compuestos saborizantes, además de etanol.

2.3.3. Tercera Fase

La traducción fiel de su nombre en inglés sería “fase estacionaria del crecimiento de las levaduras”, lo que es muy gráfico, pero queda incómodo de asimilar. Por suerte, su nombre secundario es fase de acondicionamiento (“*conditioning phase*”), nombre mucho más llevadero.

Tiene lugar pasados 3-4 días de poner la levadura en el mosto y puede tomar hasta 7 días. Es decir, su duración habitual es desde el 4º día de fermentación hasta el 10º.

En este punto, el crecimiento (es decir, reproducción) de la levadura se ralentiza, y entra en una fase de estancamiento de actividad reproductiva. Ya se han producido la mayoría de los compuestos de sabor y aroma que tenían que haberse producido, incluyendo alcoholes fúsel, ésteres y compuestos azufrados. La cerveza, en ese momento, se denomina “cerveza verde”, ya que todavía no ha madurado lo suficiente como para tener un equilibrio aceptable de sabores (Pandey *et al.*, 2018).

2.3.4. Cuarta Fase

La fase de sedimentación es el proceso a través del cual la levadura flocula y se deposita en el fondo del fermentador después de la fermentación. La levadura comienza a someterse a un proceso que preservará su vida mientras se prepara para la inactividad, mediante la producción de una sustancia llamada glucógeno (Jiang *et al.*, 2019).

2.4. Fermentación alcohólica

En términos de fermentación alcohólica se puede establecer que la fabricación de vino y cerveza son un caso particular de producción de etanol y considerado un producto del alto consumo nivel mundial, debido a que su elaboración se debe a la fermentación del mosto de uva y malta por algunas levaduras y entre ellas destaca la especie *Saccharomyces cerevisiae*, las cuales transforman los azúcares en etanol, CO₂, biomasa y ATP, en este proceso también ocurre una fermentación intermedia conocida como la fermentación de la glicerina (Burini *et al.*, 2021).

2.4.1. Levaduras

Son hongos unicelulares eucariotas que se reproducen por gemación o fisión. En la elaboración de cerveza, *Saccharomyces cerevisiae* es el género y la especie de mayor importancia, aunque muchas otras especies son cruciales para dar forma a las características de los estilos de cerveza y otras bebidas fermentadas. Las levaduras ale y lager se clasificaron originalmente como *Saccharomyces cerevisiae*, pero ahora se sabe que las levaduras lager son una especie separada, *Saccharomyces pastorianus*. Actualmente se entiende que es un híbrido de *S. cerevisiae* y *Saccharomyces eubayanus*, una especie que originalmente fue aislada de América del Sur. Las levaduras son muy pequeñas, típicamente de 5 a 10 micras (1 micra = 10^{-4} centímetros), que es alrededor de 5 veces el tamaño de la mayoría de las bacterias.

Es importante comprender que las levaduras son organismos vivos que responderán a su entorno produciendo más o menos ciertos compuestos. El cervecero controla el entorno en el que se colocan las levaduras, por lo que es muy importante que el cervecero sepa cómo responderá la levadura a ciertos factores ambientales. Los factores más importantes que afectan el rendimiento de la levadura que un cervecero puede controlar son:

Gravedad del mosto

Temperatura

Tasa de lanzamiento

Oxigenación/Aeración

Cepa de levadura

Contenido de nitrógeno

Contenido nutritivo

Grain bill/Mash program (espectro de azúcares fermentables)

Saneamiento/Técnica.

2.4.2. *Saccharomyces cerevisiae*

Esta levadura está ampliamente considerada como una especie de mejor adaptada para la fermentación, e la principal especie que impulsa el proceso en fermentaciones no inoculadas,

y durante muchas décadas fue casi la única especie de levadura comercializada para la fermentación alcohólica. En consecuencia, las estrategias biotecnológicas basadas en *Saccharomyces cerevisiae* para disminuir el rendimiento de etanol no se centra en nuevos aislados naturales sino en modificar el metabolismo del carbono de las cepas ya utilizadas (Wang et al., 2020). El objetivo es desviar el carbono del azúcar a la producción de otros metabolitos, principalmente mediante ingeniería metabólica, pero también por evolución adaptativa en el laboratorio (Lee et al., 2021).

2.4.2.1. Nutrientes de las levaduras

La levadura *Saccharomyces* responde a las dos clases principales de nutrientes, carbono y nitrógeno. Me centraré en los medios por los cuales las células de levadura perciben la cantidad y la calidad de estas clases de nutrientes y cómo utilizan esa información, tanto individualmente como en combinación, para alterar sus paisajes celulares, metabólicos, transcripcionales y de desarrollo. *Saccharomyces* también necesita de otras clases de nutrientes, incluidos el fósforo, el azufre y los aminoácidos.

Las células de levadura reconocen la naturaleza y la disponibilidad de los compuestos de nitrógeno y ajustan activamente sus capacidades transcripcionales, metabólicas y biosintéticas para que coincidan con esa percepción. Cuando el nitrógeno es limitante, las células ralentizan su crecimiento, principalmente a través de la reducción de la biogénesis y traducción ribosomal, lo que resulta en la expansión de la fase G1 del ciclo celular. En el caso extremo de agotamiento del nitrógeno, las células dejan de crecer, incluso con todos los demás nutrientes disponibles en exceso, y entran en un estado de reposo específico del nitrógeno (Vallejo et al., 2020).

2.4.2.2. Metabolismo

El crecimiento celular es el metabolismo central de los nutrientes para generar energía, crear bloques de construcción para la biosíntesis macromolecular y promover la síntesis de la panoplia de moléculas necesarias para hacer dos células a partir de una. Las células de levadura deben reconocer qué nutrientes están disponibles y adaptar su actividad metabólica para que coincida con la naturaleza y los niveles de esos nutrientes disponibles. Varios estudios han documentado cambios sustanciales en los niveles de varios metabolitos luego de transiciones de nutrientes. Por ejemplo, los niveles de piruvato de fosfoenol aumentan después de la falta de glucosa y los niveles de α -cetoglutarato aumentan significativamente después de la falta de nitrógeno. Sorprendentemente, la correlación entre la expresión génica

y el metabolismo en la levadura es bastante pobre: los niveles de metabolitos están poco influenciados por los niveles de expresión de genes que codifican enzimas para su síntesis o consumo. En consecuencia, es probable que el flujo metabólico esté controlado por la acción de masas combinada con la regulación alostérica y la modificación postraduccional de enzimas metabólicas clave. La medida en que cada uno de estos procesos contribuye a la regulación metabólica solo se comprende parcialmente (Klosinska et al., 2011). A conjunto complejo de comunicación biológica determina las interacciones entre microorganismos: toxinas asesinas y compuestos antimicrobianos (Albergaria y Arneborg, 2016); limitación de nutrientes (Wang et al., 2016), que podría resultar de una rápida absorción de nutrientes; o la liberación de otros compuestos como los ácidos grasos o el ácido acético. La investigación de las interacciones entre *Saccharomyces* y *Cabe* destacar las levaduras no *Saccharomyces* durante la fermentación del vino, y comprender los mecanismos de modulación realizados por metabolitos derivados de la actividad de la levadura es importante para controlar este proceso (Ciani y Comitini, 2015).

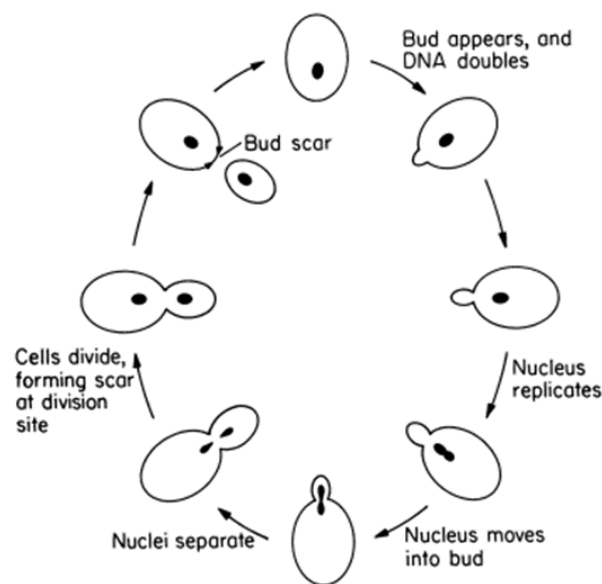


Figura 2: Ciclo de división celular de una levadura típica, *Saccharomyces cerevisiae*

La formación de etanol a partir de glucosa se logra en un cultivo discontinuo de *Saccharomyces cerevisiae* y se pueden obtener datos que indican el crecimiento de la levaduras conforme se consumen los azúcares.

Tabla 1. Valores de consumo de sustrato y crecimiento de biomasa y producción de etanol durante el tiempo de fermentación

Tiempo (h)	Glucosa (S), g/L	Biomasa (X), g/L	Etanol (P), g/L
0	100	0,5	0
2	95	1	2,5
5	85	2,1	7,5
10	58	4,8	20,5
15	30	7,7	34
20	12	9,6	43
25	5	10,4	47,5
30	2	10,7	49

Tabla 1: Valores de consumo de sustrato y crecimiento de biomasa y producción de etanol durante el tiempo de fermentación

2.4.2.3. Temperatura optima de crecimiento

La temperatura óptima para el crecimiento de las levaduras está en el rango mesófilo de 25 a 30 °C. Las levaduras en general pueden crecer en un rango de temperaturas de 0 °C a 47 °C. Las levaduras crecen bien en condiciones ácidas, con un pH de 4,0 a 4,5. Pueden crecer a un pH más bajo que la mayoría de las bacterias, pero no crecen bien en condiciones alcalinas. Las levaduras están ampliamente distribuidas en la naturaleza y comúnmente ocurren en uvas y otras frutas. También se encuentran en el polvo y el agua, y se pueden encontrar en la piel y en el tracto intestinal de humanos y animales (Hommel, 2014).

2.4.2.4. Sustrato

Algunas levaduras, conocidas como levaduras osmófilas, pueden crecer en presencia de altas concentraciones de azúcares o sal con un valor *tan* bajo como 0,62–0,65. Cada levadura tendrá su propia característica *aw* óptima y un rango de *aw* sobre el cual puede crecer. La *aw*

mínima y óptima para una levadura determinada puede cambiar según factores externos, como la [nutrición](#), el pH, la temperatura, el oxígeno y la presencia de inhibidores.

2.5. Azúcares fermentables

La sacarosa es ampliamente utilizada como edulcorante en las industrias alimenticias y en bebidas. Es una materia prima importante en la fermentación microbiana para producir alcohol y ácidos orgánicos. El rendimiento de producción alcohólica en la sacarosa es bajo, y disminuye al aumentar la concentración de sacarosa al inicio de la fermentación (Zhuang et al., 2021).

La galactosa es un azúcar obtenido del hidrólisis de algunas biomasas marinas como las algas rojas. La levadura *S. cerevisiae* es capaz de crecer en galactosa, sin embargo, la tasa de absorción específica es aproximadamente 2.5 – 3.3 más baja que las que presentan en glucosa. Además, se conoce que el rendimiento y producción de etanol a partir de la fermentación de galactosa es considerablemente más baja que en la fermentación de glucosa debido a un respiro más lento del metabolismo metabólico por falta del efecto Crabtree (Zhuang et al., 2021)

La xilosa es uno de los azúcares más abundantes en la biomasa lignocelulósica, también conocida como azúcar de madera. La ingeniería genética ha trabajado en la modificación genética de *S. cerevisiae* para que puede fermentar la xilosa. El producto de la fermentación de la xilosa es el xilitol, el cual es un alcohol de azúcar natural y es de gran utilidad en la industria alimentaria y médica por su utilizad como azúcar sustituto para personas con diabetes (Muloiwa et al., 2020).

2.6. Biomasa

Los procesos típicos de conversión biológica de biomasa son la fermentación y la digestión anaeróbica. En la fermentación de biomasa, los microorganismos se utilizan para convertir biológicamente materia prima biológica en biocombustibles (como bioetanol y biobutanol), productos químicos, materiales o gases combustibles. Por ejemplo, el almidón y la melaza se utilizan normalmente como materias primas para producir etanol mediante fermentación, durante la cual los azúcares simples (p. ej., glucosa, maltosa y sacarosa) se fermentan en bioetanol o biobutanol. Las principales variables operativas que afectan el rendimiento de etanol y la eficiencia de la fermentación son la presión osmótica y la presencia y eliminación

de algunos subproductos (tóxicos para las levaduras) de las reacciones de hidrólisis y el metabolismo de la levadura, por ejemplo, hidroximetil furfural (HMF). Por lo tanto, seleccionar el medio de fermentación y el tipo de levadura, detoxificar el hidrolizado y separar/eliminar los subproductos de la fermentación son medidas efectivas para mejorar el rendimiento de la fermentación.

La digestión anaeróbica es otro proceso biológico común para convertir biomasa o desechos orgánicos en biogás (principalmente CH_4 y CO_2) utilizando bacterias anaeróbicas. La temperatura, el pH y la relación C/N son los principales factores que determinan la eficiencia de producción de biogás en un proceso anaeróbico. El alto contenido de celulosa en la materia prima conduce a una baja eficiencia de la digestión anaeróbica y, por lo tanto, a una mala economía. Para mejorar la eficiencia de la producción de biogás, la materia prima biológica con alto contenido de celulosa generalmente se trata previamente para degradar la materia prima biológica en compuestos más simples. Los métodos comunes de pretratamiento incluyen la molienda mecánica, la hidrólisis fúngica y enzimática, el tratamiento químico ácido y alcalino y la explosión de vapor (Mishra & Ghosh, 2019). También se ha informado que agregar catalizadores exógenos al proceso de fermentación podría mejorar aún más la tasa de digestión y el rendimiento de biogás (Wei et al., 2020).

Por otro lado, el biohidrógeno se puede producir de manera eficiente mediante la fermentación oscura de biomasa o desechos orgánicos (Urbaniec y Bakker, 2015; Hosseini y Wahid, 2016), donde los compuestos orgánicos también pueden ser descompuestos por bacterias anaeróbicas facultativas y específicas (Kumar et al., 2018; Mishra et al., 2019). Generalmente, hay dos etapas diferentes de fermentación oscura: (i) la primera etapa de crecimiento en la que se puede producir un alto rendimiento de hidrógeno, acompañado de la producción de ácido acético y ácido butírico; y (ii) la segunda etapa, de crecimiento lento, durante la cual se generan menos hidrógeno y disolvente. Aparte de la formación de hidrógeno, la fermentación oscura también puede producir valiosos ácidos grasos volátiles (Ghimire et al., 2015). Para la fermentación oscura, la fuente de inoculación y el método de enriquecimiento, el pretratamiento del sustrato, los parámetros del biorreactor, el pH, la temperatura, el tiempo de retención hidráulica (HRT) y la presión parcial de H_2 son los principales factores para determinar la tasa de producción de hidrógeno (Mishra et al., 2019; Ghimire et al., 2015). En los últimos años, con el fin de obtener una mayor eficiencia de H_2 , se ha investigado la combinación de fermentación oscura y fermentación ligera o sistemas bioelectroquímicos (Wei et al., 2020).

2.7. Etanol

El etanol, también llamado alcohol, alcohol etílico y alcohol de grano, es un líquido transparente e incoloro y el ingrediente principal de las bebidas alcohólicas como la cerveza, el vino o el brandy. Debido a que puede disolverse fácilmente en agua y otros compuestos orgánicos, el etanol también es un ingrediente en una variedad de productos, desde productos de belleza y cuidado personal hasta pinturas y barnices para combustible.

Muchos microorganismos, incluidas bacterias y levaduras, pueden producir etanol como principal producto de fermentación a partir de carbohidratos. La fermentación industrial de etanol actual se lleva a cabo principalmente con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* debido a su rusticidad (bajo pH y alta tolerancia al etanol), aunque la bacteria *Zymomonas mobilis* tiene una mayor productividad específica de etanol y rendimiento a partir de glucosa y sacarosa.

La fermentación de etanol a partir de azúcar se simplifica en base a la siguiente reacción:



Las tasas de producción de biomasa y formación de productos son:

$$\frac{dx}{dt} = \frac{dx}{ds} \frac{ds}{dt} = -Y_{x/s} \cdot \frac{ds}{dt} \quad y \quad \frac{dP}{dt} = -Y_{P/S} \cdot \frac{ds}{dt}$$

Ecuación 4

donde los rendimientos de biomasa y producto son:

$$Y_{X/S} = -\frac{\Delta X}{\Delta S} \quad y \quad Y_{P/S} = -\frac{\Delta P}{\Delta S}$$

Ecuación 5

Por ejemplo, el rendimiento teórico de la fermentación de etanol basado en la fermentación de glucosa da como resultado dos moles de etanol:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444528452500057>

$$\frac{2 \text{ mol EtOH}}{\text{mol } C_6H_{12}O_6} = \frac{2 \times 46}{180} = 0.511 \frac{\text{g EtOH}}{C_6H_{12}O_6}$$

Ecuación 6

3. Metodología

3.2. Lugar de la investigación

La presente investigación se la desarrollo en el laboratorio de Bioconversión de la Facultad de Ciencias Químicas y de la Salud de la Universidad Técnica de Machala, ubicado en el km 5 1/2 vía Pasaje.

3.3. Diseño del experimento

Se hizo crecer la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en tres sustratos azucarados de diferente origen. A continuación, en la tabla 1 se muestran las condiciones del experimento de crecimiento de *S. cerevisiae*.

Tabla 2. Concentraciones, temperatura y concentración de inóculo del experimento

Sustrato	Concentración	Temperatura (°C)	Concentración de inóculo (g/L)
Sacarosa	26	25	4
Jugo de caña	16	25	4
Jugo de uva	18	25	4

Tabla 2: Concentraciones, temperatura y concentración de inóculo del experimento

3.4. Fermentación alcohólica

La fermentación alcohólica se llevó a cabo en un kitasato de 4 L, donde se colocó 1 litro de sustrato, se inóculo con 4 g/L de levadura *S. cerevisiae* de la marca comercial Fermipan y se incubo a ≈ 25 °C durante 24 horas. Posterior a esto se cuantifico el volumen de CO₂ producido, azúcares reductores (AR), contenido de etanol y concentración de biomasa.

3.4.1. Determinación de la Cinética de crecimiento

El crecimiento de las células cultivadas en ausencia de etanol se determinó cada 15 minutos hasta las 2 h midiendo el valor de consumido de azúcar, para lo cual se tomó una muestra de 300 μ l. Esta lecturas se realizaron a 600 nm (Zhang et al., 2020).

El modelo cinético utilizado para ajustar los datos experimentales, fue el modelo de Monod. Las ecuaciones del modelo son las siguientes:

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_s + S}$$

Ecuación 7

$$\frac{dx}{dt} = \mu * t$$

Ecuación 8

$$\frac{ds}{dt} = \frac{-\mu * X}{Y_{x/s}}$$

Ecuación 9

Se ajustaron los datos correspondientes a la fase de crecimiento logarítmico, es decir al tramo recto de la curva de crecimiento de biomasa y en el que se presenta la máxima velocidad específica de crecimiento.

a. Al ajustar los datos de biomasa a la ecuación logística, determine la capacidad de carga coeficiente k.

$$Y_{P/S} \text{ y } Y_{X/S}$$

b. Determinar los coeficientes de rendimiento

3.5. Medición de ° brix

En el caso de una solución de azúcar, la cantidad de °Brix medidos con un refractómetro se refiere al contenido de azúcar en masa y es una medida de los sólidos solubles. Las concentraciones de sustrato (% °Brix) en el líquido fermentado depende de gran medida del tipo de microorganismo utilizado durante la fermentación (King et al., 2021).

3.6. Azúcares reductores

Los azúcares reductores se ensayaron en solución como se describe por Miller 1980.

Las soluciones de azúcar se prepararon en RO (ósmosis inversa) agua. A 0.5 mL de la solución de azúcar en un tubo de ensayo 10 ml de la se añadió 0.5 ml reactivo DNS. Los tubos se colocaron en agua hirviendo baño durante 5 min, transferido a hielo para enfriar rápidamente y luego llevado a temperatura ambiente colocándolos en baño de agua a 25° C. La absorbancia se midió a 540 nm, utilizando un espectrofotómetro Zhimaczu (Saqib & Whitney, 2011) .

3.7. Cinética de la fermentación alcohólica

La cinética de la fermentación alcohólica se la determinó por la siguiente ecuación:

$$n(\%) = \frac{\Delta E}{=0.51 \cdot (S_0 - S)} * 100$$

Ecuación 10

3.8. Medición de CO₂ producido

Se utilizan una trampa de agua y una trampa de eliminación de espuma ya que el gas de escape está muy húmedo y ocasionalmente la espuma sube al tubo de escape. El gas desplaza el agua contenida en un recipiente a otro recipiente graduado que permite medir la cantidad de dióxido de carbono producido en la fermentación alcohólica (Balzhiser, 1992) .

Las concentraciones iniciales de azúcar estaban entre 260, 160 y 180 g/litro, la temperatura se entre ≈25°C, y la concentración de levadura seca activa fue de 4 g/litro de mosto.

La ecuación (2) implica el volumen de CO₂ liberado y la concentración inicial de azúcar, lo que permite predecir los azúcares con un error medio de 7,8 g/litro (+ 4% para un S₀ = 200 g/litro).

$$s = -3.92 V_c + 0.858S_0 + 11.7$$

Ecuación 1

3.9. Cuantificación de etanol producido

La producción relativa de etanol (como porcentaje en volumen) se calcula multiplicando la pérdida de peso (en gramos de CO₂) por 1,25 (Diaz et al., 2018).

3.10. Cuantificación de biomasa producida

Para la cuantificación de la levadura en los extractos de fermentación cada reacción contenía 10µL de SYBR Green PCR Spermix, 5 pmol de cada cebador y 2µL de muestra. La amplificación consistió en un ciclo de la desnaturalización a 95oC durante 2 minutos; 39 ciclos de desnaturalización a 95oC durante 15 segundos, las temperaturas óptimas para estos ensayos fueron de 20 segundos a 72oC durante 30 segundos y una extensión final de 72 oC durante 5 minutos; estos análisis de PCR se llevaron a cabo mediante una temperatura de 65oC hasta 95oC con 0,5oC por unidad de fluorescencia. En este estudio las amplificaciones se realizaron con un sistema de detección de PCR en tiempo real (Wang et al., 2020).

4. Resultados

4.2. Crecimiento de biomasa

La tasa de consumo de sustrato siempre está relacionada con la cantidad de biomasa crecida; de hecho, comúnmente es; $= q(S) \times X$, se debe de tomar en cuenta el coeficiente de rendimiento según el microorganismo que este creciendo () (Wang et al., 2020) . A continuación en la figura se muestra el crecimiento de *S cerevisiae* en tres sustratos diferentes.

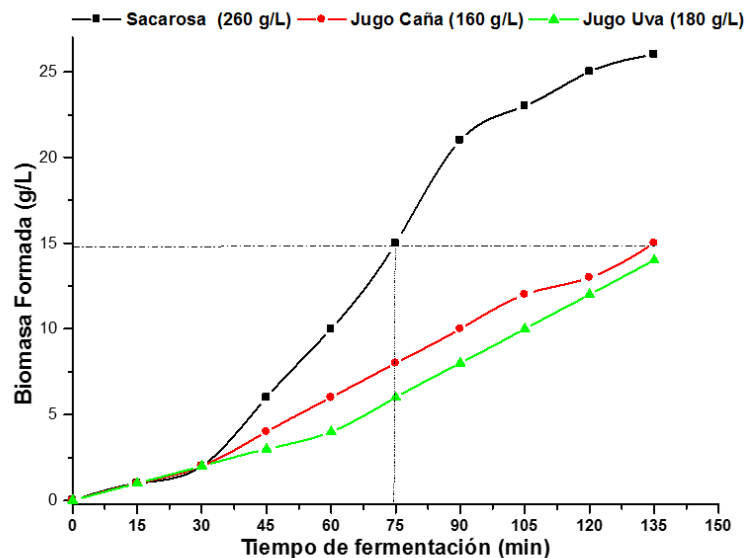


Figura 3: Producción de biomasa (*Saccharomyces cerevisiae*) en tres sustratos estudiados.

La producción de biomasa fue de mayor concentración y mayor velocidad de crecimiento fue en experimento donde se utilizó una solución de sacarosa a concentración de 260 g/L, al cabo de 75 minutos de alcanzo una concentración de biomasa de 14,8 g/L, igual concentración los experimentos donde se utilizó jugo de caña a concentración de 160 g/L y jugo de uva a concentración de 180 g/L, en estos dos últimos experimentos el tiempo de fermentación fue de 135 minutos, casi el doble de tiempo que el experimento con sacarosa.

Estudios de fermentación de hidrolizados de almidón de yuca favorecieron el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* y los rendimientos de biomasa ($Y_{X/S}$) obtenidos para los tres cultivo realizados con hidrolizados enzimáticos fueron de 0.472, 0.462 y 0.470g*g⁻¹, respectivamente (Hu *et al.*, 2019).

4.3. Producción de dióxido de carbono

En la fermentación alcohólica según la estequiometría química el 0,55 del sustrato se convierte en etanol y el 0,45 restante en dióxido de carbono (Ashok Pandey *et al.*, 2016). A continuación, en la figura 3 se muestra los volúmenes de CO₂ producidos en los tres experimentos estudiados

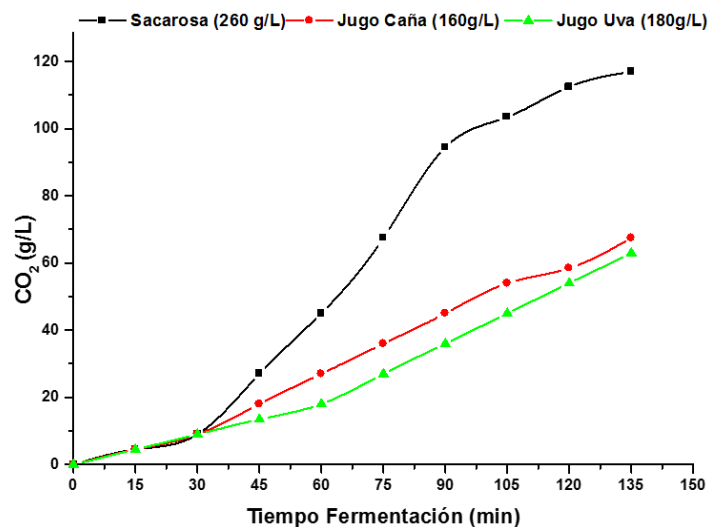


Figura 4: Producción de dióxido de carbono en la fermentación de los tres sustratos estudiados.

La producción de CO₂ en la fermentación que se utilizó sacarosa como sustrato, se produjo 117 g/L de dióxido de carbono, llegando $S_r = 0$, mientras que las fermentaciones donde se utilizó jugo de caña y de uva quedo sustrato residual $S_r = 4$, quedando sin reaccionar

alrededor del 25% de los azúcares fermentables totales y por lo tanto menor cantidad de dióxido de carbono producido.

La fermentación de glucosa y sacarosa produce mayor cantidad de dióxido de carbono, debido a que la levadura puede romperlos a azúcares simples, mientras en sustratos complejos, los azúcares se encuentran unidos a otros compuestos y estos resultan difícil de hidrolizar a azúcares y esto afecta la tasa de producción de CO₂ (Crancer et al., 2018).

4.4. Producción volumétrica de CO₂

La cuantificación del CO₂ producido es una variable importante para poder diseñar y dimensionar el biorreactor donde se va a crecer una levadura de crecimiento rápido y evitar desbordamiento del sistema. A continuación, en la figura 4 se muestra los volúmenes de dióxido de carbono producido en la fermentación alcohólica de los tres sustratos estudiados.

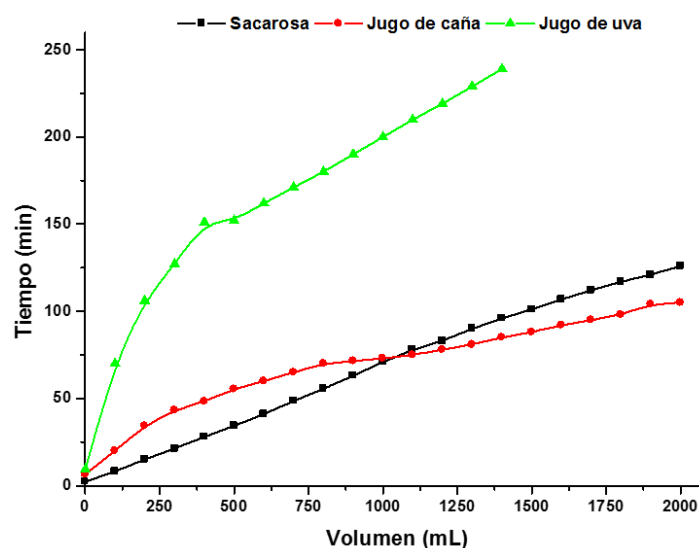


Figura 5: volúmenes de dióxido de carbono producido en la fermentación alcohólica de los tres sustratos estudiados.

La producción volumétrica de CO₂ en la fermentación alcohólica donde se utilizó sacarosa como sustrato, se produjo 2000 mL en 125 minutos de proceso, el jugo de caña produjo 2000 ml de CO₂, en 105 minutos y el jugo de uva produjo 1375 ml en 237 minutos, más del doble de tiempo que los dos experimentos antes mencionados.

Procesos de fermentación alcohólicas, han determinado que la producción de CO₂ puede mejorar significativamente bajo una presión elevada, lo que resultaría en una mayor tasa de

crecimiento de la levadura ($0,12 \text{ h}^{-1}$), densidad celular (18 g L^{-1}) y tasa de absorción de gas ($200 \text{ mmoles L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) que una fermentación bajo presión atmosférica. La ganancia, sin embargo, no fue proporcional al aumento de presión como predice la ley de Henry (Yu & Munasinghe, 2018).

5. Conclusiones

S cerevisiae crece con mayor rapidez en sustratos fáciles de hidrolizar como las soluciones de sacarosa, al cabo de 75 minutos se alcanza un incremento de biomasa de 10.8 g/L , frente a los sustratos reales donde la levadura tarda el doble de tiempo para crecer en la misma proporción.

En los sustratos como el jugo de caña de azúcar y jugo de uva solo reacciona el 75% de los azúcares fermentables, reduciéndose la concentración de biomasa y la cantidad de dióxido de carbono, mientras que la solución de sacarosa al 26%, todos los azúcares se convierten en etanol, dióxido de carbono y existe mayor producción de biomasa en menor tiempo de fermentación.

La mayor cantidad de producción de dióxido de carbono en la fermentación alcohólica se produce durante las 100 primeras horas de proceso y en el caso de la fermentación de mosto de uva la producción de CO_2 se detiene por completo a las 3.5 horas de fermentación.

6. Bibliografía

- Balzhiser, S. (1992). Bioprocess engineering: Basic concepts. *Journal of Controlled Release*, 22(3), 293. [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(92\)90106-2](https://doi.org/10.1016/0168-3659(92)90106-2)
- Crancer M, Roy J, Zavaleta C, & Hjalmeron E. (2018). Analysing the rate of Carbon Dioxide created by fermentation in yeast with different types of sugars. *Journal of Undergraduate Biology Laboratory Investigations*.
- Diaz, C. E., Sierra, Y. K., & Hernández, J. A. (2018). Determination of the percentage of ethanol produced by *Saccharomyces cerevisiae* from semi-purified glycerin. *Journal of Physics: Conference Series*, 1126(1). <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1126/1/012008>
- Harmand, J., Rapaport, A., & Nidelet, T. (2019). About overyielding with mixed cultures in batch processes. *IFAC-PapersOnLine*, 52(26), 163–168. <https://doi.org/10.1016/j.ifacol.2019.12.252>
- Hommel, R. (2014). *Enciclopedia de microbiologia de alimentos* (Vol. 1, pp. 2342–2349).
- Hu, Y., Zhu, Z., Nielsen, J., & Siewers, V. (2019). Engineering *Saccharomyces cerevisiae* cells for production of fatty acid-derived biofuels and chemicals. *Open Biology*, 9(5). <https://doi.org/10.1098/rsob.190049>
- Jiang, H., Xu, W., & Chen, Q. (2019). High precision qualitative identification of yeast growth phases using molecular fusion spectra. *Microchemical Journal*, 151(August), 104211. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104211>
- Klosinska, M. M., Crutchfield, C. A., Bradley, P. H., Rabinowitz, J. D., & Broach, J. R. (2011). Yeast cells can access distinct quiescent states. *Genes and Development*, 25(4), 336–349. <https://doi.org/10.1101/gad.2011311>
- Lee, S. B., Tremaine, M., Place, M., Liu, L., Pier, A., Krause, D. J., Xie, D., Zhang, Y., Landick, R., Gasch, A. P., Hittinger, C. T., & Sato, T. K. (2021). Crabtree/Warburg-like aerobic xylose fermentation by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering*, 68(September), 119–130. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2021.09.008>
- Mishra, A., & Ghosh, S. (2019). Bioethanol production from various lignocellulosic feedstocks by a novel “ fractional hydrolysis ” technique with different inorganic acids and co- culture fermentation. *Fuel*, 236(September 2018), 544–553. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2018.09.024>
- Moodley, P., & Gueguim Kana, E. B. (2019). Bioethanol production from sugarcane leaf waste: Effect of various optimized pretreatments and fermentation conditions on process kinetics. *Biotechnology Reports*, 22, e00329. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00329>

- Muloiwa, M., Nyende-Byakika, S., & Dinka, M. (2020). Comparison of unstructured kinetic bacterial growth models. *South African Journal of Chemical Engineering*, 33(May 2019), 141–150. <https://doi.org/10.1016/j.sajce.2020.07.006>
- O’Conor, C. M. (2019). 4.3: Yeast growth phases. *LibreText*, 17512.
- Pandey, A., Larroche, C., Riche, S., Dussap, C., & Gnansounou, E. (2018). Biofuels. In *Elsevier*.
- Pandey, Ashok, Sanromán, M. Á., Du, G., Soccol, C. R., & Dussap, C. G. (2016). Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Food and Beverages Industry. In *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Food and Beverages Industry*.
- Saqib, A. A. N., & Whitney, P. J. (2011). Differential behaviour of the dinitrosalicylic acid (DNS) reagent towards mono- and di-saccharide sugars. *Biomass and Bioenergy*, 35(11), 4748–4750. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.09.013>
- Speers, A., & Forbes, J. (2015). Yeast: An overview. In *Brewing Microbiology: Managing Microbes, Ensuring Quality and Valorising Waste*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-331-7.00001-0>
- Uwaha, M. (2015). Growth Kinetics. *Handbook of Crystal Growth*, 359–399. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-56369-9.00008-3>
- Vallejo, B., Matallana, E., & Aranda, A. (2020). Saccharomyces cerevisiae nutrient signaling pathways show an unexpected early activation pattern during winemaking. *Microbial Cell Factories*, 19(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01381-6>
- Walker, G. M., & Dundee, A. (2009). Defining Statement. *Cell*, 478–491.
- Wang, X., Glawe, D. A., Weller, D. M., & Okubara, P. A. (2020). Real-time PCR assays for the quantification of native yeast DNA in grape berry and fermentation extracts. *Journal of Microbiological Methods*, 168, 105794. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2019.105794>
- Wei, R., Li, H., Chen, Y., Hu, Y., Long, H., Li, J., & Xu, C. C. (2020). Environmental Issues Related to Bioenergy. In *Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences* (2nd ed.). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-819727-1.00011-x>
- Wunderlich, S., & Back, W. (2009). General Aspects of Beer and Constituents - Beer Making, Hops and Yeast. *Beer in Health and Disease Prevention*, i, 3–16.
- Yu, J., & Munasinghe, P. (2018). Gas fermentation enhancement for chemolithotrophic growth of *Cupriavidus necator* on carbon dioxide. *Fermentation*, 4(3). <https://doi.org/10.3390/fermentation4030063>

Zhang, X., Zhang, Y., & Li, H. (2020). Regulation of trehalose, a typical stress protectant, on central metabolisms, cell growth and division of *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK113-7D. *Food Microbiology*, 89(February), 103459. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103459>

Zhuang, N., Ma, J., Yang, L., Xue, R., Qian, X., Chen, M., Zhang, S., Chu, Z., Dong, W., Zhou, J., & Jiang, M. (2021). Rapid determination of sucrose and glucose in microbial fermentation and fruit juice samples using engineered multi-enzyme biosensing microchip. *Microchemical Journal*, 164(30), 106075. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106075>