



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO**

**INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA**

**ÁREA ACADÉMICA DE QUÍMICA**

**DOCTORADO EN CIENCIAS AMBIENTALES**

**TESIS DOCTORAL**

**UTILIZACIÓN DEL LACTOSUERO EN LA PRODUCCIÓN DE ACETATO DE  
ISOAMILO CON *KLUYVEROMYCES MARXIANUS* COMO ESTRATEGIA DE  
MITIGACIÓN DEL IMPACTO AMBIENTAL GENERADO POR LA INDUSTRIA  
QUESERA**

Para obtener el grado de  
Doctor en Ciencias Ambientales

**PRESENTA**

M. en B. Miguel Ángel Hernández Cruz

Director

Dr. Carlos Alberto Gómez Aldapa

Codirector

Dr. Arturo Cadena Ramírez

Mineral de la Reforma, Hidalgo, México, noviembre 2025



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo  
Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería  
*School of Engineering and Basic Sciences*

Mineral de la Reforma, Hgo., a 20 de noviembre de 2025

Número de control: ICBI-D/2977/2025

Asunto: Autorización de impresión de tesis.

**MTRA. OJUKY DEL ROCÍO ISLAS MALDONADO**  
**DIRECTORA DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR DE LA UAEH**

Por este conducto le comunico que el comité revisor asignado al **M. en B. Miguel Ángel Hernández Cruz**, alumno del Doctorado en Ciencias Ambientales (Tradicional) con número de cuenta **190819**, autoriza la impresión del proyecto de tesis titulado **"Utilización del lactosuero en la producción de acetato de isoamilo con *Kluyveromyces marxianus* como estrategia de mitigación del impacto ambiental generado por la industria quesera"**, en virtud de que se han efectuado las revisiones y correcciones pertinentes.

A continuación, se registran las firmas de conformidad de los integrantes del comité revisor.

PRESIDENTE	Dr. Javier Castro Rosas
SECRETARIO	Dra. Esmeralda Rangel Vargas
1 <sup>er</sup> VOCAL	Dr. Carlos Alberto Gómez Aldapa
2 <sup>do</sup> VOCAL	Dr. Arturo Cadena Ramírez
3 <sup>er</sup> VOCAL	Dr. Jesús Bernardo Páez Lerma
1 <sup>er</sup> SUPLENTE	Dra. María del Rocío Ramírez Vargas
2 <sup>do</sup> SUPLENTE	Dra. Laura Conde Báez

Sin otro particular, reitero a Usted la seguridad de mi atenta consideración.

Atentamente  
"Amor, Orden y Progreso"

Mtro. Gabriel Vergara Rodríguez  
Director del ICBI

CRG/SEP



Departamento de Planeación, Carretera Pachuca-Tulancingo Km. 4.5 Colonia Carboneras, Mineral de la Reforma, Hidalgo, México. C.P. 42184  
Teléfono: 771 71 720 00 Ext. 40001  
direccion\_icbi@uaeh.edu.mx, vergara@uaeh.edu.mx

"Amor, Orden y Progreso"



2025



uaeh.edu.mx

## **Agradecimientos**

El presente trabajo fue desarrollado principalmente en los Laboratorios de Fisicoquímica de Alimentos I y de Microbiología de Alimentos, pertenecientes al Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (ICBI-UAEH), institución que fungió como sede central de las actividades experimentales, metodológicas y de análisis. Este proceso fue posible gracias a la infraestructura especializada y al valioso acompañamiento académico brindado por el Dr. Carlos Alberto Gómez Aldapa, director del proyecto, del Dr. Javier Castro Rosas y a la Dra. Esmeralda Rangel Vargas, asesores, cuya orientación y compromiso fueron fundamentales para el desarrollo de esta investigación. A todos ellos, expreso mi más sincero reconocimiento.

Como apoyo complementario, se llevaron a cabo actividades específicas en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Politécnica de Pachuca (UPP), bajo la codirección del Dr. Arturo Cadena Ramírez y con la asesoría de la Dra. María del Rocío Ramírez Vargas, quienes contribuyeron significativamente en el desarrollo de este proyecto. Asimismo, agradezco a la Unidad de Posgrado e Investigación del Instituto Tecnológico de Durango (UPIDET-ITD), donde realizaron análisis especializados que fortalecieron la revisión documental, la validación metodológica y el enfoque interdisciplinario de esta investigación, con la asesoría del Dr. Jesús Bernardo Páez Lerma y el apoyo del Dr. Nicolás Óscar Soto Cruz y el Mtro. Erick Acosta-García. De igual manera, extiendo mi agradecimiento a la Dra. Laura Conde Báez por su orientación académica en este trabajo.

Mi gratitud se extiende de manera especial a la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) por el otorgamiento de la beca número 491576, la cual permitió la ejecución integral del proyecto y fomentó la colaboración interinstitucional. También agradezco al Consejo de Ciencia, Tecnología e Innovación de Hidalgo (CITNOVA) por el respaldo brindado mediante la beca de estancias cortas de posgrado, que contribuyó al fortalecimiento académico y técnico de esta propuesta.

## Contribuciones derivadas de la tesis doctoral

### Publicaciones

**Hernández-Cruz, M. A.**, Cadena-Ramírez, A., Castro-Rosas, J., Páez-Lerma, J. B., Ramírez-Vargas, M. R., Rangel-Vargas, E., Romo-Gómez, C., Lara-Gómez, A. B., Conde-Báez, L., & Gómez-Aldapa, C. A. (2024). Comparative Analysis of Three Types of Whey as Substrate for Fermentation by *Kluyveromyces marxianus* and its Influence on Isoamyl Acetate Synthesis. *Waste and Biomass Valorization*, 15(6), 3413–3424. <https://doi.org/10.1007/s12649-023-02380-5>

**Hernández-Cruz, M. A.**, Vázquez-Cuevas, G. M., Castro-Rosas, J., Hernández-Juárez, M., & Gómez-Aldapa, C. A. (2023). *Kluyveromyces marxianus*, sus aplicaciones en lactosuero. *Pädi Boletín Científico De Ciencias Básicas E Ingenierías Del ICBI*, 10(20), 1–9. <https://doi.org/10.29057/icbi.v10i20.9362>

### Presentaciones en eventos académicos y científicos

Congreso Internacional de Investigación e Innovación Multidisciplinaria (CIIIM). Instituto Tecnológico de Orizaba, Orizaba, México. (21-25 octubre de 2024). Evaluación del efecto de dos precursores en la síntesis de acetato de isoamilo por *Kluyveromyces marxianus* utilizando lactosuero como fuente de carbono. Miguel Ángel Hernández-Cruz, Javier Castro-Rosas, Jesús Bernardo Paéz-Lerma, Ramírez-Vargas María del Rocío, Arturo Cadena-Ramírez.

4° Congreso Internacional y 10° Congreso Nacional de Ingeniería y Tecnologías para el Desarrollo Sustentable (CONAINTE). Instituto Tecnológico Superior del Occidente del Estado de Hidalgo, Mixquiahuala de Juárez, Hidalgo (24 octubre 2024). Biotecnología Aplicada al lactosuero: eficiencia de dos cepas de *Kluyveromyces marxianus* en el consumo de lactosa. Hernández-Cruz Miguel Ángel, Gómez-Aldapa Carlos Alberto, Cadena-Ramírez Arturo, Castro-Rosas Javier, Páez-Lerma Jesús Bernardo, Rangel-Vargas Esmeralda, Ramírez-Vargas María del Rocío, Conde-Báez Laura, Lara-Gómez Ariadna Bárbara y Cabrera-Domínguez Edgar Daniel.

I Congreso de Ciencia, Tecnología, Academia y Humanidades. Centro de Investigación en Geociencias Aplicadas (CIGA). Saltillo, Coahuila (16-19 abril 2024). Fermentación de lactosuero con *Kluyveromyces Marxianus* y el efecto de la adición de leucina sobre la producción de acetato de isoamilo. Hernández Cruz M.A., Lara Gómez A.B., Castro Rosas J., Cadena Ramírez A., Páez Lerma J.B., Ramírez Vargas M.R., Conde Báez L., Rangel Vargas E., Romo Gómez C. y Gómez Aldapa C.A.

X Congreso Internacional de Biotecnología SOCIBI. Sociedad Científica Internacional de Biotecnólogos A.C. Tlaxcala, México (02-05 diciembre 2023). Fermentación de lactosuero con *Kluyveromyces marxianus* y el efecto de la adición de alcohol isoamílico sobre la producción de acetato de isoamilo (aroma a plátano). Miguel Ángel Hernández-Cruz, Arturo Cadena-Ramírez, Jesús Bernardo Paéz-Lerma, Carlos Alberto Gómez-Aldapa

XLIV Encuentro Nacional de la AMIDIQ. Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química A.C. Huatulco, Oaxaca, México (30 mayo-02 junio 2023). Efecto del oxígeno disponible en el espacio de cabeza sobre la síntesis de acetato de isoamilo (aroma a plátano) por *kluyveromyces marxianus* a partir de lactosuero dulce. Miguel Ángel Hernández Cruz, Ariadna Bárbara Lara Gómez, Javier Castro Rosas, Arturo Cadena Ramírez, Carlos Alberto Gómez Aldapa.

LatinXChem Twitter Conference 2022 en Nov. 28, 2022 *Kluyveromyces marxianus*, sus aplicaciones en lactosuero Miguel Ángel Hernández Cruz, Javier Castro Rosas, Martín Hernández Juárez, Gabriela Marisol Vázquez Cuevas, Carlos Alberto Gómez Aldapa.

## CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	X
ÍNDICE DE FIGURAS .....	XII
RESUMEN.....	XV
ABSTRACT.....	XVII
INTRODUCCIÓN.....	XIX
1. MARCO TEÓRICO.....	1
1.1 Lactosuero .....	1
1.1.1 Composición y características generales .....	1
1.1.2 Tipos de lactosuero.....	2
1.2 Producción mundial, nacional y estatal.....	2
1.3 Impacto ambiental .....	4
1.4 Tratamiento de lactosuero.....	5
1.4.1 Procesos biológicos para el tratamiento de lactosuero .....	6
1.4.2 Fermentación .....	7
1.4.3 Importancia de los parámetros cinéticos .....	9
1.5 Microorganismos en la fermentación del lactosuero .....	10
1.5.1 <i>Kluyveromyces marxianus</i> .....	10
1.6 Aromas generados en la fermentación y rutas metabólicas.....	13
1.7 Acetato de isoamilo .....	16
2. ANTECEDENTES .....	20
2.1 Producción de bioalcoholes.....	20
2.1.1 Bioetanol .....	20
2.1.2 2-feniletanol y 2,3 butanodiol.....	23
2.2 Producción de biomasa .....	24
2.3 Producción de bebidas .....	26
2.4 Producción de biocombustibles.....	27
2.5 Producción de otros compuestos .....	28
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	30

4. HIPÓTESIS.....	31
5. JUSTIFICACIÓN .....	32
6. OBJETIVOS.....	34
6.1 Objetivo general.....	34
6.2 Objetivos específicos.....	34
7 METODOLOGÍA.....	35
7.1 Microorganismo y medio de cultivo .....	36
7.2 Sustrato.....	36
7.3 Caracterización del lactosuero .....	36
7.3.1 Determinación de lactosa .....	36
7.3.2 Determinación de grasa.....	37
7.3.3 Determinación de pH .....	37
7.3.4 Determinación de humedad.....	37
7.3.5 Determinación de cenizas (minerales) .....	37
7.3.6 Determinación del contenido de proteínas y de la densidad .....	37
7.4 Acondicionamiento del lactosuero y fermentaciones.....	38
7.4.1 Fermentación de lactosuero crudo .....	38
7.4.2 Fermentación de lactosuero con precursores .....	38
7.4.3 Optimización de la producción de acetato de isoamilo en fermentación del lactosuero.....	38
7.4.3.1 Diseño experimental .....	38
7.4.3.2 Optimización por Superficie de Respuesta .....	39
7.4.3.3 Validación.....	39
7.4.4 Fermentación del lactosuero con una fase adaptativa de <i>Kluyveromyces marxianus</i> .....	40
7.5 Producción de acetato de isoamilo .....	40
7.6 Conteo de levaduras.....	41
7.7 Métodos analíticos.....	41
7.7.1 Cromatografía de Gases.....	41

7.7.2 Cromatografía de Líquidos de Ultra Alta Presión (UHPLC).....	43
7.8 Análisis estadístico .....	44
8 RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	45
8.1 Caracterización de lactosuero .....	45
8.2 Cinéticas de fermentación del lactosuero crudo en matraces de distintos volúmenes .....	48
8.2.1 Crecimiento de microorganismos y consumo de lactosa.....	48
8.2.2 Producción de etanol, de alcohol isoamílico y de acetato de isoamilo.....	51
8.3 Cinéticas de fermentación en lactosuero crudo con la adición de precursores .....	54
8.3.1 Cinéticas de fermentación en lactosuero crudo con la adición de alcohol isoamílico.....	55
8.3.1.1 Crecimiento de los microorganismos y el consumo de lactosa .....	55
8.3.1.2 Producción de etanol y de acetato de isoamilo.....	58
8.3.2 Cinéticas de fermentación en lactosuero crudo con la adición de L-leucina.....	61
8.3.2.1 Crecimiento de los microorganismos y el consumo de lactosa .....	62
8.3.2.2 Producción de etanol, de alcohol isoamílico y de acetato de isoamilo.....	64
8.3.3 Análisis comparativo y discusión cinético-metabólica.....	67
8.4 Cinéticas de fermentación del lactosuero – Diseño central compuesto rotatable .....	72
8.4.1 Crecimiento de microorganismos y consumo de lactosa.....	73
8.4.2 Producción de acetato de isoamilo.....	78
8.4.3 Análisis de superficie de respuesta (ASR) .....	80
8.4.4 Optimización.....	85
8.4.5 Validación de la optimización y de las cinéticas de fermentación del lactosuero por la cepa <i>K. marxianus</i> ITD00262-C posterior a una fase de adaptación .....	86
8.4.5.1 Crecimiento de microorganismos y consumo de lactosa.....	87
8.4.5.2 Producción de acetato de isoamilo.....	88
8.4 Estrés adaptativo .....	91
8.4.1 Relevancia biotecnológica del uso del estrés adaptativo .....	93



8.5 Validación del modelo de superficie de respuesta: predicción y ajuste experimental .....	94
8.5.1 Relevancia biotecnológica del modelo validado .....	101
8.5.2 Comparación con estudios previos en fermentación del lactosuero y la producción de bioaromas.....	101
8.5.3 Fermentación del lactosuero: de la eliminación pasiva al aprovechamiento activo .....	102
8.5.4 Producción del acetato de isoamilo: mecanismos, cepas y matrices.....	103
8.5.5 Enfoque catalítico versus fermentación convencional .....	104
9 CONCLUSIONES.....	105
10 REFERENCIAS .....	107

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Componentes del lactosuero.....	1
<b>Tabla 2.</b> Composición general de los tipos de lactosuero. ....	2
<b>Tabla 3.</b> Clasificación taxonómica de <i>Kluyveromyces marxianus</i> . ....	11
<b>Tabla 4.</b> Compuestos volátiles mayoritarios detectados en la bebida destilada de lactosuero. ....	14
<b>Tabla 5.</b> Compuestos volátiles minoritarios detectados en la bebida destilada de lactosuero. ....	15
<b>Tabla 6.</b> Obtención de alcoholes utilizando lactosuero como fuente de carbono. ....	22
<b>Tabla 7.</b> Producción de biomasa a partir de lactosuero como fuente de carbono. ....	25
<b>Tabla 8.</b> Producción de bebidas a base de lactosuero. ....	27
<b>Tabla 9.</b> Obtención de biocombustibles utilizando lactosuero como fuente de carbono. ...	28
<b>Tabla 10.</b> Obtención de distintos compuestos utilizando lactosuero como fuente de carbono. ....	29
<b>Tabla 11.</b> Variables independientes del diseño central compuesto rotatable. ....	39
<b>Tabla 12.</b> Soluciones para curva de calibración en CG-FID.....	42
<b>Tabla 13.</b> Soluciones para curva de calibración en CG-MS. ....	43
<b>Tabla 14.</b> Concentraciones empleadas para la obtención de la curva de calibración de carbohidratos para UHPLC. ....	44
<b>Tabla 15.</b> Composición fisicoquímica del lactosuero. ....	45
<b>Tabla 16.</b> Parámetros cinéticos de fermentación de <i>K. marxianus</i> en el lactosuero evaluando el efecto de la adición del alcohol isoamílico. ....	69
<b>Tabla 17.</b> Parámetros cinéticos de fermentación de <i>K. marxianus</i> en el lactosuero evaluando el efecto de la adición de L-leucina.....	70
<b>Tabla 18.</b> Diseño experimental de las fermentaciones del lactosuero con la adición del alcohol isoamílico y de la L-leucina.....	72
<b>Tabla 19.</b> Optimización de la producción de acetato de isoamilo a las 48 h en la fermentación del lactosuero con adición del alcohol isoamílico y de L-leucina con la cepa <i>K. marxianus</i> ITD00252-P. ....	86
<b>Tabla 20.</b> Optimización de la producción de acetato de isoamilo a las 12 h en la fermentación del lactosuero con adición del alcohol isoamílico y L-leucina con la cepa <i>K. marxianus</i> ITD00252-C. ....	86

<b>Tabla 21.</b> Importancia de los modelos de regresión (valor de F) y de los efectos de las variables de respuesta en la optimización de la producción de acetato de isoamilo en la fermentación de lactosuero con la cepa <i>K. marxianus</i> ITD00252-P a las 48 h. ....	95
<b>Tabla 22.</b> Comparación de valores experimentales contra valores predichos por el modelo teórico de la validación de la optimización de la producción de acetato de isoamilo en la fermentación del lactosuero empleando la cepa <i>K. marxianus</i> ITD00252-P a las 48 h. ....	96
<b>Tabla 23.</b> ANOVA del modelo cuadrático del diseño central compuesto rotatable para la optimización del pH en la producción de acetato de isoamilo en la fermentación del lactosuero empleando la cepa <i>K. marxianus</i> ITD00252-P a las 48 h. ....	96
<b>Tabla 24.</b> Coeficientes de regresión del modelo y nivel de significancia en la producción de acetato de isoamilo en la fermentación del lactosuero empleando la cepa <i>K. marxianus</i> ITD00252-P a las 48 h. ....	97
<b>Tabla 25.</b> Importancia de los modelos de regresión (valor de F) y efectos de las variables de respuesta de la optimización de la producción de acetato de isoamilo en la fermentación del lactosuero empleando la cepa <i>K. marxianus</i> ITD00252-C a las 12 h. ....	97
<b>Tabla 26.</b> Comparación de los valores experimentales contra los valores teóricos de la validación de la optimización de la producción de acetato de isoamilo en la fermentación del lactosuero con <i>K. marxianus</i> ITD00252-C a las 12 h (solución uno: con concentraciones de 0.311% (v/v) de alcohol isoamílico y de 1.197 g/L de L-leucina). ....	99
<b>Tabla 27.</b> Comparación de los valores experimentales contra los valores teóricos de la validación de la optimización de la producción de acetato de isoamilo en la fermentación de lactosuero con <i>K. marxianus</i> ITD00252-C a las 12 h (solución dos: con concentraciones de 0.267% (v/v) de alcohol isoamílico y de 0.958 g/L de L-leucina). ....	99
<b>Tabla 28.</b> ANOVA del modelo cuadrático del diseño central compuesto rotatable para la optimización del pH en la producción de acetato de isoamilo en la fermentación del lactosuero con <i>K. marxianus</i> ITD00252-C a las 12 h. ....	99
<b>Tabla 29.</b> Coeficientes de regresión del modelo y su nivel de significancia que describen la fermentación del lactosuero con <i>K. marxianus</i> ITD00252-P a las 12 h durante la producción del acetato de isoamilo. ....	100

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema de generación de residuos de la industria quesera. ....	3
<b>Figura 2.</b> Tratamientos comúnmente aplicados a lactosuero. ....	5
<b>Figura 3.</b> Bio-productos generados utilizando lactosuero como fuente de carbono, mediante procesos biológicos. ....	7
<b>Figura 4.</b> Modelo de regulación de permeabilización e hidrólisis de lactosa en <i>Kluyveromyces</i> . ....	12
<b>Figura 5.</b> Vías metabólicas para la biosíntesis de moléculas de aroma y sabor. ....	17
<b>Figura 6.</b> Producción de compuestos aromáticos en levaduras. ....	18
<b>Figura 7.</b> Esquema general de la fase experimental. ....	35
<b>Figura 8.</b> Cinéticas de crecimiento de <i>K. marxianus</i> y consumo de lactosa durante las fermentaciones de lactosuero en tres recipientes de distintas capacidades. ....	49
<b>Figura 9.</b> Monitoreo de pH durante las fermentaciones de lactosuero en tres recipientes de distintas capacidades. ....	50
<b>Figura 10.</b> Cinéticas de producción de etanol durante las fermentaciones de lactosuero en tres recipientes de distintas capacidades. ....	52
<b>Figura 11.</b> Cinéticas de crecimiento de <i>K. marxianus</i> durante las fermentaciones de lactosuero con adición de alcohol isoamílico a distintas concentraciones. ....	56
<b>Figura 12.</b> Concentraciones de lactosa durante las fermentaciones de lactosuero con <i>K. marxianus</i> con adición de alcohol isoamílico a distintas concentraciones. ....	56
<b>Figura 13.</b> Monitoreo de pH durante las fermentaciones de lactosuero con adición de alcohol isoamílico a distintas concentraciones. ....	57
<b>Figura 14.</b> Cinéticas de producción de etanol durante las fermentaciones de lactosuero con <i>K. marxianus</i> con adición de alcohol isoamílico a distintas concentraciones. ....	58
<b>Figura 15.</b> Cinéticas de producción de acetato de isoamilo durante las fermentaciones de lactosuero con <i>K. marxianus</i> con adición de alcohol isoamílico a distintas concentraciones. ....	59
<b>Figura 16.</b> Monitoreo de concentraciones de alcohol isoamílico durante las fermentaciones de lactosuero con <i>K. marxianus</i> con adición de alcohol isoamílico a distintas concentraciones. ....	60
<b>Figura 17.</b> Cinéticas de crecimiento de <i>K. marxianus</i> y consumo de lactosa durante las fermentaciones de lactosuero con adición de L-leucina a distintas concentraciones. ....	62

<b>Figura 18.</b> Cinética de pH durante las fermentaciones de lactosuero con adición de L-leucina a distintas concentraciones. ....	64
<b>Figura 19.</b> Cinéticas de producción de etanol durante las fermentaciones del lactosuero con <i>K. marxianus</i> con adición de L-leucina a distintas concentraciones. ....	65
<b>Figura 20.</b> Cinéticas de producción del alcohol isoamílico durante las fermentaciones del lactosuero con <i>K. marxianus</i> con la adición de L-leucina a distintas concentraciones. ....	65
<b>Figura 21.</b> Cinéticas de producción del acetato de isoamilo durante las fermentaciones del lactosuero con <i>K. marxianus</i> con la adición de L-leucina a distintas concentraciones. ....	66
<b>Figura 22.</b> Comportamiento cinético de la generación de biomasa de <i>Kluyveromyces marxianus</i> ITD00262-P en respuesta a los tratamientos del diseño experimental.....	74
<b>Figura 23.</b> Comportamiento cinético de la generación de biomasa de <i>Kluyveromyces marxianus</i> ITD00262-C en respuesta a los tratamientos del diseño experimental. ....	74
<b>Figura 24.</b> Cinética de consumo de la lactosa por <i>Kluyveromyces marxianus</i> ITD00262-P en los tratamientos del diseño experimental. ....	76
<b>Figura 25.</b> Cinética de consumo de la lactosa por <i>Kluyveromyces marxianus</i> ITD00262-C en los tratamientos del diseño experimental. ....	76
<b>Figura 26.</b> Monitoreo del pH en el medio de fermentación por <i>Kluyveromyces marxianus</i> ITD00262-P durante los tratamientos del diseño experimental. ....	77
<b>Figura 27.</b> Monitoreo del pH en el medio de fermentación por <i>Kluyveromyces marxianus</i> ITD00262-C durante los tratamientos del diseño experimental. ....	77
<b>Figura 28.</b> Producción del acetato de isoamilo por <i>Kluyveromyces marxianus</i> ITD00262-P en los tratamientos del diseño central. ....	78
<b>Figura 29.</b> Producción de acetato de isoamilo por <i>Kluyveromyces marxianus</i> ITD00262-C en los tratamientos del diseño central. ....	79
<b>Figura 30.</b> Superficie de respuesta de la producción de biomasa en la fermentación del lactosuero a las 48 h empleando la cepa <i>Kluyveromyces marxianus</i> ITD00262-P.....	81
<b>Figura 31.</b> Superficie de respuesta de la producción de biomasa en la fermentación del lactosuero a las 12 h empleando la cepa <i>Kluyveromyces marxianus</i> ITD00262-C.....	81
<b>Figura 32.</b> Superficie de respuesta de la concentración de lactosa en la fermentación del lactosuero a las 48 h empleando la cepa <i>Kluyveromyces marxianus</i> ITD00262-P.....	82
<b>Figura 33.</b> Superficie de respuesta de la concentración de lactosa en la fermentación del lactosuero a las 48 h empleando la cepa <i>Kluyveromyces marxianus</i> ITD00262-C.....	82

<b>Figura 34.</b> Superficie de respuesta de la producción de acetato de isoamilo en la fermentación del lactosuero a las 48 h empleando la cepa <i>Kluyveromyces marxianus</i> ITD00262-P. ....	83
<b>Figura 35.</b> Superficies de respuesta de la producción de acetato de isoamilo en la fermentación del lactosuero a las 12 h empleando la cepa <i>Kluyveromyces marxianus</i> ITD00262-C. ....	83
<b>Figura 36.</b> Cinéticas de generación de biomasa y del consumo de lactosa durante la validación de la optimización de la fermentación del lactosuero, comparadas con la cinética de fermentación utilizando <i>K. marxianus</i> adaptada. ....	87
<b>Figura 37.</b> Cinéticas del pH en la validación de la optimización de la fermentación del lactosuero, comparada con la cinética de fermentación utilizando <i>K. marxianus</i> adaptada. ....	88
<b>Figura 38.</b> Cinéticas de la producción de etanol durante la validación de la optimización de la fermentación del lactosuero, comparada con la cinética de fermentación utilizando <i>K. marxianus</i> adaptada. ....	89
<b>Figura 39.</b> Cinéticas de la producción de acetato de isoamilo durante la validación de la optimización de la fermentación del lactosuero, comparada con la cinética de fermentación utilizando <i>K. marxianus</i> adaptada. ....	90

## RESUMEN

El lactosuero es un subproducto de la industria quesera, el cual constituye entre el 80 y 90% del volumen de la leche procesada. Su alto contenido de materia orgánica, asociado principalmente a su contenido de lactosa, proteínas y grasas, lo convierte en un residuo de interés ambiental, por su elevado potencial contaminante cuando es desechado sin tratamiento, ocasionando alteraciones en suelos y cuerpos freáticos. Sin embargo, esta composición también lo convierte en un sustrato atractivo para su valorización biotecnológica mediante fermentación microbiana. En este marco, la presente investigación evaluó el uso de lactosuero crudo como fuente de carbono para la producción de acetato de isoamilo, un compuesto de interés industrial caracterizado por su aroma a plátano, empleando la levadura *Kluyveromyces marxianus* como biocatalizador.

La investigación se llevó a cabo con el objetivo de disminuir la carga orgánica del lactosuero y simultáneamente obtener un producto de valor agregado. Se emplearon como precursores metabólicos el alcohol isoamílico y la L-leucina, compuestos involucrados en la ruta de Ehrlich la cual es responsable de la formación de alcoholes superiores y de ésteres volátiles. El proceso fermentativo fue optimizado a través de un diseño central compuesto rotatable de superficie de respuesta, considerando como variables la concentración de los precursores y evaluando como respuestas la producción de acetato de isoamilo, el consumo de lactosa y la generación de biomasa.

Los resultados demostraron que *K. marxianus* tuvo la capacidad de metabolizar y crecer eficientemente en el lactosuero sin necesidad de pretratamientos como la desproteinización, la clarificación o la concentración, reduciendo la cantidad de lactosa presente hasta en un 99.7%. Se observó que la adición de L-leucina favoreció significativamente la conversión de la lactosa y la producción de metabolitos secundarios, en comparación con el alcohol isoamílico exógeno, el cual mostró efectos inhibitorios a concentraciones iguales o superiores al 0.75%. Las condiciones óptimas de fermentación se determinaron con 0.267% (v/v) de alcohol isoamílico y 0.958 g/L de L-leucina, lo que resultó en la producción de 35 mg/L de acetato de isoamilo, verificada experimentalmente mediante cromatografía de gases.

Asimismo, se llevó a cabo una fase de adaptación fisiológica de la levadura, la cual incrementó la tolerancia al estrés osmótico y mejoró la estabilidad metabólica, lo que

permitió aumentar la síntesis de compuestos volátiles. Este método adaptativo permitió la modificación de la expresión de las enzimas alcohol acetiltransferasas sin necesidad de ingeniería genética, lo que brinda beneficios en términos biotecnológicos y regulatorios para su aplicación industrial.

Los resultados obtenidos confirman que el lactosuero crudo tiene el potencial de ser un fermentativo viable para la obtención de bioaromas naturales, además representan una estrategia sustentable para mitigar su impacto ambiental. Finalmente, este estudio contribuye al desarrollo de tecnologías limpias fundamentadas en la economía circular, ya que transforma un residuo agroindustrial en un producto de alto valor comercial mediante procesos biotecnológicos sostenibles, estableciendo las bases para su aplicación a escala piloto o industrial en la producción de compuestos aromáticos.



## ABSTRACT

Whey is a byproduct of the cheese industry, constituting between 80 and 90% of the volume of processed milk. Its high organic matter content, primarily due to its lactose, protein, and fat content, makes it a waste product of environmental concern because of its high polluting potential when dried without treatment, causing alterations in soils and groundwater. However, this same composition also makes it an attractive substrate for biotechnological valorization through microbial fermentation. In this context, the present research evaluated the use of raw whey as a carbon source for the production of isoamyl acetate, an industrially important compound characterized by its banana aroma, using the yeast *Kluyveromyces marxianus* as a biocatalyst.

The research was conducted with the objective of reducing the organic load of whey and simultaneously obtaining a value-added product. Isoamyl alcohol and L-leucine were used as metabolic precursors. These compounds are involved in the Ehrlich pathway, which is responsible for the formation of higher alcohols and volatile esters. The fermentation process was optimized using a central composite rotating response surface design, considering the concentration of the precursors as variables and evaluating isoamyl acetate production, lactose consumption, and biomass generation as responses.

The results demonstrated that *K. marxianus* was able to metabolize and grow efficiently in whey without the need for pretreatments such as deproteinization, clarification, or concentration, reducing the amount of lactose present by up to 99.7%. The addition of L-leucine significantly favored lactose conversion and the production of secondary metabolites compared to exogenous isoamyl alcohol, which showed inhibitory effects at concentrations of 0.75% or higher. Optimal fermentation conditions were determined using 0.267% (v/v) isoamyl alcohol and 0.958 g/L L-leucine, resulting in the production of 35 mg/L isoamyl acetate, experimentally verified by gas chromatography.

A physiological adaptation phase was also carried out on the yeast, which increased its tolerance to osmotic stress and improved its metabolic stability, thus enabling increased synthesis of volatile compounds. This adaptive method allowed for the modification of alcohol acetyltransferase enzyme expression without the need for genetic engineering, offering biotechnological and regulatory benefits for its industrial application.

The results obtained confirm that raw whey has the potential to be a viable fermentative medium for obtaining natural bioflavors and also represent a sustainable strategy for mitigating its environmental impact. Finally, this study contributes to the development of clean technologies based on the circular economy, since it transforms an agro-industrial waste into a product of high commercial value through sustainable biotechnological processes, establishing the basis for its application on a pilot or industrial scale in the production of aromatic compounds.

## INTRODUCCIÓN

La leche y sus derivados son ampliamente consumidos a nivel mundial con una producción de 965 millones de toneladas (Mt) en el año 2023 y con una proyección de incremento del 1.1% para el año 2024. Se estima que en 2025 la producción mundial de leche llegue a  $\approx 993$  Mt, esta cifra crecerá un  $\approx 1.5\%$  anual durante la próxima década debido al aumento poblacional. En este contexto, cerca del 30% de la producción total de leche se utiliza para elaborar productos como queso, mantequilla, leche descremada en polvo, leche entera en polvo o suero en polvo, generando lactosuero como residuo agrícola (OECD/FAO, 2024). Por su parte, en México el consumo de queso alcanzó 630,000 toneladas en 2023 (USDA, 2025).

Este proceso genera preocupaciones ambientales, debido a que el 90% del volumen de leche utilizada para la producción de quesos se desecha como lactosuero, con un alto contenido orgánico asociado principalmente a su contenido de lactosa (45-60 g/L), proteínas, lípidos, sales, entre otros (González-Siso, 1996; Prazeres, Carvalho, & Rivas, 2012). Es de destacarse que del total de lactosuero generado, solo el 53% es tratado antes de ser desechado; el resto se vierte en suelos o cuerpos de agua debido a que pequeñas y medianas empresas no cuentan con sistemas de gestión principalmente por los costos que esto involucra (Abboud, Aljundi, Khleifat, & Dmour, 2010; Ghasemi et al., 2009; Grba, Stehlik-Tomas, Stanzer, Vahèia, & Škrln, 2002; Ozmihi & Kargi, 2007; Prazeres et al., 2012).

La composición de este subproducto de la industria quesera presenta una Demanda Biológica de Oxígeno (DBO) de 40-60 g/L y una Demanda Química de Oxígeno (DQO) de 50-80 g/L, ocasionando un grave impacto ambiental al desecharlo sin tratamiento previo, provocando alteraciones en sistemas bióticos y abióticos (Athanasiadis, Paraskevopoulou, Blekas, & Kiosseoglou, 2004; Panesar, Kennedy, Gandhi, & Bunko, 2007). Esto ha impulsado el desarrollo de alternativas innovadoras para valorizar el lactosuero, aprovechándolo como fuente de carbono en la producción de diversos productos, como el acetato de isoamilo (aroma a plátano), contribuyendo así a mitigar su impacto ambiental.

# 1. MARCO TEÓRICO

## 1.1 Lactosuero

El lactosuero, derivado de la precipitación de la caseína durante la producción de queso, constituye entre el 85 y 95% del volumen total de la leche procesada, siendo el principal residuo generado por esta industria (González-Siso, 1996).

### 1.1.1 Composición y características generales

Las características que presentan estos efluentes varían según el producto manufacturado, el clima de la región donde se encuentra la vaca, las condiciones operativas y los métodos de limpieza industrial. Entre las principales industrias productoras de lactosuero destacan las de yogurt, mantequilla, leche, helado y, en particular, queso, que genera un alto volumen de residuos líquidos (Pattnaik et al., 2007).

La elevada carga orgánica del lactosuero se debe, principalmente, a su alto contenido de lactosa, que está presente en concentraciones entre 45 y 60 g/L. Este disacárido, compuesto por una unidad de  $\alpha$ -D-glucosa y otra de  $\beta$ -D-galactosa mediante un enlace  $\beta$ -1,4-glicosídico, se identifica sistemáticamente como 4-O- $\beta$ -galactopiranosil-D-glucopiranososa ( $C_{12}H_{22}O_{11}$ ) (Guimaraes, Teixeira, & Domingues, 2010).

La Tabla 1 presenta los principales componentes del lactosuero, los cuales además de lactosa, incluyen proteínas solubles, lípidos, sales minerales y otros compuestos menores (Prazeres et al., 2012).

**Tabla 1.** Componentes del lactosuero.

Lactosa	45-60 g/L
Proteína soluble	6-8 g/L
Lípidos	4-5 g/L
Sales Minerales	8-10 % extracto seco
Otros	Ácido láctico, urea, ácido úrico, vit. B.

(Adaptado de Prazeres et al., 2012)

En términos de proteínas, el lactosuero contiene una mezcla heterogénea, como la  $\beta$ -lactoglobulina (40-50% p/p),  $\alpha$ -lactoalbúmina (12-15% p/p), inmunoglobulinas (8% p/p) y

pequeñas cantidades de albúmina, lactoferrina, lactoperoxidasa, proteosa-peptona y glicomacropéptido (Madureira et al., 2007).

Entre los componentes inorgánicos predominan NaCl y KCl, que superan el 50% de la fracción salina, junto con sales de calcio (principalmente en forma de fosfatos). También se encuentran presentes ácidos como el láctico y el cítrico, compuestos de nitrógeno no proteico (urea y ácido úrico) y vitaminas del grupo B (González-Siso, 1996).

### 1.1.2 Tipos de lactosuero

El lactosuero se clasifica en función del método utilizado para la coagulación-precipitación de la caseína durante la fabricación del queso. La precipitación con proteínas proteolíticas (cuajo), genera lactosuero dulce, con un pH cercano a 6.5. Por otro lado, el uso de compuestos ácidos (orgánicos o minerales) produce un lactosuero ácido, cuyo pH es inferior a 5. Estas diferencias en el proceso están directamente relacionadas con la cantidad de residuos minerales presentes en los efluentes, siendo el lactosuero ácido más rico en fosfatos, calcio y lactato (Tabla 2) (Jelen, 2002; Panesar et al., 2007).

**Tabla 2.** Composición general de los tipos de lactosuero.

Componente	Lactosuero (g/L)	
	Dulce	Ácido
Sólidos totales	63.0-70.0	63.0-70.0
Lactosa	46.0-52.0	44.0-46.0
Proteína	6.0-10.0	6.0-8.0
Calcio	0.4-0.6	1.2-1.6
Fosfatos	1.0-3.0	2.0-4.5
Lactato	2.0	6.4
Cloruros	1.1	1.1

Tomado de Jelen, (2002).

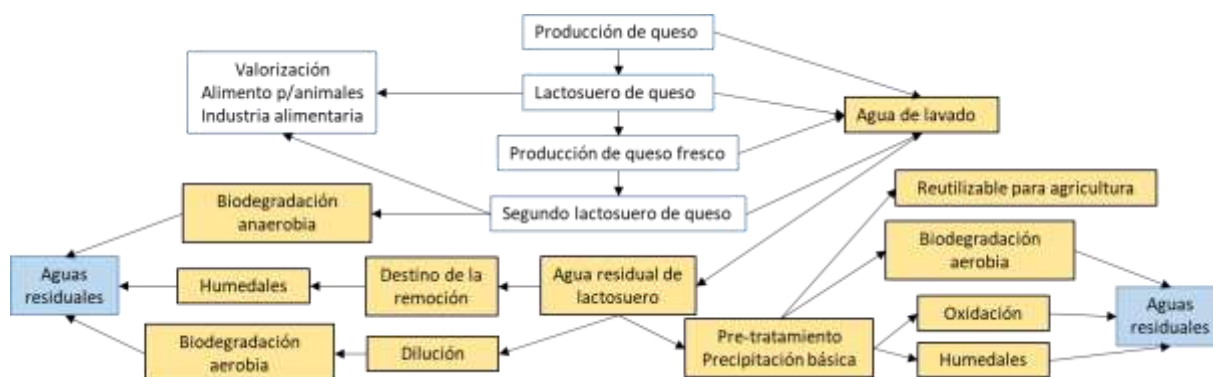
A pesar de ser considerado un residuo industrial, el lactosuero contiene altos niveles de lactosa y de proteína, lo que le confiere un significativo valor nutricional. Según Ergüder et al. (2001), cerca del 99% de sus componentes son biodegradables, aunque su tratamiento resulta complejo debido a la diversidad y variabilidad de sus elementos.

## 1.2 Producción mundial, nacional y estatal

Como se mencionó en el apartado 1.1.1, la industria láctea, particularmente la dedicada a la producción de helado, mantequilla y queso, constituye la principal fuente generadora de

lactosuero. El queso, considerado el segundo producto lácteo procesado más consumido a nivel mundial (OECD/FAO, 2021), produce tres tipos de residuos líquidos durante su elaboración como se ilustra en la Figura 1. El primero, conocido como “lactosuero de queso”, proviene de la precipitación de la caseína en la producción de quesos. El “segundo lactosuero de queso”, se obtiene a partir del aprovechamiento del primer residuo para la obtención de productos como el requesón. Mientras que, el tercer residuo resulta de la mezcla de los dos lactosueros anteriores junto con los efluentes generados durante la limpieza de los equipos (Pires et al., 2021; Prazeres et al., 2012; Zotta et al., 2020).

A nivel global, se estima una producción mundial anual de aproximadamente  $10^8$  toneladas de lactosuero. De esta cantidad, solo el 53% recibe algún tipo de tratamiento previo a su disposición, mientras que el 47% restante se descarga directamente en cuerpos de agua o suelos, sin control ni remediación, lo cual constituye una práctica común que requiere medidas para minimizar los daños ambientales (Ghasemi et al., 2009; Grba et al., 2002; Prazeres et al., 2012). Por su parte en México, de acuerdo con cifras del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), durante el año 2021 se produjeron alrededor de 516 toneladas de queso, lo que corresponde a la generación de aproximadamente 4,500 toneladas de lactosuero como subproducto.



**Figura 1.** Esquema de generación de residuos de la industria quesera.  
Tomado de Carvalho et al. (2013).

En la producción de queso, la gestión del lactosuero como residuo enfrenta tres principales desafíos: 1) alto costo del tratamiento, estimado en US\$ 0.50/kg de DQO removida (Ozmihci & Kargi, 2007), 2) los elevados costos de transporte, debido a su alto contenido de agua y 3) la dificultad de almacenamiento prolongado por el riesgo de deterioro causado por bacterias y hongos (Abboud et al., 2010; Ozmihci & Kargi, 2007). Aunque el tratamiento de este efluente presenta obstáculos, su revalorización como insumo para la alimentación

animal o como sustrato en bioprocesos, es una alternativa prometedora para reducir su impacto ambiental. Actualmente, se ha intensificado la investigación orientada al desarrollo de tecnologías emergentes para su tratamiento y aprovechamiento como materia prima para la obtención de productos de valor agregado (Delgado-Macuil et al., 2025).

### **1.3 Impacto ambiental**

El vertido no controlado del lactosuero genera impactos ambientales severos, atribuibles principalmente a su alto contenido de materia orgánica, incluyendo lactosa, proteínas, grasas y sales minerales. En el caso de su disposición sobre suelos, este residuo altera las características fisicoquímicas y biológicas del medio, afectando negativamente la aireación, la disponibilidad de nutrientes, reduciendo la productividad agrícola. Cuando es descargado en cuerpos de agua, el lactosuero provoca consumo excesivo de oxígeno, provocando fenómenos como la impermeabilización, la eutrofización, la toxicidad por amonio, entre otros, afectando la vida acuática (Panesar et al., 2007; Prazeres et al., 2012).

En este sentido, el crecimiento de las industrias queseras ha resultado en un incremento proporcional en la generación de lactosuero, lo que refuerza la importancia de su correcta gestión para minimizar daños ambientales (Prazeres et al., 2012). La magnitud del impacto de este residuo se cuantifica mediante indicadores como la Demanda Biológica de Oxígeno (DBO) y la Demanda Química de Oxígeno (DQO), que reflejan la disponibilidad de oxígeno para procesos biológicos. Los valores de DBO y DQO del lactosuero oscilan entre 0.1 y 100 Kg/m<sup>3</sup>, con un índice de biodegradabilidad (DBO<sub>5</sub>/DQO) de 0.4-0.8 (Prazeres et al., 2012).

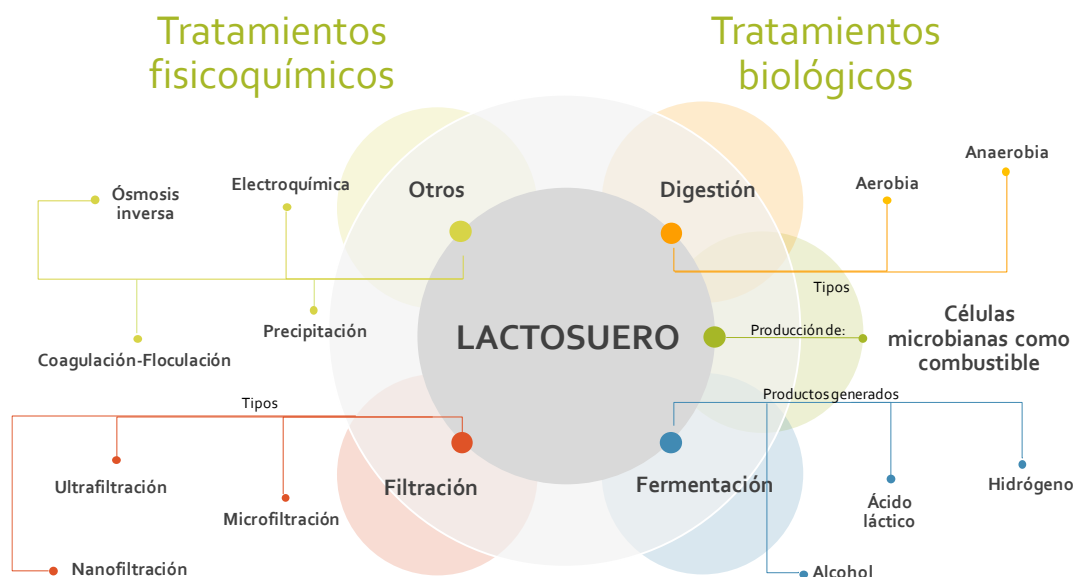
Además de materia orgánica, el lactosuero contiene sales minerales como calcio, potasio y sodio (0.46-10%), responsables de la contaminación inorgánica en cuerpos receptores. Sin embargo, estas sales también pueden ser aprovechadas mediante su recuperación en forma de precipitados químicos, lo que ofrece una vía adicional para su valorización (Dragone, Mussatto, Oliveira, & Teixeira, 2009).

El lactosuero, debido a sus características significativamente diferentes con respecto a las aguas residuales comunes, representa un considerable contaminante, lo que ha llevado a gobiernos y autoridades regulatorias a prohibir su vertido sin tratamiento previo, exigiendo su gestión mediante tecnologías adecuadas (Smithers, 2015). Estas restricciones han incentivado la búsqueda de alternativas para su tratamiento, enfocándose en comprender sus componentes y posibles aplicaciones.

En este contexto, los residuos agroindustriales, en particular el lactosuero generado en la obtención de queso, tienen un alto potencial para ser aprovechados como materia prima en procesos de bioconversión, lo que puede contribuir simultáneamente a la mitigación de su impacto ambiental y a la generación de productos con valor comercial.

#### 1.4 Tratamiento de lactosuero

El lactosuero, como se ha mencionado previamente, es un efluente con valor nutricional debido a su alto contenido orgánico y mineral. Este residuo ha sido sometido a diversos tratamientos, que incluyen procesos biológicos con o sin valorización, métodos fisicoquímicos, o simplemente se ha vertido directamente en el ambiente. En este contexto, Prazeres et al. (2012), clasifican dos tipos principales de tratamientos para este residuo. Los primeros involucran tratamientos fisicoquímicos, que abarcan procesos como la precipitación, la coagulación-floculación, la filtración, entre otros. La segunda vertiente involucra tratamientos biológicos, dentro de los cuales se incluyen métodos como las digestiones aerobia y anaerobia, la hidrólisis de la lactosa, la fermentación para obtener metabolitos de interés (como etanol, hidrógeno o ácido láctico) y procesos bioelectroquímicos como las celdas de combustible microbianas (Figura 2).



**Figura 2.** Tratamientos comúnmente aplicados a lactosuero.  
Adaptado de Prazeres et al. (2012).

Entre las características que intervienen y limitan la selección del tratamiento del lactosuero, destacan la variabilidad del mismo, entre los cuales se incluyen factores como la diferencia



de la carga orgánica, el pH, la temperatura, la diversidad de la actividad biológica y la competencia microbiana. Particularmente, los procesos fisicoquímicos como la precipitación, la electroquímica y la coagulación-floculación, permiten la remoción parcial de compuestos orgánicos, logrando recuperar hasta un 90% de las proteínas, aunque con baja eficiencia en la eliminación de lactosa, que es el principal responsable de la contaminación orgánica (Prazeres et al., 2012; Sánchez-Moya et al., 2020).

Por otro lado, tecnologías de separación por membranas como la nano-filtración y la ósmosis inversa, han demostrado ser altamente eficaces, logrando reducir la DQO en un rango del 74 al 98%. Sin embargo, la implementación de estas técnicas es limitada, debido a su alto costo económico, principalmente para pequeñas y medianas industrias queseras. Además, es importante considerar que, aunque la mayoría de los tratamientos reducen la DQO del efluente, esto no garantiza que el residuo final cumpla con los estándares necesarios para su vertido en el ambiente, debido a que las concentraciones suelen exceder los límites aceptables, lo que puede ocasionar problemas ambientales significativos, que contribuyen a la eutrofización de cuerpos de agua receptores (Prazeres et al., 2012).

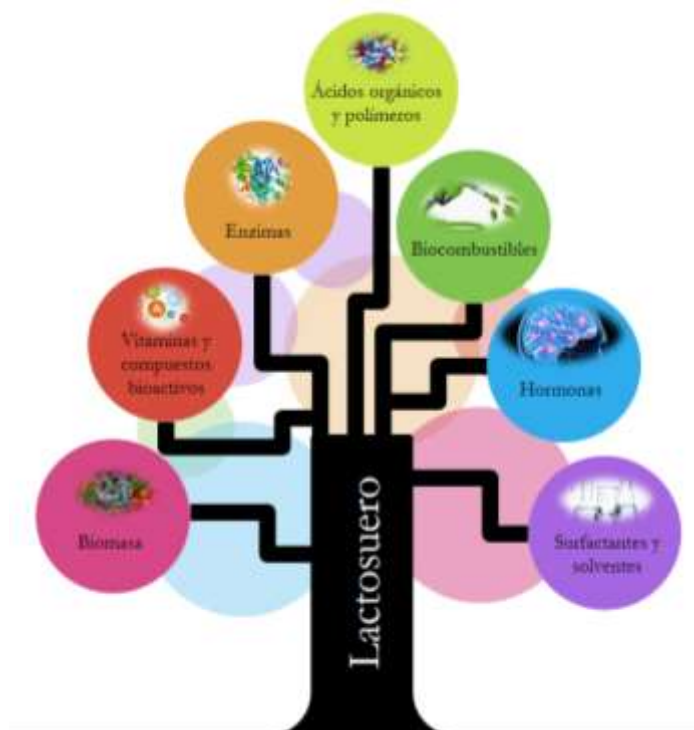
#### **1.4.1 Procesos biológicos para el tratamiento de lactosuero**

La selección del tratamiento adecuado para reducir el impacto ambiental del lactosuero se convierte en un desafío derivado de la complejidad y de la variabilidad de su composición. No obstante, la elección del proceso debe considerar, además de la composición del efluente, factores como el volumen generado, las tecnologías disponibles, la normativa ambiental aplicable y los costos asociados al tratamiento, la valorización y el destino final de los subproductos obtenidos (Prazeres et al., 2012).

Como resultado de lo anterior, el tratamiento biológico de residuos agroindustriales ofrece una alternativa integral de gestión de este residuo. Según lo reportado por Sar et al. (2022), el lactosuero puede ser empleado como sustrato para la obtención de una diversidad de bioproductos, entre los que destacan biomasa, vitaminas, compuestos bioactivos, ácidos orgánicos, surfactantes, solventes, biocombustibles, hormonas, polímeros y enzimas (Figura 3). Además, en años recientes, su uso en fermentaciones dirigidas a la producción de etanol ha recibido especial atención, como se discute en el apartado de antecedentes.

Es importante señalar que, aunque la mayoría de los tratamientos convencionales y emergentes tienen como objetivo principal la valorización y el tratamiento de lactosuero,

resulta crucial que los subproductos generados sean adecuadamente caracterizados y tratados antes de su eliminación definitiva. En este aspecto, la información disponible sigue siendo limitada (Prazeres et al., 2012; Mamani Condori et al., 2024).



**Figura 3.** Bio-productos generados utilizando lactosuero como fuente de carbono, mediante procesos biológicos. Adaptado de Sar et al. (2022).

Considerando la información revisada, es importante tomar en cuenta la implementación combinada de distintas tecnologías para reducir el impacto ambiental del lactosuero. Sin embargo, esta elección dependerá en gran medida del potencial técnico y económico de la unidad productiva. La limitada información sobre el manejo integral de este efluente, debido a la complejidad de su composición, representa un desafío adicional. Por esta razón, el uso de microorganismos constituye una alternativa prometedora para la gestión integral de este residuo, ya que no solo reduce su contenido orgánico, sino que también permite la obtención de productos con aplicaciones industriales.

#### 1.4.2 Fermentación

La fermentación es un proceso metabólico predominantemente anaeróbico, mediante el cual los microorganismos transforman sustratos orgánicos en energía y en productos finales

como ácidos, alcoholes o gases. Tradicionalmente, este término se ha asociado a reacciones bioquímicas ejecutadas por bacterias y levaduras, responsables de conferir propiedades organolépticas específicas a productos alimentarios. No obstante, en un contexto más amplio, el término fermentación también se extiende a procesos aeróbicos, como la fermentación oxidativa del ácido acético o la acción de hongos filamentosos en la producción de enzimas (Nout, 2024).

En este sentido, los microorganismos representan la base esencial de los procesos fermentativos, ya que deben encontrarse en cantidades suficientemente altas y mantener una actividad metabólica óptima para tener un efecto en la composición de los ingredientes y alcanzar las características deseadas en el producto final (Nout, 2024).

Según Nout (2024), existen dos enfoques principales en la fermentación. El primero, conocido como fermentación natural o no controlada, se caracteriza por la ausencia de microorganismos añadidos al medio de fermentación. Una de sus ventajas es que permite la adaptación natural de los microorganismos presentes, favoreciendo el crecimiento selectivo de aquellos más adecuados para el proceso. En este tipo de fermentación, el medio no se somete a calentamiento previo, a menos que se busque estimular la acción de microorganismos termoresistentes. Además, las condiciones del proceso pueden incluir la exclusión del aire en recipientes cerrados, lo que favorece el predominio de microorganismos anaeróbicos facultativos.

El segundo enfoque es la fermentación mediada por cultivos, que consiste en la inoculación controlada de microorganismos fermentativos deseables al medio de fermentación, asegurando condiciones favorables para su crecimiento y actividad metabólica. Este método puede emplear distintos tipos de cultivos:

- 1) Enriquecimientos naturales. Consorcios microbianos que pueden estar presentes en el equipo, el entorno de procesamiento y en otros medios naturales.
- 2) Cultivos tradicionales multicepa. Mezclas microbianas concentradas, ya sea en forma líquida o seca, que contiene una flora microbiana mixta.
- 3) Cultivos puros. Cepas puras de bacterias u hongos seleccionadas y controladas en laboratorio, seleccionadas para garantizar resultados de fermentación deseados.

Los sistemas de producción en fermentaciones se pueden clasificar según su modo de operación y el tipo de control de proceso, como se muestra a continuación:

**Fermentación por lote (Batch).** Este método simple, ampliamente utilizado en la industria, consiste en la adición de la totalidad del sustrato y de los nutrientes al recipiente en el momento de la inoculación. La fermentación se desarrolla en condiciones controladas hasta alcanzar la concentración deseada del producto (Ingledew & Lin, 2011).

**Fermentación por lote alimentado (Fed-Batch).** En este sistema, el nutriente limitante se incorpora de manera progresiva durante la fermentación, permitiendo controlar la velocidad de reacción. El caldo de cultivo no se retira del reactor hasta el final del proceso, lo que minimiza el riesgo de contaminación asociado a los sistemas continuos (Srivastava & Gupta, 2011).

**Fermentación por lote continuo.** Este tipo de proceso es eficiente para la producción a gran escala, ya que mantiene un flujo constante de entrada de nutrientes y de salida de producto. La producción es estable y sostenida en el tiempo, mientras que las células permanecen en una fase de crecimiento predefinida (Ingledew & Lin, 2011).

#### 1.4.3 Importancia de los parámetros cinéticos

La optimización de los procesos fermentativos requiere el monitoreo y el análisis de los parámetros cinéticos que permiten evaluar el rendimiento del sistema microbiano y su capacidad para transformar el sustrato en productos deseados. Estos parámetros son esenciales para diseñar estrategias de operación y escalar bioprocesos de manera eficiente (Duarte, 1998; Zapata, 2005). Entre los más relevantes destacan:

- $\mu$ : velocidad específica de crecimiento microbiano ( $\text{h}^{-1}$ ).
- $\mu_{max}$ : velocidad específica máxima de crecimiento en condiciones óptimas.
- $Y_{x/s}$ : rendimiento de biomasa generada sobre sustrato consumido (g/g).
- $Y_{p/s}$ : rendimiento de producto sobre sustrato consumido (g/g).
- $P$ : productividad volumétrica ( $\text{g/L}\cdot\text{h}$ ).
- $(r_s)$ : velocidad de consumo de sustrato ( $\text{g/L}\cdot\text{h}$ )

La evaluación de los parámetros cinéticos se realiza utilizando técnicas experimentales y modelos matemáticos. Algunos de estos métodos incluyen:

- Cuantificación de biomasa, mediante técnicas como espectrofotometría, peso seco y conteo celular.

- Cuantificación de metabolitos, empleando técnicas como cromatografía de gases o de líquidos, para determinar la concentración de productos como etanol, ácido láctico, entre otros.
- Modelado matemático, donde se utilizan ecuaciones como la de Monod o Michaelis-Menten para describir la cinética de crecimiento y de consumo de sustrato.
- Curvas de fermentación, que representan gráficamente la evolución temporal de la biomasa, el sustrato y el producto.

## 1.5 Microorganismos en la fermentación del lactosuero

Es de conocimiento general que los microorganismos, como ciertas bacterias, hongos y levaduras, desempeñan un papel fundamental en la fermentación industrial y en la bioconversión de residuos industriales. En particular, estos microorganismos han sido clave en la producción de alimentos como yogurt, pan, queso, vino y cerveza, así como en aplicaciones ambientales relacionadas con la reducción del impacto ambiental de residuos complejos, como el lactosuero (Rodríguez, 2016; Barreto, 2018).

Entre los componentes predominantes del lactosuero destaca la lactosa, un disacárido cuya asimilación requiere de sistemas enzimáticos específicos. En este contexto, algunas levaduras presentan la capacidad de metabolizar la lactosa, ya sea mediante hidrólisis extracelular o intracelular. Uno de los microorganismos más estudiados por su eficiencia en este proceso es *Kluyveromyces marxianus*, una levadura capaz de utilizar directamente la lactosa como fuente de carbono y de energía (González-Siso, 1996).

El mecanismo principal de aprovechamiento de la lactosa por esta levadura implica la acción de la enzima  $\beta$ -galactosidasa (lactasa), la cual cataliza la hidrólisis de la lactosa en sus monosacáridos constituyentes: glucosa y galactosa. Este paso es fundamental para el ingreso de dichos azúcares en las rutas centrales del metabolismo energético, como la glucólisis y la vía de Leloir (Nath et al., 2015).

### 1.5.1 *Kluyveromyces marxianus*

El género *Kluyveromyces* agrupa levaduras aisladas de diversas fuentes ecológicas, tales como moscas de la fruta, de la vegetación, del agua de mar y de productos lácteos. De sus 6 especies identificadas, *Kluyveromyces lactis* y *Kluyveromyces marxianus* son las más relevantes para la industria láctea, dada su aplicación en procesos de maduración de

distintas variedades de queso y en la producción de leche fermentada, como el kéfir (Mounier & Coton, 2022).

Las investigaciones han demostrado que la fisiología heterogénea de *K. marxianus* y la información genómica limitada, son factores clave para comprender su biología celular y su diversidad metabólica. Esta versatilidad ha permitido el desarrollo de diversas aplicaciones biotecnológicas, incluyendo la producción de enzimas, su uso en aplicaciones unicelulares, así como el desarrollo de bio-ingredientes a partir del lactosuero, además, ha propiciado el descubrimiento de metabolitos con actividades biológicas de gran relevancia (Mounier & Coton, 2022).

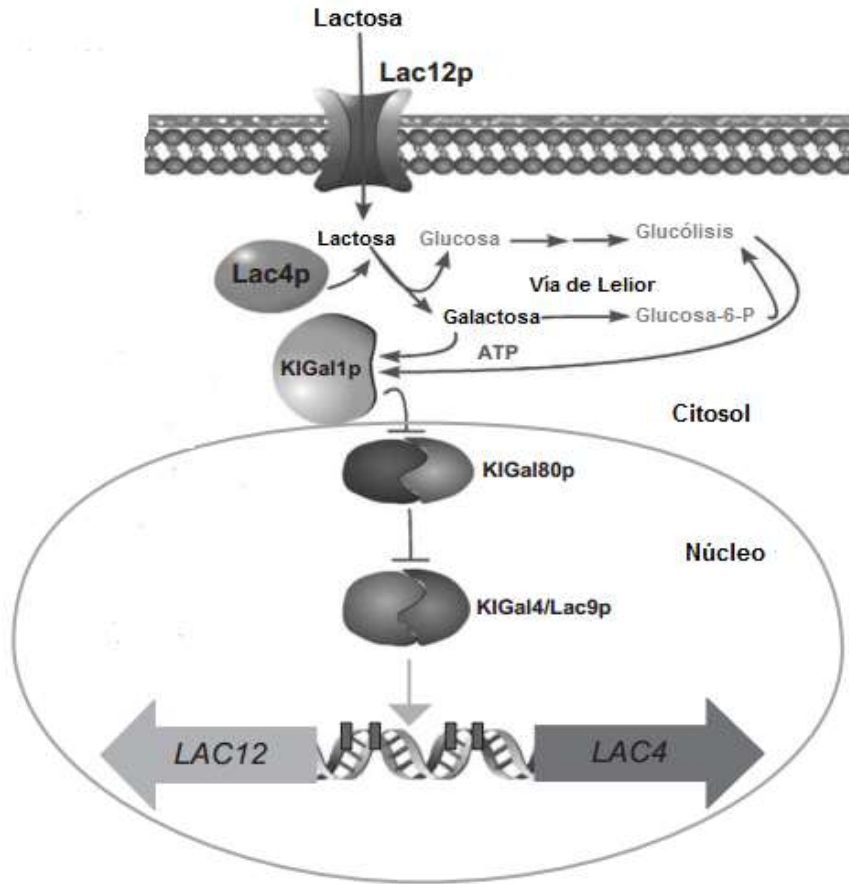
**Tabla 3.** Clasificación taxonómica de *Kluyveromyces marxianus*.

Reino: <i>Fungi</i>	Sinónimo: <i>Kluyveromyces fragilis</i>
Filo: <i>Ascomycota</i>	
Sub filo: <i>Saccharomycotina</i>	Sinónimo: <i>Kluyveromyces cicerispori</i>
Clase: <i>Saccharomycetes</i>	
Orden: <i>Saccharomycetales</i>	Sinónimo: <i>Candida pseudotropicalis</i>
Familia: <i>Saccharomycetaceae</i>	
Género: <i>Kluyveromyces</i>	Amorfo: <i>Candida kefir</i>
Especie: <i>Kluyveromyces marxianus</i> (E.C.Hansen) Van der Walt	

(NCBI, s.f).

La levadura *K. marxianus* (E. C. Hansen) Van der Walt, también conocida como *Kluyveromyces fragilis*, pertenece a la familia *Saccharomycetaceae* (Tabla 3). Esta levadura cuenta con el estatus GRAS (por sus siglas en inglés: Generally Recognised as Safe), lo que garantiza su inocuidad para usos alimentarios. Esta condición la posiciona como una alternativa competitiva frente a *S. cerevisiae* y *K. lactis*, con la ventaja adicional de su capacidad para asimilar la lactosa (Gantumur et al., 2022; Hensing et al., 1995).

Fisiológicamente, *K. marxianus* posee un metabolismo respiratorio-fermentativo facultativo, similar al de *S. cerevisiae*, por lo que es capaz de producir ATP, tanto mediante fosforilación oxidativa, a través del ciclo del TCA, así como mediante la fermentación alcohólica, transformando azúcares en etanol (Fonseca et al., 2008; Lane et al., 2011). Entre las condiciones de crecimiento más destacadas de *K. marxianus* se encuentra su capacidad para crecer en leche a 25 °C, alcanzando poblaciones de 10<sup>8</sup> UFC/mL en un periodo de tres días. En fermentaciones donde la lactosa actúa como sustrato, su eficiencia depende de la temperatura: a 10 °C metaboliza aproximadamente el 70% de la lactosa disponible, mientras que a 25 °C alcanza el 100% (Mounier & Coton, 2022).



**Figura 4.** Modelo de regulación de permeabilización e hidrólisis de lactosa en *Kluyveromyces*.  
Tomado de Rubio-Teixeira, (2006).

Una ventaja competitiva de esta levadura es su termotolerancia. A diferencia de *S. cerevisiae*, cuya temperatura máxima de crecimiento se limita a 39 °C, *K. marxianus* puede crecer hasta los 50 °C, lo cual permite reducir costos de enfriamiento en procesos industriales (Choudhary et al., 2016; Hong et al., 2007; Trip & Youk, 2020). Por otro lado, su tolerancia salina también es notable: a una concentración de sal del 15%, el crecimiento máximo alcanza concentraciones de hasta 10<sup>5</sup> UFC/mL (Mounier & Coton, 2022).

El Metabolismo de la lactosa en *K. marxianus* involucra dos proteínas clave: la permeasa Lac12p, responsable del transporte activo del disacárido hacia el citoplasma y la β-galactosidasa citosólica Lac4p, que cataliza su hidrólisis en glucosa y galactosa. Mientras que la glucosa puede entrar directamente en la vía glucolítica, la galactosa requiere su conversión en glucosa-6-fosfato a través de la vía de Leloir (Figura 4) (Rubio-Teixeira, 2006; Lane & Morrissey, 2010).

La identificación de esta levadura se realiza comúnmente mediante pruebas de asimilación de diversas fuentes de carbono y de su perfil enzimático. Además, a diferencia de *K. lactis*, *K. marxianus* es la única especie capaz de metabolizar inulina, lo que constituye un rasgo distintivo que puede emplearse como criterio para su identificación (Lane et al., 2011; Varela et al., 2017; Arrizon et al., 2011).

Además, el potencial de *K. marxianus* para sintetizar compuestos volátiles con propiedades sensoriales y aplicaciones comerciales está siendo explorado actualmente (Morrissey et al., 2015). Entre los compuestos estudiados destacan los ésteres de alcoholes superiores, como el 2-feniletanol, el acetato de 2-feniletilo, acetato de etilo y el acetato de isoamilo (Mounier & Coton, 2022).

Como se detalla en la Tabla 4, la capacidad de *K. marxianus* para transformar lactosa en compuestos aromáticos con valor comercial, tal es el caso de acetato de isoamilo, la convierte en una herramienta biotecnológica atractiva. Sin embargo, la complejidad del lactosuero como sustrato impone retos que deben abordarse mediante ajustes de formulación, condiciones de cultivo y selección de cepas, a fin de maximizar el rendimiento (Dragone et al., 2009).

## **1.6 Aromas generados en la fermentación y rutas metabólicas**

En el contexto de la fermentación de bebidas y de alimentos, la producción de compuestos volátiles es un fenómeno de alto impacto sensorial. Aunque el término “olor” se utiliza de forma general, en la literatura técnica se prefiere el término “aroma” para designar aquellas sustancias volátiles percibidas como agradables, mediante el sentido del olfato. Estas moléculas, incluso en concentraciones muy bajas, pueden modificar significativamente el perfil organoléptico de los productos fermentados (Badui, 2006).

Durante la fermentación, además del etanol producido, se genera una amplia variedad de compuestos, como carbonílicos, alcoholes superiores, ésteres, ácidos y acetales. Las concentraciones de estos compuestos pueden variar ampliamente: algunos se encuentran en niveles elevados (cientos de mg/L), mientras que otros aparecen en cantidades significativamente más bajas (incluso en ng/L). En años recientes, se han intensificado las investigaciones sobre la actividad sensorial de los componentes individuales de los olores de los alimentos y de las bebidas alcohólicas, así como la relación entre el olor y la



composición química de la fracción volátil de estos productos (Plutowska & Wardencki, 2008).

Un ejemplo destacado es el estudio de Dragone et al. (2009), quienes analizaron los compuestos volátiles generados en una bebida destilada elaborada a partir de lactosuero fermentado por *K. marxianus*. El objetivo principal fue optimizar la formación de etanol, alcanzando una concentración de 35.4% v/v. Además, mediante cromatografía, se identificaron y cuantificaron 40 compuestos volátiles presentes en la bebida, evidenciando la complejidad aromática del producto.

**Tabla 4.** Compuestos volátiles mayoritarios detectados en la bebida destilada de lactosuero.

Compuestos		Concentración (mg/L)	Umbral de olor (mg/L)	Descriptor
Aldehídos	Acetaldehído	36.7	25 $\infty$	Nuez
				Jerez
				Hojas verdes
Esteres	Acetato de etilo	138	12.3 §; 17*	Solvente, <b>Frutal</b>
				Esmalte de uñas
Alcoholes	2-Metil-1-butanol (alcohol isopentílico) + 3-Metil-1-butanol (alcohol isoamílico)	176 + 887	7 *	Alcohol
				Plátano
				Medicinal
				Solvente
				Dulce
				Aromático
	2-Metil-1-propanol (alcohol isobutílico)	542	65 <sup>a</sup> , $\infty$	Queso
				Alcohol
				Plátano
				Medicinal
				Solvente
				Esmalte de uñas
	1-Propanol	266	750 $\infty$	
	2-Butanol	34.7	16 $\infty$	
	2-Feniletanol	7.8	7.5 *	Rosas
			14 §	Dulce
				Perfume
Ácidos	Ácido acético	79.7	399 <sup>c</sup> §	Vinagre

\*Umbral de percepción olfativa en solución hidro-alcohólica; §Umbral olfativo en el modelo de vino; \*Umbral de percepción olfativa en agua; Umbral de diferencia olfativa en el vino;  $\infty$ Umbral de diferencia de alcohol en la cerveza. Tomado de Dragone et al. (2009).

Entre los resultados mencionados, el grupo de alcoholes superiores fue el más abundante cuantitativamente, identificando seis alcoholes superiores, un éster, un aldehído y dos ácidos con concentraciones superiores a 6.0 mg/L, como se muestra en la Tabla 4. Además de los compuestos mayoritarios, se identificaron 30 compuestos volátiles minoritarios, como se detalla en la Tabla 5, entre ellos: aldehídos (ej. furfural), terpenos (linalol, geraniol) y una gama de ésteres frutales como el acetato de isoamilo, detectado en concentraciones

cercanas a 831 µg/L, con umbrales olfativos bajos (30 µg/L), lo que lo convierte en un contribuyente principal al aroma característico de plátano.

**Tabla 5.** Compuestos volátiles minoritarios detectados en la bebida destilada de lactosuero.

	Compuesto	Concentración (µg/L)	Umbral de olor (µg/L)	Descriptores
Aldehídos	Furfural	101.1	88,000 §	Papel, dulce; almendra amarga
	Benzaldehído	49.3	2000 ∞	
	Heptanal	26.5		
Esteres	Etil butanoato (etil butirato)	1740	20 §	Papaya, mantequilla, dulce, manzana, perfume, fruta
	Etil hexanoato (etil caproato)	1420	14 §	Manzana, fruta, dulce, éster, anís
	Etil octanoato (etil caprilato)	1320	5 §; 250*	Manzana, dulce, frutal
	Feniletilacetato	876	650*	Rosa, miel, manzana, dulce, flores
	<b>3-Metilbutil acetato (acetato de isoamilo)</b>	831	30 §; 200*	Plátano, manzana, éster
	Etil 3-metilbutanoato	541	3 §	Frutal, manzana, dulce, valérico; frutal
	Etil 2-metilbutanoato	467	18 §	Frutal
	Etil decanoato (etil caprato)	302	200 §	Ácido graso, frutal, manzana, solvente
	Etil 2-hidroxipropanoato (etil lactato)	83.3	14,000 *	Fresa, frambuesa
	Etil 9-decanoato	76.2		
	Dietil succinato (dietil butanodioico ácido)	42.4	75,000 ‡	
Alcoholes	1-Hexanol	592	5200*	Coco, hojas verdes, desagradable
	1-Butanol	352	150000 ‡	
	1-Octanol	345	900 ∞	Alcohol
	1-Heptanol	207		Coco, nuez, aceite
	3-Metil-1-pentanol	181		
	2 Heptanol	169		
	3-Metil-3-buten-1-ol	88.5		
Ácidos	Ácido octanoico (ácido caprílico)	280	500 §	Cabra, ácido graso, aceite vegetal
	Ácido hexanoico (ácido caproico)	133	420 §	Cabra, ácido graso, aceite vegetal, sudor, verde
	Ácido 3-metilbutanoico + ácido 2-metilbutanoico	75.7		
	Ácido dodecanoico (ácido laurico)	57.2	6100 ∞	Ácido graso, jabón, cera
	Ácido nonanoico (ácido pelargónico)	26.9		
Terpenos	Ácido geránico	171		
	Linalol	110	25 §	Anís, terpenoide, rosas, limón
	Geraniol	55.5	36 §	
	α-Terpineol	49.5	330 §	Pino, terpenoide

\*Umbral de percepción olfativa en solución hidro-alcohólica; §Umbral olfativo en el modelo de vino; \*Umbral de percepción olfativa en agua; ‡ Umbral de diferencia olfativa en el vino; ∞Umbral de diferencia de alcohol en la cerveza. Tomado de Dragone et al. (2009).

Investigaciones más recientes, como la Gantumur et al. (2022), han identificado patrones similares en fermentaciones realizadas con *S. cerevisiae*, observando la formación de

alcohol isoamílico, alcohol isobutílico, 2-metil-1-butanol, 1-propanol, acetaldehído y acetato de etilo como compuestos clave en el perfil aromático. Cabe mencionar que *S. cerevisiae* no puede metabolizar lactosa, por lo que se requiere un pretratamiento (hidrolizado enzimático o químico) del lactosuero.

De forma similar, *Kluyveromyces lactis* ha sido objeto de estudio como catalizador biológico en el tratamiento del lactosuero, con el objetivo de disminuir su carga orgánica y analizar la actividad de la enzima  $\beta$ -galactosidasa, así como su relación con la síntesis de etanol (Sampaio et al., 2020).

Los resultados anteriores muestran la importancia de implementar la extracción continua de los compuestos generados, dado que estos pueden inhibir el crecimiento de los microorganismos. Un ejemplo de este fenómeno fue observado por Zafar y Owais (2006), quienes reportaron una inhibición significativa en la fermentación de lactosuero por *K. marxianus* a partir de las 12 h, atribuida a la toxicidad del etanol acumulado. Por tanto, se considera fundamental implementar estrategias de extracción en línea para compuestos volátiles, a fin de mantener la variabilidad microbiana y prolongar la fase productiva.

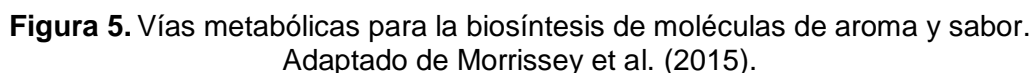
Aunado a lo anterior, Gantumur et al. (2022), señalan que la optimización del uso de sustratos y la conversión de estos a compuestos específicos durante el proceso de fermentación se puede alterar por diversos factores, tales como: la temperatura, la velocidad de agitación, el tiempo de incubación, el pH y por la presencia de sólidos grasos en el medio de fermentación.

## **1.7 Acetato de isoamilo**

Dentro del conjunto de compuestos aromáticos utilizados en las industrias alimentaria, cosmética y farmacéutica, los ésteres de cadena corta son particularmente valorados por sus propiedades sensoriales y por su alta volatilidad. Entre ellos, destaca el acetato de isoamilo por su característico aroma a plátano, lo que lo convierte en uno de los compuestos más utilizados en la industria.

Tradicionalmente, el acetato de isoamilo se produce mediante síntesis química, utilizando la esterificación de Fisher. Esto se debe al elevado costo de los procesos de extracción a partir de vegetales o de la fermentación de productos. Sin embargo, la tendencia actual del mercado favorece cada vez más su obtención por vías biotecnológicas, dado el creciente interés por productos de origen “natural” (Romero et al., 2005).

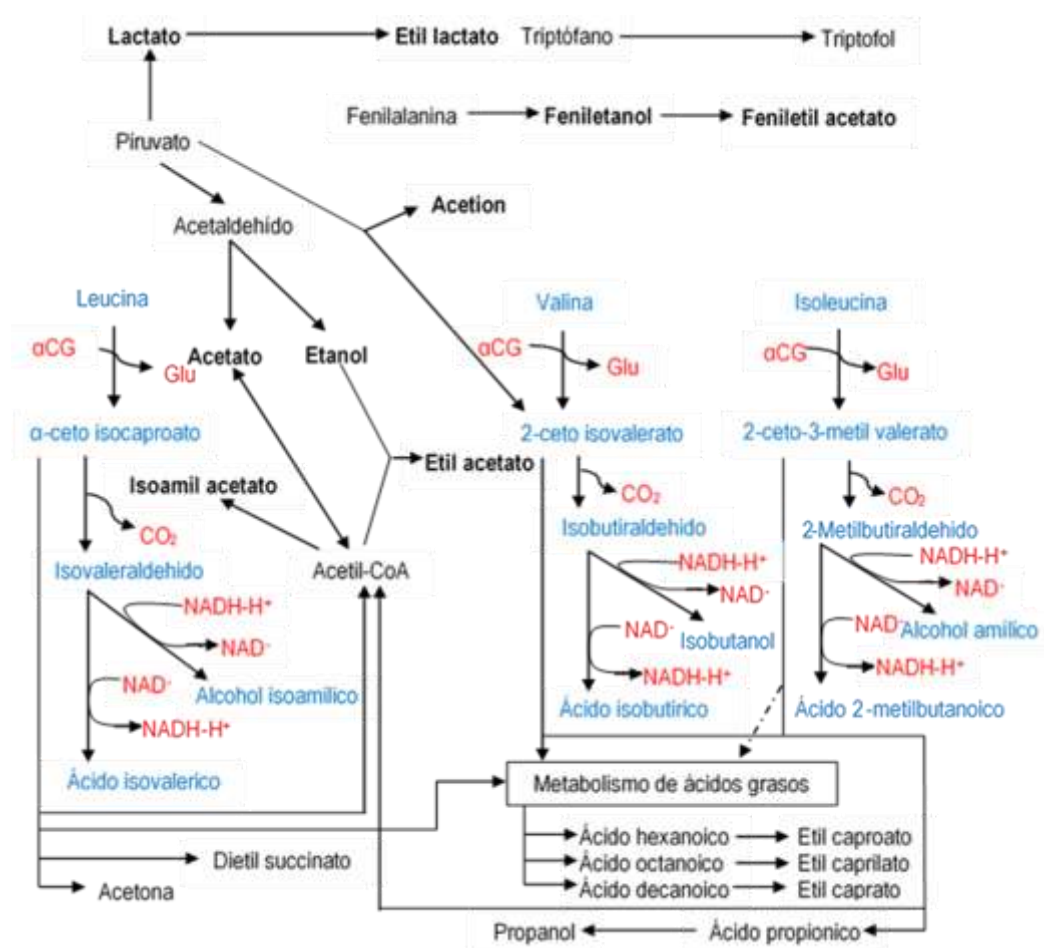
Sobre este tema, Alonso-Vargas et al. (2022), evaluaron la producción de 2-feniletanol (aroma a rosas) utilizando *K. marxianus* y lactosuero como sustrato, bajo condiciones de estrés metabólico inducidas por la modificación en la relación C/N (utilizando sulfato de amonio) y la adición de distintas cantidades de L-fenilalanina como precursor, logrando una producción de 1.2 g/L del aroma a rosas. Este resultado es comparable con los 1.169 g/L de 2-feniletanol reportados por Kong et al. (2020), quienes realizaron la investigación utilizando el microorganismo *Pichia pastoris* genéticamente modificada y aplicado en un medio conocido (medio BMM- compuesto por fosfato de potasio 100 mM, 1,34% YNB; 4 x10<sup>-5</sup>%; biotina, 2% glucosa).



17

las Figuras 5 y 6, presentan algunas de las posibles rutas metabólicas que *Kluyveromyces marxianus* puede seguir para la síntesis de acetato de isoamilo.

Las moléculas responsables de características de sabor se originan de procesos anabólicos y catabólicos normales en la célula. En la Figura 5 se representa el esquema abreviado que ilustra cómo estos procesos conducen a la síntesis de distintos metabolitos. Aunque las reacciones se representan como unidireccionales, muchas de estas son reversibles. Este esquema es un ejemplo de las reacciones que pueden llevarse a cabo mediante múltiples enzimas en *S. cerevisiae*, puesto que la información disponible de datos para *K. marxianus* es limitada (Morrissey et al., 2015).



**Figura 6.** Producción de compuestos aromáticos en levaduras.

Nota: Los nombres en negritas indican compuestos aromáticos importantes entre ellos el acetato de isoamilo. Los compuestos que se muestran en color azul constituyen una representación esquemática de la vía de Ehrlich, responsable de la producción de alcoholes superiores y ácidos volátiles. Cofactores y metabolitos de transición se muestran en rojo. αCG es α-ceto glutamato y Glu es el glutamato (Styger, 2011).

Es importante destacar que la producción del aroma a plátano utilizando distintos residuos alimentarios es un área de investigación en desarrollo. En este sentido, Gómez-Aldapa et al. (2021), reportaron la conversión de lactosa a acetato de isoamilo mediante la fermentación con *K. marxianus*, logrando una concentración final de 9.52 g/L. No obstante, la caracterización completa del perfil aromático, la cuantificación de lactosa residual y la eficiencia del sistema de extracción aún requieren mayor estudio para consolidar este proceso a nivel piloto.

En conjunto, la producción de acetato de isoamilo a partir de lactosuero representa una oportunidad tecnológica con alto potencial de valorización, siempre que se desarrollen estrategias de control para evitar la inhibición microbiana y se implementen sistemas eficientes de recuperación y purificación de compuestos volátiles.

## **2. ANTECEDENTES**

En los últimos años se han observado cambios significativos en los patrones climáticos a nivel mundial impulsados en gran parte por diversas actividades antropogénicas (Pope et al., 2021). Entre estas, las actividades industriales vinculadas a la producción de alimentos se destacan por su contribución a la generación de residuos orgánicos con alta carga contaminante. Particularmente la industria láctea produce grandes volúmenes de lactosuero como subproducto de la elaboración de quesos, representando un residuo de interés ambiental debido a su elevado contenido orgánico (Prazeres et al., 2012).

Durante las primeras dos décadas del siglo XXI, la necesidad de gestión integral del lactosuero como residuo ha cobrado gran relevancia, fomentando el desarrollo de nuevas tecnologías. Sin embargo, la selección de un tratamiento adecuado sigue siendo un desafío, debido a que influyen factores como la complejidad y la variabilidad de la composición del lactosuero, volumen generado, las tecnologías disponibles y las normativas aplicables a su disposición final. Además, deben considerarse los costos asociados tanto al tratamiento del residuo como a la disposición final de subproductos (Prazeres et al., 2012).

En este contexto, la investigación biotecnológica ha explorado el aprovechamiento del lactosuero como sustrato para la obtención de bioproductos de valor agregado. Sar et al. (2022), documentaron su uso en la producción de enzimas, de biomasa, de solventes y de biocombustibles, destacando la generación de bioetanol. A continuación, se presenta una revisión del uso del lactosuero para la producción de distintos productos, los microorganismos utilizados y la reducción de su carga orgánica.

### **2.1 Producción de bioalcoholes**

#### **2.1.1 Bioetanol**

Es importante destacar que el uso de biocombustibles y de productos químicos derivados de fuentes de carbono renovables, obtenidas a partir de residuos agroindustriales, se ha convertido en una alternativa viable frente al uso de combustibles fósiles. En este contexto, el bioetanol sobresale como producto clave, siendo su producción a gran escala mediante *S. cerevisiae* un ejemplo notable. Este microorganismo es ampliamente utilizado para la conversión de glucosa a etanol, debido a su elevada tasa de producción y su tolerancia a este producto, con niveles superiores a los 120 g/L (Qiu & Jiang, 2017).

*S. cerevisiae*, en comparación con otros microorganismos con aplicaciones industriales para producción de proteínas, de lípidos y de compuestos químicos básicos, ofrece la ventaja contar con un metabolismo y una genómica ampliamente estudiada (Lobs, Schwartz, & Wheeldon, 2017). Adicional al bioetanol, el lactosuero ha sido explorado como materia prima para la producción de compuestos como el 2,3-butanodiol y del 2-feniletanol, este último caracterizado por su distintivo aroma a rosas (Tabla 6).

En la Tabla 6 se resumen investigaciones sobre el uso de lactosuero en combinación con otros residuos para la producción de bioetanol. En este contexto, Cunha et al. (2017) estudiaron el uso de lactosuero en combinación con residuos de madera de *Eucalyptus globulus* como sustrato, empleando *S. cerevisiae* genéticamente modificada para optimizar la producción del este. Este enfoque permitió obtener un rendimiento de 93 g/L de bioetanol. Resultados similares fueron reportados por Rodrigues et al. (2016), quienes lograron un rendimiento de 80 g/L de bioetanol al emplear *K. lactis* y *S. cerevisiae* en un sustrato combinado de lactosuero y residuos de algarroba.

Por otro lado, Jin et al. (2016), utilizaron lactosuero permeado mezclado con trigo como sustrato, empleando *S. cerevisiae*, *A. oryzae* y *K. lactis*, en el proceso. Este estudio resultó en un rendimiento de 196.7 g/L de bioetanol, de los cuales sólo 18.4 g fueron atribuidos exclusivamente al lactosuero, logrando además una hidrólisis del 88.2% de la lactosa.

Adicionalmente, investigaciones recientes han explorado el uso de microorganismos genéticamente modificados para este propósito. En este sentido, Pasotti et al. (2020), reportaron el empleo de *Escherichia coli* genéticamente modificada, capaz de metabolizar la lactosa contenida en el lactosuero permeado, obteniendo bioetanol y reduciendo la DQO en un 75%.

El resumen de las investigaciones mostradas en la Tabla 6 permite identificar que la utilización de lactosuero crudo es poco frecuente. Por ejemplo, Murari et al. (2019), así como Saini et al. (2017), destacan la necesidad de tratamientos previos para mejorar su aprovechamiento. En el primer caso, el lactosuero contenía 60 g/L de lactosa y se suplementó con fosfatos y sulfatos, obteniendo un rendimiento de 25.81 g/L de bioetanol y una reducción de 78.94% de la carga orgánica en términos de DQO. Por otro lado, el segundo grupo de investigación utilizó lactosuero filtrado y concentrado a 200 g/L de lactosa, logrando un rendimiento de 79.33 g/L de bioetanol y una reducción del 87% de la carga orgánica en términos de lactosa. Es relevante mencionar que en ambos estudios se



empleó *K. marxianus* y que la diferencia en el rendimiento de bioetanol se atribuye al contenido de lactosa en cada sustrato.

**Tabla 6.** Obtención de alcoholes utilizando lactosuero como fuente de carbono.

Pre-tratamiento del lactosuero	Microorganismo(s) utilizado	Producción máxima	Reducción de materia orgánica	Referencia
Obtención de bioetanol				
Filtrado y concentrado	<i>Kluyveromyces lactis</i>	22.2 g/L	82 % de lactosa	Sampaio et al. (2020)
Crudo y suplementado	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	25.81 g/L	78.94% en DQO	Murari et al. (2019)
Filtrado y concentrado	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	79.33 g/L	87 % aprox. de lactosa	Saini et al. (2017)
Crudo en combinación con residuos de algarroba, enriquecido y suplementado	<i>Kluyveromyces lactis</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	80 g/L	-	Rodrigues et al. (2016)
En polvo en combinación con madera de <i>Eucalyptus globulus</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> modificada	93 g/L	-	Cunha et al. (2017)
Permeado	<i>E. coli</i> modificada	-	75 % en DQO	Pasotti et al. (2020)
Concentrado	<i>S. cerevisiae</i> .modificada (Ej2E8 condiciones anaeróbicas)	48.8 g/L	100 % aprox. de lactosa	Liu et al. (2016)
Permeado en combinación con trigo	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Aspergillus oryzae</i> y <i>Kluyveromyces lactis</i>	196.7 g/L (18,4 g asociados sólo al lactosuero)	88.2 % de lactosa hidrolizada	Jin et al. (2016)
En polvo	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	43.71 g/L	90 % aprox. de lactosa	Das et al. (2016)
Concentrado	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> y <i>Kluyveromyces marxianus</i>	63.9 g/L	91% de lactosa hidrolizada	Beniwal, Saini, Kokkiligadda, & Vij (2018)
Obtención de 2-feniletanol				
Pasteurizado, suplementado (L-fenilalanina)	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	1.2 g/L	76% en DQO	Alonso-Vargas et al. (2022)
Pasteurizado, suplementado (L-fenilalanina)	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	0.78 g/L	99.4 % de lactosa	Conde-Báez et al. (2019)
Obtención bencil calbonil				
Pasteurizado, suplementado (L-fenilalanina)	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	1.205 g/L	99.1 % de lactosa	Conde Báez et al. (2017)
Obtención de 2,3 butanodiol				
En polvo, suplementado, adición de suero en tres ocasiones con 26 g/L de lactosa	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	48.29 g/L	95 % aprox. de lactosa	Guo et al. (2017)

Tomado de Hernández-Cruz et al. (2023)

De manera similar, Sampaio et al. (2020), reportaron un rendimiento de 22.2 g/L de bioetanol, utilizando lactosuero filtrado y concentrado con un contenido de 100 g/L de lactosa. A diferencia del estudio de Saini et al. (2017), este estudio empleó *K. lactis*, logrando una reducción del 82% de lactosa. Estos hallazgos confirman que los procesos biológicos aplicados son eficaces para reducir al menos el 75% de la carga orgánica del residuo lácteo.

### **2.1.2 2-feniletanol y 2,3 butanodiol**

Dentro del grupo de los alcoholes, el 2-feniletanol es un producto que se ha estudiado. Este alcohol superior, conocido por su aroma a rosas, es utilizado como aditivo en las industrias alimentaria, cosmética, farmacéutica y química. Además, debido a sus propiedades antibacterianas y antifúngicas, también se ha empleado como desinfectante (Etschmann et al., 2002; Hua & Xu, 2011; Martínez-Ávila et al., 2018; Zhu et al., 2011). Cabe destacar que el creciente interés por obtener productos naturales como alternativa a la síntesis química ha promovido el desarrollo de estas investigaciones en este ámbito.

Estudios realizados por Conde Báez et al. (2017, 2019) y Alonso-Vargas et al. (2022), exploraron el uso del lactosuero para la producción de 2-feniletanol mediante *K. marxianus*. En estas investigaciones, se utilizó lactosuero pasteurizado, suplementado con sales de amonio y L-fenilalanina, se alcanzaron rendimientos de 1.205 g/L, 0.78 g/L y 1.2 g/L, respectivamente, logrando reducciones significativas del 99.1% y 99.4% de lactosa en los dos primeros casos, así como una disminución del 76% en la DQO en el tercero.

El 2,3-butanodiol es otro alcohol con aplicaciones industriales. Guo et al. (2017), obtuvieron este compuesto utilizando lactosuero en polvo como sustrato y empleando *Klebsiella pneumoniae*. El proceso, realizado de forma continua, con una concentración inicial de 60 g/L de lactosa en el medio, incluyó la adición de 3 dosis de lactosuero con 26 g/L de lactosa cada una, logrando un rendimiento de 48.29 g/L de 2,3-butanodiol y una reducción del 95% de lactosa. Este producto se emplea como materia prima y combustible, así como en la fabricación de tintas de impresión, perfumes, fumigantes, agentes humectantes, suavizantes, explosivos, plastificantes y en la industria farmacéutica, como vehículo (Garg & Jain, 1995; Ji, Huang, & Ouyang, 2011; Ma et al., 2009).

En relación con lo mencionado, la Tabla 6 muestra que el estudio sobre el uso del lactosuero para la producción de diversos alcoholes sigue en desarrollo. En estos estudios, se han empleado distintos microorganismos que pueden emplear el lactosuero sometido a distintos

pre-tratamientos como fuentes de carbono. Cabe destacar que el aprovechamiento de este tipo de residuos alimentarios contribuye significativamente a mitigar su impacto ambiental, logrando reducciones en el contenido orgánico que varían entre el 75 y el 99%.

## 2.2 Producción de biomasa

En la industria alimentaria, el lactosuero es utilizado en la elaboración de alimentos procesados (lácteos, cárnicos, congelados y fórmulas infantiles) y como fuente proteica de alto valor en forma de concentrados, aislados o hidrolizados (Yadav et al., 2016). Una línea importante de valorización es su uso para la producción de proteína unicelular (biomasa microbiana), que se utiliza principalmente como insumo para la alimentación animal (Panesar & Kennedy, 2012; Yadav et al., 2014).

La Tabla 7 reúne algunas de las investigaciones más recientes sobre la obtención de proteínas a partir de lactosuero, donde se emplearon diversos microorganismos, como los pertenecientes al género *Kluyveromyces*, entre los cuales destaca la especie *K. marxianus*, que ha demostrado ser una cepa eficaz para este propósito a partir del lactosuero. En este contexto, Maguire et al. (2022) y Bosso et al. (2019), plantearon como objetivo la producción de la enzima  $\beta$ -galactosidasa, ampliamente utilizada en la industria alimentaria. El primer grupo de investigación utilizó una mezcla de melaza de maíz (88%) y de lactosuero (12%) como fuente de carbono, empleando *K. lactis*, obteniendo una actividad máxima de  $\beta$ -galactosidasa de 4.9 U/mg. Por su parte, Bosso et al. emplearon lactosuero permeado y ultrafiltrado con *S. fragilis*, alcanzando una producción máxima enzimática de  $\beta$ -galactosidasa de 12.01 U/mL, reportando un 89% de lactosa hidrolizada, aportando a la reducción de la carga orgánica del residuo.

Estudios adicionales de Trigueros et al. (2016), Coelho-Sampaio et al. (2016), Lukjanenko et al. (2015) y Yadav et al. (2016), corroboran estos resultados, reportando incrementos significativos en proteína intracelular empleando lactosuero en diferentes condiciones, como lactosuero permeado, desproteinizado, adicionado con glucosa y suplementado con sales de amonio.

La producción de biomasa es de interés en la industria alimentaria, ya que, debido a su composición, es utilizada tanto en la suplementación de alimentos para animales como en la dieta humana (Nasseri et al., 2011). De manera general, las investigaciones de estos grupos reportan una reducción de carga orgánica del lactosuero de entre el 87% y 92%,

indicando que este tipo de tratamiento aporta a mitigar el impacto ambiental asociado a este residuo.

**Tabla 7.** Producción de biomasa a partir de lactosuero como fuente de carbono.

Pre-tratamiento del lactosuero	Microorganismo(s) utilizado	Producción máxima	Reducción de materia orgánica	Referencia
Obtención de Biomasa (proteína intracelular).				
Permeado, suplementado y adicionado con glucosa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>Boulardii</i>	8.2 g/L de biomasa	87 % de lactosa aprox.	Trigueros et al. (2016)
Desproteinizado, suplementado con extracto de levadura, sulfato de magnesio y sulfato de amonio	<i>Kluyveromyces lactis</i>	2.14 gDW/L h	-	Coelho Sampaio et al. (2016)
Permeado, suplementado con sulfato de amonio	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Aumento de 45 % de DW de proteínas en células.	-	Lukjanenko et al. (2015)
En polvo , suplementado con urea	<i>Kluyveromyces marxianus</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	0.27 g biomasa/g lactosa consumida y 0.31 g biomasa/l lactosa consumida.	92 % en DQO	Yadav et al. (2016)
Obtención de Biomasa (proteína $\beta$ -galactosidasa).				
Crudo con melaza y polvo de maíz. Una mezcla de 88 % polvo de maíz y 12 % suero logró la mayor actividad enzimática	<i>Kluyveromyces lactis</i>	4.9 U mg $\beta$ -galactosidasa máxima actividad	10.56 $\pm$ 0.21 g lactosa/100 mL	Maguire et al. (2022)
Permeado ultrafiltrado	<i>Saccharomyces fragilis</i>	$\beta$ -galactosidasa producción enzimática de 12.01 U. mL	89 % de lactosa hidrolizada	Bosso et al. (2019)
Obtención de Biomasa (proteína intracelular). Reducción de antigenicidad				
Concentrado de proteínas del suero	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	La antigenicidad optimizada de $\alpha$ -LA y $\beta$ -LG en proteínas de suero bovino se redujo en un 29 % y un 53 %.	-	Zhao et al. (2020)

Tomado de Hernández-Cruz et al. (2023)

Por último, Zhao et al. (2020), realizaron un estudio enfocado en la disminución de la antigenicidad de dos proteínas principales de la leche de vaca: la  $\alpha$ -lactoalbumina y la  $\beta$ -lactoglobulina, responsables de causar alergias. Sus resultados mostraron una reducción del 29% y 53% en la antigenicidad de estas proteínas, respectivamente.

## 2.3 Producción de bebidas

Como se mencionó en el apartado 2.1, la generación de bioetanol a partir de lactosuero es un proceso bien establecido que se ha estudiado desde el año 1978 (Ling, 2008). A pesar de ello, la producción de licor utilizando lactosuero representa un área de investigación que aún no ha sido explorada a profundidad. En este tipo de bebidas, la identificación y la cuantificación de los compuestos volátiles generados es de gran importancia, ya que permiten su comparación con otras bebidas destiladas, como por ejemplo el Whisky (Dragone et al., 2009).

En este contexto, la Tabla 8 muestra investigaciones que destacan los microorganismos empleados y la producción máxima de etanol, dado que este es el componente principal de las bebidas. Dentro de estos estudios, Gantumur et al. (2022), reportaron un rendimiento de 56.4 g/L de etanol utilizando *S. cerevisiae*, en lactosuero desnatado, suplementado e hidrolizado. Este último tratamiento fue necesario para romper la lactosa, ya que el microorganismo no posee la capacidad de metabolizarla.

Por otro lado, Risner et al. (2018), así como Guneser et al. (2016), utilizaron el microorganismo *K. marxianus*, aunque ambos estudios utilizaron lactosuero, el último grupo de investigación obtuvo un rendimiento de 46 g/L de etanol a partir de una mezcla de residuos agroindustriales que, además del lactosuero, incluía pulpa de tomates, de pimientos y de uvas procesadas.

En este apartado, aunque el objetivo principal es la producción de etanol, es esencial la identificación y cuantificación de los compuestos volátiles generados, ya que estos contribuyen a las características organolépticas de la bebida (Dragone et al., 2009). En el análisis de estas bebidas, se identificaron compuestos que aportan al sabor, tales como el alcohol isoamílico (aroma a plátano), el acetato de isoamilo (aroma afrutado, plátano), el alcohol feniletílico (aroma a rosas) y el acetato de feniletilo (aroma floral), entre otros (Gantumur et al., 2022; Guneser et al., 2016; Risner et al., 2019). La productividad de estos compuestos volátiles está influenciada por el tipo de residuos agroindustriales empleados (Guneser et al., 2016).

Adicionalmente a las bebidas mencionadas, otro producto generado a partir del lactosuero es la bebida probiótica carbonatada reportada por Kadyan et al. (2021). En este estudio, se empleó una combinación de dos microorganismos, el probiótico *Lactobacillus plantarum* y

la levadura *K. lactis*, El análisis de este producto arrojó un contenido de  $10^8$  células/mL, con actividad antioxidante y antimicrobiana, además de un bajo contenido alcohólico, cabe mencionar que sensorialmente presentó un sabor ligeramente ácido y dulce.

**Tabla 8.** Producción de bebidas a base de lactosuero.

Pre-tratamiento del lactosuero	Microorganismo(s) utilizado	Producción máxima	Reducción de materia orgánica	Referencia
Obtención de bebida fermentada				
Pasteurizado, desnatado, suplementado, calentado, hidrolizado	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	Bebida destilada, Etanol, (56.4 g/L)	-	Gantumur et al. (2022)
Suero ácido y suero dulce, suplementado con sales de amonio	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Etanol de 1,5 a 2,5 % (peso/peso)	-	Risner et al. (2018)
Se utilizaron como medios de cultivo suero y pulpa de tomates procesados, pimientos y uvas	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Etanol 45-46 g/L	-	Guneser et al. (2016)
Obtención de bebida probiótica carbonatada				
Clarificado, estabilizado con pectina y citrato trisódico y adicionado con sacarosa	<i>Lactobacillus plantarum</i> y <i>Kluyveromyces lactis</i>	Recuento de probióticos de $\geq 10^8$ células/mL.	-	Kadyan et al. (2021)

Tomado de Hernández-Cruz et al. (2023)

Es importante mencionar que no se presentan valores de reducción de materia orgánica, debido a que el objetivo de las investigaciones fue la obtención de una bebida, sin extracción de algún tipo de producto en específico.

## 2.4 Producción de biocombustibles

El lactosuero ha sido también evaluado como fuente de carbono para la producción de biocombustibles en la búsqueda de alternativas sostenibles frente al agotamiento de combustibles fósiles y la contaminación derivada de su explotación. Estas problemáticas han impulsado el desarrollo de nuevas tecnologías y de fuentes de energía renovables que aporten a una economía sostenible (Dessi et al., 2020).

En este sentido, la generación de hidrógeno como combustible a partir de fuentes renovables, como el lactosuero, podría ser una alternativa de interés. Dessi et al. (2020) y Remón et al. (2016), destacan el uso del lactosuero para la producción de biohidrógeno, donde el primero reportó la generación de ácidos grasos volátiles como subproductos del proceso.

Otros biocombustibles que han sido objeto de estudio incluyen el biodiesel, reportado por Carota et al. (2017), así como el metano y la estruvita, reportados por Escalante et al. (2018) (Tabla 9). La variabilidad de productos obtenidos a partir del lactosuero como fuente de carbono, empleando microorganismos es una alternativa emergente para evitar el uso de combustibles fósiles, aprovechando los residuos de la industria alimentaria y con ello reduciendo su impacto ambiental.

**Tabla 9.** Obtención de biocombustibles utilizando lactosuero como fuente de carbono.

Pre-tratamiento del lactosuero	Microorganismo(s) utilizado	Producción máxima	Reducción de materia orgánica	Referencia
Obtención de hidrógeno				
Crudo <sup>1</sup>	Lodos activados	2.0 L de H/L lactosuero	-	Dessi et al. (2020)
Filtrado, Solución de lactosa	Reformado catalítico	Hidrógeno	-	Remón et al. (2016)
Obtención de biodiesel				
Centrifugado, diluido con agua desionizada y suplementado con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> hasta una relación C/N de 55	<i>Cryptococcus curvatus</i> <i>Cryptococcus laurentii</i>	9,9 g/L de lípidos totales con un rendimiento de 32,6 % de biodiesel.	86.7 y 77.9 % reducción de DQO respectivamente	Carota et al. (2017)
Obtención de metano y estruvita				
Crudo	Purina de ganado	0.51-0.60 L metano/g 8.5-10.4 g estruvita/L	83 % de materia orgánica	Escalante et al. (2018)

Tomado de Hernández-Cruz et al. (2023)

## 2.5 Producción de otros compuestos

Por último, también se ha reportado la producción de otros compuestos, donde se destaca la producción de **ácido polimálico**, un poliéster utilizado en el campo biomédico y como precursor para la formación de ácido L-málico, con aplicaciones en las industrias alimentaria y farmacéutica (Ding et al., 2010; Xia et al., 2021). Este compuesto es reportado por Xia et al. (2021), en el cual obtuvieron un rendimiento de 97.3 g/L a partir de lactosuero hidrolizado empleando *K. marxianus*, alcanzando una reducción del 96.4% de la carga orgánica, expresado como lactosa hidrolizada.

Otro producto es el **ácido láctico** reportado por Lech (2020), con una producción de 25.7 g/L utilizando *Lactobacillus rhamnosus* en lactosuero permeado, suplementado con peptona, huevo y extracto de levadura para mejorar el rendimiento, reduciendo en un 98% el contenido orgánico (Tabla 10). Este ácido tiene usos en las industrias cosmética y farmacéutica; en esta última se utiliza principalmente para obtener lactatos solubles en agua

o para la fabricación de cápsulas biodegradables para la administración de fármacos (Jalil & Nixon, 1990; Smith, 1996).

Un compuesto de especial interés, pero poco estudiado, es el acetato de isoamilo o isopentil acetato. Este éster de ácido graso de cadena corta, conocido por su aroma particular a plátano, tiene aplicaciones en la industria alimentaria y como solvente ("National Library of Medicine National Center for Biotechnology Information").

**Tabla 10.** Obtención de distintos compuestos utilizando lactosuero como fuente de carbono.

Pre-tratamiento del lactosuero	Microorganismo (s) utilizado	Producción máxima	Reducción de materia orgánica	Referencia
Obtención ácido polimálico				
Solución en polvo, precipitado e hidrolizado	<i>Aureobasidium pullulans</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i>	97.3 g/L	96.4 % lactosa hidrolizada	Xia et al. (2021)
Obtención de ácido láctico				
Permeado suplementado peptona, huevo y extracto de levadura	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	25.7 g/L	98% de lactosa	Lech (2020)
Obtención isopentil acetato				
Pasteurizado, suplementado con alcohol isoamílico	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	9.52 g/L.	-	Gómez-Aldapa et al. (2021)

Tomado de Hernández-Cruz et al. (2023)

En este sentido, Gómez-Aldapa et al. (2021), reportaron un rendimiento de 9.52 g/L de acetato de isoamilo empleando *K. marxianus* y lactosuero suplementado con sulfato de amonio y alcohol isoamílico, siendo este último un precursor clave para favorecer su formación. Sin embargo, se requiere mayor investigación para optimizar su producción, ya que los estudios actuales son limitados. Aunque tradicionalmente este compuesto es obtenido mediante síntesis química, su producción biológica representa una alternativa sustentable que aún requiere optimización técnica.

La valorización biotecnológica del lactosuero ha demostrado ser una estrategia eficaz para reducir su impacto ambiental y generar productos de valor agregado. La mayoría de las investigaciones han logrado reducciones de carga orgánica superiores al 75%, con el empleo de diversos microorganismos y estrategias de pretratamiento. Sin embargo, persiste una brecha importante en el desarrollo de procesos que incluyan etapas de extracción y de purificación de los compuestos generados, lo cual es esencial para su aprovechamiento industrial.



### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El lactosuero constituye uno de los principales residuos agroindustriales generados por la industria láctea, y su descarga sin tratamiento previo, genera impactos ambientales significativos. Este efecto adverso está relacionado con su alto contenido orgánico, atribuible principalmente a su alta concentración de lactosa., que actúa como fuente de carbono, rápidamente biodegradable. Cuando se vierte en suelos, el lactosuero altera su estructura fisicoquímica y modifica la microbiota nativa, afectando negativamente el rendimiento de los cultivos. Por otro lado, en cuerpos de agua, su descomposición reduce la disponibilidad del oxígeno disuelto, comprometiendo la viabilidad de los ecosistemas acuáticos (Panesar et al., 2007; Prazeres et al., 2012).

A nivel global, se estima que aproximadamente el 47% del lactosuero producido es vertido directamente en el ambiente sin ningún tipo de valorización o tratamiento, mientras que solo el 53% se destina a procesos de aprovechamiento o disposición controlada (Ghasemi et al., 2009; Grba et al., 2002). Este residuo representa entre el 85 y el 95% del volumen total de leche utilizada para la producción de quesos (González-Siso, 1996), lo cual acentúa la magnitud del problema. Específicamente en México, durante el año 2021 se reportó una producción de 516 toneladas de queso, lo que implica una generación estimada de aproximadamente 4,500 toneladas de lactosuero (INEGI, 2022).

La falta de infraestructura especializada para el manejo del lactosuero, aunada a los elevados costos asociados a su tratamiento y su transporte, ha llevado a que muchas unidades productivas, particularmente las de pequeña y mediana escala, opten por su vertido directo. Esta situación enfatiza uno de los principales desafíos para la sostenibilidad de la industria láctea, tanto en términos ambientales como económicos (Abboud et al., 2010; Ozmihci & Kargi, 2007).

Además, el crecimiento poblacional y el cambio climático agudizará en mayor medida la crisis hídrica, haciéndola potencialmente insostenible. Por ello, es imprescindible establecer medidas y programas orientados al desarrollo sustentable. Una opción viable es el aprovechamiento del lactosuero, lo que no solo mitiga su impacto ambiental, sino que también permite la producción de acetato de isoamilo, un compuesto con aplicaciones industriales.

## 4. HIPÓTESIS

La fermentación del lactosuero mediante *Kluyveromyces marxianus*, complementada con la adición de alcohol isoamílico y/o L-leucina como precursores metabólicos, potenciará la síntesis de acetato de isoamilo, lo que permitirá de forma simultánea una reducción significativa en el contenido de lactosa del residuo, contribuyendo de forma efectiva a la disminución de su carga orgánica y con ello a la mitigación de su impacto ambiental.

## 5. JUSTIFICACIÓN

El aprovechamiento del lactosuero como materia prima para la generación de bioproductos ha adquirido creciente relevancia en el ámbito científico-tecnológico, en particular como estrategia para reducir el impacto ambiental derivado de la industria quesera. Esta línea de investigación se alinea con los principios del desarrollo sostenible y la economía circular, al proponer soluciones que simultáneamente permitan el tratamiento de residuos y la obtención de productos de valor añadido.

En 2023, la producción mundial de leche alcanzó 927 Mt (OCDE/FAO, 2024), mientras que, en el caso específico de México, aunque la magnitud del impacto ambiental derivado de los residuos lácteos no se conoce con precisión, datos de la FAO indican que en 2019 se produjeron 158,391 toneladas de queso. De acuerdo con González-Siso (1996), el lactosuero representa entre el 85 y el 95% del volumen total de leche utilizada para la elaboración de queso, lo que sugiere una generación potencial superior a 1,425 millones de litros de lactosuero. A este panorama se suma la problemática del inadecuado manejo de dicho subproducto, en este sentido Panesar et al. (2007), mencionan que, si bien el 53% de este volumen es tratado o empleado para otros fines, el 47% restante es vertido directamente en cuerpos de agua o en suelos, alterando su composición fisicoquímica y biológica (Panesar et al., 2007; Prazeres et al., 2012).

Los principales desafíos para su tratamiento incluyen los altos costos asociados y la ausencia de infraestructura adecuada en las plantas procesadoras, particularmente en aquellas de escala media y pequeña (Abboud et al., 2010; Ozmihci & Kargi, 2007). Estas limitantes han guiado el desarrollo de investigaciones orientadas a su valorización mediante procesos biotecnológicos. La revisión de literatura realizada en el presente trabajo identificó diversas aproximaciones experimentales que emplean microorganismos para transformar el lactosuero en producto como bioetanol (Murari et al., 2019), 2-feniletanol (Alonso-Vargas et al., 2022), biomasa (Lukjanenko et al., 2015), enzimas (Bosso et al., 2019), bebidas fermentadas (Risner et al., 2018), hidrógeno (Dessi et al., 2020), biodiesel (Carota et al., 2017), metano (Escalante et al., 2018), ácido polimálico (Xia et al., 2021), ácido láctico (Lech, 2020) y acetato de isoamilo (Gómez-Aldapa et al., 2021).

El acetato de isoamilo es un éster de interés industrial caracterizado por su aroma a plátano, ampliamente utilizado en las industrias alimentaria y farmacéutica. Sin embargo, estos estudios enfocados en su producción a partir de lactosuero se han centrado principalmente

en la cuantificación del producto específico dentro del líquido de fermentación, así como en la reducción de la carga orgánica (principalmente lactosa). Asimismo, se ha privilegiado el uso de lactosuero previamente tratado (desnatado, desproteinizado y concentrado), lo cual limita la aplicabilidad directa en escenarios donde no se cuenta con sistemas de preprocesamiento.

Persiste una escasa documentación respecto al empleo del lactosuero crudo como sustrato fermentativo, así como sobre la caracterización exhaustiva de los compuestos secundarios producidos y su posterior recuperación. En la mayoría de los estudios revisados, los análisis se restringen a la identificación de metabolitos solubles sin proponer métodos para su extracción o su purificación, lo cual representa una brecha tecnológica en el aprovechamiento integral de este residuo.

Ante esta situación, la presente investigación propone una estrategia basada en la fermentación directa del lactosuero crudo para la producción de acetato de isoamilo empleando *Kluyveromyces marxianus* y precursores metabólicos específicos. Esta propuesta busca ofrecer una alternativa biotecnológica de bajo costo y alta eficiencia, con capacidad de reducir significativamente el contenido orgánico del residuo hasta niveles compatibles con los límites máximos permisibles establecidos por la normativa ambiental, que contribuya al desarrollo de nuevos procesos de valorización aplicables a la industria láctea nacional.

## 6. OBJETIVOS

### 6.1 Objetivo general

Producir acetato de isoamilo a partir de lactosuero empleando *Kluyveromyces marxianus* como estrategia para la reducción del impacto ambiental generada por la industria quesera.

### 6.2 Objetivos específicos

1. Determinar la composición fisicoquímica del lactosuero obtenido de una empresa quesera de la región Tulancingo, Hidalgo, con el fin de caracterizar sus propiedades nutricionales y establecer su potencial como sustrato fermentativo.
2. Evaluar el consumo de lactosa por *Kluyveromyces marxianus* durante la fermentación del lactosuero, con el propósito de cuantificar la disminución de carga orgánica y estimar su viabilidad como estrategia de tratamiento biotecnológico.
3. Evaluar las condiciones de reacción mediante la adición de alcohol isoamílico o L-leucina, para favorecer la biosíntesis de acetato de isoamilo en fermentaciones controladas con *K. marxianus*, considerando variables como concentración, tiempo y temperatura.
4. Optimizar y validar la producción de acetato de isoamilo en fermentaciones de lactosuero con *K. marxianus*, aplicando un diseño experimental central compuesto rotatable que permita identificar las condiciones más eficientes y reproducibles del proceso.
5. Evaluar el rendimiento fermentativo y la eficiencia metabólica de *K. marxianus* en la producción de acetato de isoamilo y el consumo de lactosa, utilizando un inóculo previamente sometido a evolución adaptativa bajo condiciones óptimas, con el fin de mejorar la productividad y la estabilidad del sistema.

## 7 METODOLOGÍA

### Definición espacial y temporal

La zona Acatlán-Tulancingo se ubica en el estado de Hidalgo, esta zona se caracteriza por la producción de diferentes tipos de quesos, que es un sector de gran importancia en el sistema alimentario mexicano. La zona del Valle de Tulancingo es una de las tres principales cuencas lecheras del estado de Hidalgo, junto con Tizayuca y el Valle del Mezquital. Se estima que se producen un millón 150 mil litros de leche diarios, lo que representa el 4.2% de la producción nacional, de los cuales el 56% (644,000 L) tiene como destino la producción de queso (Castelán, 2020).

Gran parte de los quesos son de producción artesanal, producidos por pequeñas industrias, lo que conlleva que el lactosuero generado no se gestione de manera apropiada, generalmente desechándolo directamente en los drenajes municipales, ocasionando un impacto ambiental en el agua y en el suelo.

Este proyecto fue llevado a cabo según el esquema general presentado en la Figura 7.

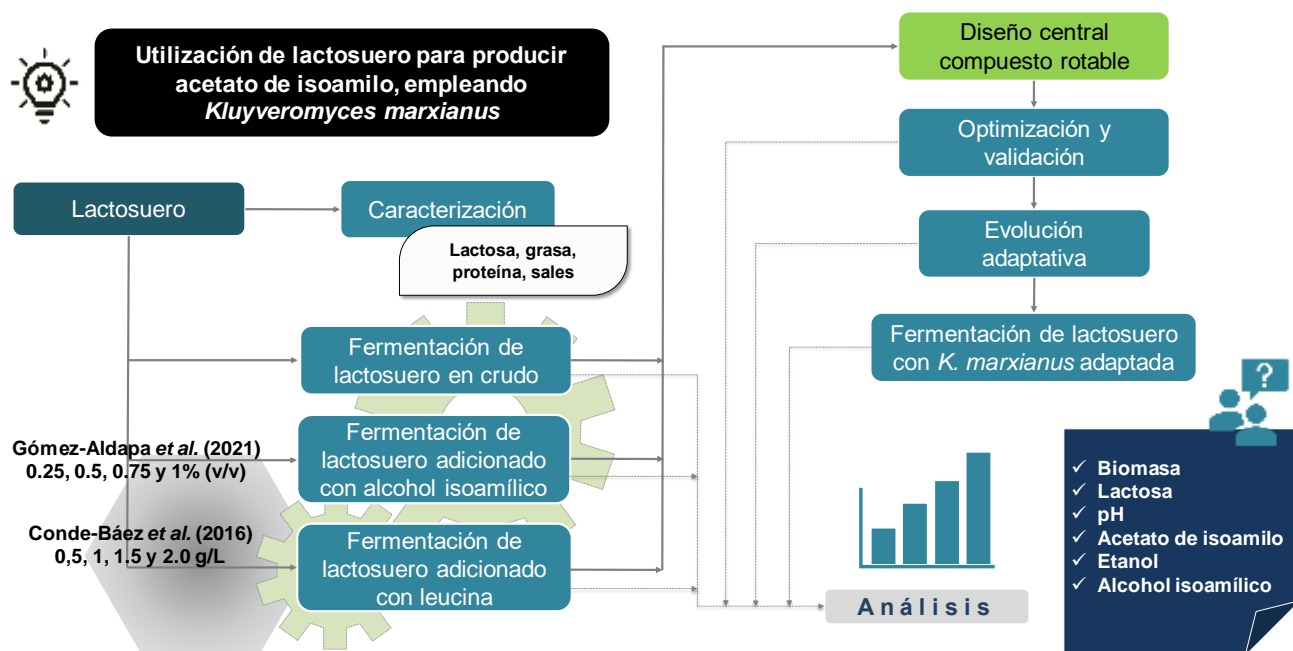


Figura 7. Esquema general de la fase experimental.

## **7.1 Microorganismo y medio de cultivo**

Se utilizó la levadura *Kluyveromyces marxianus* ITD00262, aislada del proceso de fermentación alcohólica del *Agave duranguensis*, la cual fue donada por el Laboratorio de Biotecnología del Instituto Tecnológico de Durango. Esta levadura fue sembrada en placas con medio lactosado, se incubó a 28 °C durante 24 h y posteriormente se almacenó a 4 °C hasta su utilización. El medio lactosado se constituyó por caldo lactosado (Bioxon, México) (5 g/L de lactosa, 5 g/L de peptona de gelatina y 3 g/L de extracto de carne de res) y agar para métodos estándar (Bioxon, México) (5 g/L de peptona de caseína, 2.5 g/L de extracto de levadura, 1 g/L de dextrosa y 15 g/L de agar).

## **7.2 Sustrato**

Se utilizó lactosuero dulce (LD) obtenido del proceso de elaboración del queso tipo Panela, el cual fue proporcionado por una empresa productora de lácteos, ubicada en Tulancingo, Hidalgo. El lactosuero se recolectó directamente de la línea de producción y se almacenó en contenedores de polietileno de alta densidad (HDPE) con capacidad de 20 L. Posteriormente, se transportó en contenedores con hielo hasta el laboratorio, donde fue transferido a recipientes de tereftalato de polietileno (PET) de 2 L. Finalmente, el suero fue pasteurizado en baño María a 63 °C durante 30 min y almacenado en congelación (-20 °C) hasta su uso como medio base.

## **7.3 Caracterización del lactosuero**

### **7.3.1 Determinación de lactosa**

El contenido de lactosa presente en las muestras se cuantificó por el método de azúcares reductores con ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), modificado según Hortsch, Löser, & Bley (2008). Para preparar el reactivo DNS, se disolvieron 10.6 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico y 19.8 g de NaOH en 1416 mL de agua destilada, posteriormente se agregaron 306 g de tartrato de sodio y potasio en la misma solución (se almacenó en la obscuridad).

El análisis se realizó tomando 0.5 mL de la muestra (previamente centrifugada a 6000 rpm/3 min) y 1.5 mL del reactivo DNS en un tubo de ensayo de 25 mL, el tubo se colocó en agua a 100 °C por 5 min, se enfrió a temperatura ambiente y se diluyó con 5 mL de agua destilada. La lactosa reduce uno de los dos grupos nitro, lo que provoca cambios en el color de amarillo a café, que es cuantificada fotométricamente a 540 nm (la curva de calibración se

preparó utilizando agua como blanco y con soluciones de lactosa a concentraciones de 0, 1, 2, 4, 6 y 8, g/L preparadas a partir de una solución patrón de 10 g/L).

Nota: En caso de ser necesario y debido a la alta concentración de las muestras que no podrían ser leídas por el espectrofotómetro a 540 nm, el volumen de 0.5 mL de muestra se modificó por 0.05 mL de muestra, complementado con 0.45 mL de agua destilada, obteniendo así una dilución en proporción 1:10.

### **7.3.2 Determinación de grasa**

El contenido de grasa se cuantificó utilizando el método Gerber, siguiendo el procedimiento AOAC 33.2.27 A (1990).

### **7.3.3 Determinación de pH**

El pH se determinó siguiendo los lineamientos establecidos en la norma NMX-F-317-NORMEX-2013.

### **7.3.4 Determinación de humedad**

Este método se fundamenta en la pérdida de peso de las muestras como resultado de la evaporación del agua. Para ello, se utilizó una termobalanza marca OHAUS, compuesta por una balanza electrónica y un módulo calefactor, que calcula y expresa el contenido de agua en la muestra en porcentaje. El procedimiento consistió en pesar  $\geq 1$  g de muestra, colocarlo en el equipo programado para calentar a una temperatura de 100 °C, obteniéndose el resultado una vez que se alcanzó un peso constante.

### **7.3.5 Determinación de cenizas (minerales)**

El contenido de cenizas se determinó siguiendo el principio de calcinación, de acuerdo con el método 945.46 de la AOAC (1990).

### **7.3.6 Determinación del contenido de proteínas y de la densidad**

La cuantificación de las proteínas y de la densidad se realizaron empleando un analizador ultrasónico de leche Lactoscan MCC (Milkotronic Ltd., Bulgaria) de acuerdo a las especificaciones del fabricante.



## **7.4 Acondicionamiento del lactosuero y fermentaciones**

### **7.4.1 Fermentación de lactosuero crudo**

Esta metodología se diseñó tomando como referencia reportes que indican que la producción de ciertos metabolitos y el consumo de sustrato dependen del tipo de fermentación (aerobia o anaerobia). Por ello, se planificaron tres tratamientos para evaluar el oxígeno disponible en el espacio de cabeza durante la fermentación. Cada tratamiento se realizó en recipientes de distintas capacidades; matraces de capacidad de 50 mL, conteniendo 25 mL de lactosuero, matraces de 125 mL, conteniendo 75 mL de lactosuero y matraces de 500 mL, conteniendo 325 mL de lactosuero (experimentos por triplicado).

### **7.4.2 Fermentación de lactosuero con precursores**

Esta etapa del procedimiento experimental se planteó con base en lo descrito por Gómez-Aldapa et al. (2021), quienes mencionan que *K. marxianus* tiene la capacidad de utilizar alcohol isoamílico como precursor para la síntesis de acetato de isoamilo, así como con lo reportado por Conde-Báez et al. (2016), quienes emplearon el aminoácido L-fenilalanina para la producción de 2-feniletanol en concentraciones de 0.5 a 1 g/L, sin embargo, en este estudio se consideró la utilización de L-leucina, que, a través de la ruta de Ehrlich, produce la molécula de alcohol isoamílico, el cual es el metabolito clave para la síntesis de acetato de isoamilo (Styger, 2011 & Morrissey et al., 2015).

Con base en lo anterior, se plantearon ocho tratamientos: cuatro con la adición de alcohol isoamílico (Sigma-Aldrich) en concentraciones de 0.25, 0.5, 0.75 y 1% (v/v), y cuatro con la adición de L-leucina (Nutricost) en concentraciones 0.5, 1, 1.5 y 2 g/L. El objetivo fue evaluar el efecto de estos precursores en *Kluyveromyces marxianus* sobre la síntesis del acetato de isoamilo y en el consumo de lactosa. Para cada tratamiento, se utilizaron matraces de 125 mL a los cuales se les adicionaron 50 mL de lactosuero (experimentos por triplicado).

### **7.4.3 Optimización de la producción de acetato de isoamilo en fermentación del lactosuero**

#### **7.4.3.1 Diseño experimental**

De acuerdo con los resultados del apartado 9.4, se planteó un Diseño Central Compuesto Rotable (Design-Expert 13) para optimizar la producción de acetato de isoamilo. En este diseño se incluyeron 2 variables independientes, tal como se muestra en la Tabla 11. La

primera variable fue la adición de alcohol isoamílico, con concentraciones mínima y máxima de 0.15% y 0.55%, respectivamente. La segunda variable fue la adición de L-leucina, con concentraciones mínima y máxima de 0.60 y 1.90 g/L, respectivamente.

**Tabla 11.** Variables independientes del diseño central compuesto rotatable.

<i>Factor</i>	<i>Variable</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>	<i>[ ] baja</i>	<i>[ ] alta</i>	<i>Media</i>
<b>A</b>	Alcohol isoamílico (%)	0.0672	0.6328	-1 ↔ <b>0.15</b>	+1 ↔ <b>0.55</b>	0.35
<b>B</b>	L-leucina (g/L)	0.3308	2.17	-1 ↔ <b>0.60</b>	+1 ↔ <b>1.90</b>	1.25

El diseño arrojó 13 tratamientos, de los cuales 5 corresponden al punto central. A partir de estos tratamientos, se realizaron las fermentaciones correspondientes, incorporando ambos precursores (bajo las mismas condiciones de recipiente de fermentación, agitación, temperatura y tiempo). El diseño consideró 5 variables de respuesta: producción de acetato de isoamilo, concentración de alcohol isoamílico, producción de etanol, consumo de lactosa, producción de biomasa y monitoreo del pH.

Es importante destacar que esta etapa de la investigación se realizó utilizando dos cepas de *K. marxianus*: la **cepa ITD00262-P**, descrita previamente en el apartado 8.1 y la **cepa ITD00262-C**, obtenida del mismo laboratorio en esta etapa de la investigación, la cual se cultivó y almacenó bajo las mismas condiciones.

#### 7.4.3.2 Optimización por Superficie de Respuesta

Para la optimización de la producción de acetato de isoamilo, se utilizó la metodología de superficie de respuesta, considerando el tiempo de la mayor producción de aroma como variable clave dentro del diseño experimental. Esta técnica permitió analizar las interacciones entre los factores del proceso, identificando las concentraciones de precursores óptimas para maximizar la producción del metabolito deseado.

#### 7.4.3.3 Validación

Posteriormente, se realizó la validación de los diseños correspondientes a cada cepa (experimentos llevados a cabo por triplicado).

#### **7.4.4 Fermentación del lactosuero con una fase adaptativa de *Kluyveromyces marxianus***

Posterior a la validación del proceso, se implementó una etapa de adaptación de la levadura *K. marxianus* ITD00262-P durante la fermentación de lactosuero, en condiciones óptimas de 0.267% de alcohol isoamílico y 0.958 g/L de L-leucina, adicionadas. Esta fase consistió en la inoculación de la levadura en lactosuero adicionado con los precursores, ajustados a concentraciones óptimas, durante 100 generaciones, siguiendo lo reportado por De Mol et al. (2023) y Fernandes et al. (2023). El proceso incluyó la inoculación de la levadura cada 12 h en un nuevo sustrato, al que se añadieron los precursores en concentraciones iniciales. Este procedimiento tuvo como objetivo adaptar la levadura a las condiciones establecidas, minimizando su fase de adaptación en el proceso de fermentación del lactosuero.

Posteriormente, se realizó la fermentación del lactosuero bajo condiciones óptimas de adición de los precursores, manteniendo las mismas variables del recipiente de fermentación, agitación, temperatura y tiempo.

#### **7.5 Producción de acetato de isoamilo**

A partir de la cepa de *K. marxianus* previamente sembrada en el medio LPY (descrita en la sección de microorganismo y medio de cultivo), se tomó una asada y se transfirió a un matraz Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 100 mL de caldo lactosado (el matraz fue cubierto con un tapón de algodón y gasa entrecruzada con el fin de proteger el medio de la contaminación por otros microorganismos, para permitir la entrada de aire-oxígeno y de facilitar el muestreo), posteriormente, se incubó a 28 °C en una incubadora (Labline Environ Orbital Incubator Shaker, Thermo Scientific, Germany) con agitación de 120 rpm durante 24 h.

A partir de este medio, se tomó un inóculo de  $1 \times 10^6$  células/mL (cuantificado mediante conteo en cámara de Neubauer) y se adicionó a las muestras contenidas en los matraces de cada tratamiento (se cubrieron con tapones de algodón y gasa). Posteriormente los matraces se incubaron a 28 °C, con agitación a 120 rpm durante 144 h. Cada 12 h, se tomaron alícuotas de 10 mL de cada matraz, que se colocaron en tubos estériles de plástico (Eppendorf) y se almacenaron en congelación hasta su análisis por los siguientes métodos:

1. Cromatografía de gases (CG): para la detección y cuantificación de acetato de isoamilo, alcohol isoamílico y etanol.

2. Cromatografía de Líquidos de Ultra Alta Presión (UHPLC): para la detección y cuantificación de carbohidratos.
3. Método DNS: para la cuantificación de azúcares reductores.

El líquido residual de cada matraz se utilizó para la medición de pH. Este procedimiento se realizó para todos los tratamientos (7.4.1, 7.4.2, 7.4.3.3 y 7.4.4), con ensayos por triplicado, excepto en caso del tratamiento 7.4.3.1.

## **7.6 Conteo de levaduras**

A partir de cada matraz se realizó el conteo de levaduras utilizando la técnica de conteo directo al microscopio empleando una cámara de Neubauer (Marienfeld, Germany). Para ello, se tomó una alícuota de 100  $\mu\text{L}$ , las células fueron teñidas empleando una solución de azul de metileno al 0.1% (se realizaron las diluciones necesarias para facilitar el conteo).

## **7.7 Métodos analíticos**

### **7.7.1 Cromatografía de Gases**

- Análisis realizados en la etapa 7.4.1

#### **Cromatógrafo de Gases acoplado a un Detector de Ionización de Flama (CG-FID)**

Los compuestos acetato de isoamilo, alcohol isoamílico y etanol fueron cuantificados empleando un Cromatógrafo de Gases acoplado a un Detector de Ionización de Flama (CG-FID, modelo Autosystem XL, PerkinElmer Instruments, USA). Se utilizó como fase estacionaria una columna capilar DB-WAX Agilent J&W (polietilenglicol), (60 m longitud x 0.25 mm diámetro interno x 0.25  $\mu\text{m}$  tamaño de película), utilizando nitrógeno como gas portador a un flujo de 1 mL/min. El tiempo establecido en el método fue de 15.14 min, una temperatura del inyector de 220 °C y del detector de 250 °C. La temperatura del horno se programó de 60 a 170 °C, con una rampa de calentamiento de 10 °C/min, seguido de un calentamiento de 170 a 245 °C, con una rampa de calentamiento de 35 °C/min.

Las muestras, previamente centrifugadas (5000 rpm x 5 min a 5 °C) y filtradas mediante membranas de acetato de celulosa (Whatman, 0.45  $\mu\text{m}$  tamaño de poro x 25 mm diámetro), fueron inyectadas de forma manual en volúmenes de 1  $\mu\text{L}$ .

*Curva de calibración*

La identificación y cuantificación de los compuestos se realizó mediante la comparación de patrones e índices de retención con estándares puros de acuerdo con la curva calibración obtenida de acuerdo con las concentraciones mostradas en la Tabla 12.

**Tabla 12.** Soluciones para curva de calibración en CG-FID.

	<i>Etanol (%)</i>	<i>Alcohol isoamílico (%)</i>	<i>Acetato de isoamilo (%)</i>
<i>Solución madre</i>	12	0.2	0.2
<i>Solución 1</i>	9	0.15	0.15
<i>Solución 2</i>	6	0.1	0.1
<i>Solución 3</i>	3	0.05	0.05
<i>Solución 4</i>	1.5	0.025	0.025
<i>Solución 5</i>	0.6	0.01	0.01
<i>Solución 6</i>	0	0	0

➤ Análisis realizados en las etapas 7.4.2 - 7.4.4

#### **Cromatógrafo de Gases acoplado a un Detector de Espectrometría de Masas (CG-MS)**

La cuantificación de los compuestos acetato de isoamilo, alcohol isoamílico y etanol se realizó empleando un Cromatógrafo de Gases (modelo Agilent Technologies 7890A, USA) acoplado a un detector de Espectrometría de Masas (modelo Agilent Technologies 5975C, detector Triple-Axis). Se utilizó como fase estacionaria una columna capilar FFAP Perkin Elmer Elite (polietilenglicol, USA), (30 m longitud x 0.25 mm diámetro interno x de 0.25 µm tamaño de película), utilizando helio como gas portador a un flujo de 1 mL/min. El tiempo establecido en el método fue de 12.8 min y las condiciones de operación fueron las siguientes: se programó el inyector a una temperatura de 250 °C en modo splitless y el detector a 230 °C a 70 eV en modo SIM, específicamente para los iones 42, 55 y 70 (presentes en las moléculas, excepto en etanol donde solo está presente el ion 42). El horno se programó a una temperatura inicial de 40 °C durante 3 min, seguida de una rampa de calentamiento de 3 °C/min hasta alcanzar 52 °C, manteniéndose durante 1 min, posteriormente, se aplicó una rampa de calentamiento de 10 °C/min hasta llegar a 100 °C.

#### **Preparación de muestras mediante HeadSpace por Microextracción en Fase Sólida (HS-SPME)**

Las muestras fueron preparadas de la siguiente manera:

1. En un vial con septum se colocaron 8 mL de muestra, la cual fue calentada en baño María a 35 °C durante 5 min.

2. Manteniendo la muestra del baño María, se introdujo el Holder proveído con fibra de poliacrilato y se expuso en el espacio de cabeza (headspace) del vial durante 60 min.
3. Transcurrido el tiempo, se retiró el Holder y se procedió a inyectar la muestra en el cromatógrafo de gases.

#### *Curva de calibración*

La identificación y la cuantificación de los compuestos se realizó comparando los iones detectados en la muestra con los iones correspondientes de estándares puros. Se preparó una solución madre en agua de los tres compuestos: acetato de isoamilo (Sigma-Aldrich), alcohol isoamílico (Sigma-Aldrich) y etanol (Meyer), con concentraciones de 0.2%, 0.2% y 12% respectivamente. A partir de esta solución madre, se realizaron las diluciones adicionales, como se detalla en la Tabla 13.

**Tabla 13.** Soluciones para curva de calibración en CG-MS.

	<i>Etanol (%)</i>	<i>Alcohol isoamílico (%)</i>	<i>Acetato de isoamilo (%)</i>
<i>Solución madre</i>	12	0.2	0.2
<i>Solución 1</i>	3	0.05	0.05
<i>Solución 2</i>	1.5	0.025	0.025
<i>Solución 3</i>	0.75	0.0125	0.0125
<i>Solución 4</i>	0.375	0.00125	0.00125
<i>Solución 5</i>	0.0375	0.000625	0.000625
<i>Solución 6</i>	0	0	0

#### **7.7.2 Cromatografía de Líquidos de Ultra Alta Presión (UHPLC)**

El método UHPLC se utilizó como complemento al análisis realizado mediante el método DNS, con el objetivo de cuantificar los carbohidratos lactosa, galactosa y glucosa. Para ello, se empleó un Cromatógrafo de Líquidos de Ultra Alta Presión (UHPLC) (DIONEX, Ultimate 3000, RS Autosampler, Germany) acoplado a un detector UV-Vis (RefractoMax520 ERC, Germany). Como fase estacionaria, se utilizó una columna Rezer RCM Monosaccharide Ca<sup>+2</sup> (300 x 7.8 mm), utilizando agua como fase móvil a un flujo de 0.3 mL/min. Las condiciones de operación incluyeron una presión de 15 bar y una temperatura de 75 °C, con un tiempo establecido del método de 20 min.

Se inyectaron de manera automática muestras de 10 µL previamente centrifugadas (5000 rpm x 5 min a 5 °C), filtradas mediante membrana de acetato de celulosa (Whatman, tamaño de poro de 0.45 µm y diámetro 25 mm) y diluidas con agua (relación 1:2). La identificación

y la cuantificación de los compuestos se realizó comparando los patrones e índices de retención con los compuestos estándar puros.

#### *Curva de calibración*

Se preparó una solución madre en agua de los tres compuestos: lactosa (Meyer), galactosa (MP Biomedicals) y glucosa (Meyer), a concentraciones de 20 g/L, 10 g/L y 10 g/L, respectivamente. A partir de esta solución madre se realizaron las diluciones como se muestra en la Tabla 14.

**Tabla 14.** Concentraciones empleadas para la obtención de la curva de calibración de carbohidratos para UHPLC.

	<i>Lactosa (g/L)</i>	<i>Galactosa (g/L)</i>	<i>Glucosa (g/L)</i>
<i>Solución madre</i>	20	10	10
<i>Solución 1</i>	15	7.5	7.5
<i>Solución 2</i>	10	5	5
<i>Solución 3</i>	5	2.5	2.5
<i>Solución 4</i>	2	1	1
<i>Solución 5</i>	0	0	0

#### **7.8 Análisis estadístico**

Se realizó un análisis estadístico en el software STATISTICA versión 8.0, utilizando un ANOVA de una sola vía. Cada tratamiento se realizó por triplicado, evaluando seis variables de respuesta: producción de acetato de isoamilo, alcohol isoamílico, etanol, consumo de carbohidratos (lactosa), producción de biomasa y monitoreo de pH. Para la comparación entre tratamientos, se realizaron pruebas de comparación de Tukey.

## 8 RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 8.1 Caracterización de lactosuero

El lactosuero, es un subproducto de la fabricación de queso, cuya composición varía según el método utilizado para precipitar la caseína de la leche. Existen distintos tipos, entre ellas el lactosuero ácido, el de requesón y el dulce. Este último es el más común y fue empleado en este proyecto, cuya selección se fundamentó tanto en su disponibilidad como en investigaciones previas del grupo de trabajo.

En este sentido, la caracterización del lactosuero incluyó la determinación de parámetros fisicoquímicos esenciales que afectan directamente su viabilidad como sustrato fermentativo. Los resultados de este análisis se presentan en la Tabla 15. Aunque los datos obtenidos son comparables con los reportados por diversos autores, específicamente para lactosuero dulce, se observaron algunas diferencias. Se cuantificó un contenido de lactosa de aproximadamente 54.78 g/L, valor que se encuentra dentro del rango de 45-60 g/L reportado por Prazeres et al. (2012) para lactosuero en general (sin diferenciar tipos), no obstante, este valor fue superior al intervalo de 46-52 g/L de lactosa en lactosuero del tipo dulce, según lo reportado por Jelen (2002). Este disacárido constituye aproximadamente el 90% de los sólidos totales del lactosuero (Ghaly y Kamal, 2004), convirtiéndose en el principal componente responsable de la contaminación orgánica, si se libera sin tratamiento previo al ambiente. Mientras que, el contenido de proteínas y de grasas, con valores de 1.4% y 0.7% respectivamente, también contribuyen a la carga orgánica, aunque en menor proporción, cabe mencionar que estos resultados son similares a los reportados por Prazeres et al. (2012) y Jelen (2002).

**Tabla 15.** Composición fisicoquímica del lactosuero.

Componente	Contenido
Lactosa (g/L)	54.78 ± 2.03
Grasa (%)	0.7 ± 0.00
Proteína (% m/m)	1.40 ± 0.011
Minerales (g/L)	4.950 ± 0.071
Humedad (%)	94.95 ± 0.17
pH	4.50 ± 0.02
Densidad (g/ml)	1.051 ± 0.001



Desde la perspectiva bioquímica, *K. marxianus* (microorganismo GRAS) es una levadura no convencional con capacidades metabólicas superiores a otras especies, gracias a su expresión constitutiva de las enzimas Lac12p (lactosa permeasa) y Lac4p ( $\beta$ -galactosidasa citosólica). Esto le permite asimilar lactosa sin requerir pretratamientos enzimáticos externos, proporcionando una ventaja sobre otros microorganismos que no presentan capacidad nativa para utilizar este disacárido. La glucosa generada alimenta directamente la vía glucolítica, mientras que la galactosa se incorpora a través de la vía de Leloir, optimizando así el flujo de carbono hacia rutas fermentativas y biosintéticas (Rubio-Texeira, 2006).

Desde el aspecto ambiental, la elevada carga orgánica del lactosuero, medida a través de la DQO y DBO, se estima en valores de 60-80 g/L y 40-60 g/L, respectivamente, según lo reportado por Dragone et al. (2009) y Smithers (2015). Los resultados de este estudio respaldan el potencial de este contaminante, destacando la importancia de su valorización mediante fermentación para la obtención de diversos productos. Además, el uso del lactosuero en su estado crudo, sin pretratamiento, representa un avance relevante, ya que evita procesos como la hidrólisis, la filtración, la concentración o la desproteinización, los cuales encarecerían el proceso y generarían residuos secundarios.

Aunque la concentración de lípidos es baja ( $\approx 0.7\%$ ), su presencia puede influir en la emulsificación de los compuestos volátiles durante la fermentación. Estudios como el de Sampaio et al. (2020), han demostrado que los lípidos afectan la eficiencia de recuperación de compuestos aromáticos mediante técnicas de extracción en fase sólida (SPME) y también pueden afectar la percepción sensorial del producto final.

Otro aspecto importante fue el pH del lactosuero, que presentó un valor de 4.50, un valor inferior a lo reportado por Jelen (2012), quien reporta que el pH en el lactosuero dulce suele ser cercano a 6.5, debido a que en ese pH se presenta la coagulación de la caseína por acción del cuajo; en contraste, el lactosuero ácido generalmente presenta un pH más ácido (4.5), como resultado del uso de ácidos orgánicos (Jelen, 2002). Esta característica del lactosuero es de gran importancia, ya que estas diferencias de pH pueden influir positiva o negativamente en los procesos biológicos para su tratamiento (Castelló et al., 2009, Appels et al., 2008). Si bien el pH obtenido fue menor a lo esperado, este valor se encuentra dentro de los parámetros reportados por Prazeres et al. (2012) y Panesar et al. (2007), indicando que la composición del lactosuero utilizado en este proyecto es similar a la utilizada en otras

investigaciones. Estas diferencias pueden deberse a factores como pretratamientos de la leche, incluyendo tratamientos térmicos previos antes del proceso principal (Jelen, 2002).

Desde el punto de vista fisiológico, este pH se encuentra dentro del rango óptimo para *K. marxianus*, cuya tolerancia va de 4.5 y 7.5, manteniendo una alta eficiencia en la producción de bioalcoholes y ésteres (Fonseca et al., 2008; Lane & Morrissey, 2010). Durante la fermentación, la estabilidad del pH influye en la cinética de producción de compuestos como el acetato de isoamilo, debido a que la actividad de las enzimas alcohol acetil transferasas implicadas en sus síntesis se ve favorecida en ambientes ligeramente ácidos (pH 5.0-5.5) (Styger et al. 2011; Gantumur et al. 2022).

Otro aspecto importante del lactosuero es su contenido mineral, el cual es responsable de la contaminación inorgánica de este residuo. El lactosuero utilizado presentó una concentración mineral de 4.95 g/L, en línea con los valores reportados en la literatura (0.46-10%) (Prazeres et al., 2012).

Entre estas sales se encuentran principalmente NaCl y KCl, aunque también se han reportado sales de calcio (Dragone et al., 2009; Venetsaneas et al., 2009), la concentración de este componente puede tener efectos significativos sobre la osmolaridad del medio, la estabilidad de la membrana celular y la expresión de genes relacionados con la homeostasis iónica y por consecuencia en la tasa de crecimiento de los microorganismos durante la fermentación (Mounier & Coton, 2022). Al igual que el pH, la concentración de sales puede representar un desafío durante los tratamientos biológicos, por lo que debe considerarse.

Finalmente, los resultados obtenidos permiten establecer que la composición del lactosuero evaluado es adecuada para su aprovechamiento mediante fermentación con *K. marxianus*. Las condiciones identificadas en esta caracterización fundamentan su potencial orgánico para el desarrollo de procesos biotecnológicos orientados a la generación de compuestos aromáticos de interés industrial. La caracterización realizada permitió establecer condiciones iniciales robustas, que son similares a otros estudios que han utilizado este tipo de residuo para la producción de 2-feniletanol, etanol y otros (Alonso-Vargas et al., 2022; Conde-Báez et al., 2017).

## 8.2 Cinéticas de fermentación del lactosuero crudo en matraces de distintos volúmenes

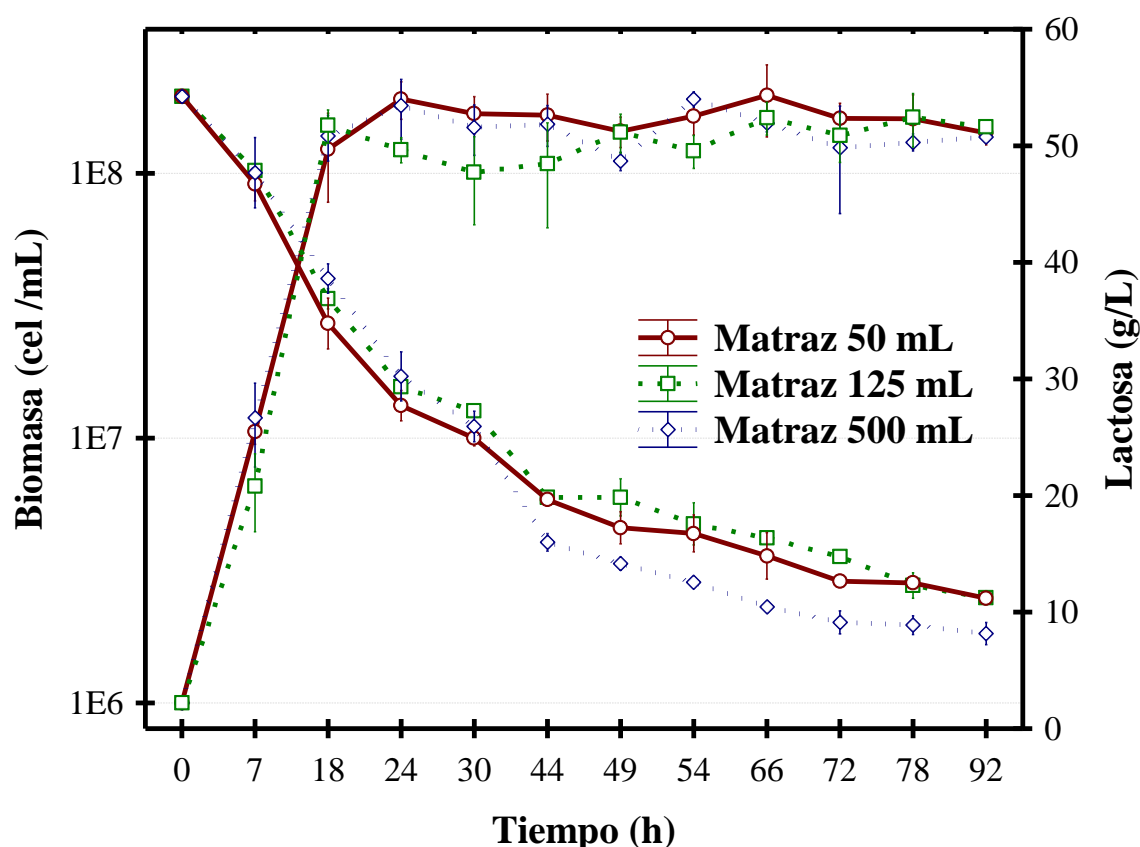
Las transformaciones biológicas de materia orgánica pueden realizarse en presencia de oxígeno (aerobias) o en ausencia de oxígeno (anaerobias), en determinadas ocasiones pueden suceder condiciones mixtas. Durante la fermentación del lactosuero utilizando *Kluyveromyces marxianus*, se evaluó el efecto de la disponibilidad de oxígeno generada a partir del uso de matraces Erlenmeyer de diferentes capacidades (como se muestra más adelante), como estrategia experimental indirecta para modular las condiciones de aireación del sistema. Esta metodología responde al principio de que el volumen del espacio de cabeza de un matraz, en relación con el volumen del cultivo, determina la cantidad de oxígeno disponible para el metabolismo microbiano, afectando de forma significativa la dinámica de crecimiento, el consumo de sustratos y la formación de metabolitos.

- ∞ Tratamiento 1 (T1). Utilización de matraces Erlenmeyer de 50 mL con 25 mL del lactosuero.
- ∞ Tratamiento 2 (T2). Utilización de matraces Erlenmeyer de 125 mL con 75 mL del lactosuero.
- ∞ Tratamiento 3 (T3). Utilización de matraces Erlenmeyer de 500 mL con 325 mL del lactosuero.

### 8.2.1 Crecimiento de microorganismos y consumo de lactosa

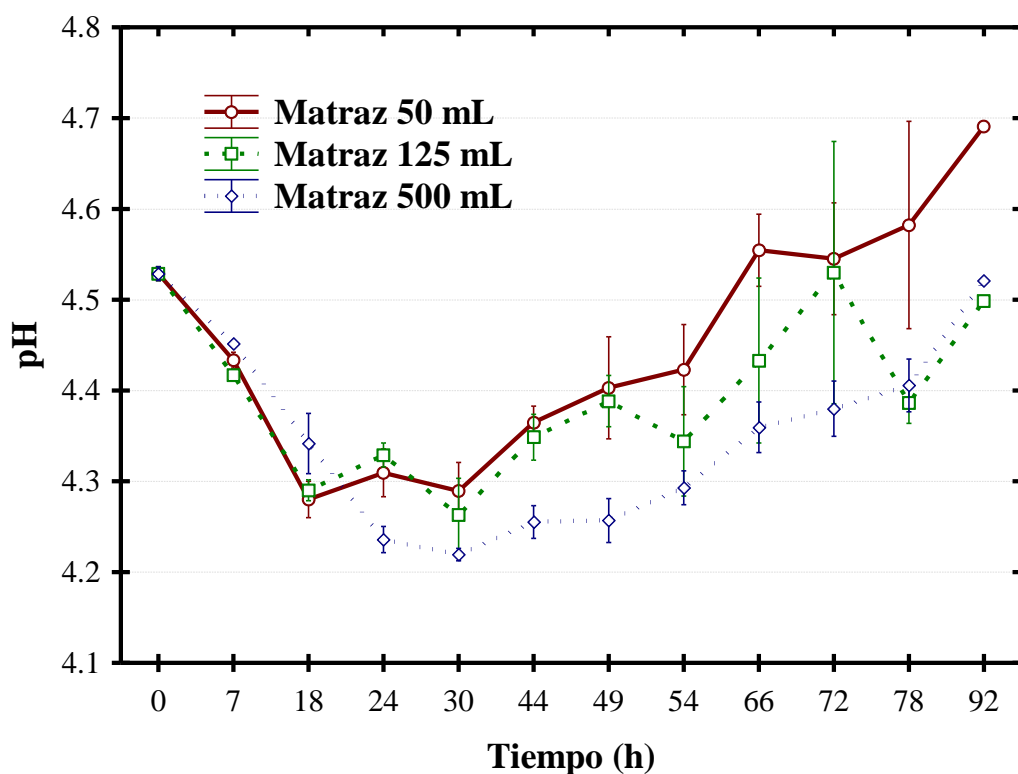
*K. marxianus* es una levadura no convencional ampliamente utilizada en procesos biotecnológicos, destacando por su capacidad de metabolizar lactosa gracias a la expresión de los genes LAC12 y LAC4, que codifican para una permeasa de lactosa y la enzima  $\beta$ -galactosidasa, respectivamente. Estas características les otorgan una ventaja frente a otras levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*, que carecen de esta capacidad (Rubio-Teixeira, 2006). En el presente estudio, los cultivos mostraron una fase exponencial de crecimiento robusta durante las primeras 18 h de fermentación, alcanzando concentraciones celulares superiores a 8 log cel/mL. Este crecimiento se correlaciona con una eficiencia notable en el consumo de lactosa, con una reducción de su concentración desde aproximadamente  $\approx 54$  g/L hasta niveles inferiores a  $\approx 10$  g/L al finalizar el ensayo, lo que representa una remoción superior al 80% (Figura 8). Asimismo, se pudo observar su capacidad de adaptación y desarrollo frente a condiciones específicas proporcionadas por la composición del lactosuero y los tratamientos establecidos.

Este patrón de crecimiento fue consistente en los tres tratamientos evaluados. No obstante, se observaron diferencias significativas en el consumo de lactosa: a las 44 h de iniciadas las fermentaciones, el tratamiento T3 (utilizando matraces de 500 mL) mostró un consumo de 70.56%, cifra significativamente superior a la observada en los tratamientos T1 y T2, con consumos de 63.79% y 63.43%, respectivamente. Esta diferencia se atribuye a la mayor oxigenación en el tratamiento T3, que favoreció una respiración celular más eficiente y redujo la formación de etanol, en concordancia con lo reportado por Lukondeh et al. (2005), quienes documentaron una reducción en la producción de etanol y un aumento en la biomasa bajo condiciones controladas de oxigenación en fermentaciones. Sumado a lo anterior, investigaciones previas han demostrado que el uso de sistemas de aireación continua mejora significativamente la tasa de consumo de lactosa por *K. marxianus* (Aktas et al., 2006), validando la hipótesis de que la disponibilidad de oxígeno modula las rutas metabólicas activadas.



**Figura 8.** Cinéticas de crecimiento de *K. marxianus* y consumo de lactosa durante las fermentaciones de lactosuero en tres recipientes de distintas capacidades.

Durante el proceso de fermentación del lactosuero con *K. marxianus*, se observó una notable variabilidad en el pH del medio a lo largo del tiempo, como se muestra en la Figura 9. Inicialmente, el pH del lactosuero fue de 4.52, proporcionando un ambiente adecuado para el inicio de la fermentación, según lo señalado por diversos autores. Durante las primeras 18 a 24 h, incluso hasta las 30 h, se observó un descenso del pH, alcanzando valores ligeramente inferiores a 4.3, este fenómeno es atribuido a la producción de ácidos orgánicos como el láctico y el acético, que son generados durante la fase logarítmica de crecimiento, cabe mencionar que este comportamiento fue similar en los tratamientos evaluados. Posteriormente el pH se estabilizó y se observó un incremento gradual durante el resto del experimento, indicando un equilibrio en la producción y el consumo de los ácidos, así como el aprovechamiento de los aminoácidos en el medio por parte de la levadura. Este comportamiento coincide con lo descrito por Ozarslan y K k Taş, (2022), quienes identificaron un patrón similar en fermentaciones con *K. marxianus*, donde la acumulación inicial de ácidos se ve seguida por una estabilización del medio asociada a una disminución de la actividad fermentativa.



**Figura 9.** Monitoreo de pH durante las fermentaciones de lactosuero en tres recipientes de distintas capacidades.

El uso de matraces con diferentes capacidades actuó como una herramienta experimental eficaz para simular condiciones aeróbicas variables sin la necesidad de sistemas mecanizados de aireación. El matraz de 500 mL, con un mayor volumen de espacio de cabeza, proporcionó mejores condiciones de oxigenación, reflejadas en un mayor consumo de lactosa, una variación gradual en el pH, y un perfil metabólico compatible con las rutas predominantemente respiratorias. Estos hallazgos refuerzan la relevancia de considerar factores físicos del cultivo, como la geometría del recipiente, en el diseño experimental de procesos fermentativos.

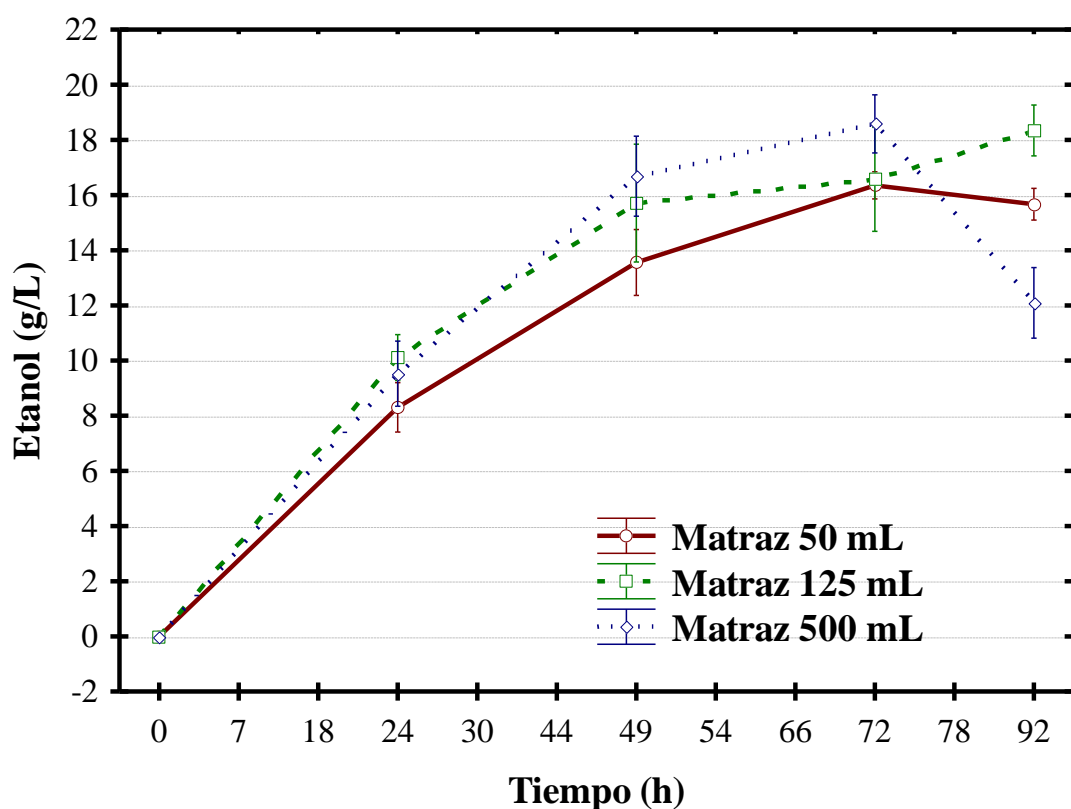
El diseño experimental basado en la utilización de matraces de distintas capacidades permitió demostrar que la disponibilidad de oxígeno, aún sin control directo, tiene un efecto determinante sobre el desempeño fermentativo de *Kluyveromyces marxianus* en el lactosuero. Este enfoque sencillo pero robusto aporta evidencia relevante sobre la influencia de las condiciones físico-químicas del sistema en la eficiencia de los bioprocesos aplicados al tratamiento y valorización de residuos agroindustriales.

### **8.2.2 Producción de etanol, de alcohol isoamílico y de acetato de isoamilo**

La fermentación del lactosuero crudo utilizando *K. marxianus* sin suplementación externa de precursores, representa un enfoque biotecnológico de interés, tanto por sus beneficios ambientales como por su aplicación en la ingeniería metabólica para el aprovechamiento de residuos lácteos. En este contexto, el lactosuero, subproducto de la industria quesera, presenta una elevada carga orgánica, especialmente por su contenido en lactosa (45–60 g/L), lo que lo convierte en un sustrato de interés para la biotransformación microbiana (Hernández-Cruz et al., 2023). Desde el punto de vista fisiológico, *K. marxianus* se distingue por su termotolerancia y por un metabolismo respiratorio-fermentativo facultativo, que le permite modular su flujo metabólico central en función de la disponibilidad de oxígeno, de carbono y de nitrógeno (Walker & O'Neill, 1990; Silveira et al., 2005).

En este contexto, los resultados obtenidos muestran la capacidad *K. marxianus* para transformar los componentes del lactosuero en los compuestos de interés. Durante los ensayos del proceso fermentativo sin adición de precursores, la levadura mostró una capacidad notable para utilizar la lactosa como única fuente de carbono, reflejada en una rápida adaptación a las condiciones del medio y en una transformación eficiente de los azúcares disponibles. En estas condiciones experimentales, se observó un incremento significativo en la concentración de etanol, como se muestra en la Figura 10. El análisis

cromatográfico de las muestras identificó y cuantificó una producción de 8 a 10 g/L de etanol durante las primeras 24 h en los tres tratamientos, sin diferencias significativas. La concentración de etanol aumentó progresivamente durante el resto de la fermentación, mostrando un comportamiento similar en los tres tratamientos, destacando que la máxima producción de este alcohol se presentó en el tratamiento T2 con 18.3 g/L (matraces de 125 mL con 75 mL de lactosuero). Esta condición específica de espacio de cabeza generó un equilibrio favorable entre la oxigenación limitada y la retención de etanol, optimizando así la actividad fermentativa de la levadura (Murari et al., 2013; Koukoumaki et al., 2024).



**Figura 10.** Cinéticas de producción de etanol durante las fermentaciones de lactosuero en tres recipientes de distintas capacidades.

Además, la comparación entre las diferentes condiciones experimentales permitió identificar que un volumen mayor de espacio de cabeza, como en el tratamiento T3 (matraces de 500 mL), impide la retención de etanol, posiblemente por su mayor volatilización o redistribución metabólica hacia otras rutas respiratorias. Estas concentraciones alcanzadas de etanol son similares a las obtenidas en estudios de fermentaciones del lactosuero sin enriquecimiento nitrogenado ni limitación de oxígeno, lo cual ha sido reportado por Dragone et al. (2009) y Murari et al. (2019). Durante la

fermentación, este patrón se alinea con resultados previos que muestran cómo las condiciones hipóxicas o anaeróbicas favorecen la desviación del flujo glucolítico hacia la fermentación alcohólica, siguiendo la vía Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), utilizando las enzimas piruvato descarboxilasa (PDC) y alcohol deshidrogenasa (ADH) para la conversión de piruvato a etanol (Diniz et al., 2012; Silveira et al., 2005).

Por otro lado, el éster acetato de isoamilo, responsable del aroma a plátano, se detectó en los tres tratamientos, aunque, las concentraciones extremadamente bajas no fueron cuantificables. Este compuesto se forma a partir de la condensación de alcohol isoamílico y de la acetil-CoA mediante la enzima alcohol acetil transferasas (AAT). La presencia de acetato de isoamilo, aunque mínima, sin precursores exógenos, indica que *K. marxianus* tiene la capacidad basal de sintetizar no sólo el alcohol isoamílico, sino también de dirigir parte del acetil-Co-A generado en la glucólisis hacia esta ruta secundaria, en lugar de emplearlo completamente en el ciclo de Krebs o en la síntesis de lípidos. Este proceso ha sido reportado por Etschmann et al. (2002) y Morrissey et al. (2015), quienes destacan la competencia entre vías catabólicas y anabólicas por el uso de la acetil-Co-A en fermentaciones. No obstante, la baja productividad observada del acetato de isoamilo en el lactosuero crudo, sugiere que el flujo metabólico dirigido a la esterificación es limitado, posiblemente por dos factores principales: 1) la concentración insuficiente de alcohol isoamílico endógeno y 2) una regulación negativa de las enzimas AAT en condiciones no limitadas de nitrógeno, como lo han descrito Styger et al. (2011) y Gantumur et al. (2022).

Comparativamente, *S. cerevisiae* es utilizada frecuentemente como organismo modelo en estudios similares a este, debido a que se conoce la variabilidad de sus perfiles de expresión genómica, los cuales dependen de las condiciones en las que se encuentra, ya sean aeróbicas, anaeróbicas o con limitación de oxígeno, lo que influye directamente en su perfil metabólico y en la expresión de genes relacionados con la fermentación (Tai et al., 2005).

En este contexto, los resultados obtenidos fueron fundamentales para conocer que el oxígeno disponible en el espacio de cabeza tiene un efecto en el metabolismo de *K. marxianus*, particularmente en el consumo de la lactosa y en la producción de etanol, aunque no así en la producción del aroma acetato de isoamilo. En este sentido, Dekker et al. (2021), identificaron que *K. marxianus* carece de un sistema funcional de esteroides, lo que limita su crecimiento en condiciones anaerobias y explica su baja producción de etanol en comparación con *S. Cerevisiae*, aunque le permite operar eficientemente en entornos



microaerobios como los generados en matraces parcialmente cerrados (Parrondo et al., 2009).

La síntesis de metabolitos volátiles, aunque limitada, revela el potencial de *K. marxianus* como biocatalizador de compuestos funcionales, incluso en medios complejos no enriquecidos. Su habilidad para transformar compuestos simples en derivados complejos mediante rutas enzimáticas específicas justifica su aplicación en procesos de biovaloración de residuos agroindustriales (Karim & Aider, 2022; Ohstrom et al., 2023). En función de estos resultados, se eligieron los matraces de 125 mL para las siguientes etapas experimentales, dado que ofrecieron un balance ideal entre oxigenación y producción de etanol.

### **8.3 Cinéticas de fermentación en lactosuero crudo con la adición de precursores**

La generación de metabolitos a partir de la fermentación de fuentes de carbono provenientes de residuos alimentarios es un aspecto de gran interés en la biotecnología moderna, ya que es una alternativa para la obtención de compuestos como el aroma acetato de isoamilo que tiene aplicación en las industrias alimentaria, cosmética y farmacéutica (Liu et al., 2023; Reyes-Sánchez et al., 2019). En este contexto, la adición de precursores específicos puede influir significativamente en la calidad y cantidad de los aromas producidos (Conde-Baez et al., 2017).

Es por ello que la estrategia experimental implicó la adición controlada de precursores, como el alcohol isoamílico y la L-leucina, al sistema fermentativo basado en lactosuero crudo. Este modelo, en el que *K. marxianus* actúa principalmente como catalizador biológico, se fundamenta en la evidencia de que el microorganismo no solo es capaz de sintetizar compuestos volátiles de forma endógena, sino que también puede transformar sustratos exógenos mediante rutas enzimáticas específicas, optimizando así la eficiencia del proceso, según lo reportado por Gómez Aldapa et al. (2021); Chua & Liu, (2020) y Conde-Baez et al. (2016).

En esta etapa, el objetivo fue dirigir los flujos metabólicos de *K. marxianus* durante la fermentación de lactosuero crudo hacia la síntesis eficiente del acetato de isoamilo, un éster de alto valor sensorial y comercial, a partir de compuestos previamente formados.

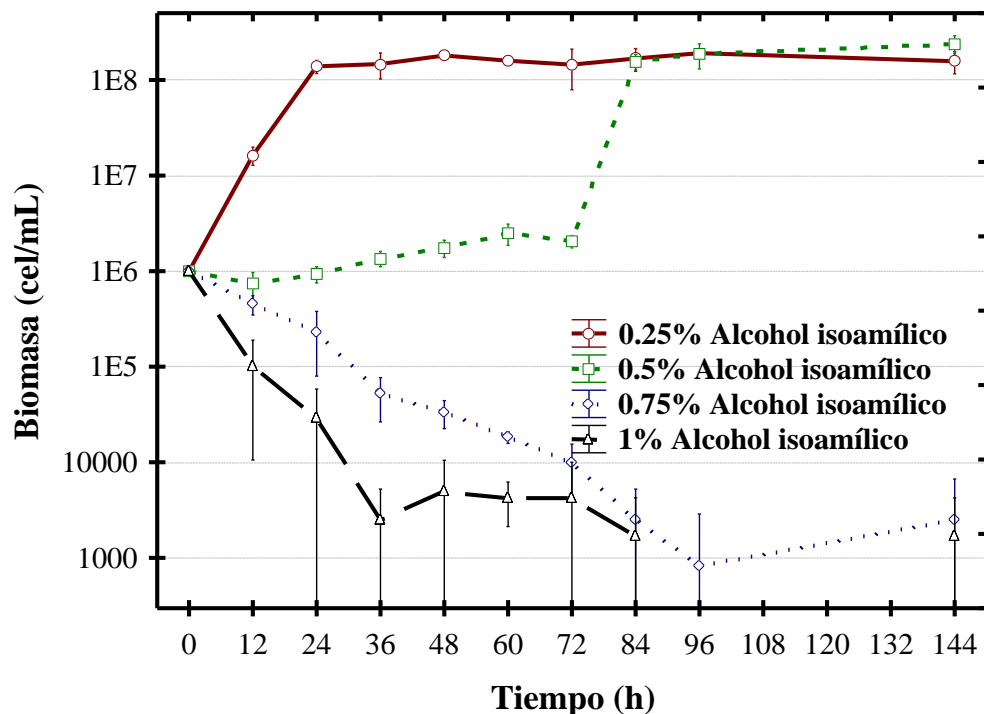
### 8.3.1 Cinéticas de fermentación en lactosuero crudo con la adición de alcohol isoamílico

#### 8.3.1.1 Crecimiento de los microorganismos y el consumo de lactosa

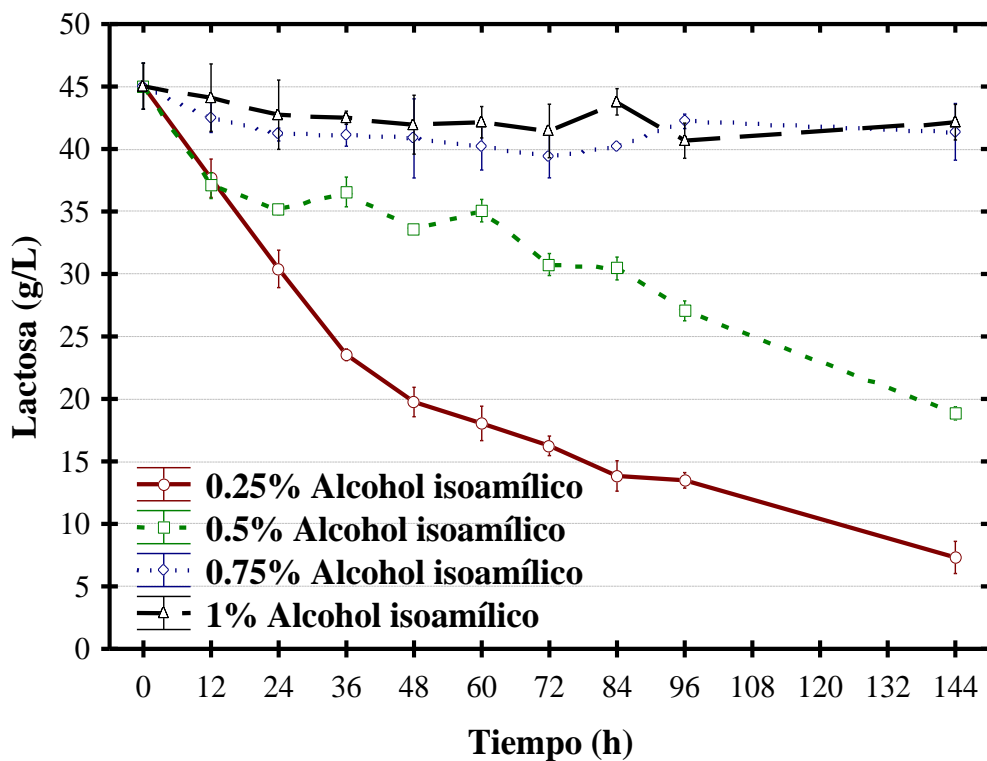
Utilizar alcohol isoamílico como precursor en la fermentación con *Kluyveromyces marxianus* es una táctica de biotransformación que busca crear compuestos volátiles de valor agregado, particularmente ésteres, como el acetato de isoamilo. No obstante, dependiendo de su concentración, estas clases de alcoholes superiores pueden tener efectos duales sobre los microorganismos: funcionar como sustratos para la síntesis de aromas o desempeñarse como agentes estresantes. Se evaluó el efecto de la adición de cuatro concentraciones de alcohol isoamílico (0.25, 0.5, 0.75 y 1 % v/v) en la fermentación de lactosuero crudo, para evaluar cómo afectaban al crecimiento celular, el consumo de lactosa y los cambios del pH del medio.

Los resultados mostrados en la Figura 11 sugieren que concentraciones altas de alcohol isoamílico ( $\geq 0.75$  %) tienen un efecto tóxico evidente en *K. marxianus*, lo cual provoca una inhibición total del crecimiento celular. Esta inhibición también se observó como una ausencia del consumo de lactosa (Figura 12), sin cambios significativos en el pH (Figura 13) durante todo el experimento, lo cual indica que la viabilidad celular se perdió desde las primeras horas. Estos hallazgos coinciden con reportes anteriores que señalan el daño a las membranas plasmáticas y la alteración de los gradientes redox en las mitocondrias como mecanismos principales de toxicidad causada por alcoholes superiores (Sainz-Mellado et al., 2023; Kavšček et al., 2015).

Por otro lado, es notable la capacidad de *K. marxianus* para adaptarse y crecer en presencia del alcohol isoamílico en concentraciones entre 0.5 y 0.25%, principalmente con la adición de la concentración más baja. La adición del precursor no sólo fue tolerada, sino también parece haber actuado como estímulo para su actividad metabólica. En la condición con 0.25% de alcohol isoamílico, el crecimiento celular comenzó desde el inicio de la fermentación, con una fase exponencial sostenida (primeras 24 h) y una disminución progresiva del pH, un comportamiento similar al presentado en el apartado 8.2.1, indicando una actividad fermentativa y una eficiente utilización de la lactosa. También se notó una reducción continua en la concentración de la lactosa, confirmando el uso del sustrato desde las primeras fases. Estos resultados indican que la presencia del alcohol funcionó como un modulador metabólico, probablemente impulsando las rutas fermentativas en lugar de las respiratorias, al reducir la tasa de respiración mitocondrial (Hong et al., 2007).

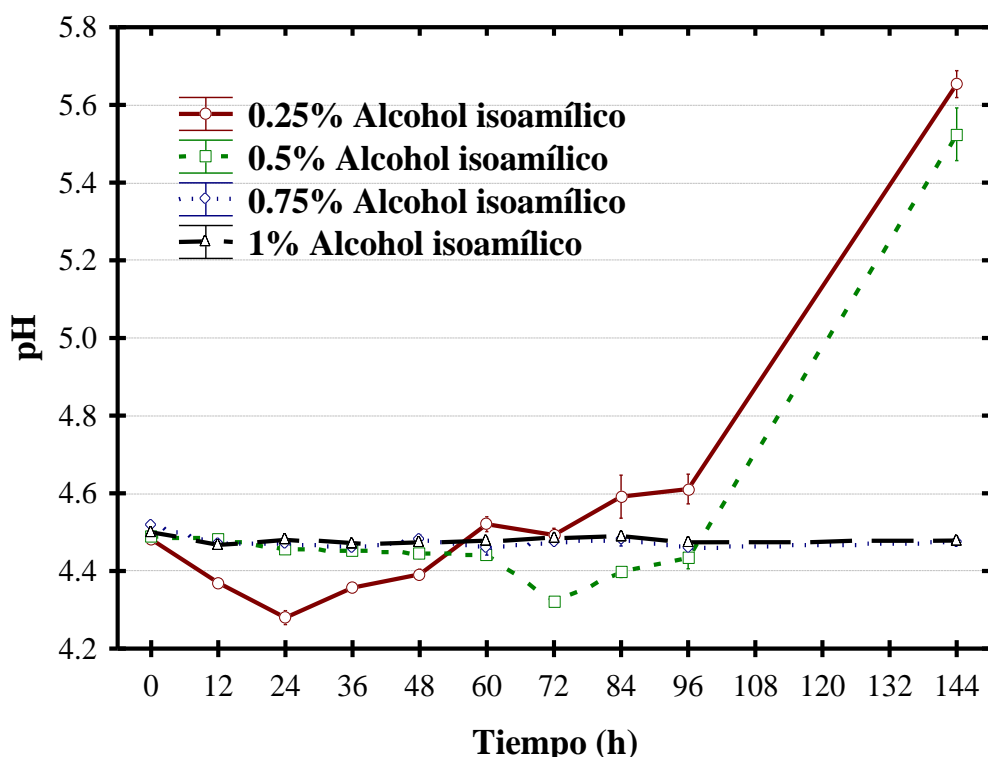


**Figura 11.** Cinéticas de crecimiento de *K. marxianus* durante las fermentaciones de lactosuero con adición de alcohol isoamílico a distintas concentraciones.



**Figura 12.** Concentraciones de lactosa durante las fermentaciones de lactosuero con *K. marxianus* con adición de alcohol isoamílico a distintas concentraciones.

A diferencia de la cinética anterior, la fermentación del lactosuero en la que se adicionó una concentración de 0.5% de alcohol isoamílico, se observó un periodo de adaptación de aproximadamente 72 h, posterior a ese tiempo se observó la fase exponencial de crecimiento, llegando a una fase estacionaria a las 84 h. Este comportamiento tiene una clara correlación en el consumo de la lactosa en el medio, que fue lento durante la fase de adaptación de *K. marxianus*, pero se intensificó durante su periodo de proliferación exponencial. El patrón del pH reforzó esta observación, mostrando una disminución posterior al establecimiento del crecimiento exponencial (Figura 13).

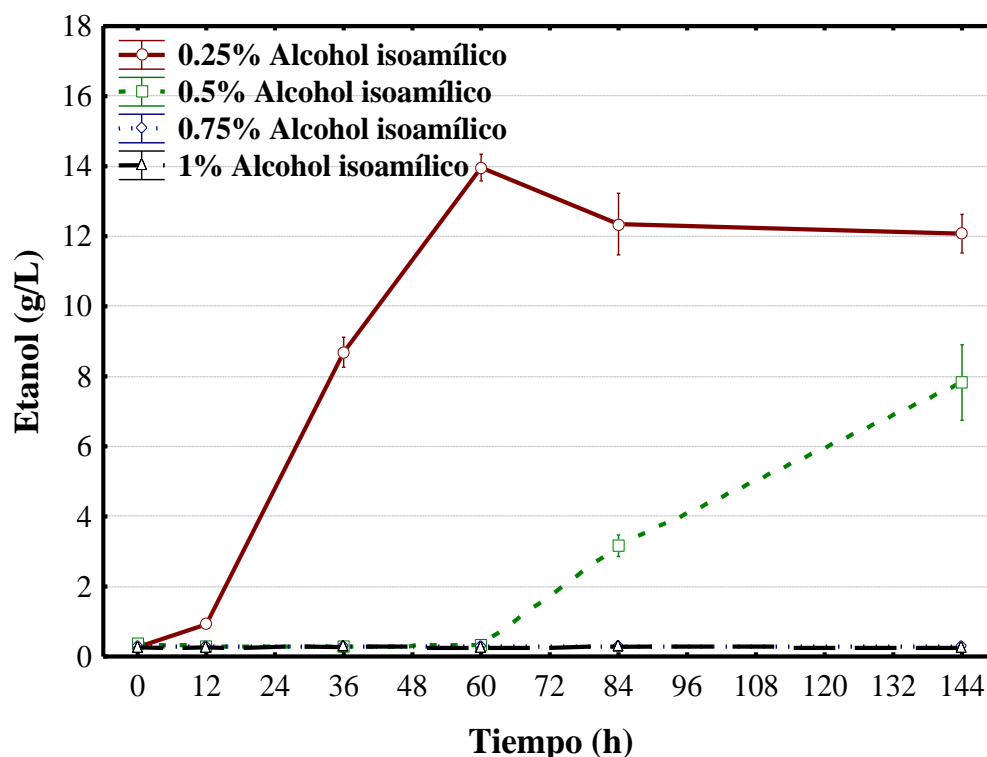


**Figura 13.** Monitoreo de pH durante las fermentaciones de lactosuero con adición de alcohol isoamílico a distintas concentraciones.

Estos resultados subrayan la importancia de establecer rangos de concentración adecuados de precursores volátiles en bioprocesos que utilizan levaduras no tradicionales. Concentraciones bajas de alcohol isoamílico pueden ser toleradas e incluso metabolizadas, mientras que valores altos interrumpen los procesos celulares esenciales. La adición de 0.25% se identificó como la más favorable para mantener el equilibrio entre la viabilidad celular y la funcionalidad metabólica del sistema, justificando su selección para etapas posteriores de optimización.

### 8.3.1.2 Producción de etanol y de acetato de isoamilo

La adición de alcohol isoamílico no solo impactó directamente en la viabilidad celular, sino también en la dirección de los flujos metabólicos de *K. marxianus* durante la fermentación. En particular, las condiciones experimentales con 0.25 y 0.5% del precursor, permitieron la producción continua de etanol y en menor medida, de acetato de isoamilo. Al igual que en los resultados de biomasa, de lactosa y de pH, las cinéticas con la adición de bajas concentraciones de alcohol. Las cinéticas de etanol mostraron que, en la condición de 0.25%, se presentó una fase de adaptación corta (12 h), seguida de una producción ascendente de etanol, que alcanzó un máximo de  $13.96 \pm 0.38$  g/L a las 60 h (Figura 14). Este comportamiento refleja una alta eficiencia fermentativa bajo condiciones de estrés moderado.

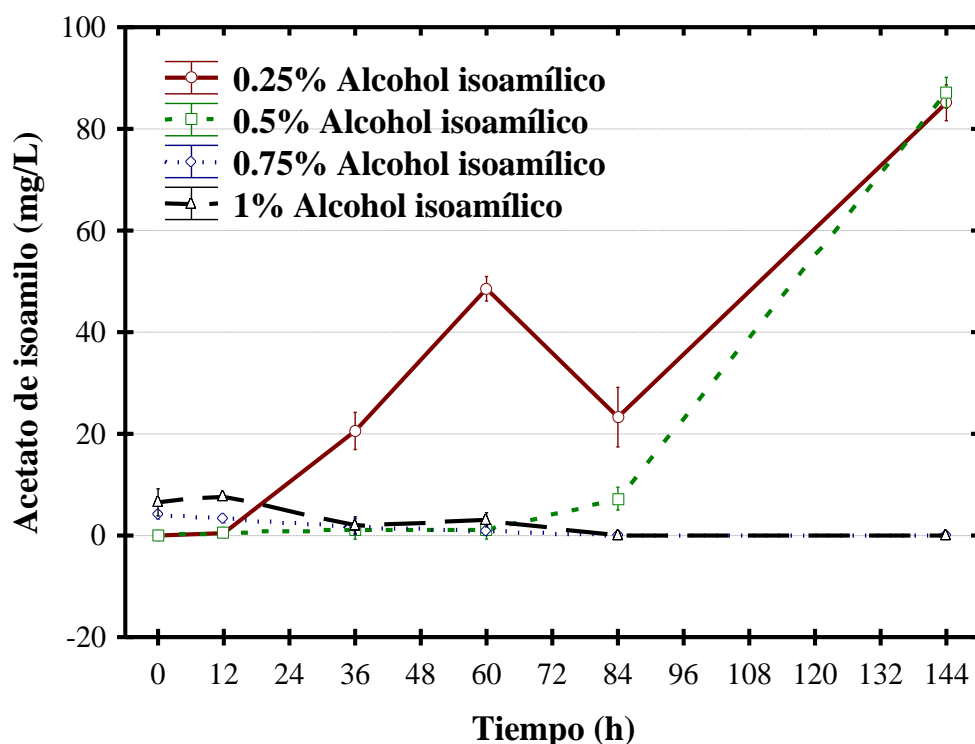


**Figura 14.** Cinéticas de producción de etanol durante las fermentaciones de lactosuero con *K. marxianus* con adición de alcohol isoamílico a distintas concentraciones.

En el caso de la adición de 0.5% de alcohol isoamílico, la producción de etanol fue más lenta, se muestra un periodo más largo de adaptación (60 h), seguido de un aumento de la concentración de etanol con una producción máxima de  $7.47 \pm 1.11$  g/L a las 144 h, lo cual coincide con el retraso que se observó en el crecimiento celular. Estas diferencias

demuestran que la presencia del precursor regula el metabolismo central, ya que no solo afecta la velocidad, sino también la magnitud de la producción de alcohol.

En relación con el acetato de isoamilo, se observó que las concentraciones más elevadas del alcohol precursor (1% y 0.75%) inhibieron por completo la formación del éster, sin que se pudiera detectar (Figura 15). Con respecto a las cinéticas de fermentación con la adición de 0.5%, se puede observar una fase de adaptación de al menos de 60 h, con una producción de  $7.25 \pm 2.26$  mg/L a las 72 h. La mayor producción cuantificada fue de  $87.09 \pm 3.03$  mg/L a las 144 h. Por otro lado, con 0.25% se observó una fase de adaptación de 12 h, posteriormente se observó la producción del éster de acetato de isoamilo de  $20.56 \pm 3.66$  mg/L y de  $48.55 \pm 2.41$  mg/L a las 36 y 60 h, respectivamente, alcanzando un máximo de  $85.14 \pm 3.52$  mg/L a las 144 h.

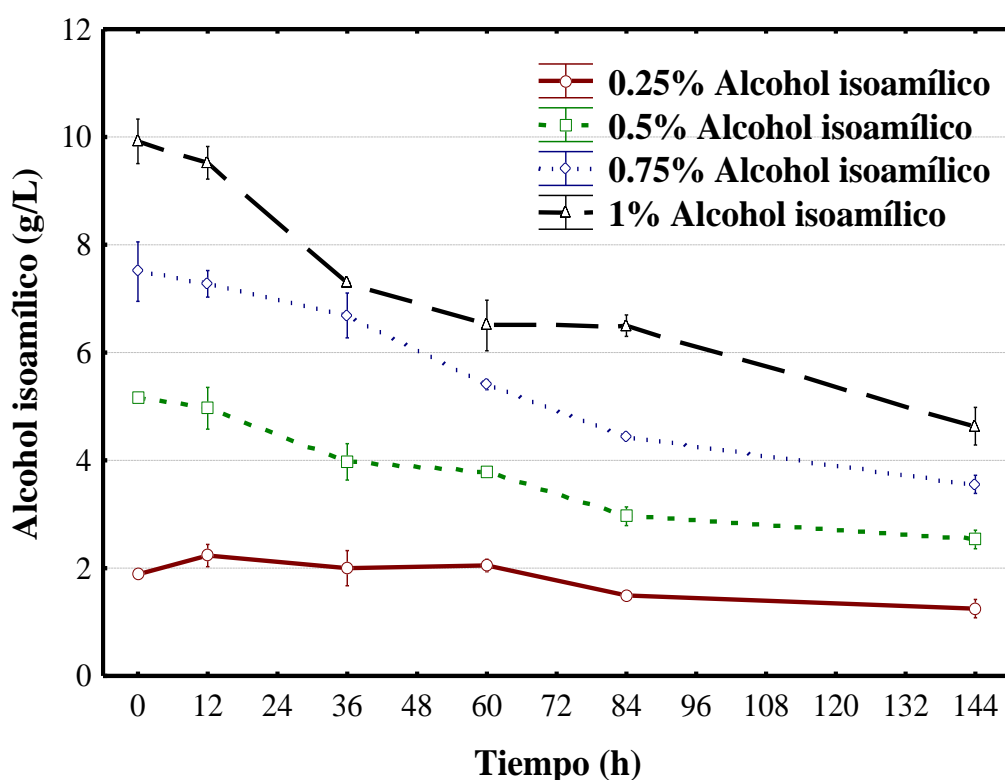


**Figura 15.** Cinéticas de producción de acetato de isoamilo durante las fermentaciones de lactosuero con *K. marxianus* con adición de alcohol isoamílico a distintas concentraciones.

Si bien, el aumento en la concentración de acetato de isoamilo no es lineal, estos resultados muestran que la adición de 0.25% de alcohol isoamílico favoreció la producción del éster y que existe un umbral de concentración de alcohol isoamílico por encima del cual las enzimas responsables de la esterificación intracelular, como las enzimas alcohol acetiltransferasas (AATs), se ven reprimidas o inactivadas. Este fenómeno puede deberse

tanto a efectos citotóxicos sobre la célula, así como a mecanismos de regulación negativa a nivel transcripcional o enzimático (Styger et al., 2011; Gantumur et al., 2022).

En este sentido, Sainz-Mellado et al. (2023), mencionan que el suministro gradual de alcohol isoamílico permite el incremento de la producción de acetato de isoamilo por *Pichia fermentans* en fermentación en estado sólido de melaza, donde se alcanzó una concentración de 390 mg/L, un aumento de 12.5 veces más en comparación con los 32 mg/L que se obtuvieron sin la adición del precursor. Cabe mencionar que dicho valor supera al reportado en esta investigación. Además, mencionan que el suministro rápido del precursor genera tanto inhibición del crecimiento, así como la capacidad de producción del éster.



**Figura 16.** Monitoreo de concentraciones de alcohol isoamílico durante las fermentaciones de lactosuero con *K. marxianus* con adición de alcohol isoamílico a distintas concentraciones.

Estos hallazgos confirman la función de *K. marxianus* como catalizador biológico, capaz de transformar directamente el alcohol isoamílico añadido mediante esterificación intracelular. La síntesis del acetato de isoamilo, desde el punto de vista bioquímico, supone que la acetil-CoA y el alcohol isoamílico interactúan en presencia de AATs. Si el metabolismo central no está afectado, como pasa al 0.25 %, es posible dirigir el flujo de carbono hacia esta vía

secundaria, lo que facilita la síntesis efectiva del éster. No obstante, cuando hay concentraciones tóxicas del precursor, la actividad de las AATs no solo se inhibe, sino que además se eleva la expresión de las enzimas éster hidrolasas, que descomponen el compuesto creado, como ha sido registrado en otros modelos de levaduras no convencionales (Plata et al., 2004; Rojas et al., 2001). Aunque la actividad de estas enzimas ha sido poco caracterizada en *K. marxianus*, se ha reportado en otras levaduras no-Saccharomyces, como *Hanseniaspora spp.* y *Torulaspora delbrueckii*, donde responden positivamente a la presencia de alcoholes de cadena ramificada en el medio (Morrissey et al., 2015; Gantumur et al., 2022).

Por otro lado, durante los procesos de fermentación, las levaduras se ven sometidas a condiciones y a factores que provocan estrés. Por ello, resulta de gran importancia evaluar su tolerancia a los factores de estrés más frecuentes en las fermentaciones, como el causado por la concentración de alcohol (Kavšček et al., 2015). Además, Mo et al. (2019), destacan que la capacidad de una levadura para producir etanol depende de su tolerancia al mismo.

En este contexto, los resultados indican que la adición controlada de alcohol isoamílico en concentraciones iguales o inferiores a 0.5% puede ser aprovechada por *K. marxianus* para la síntesis de compuestos aromáticos, sin comprometer la viabilidad celular, ni la eficiencia del proceso. Este estudio resalta el potencial de esta levadura como catalizador biológico en sistemas de producción de bioaromas a partir de residuos agroindustriales como el lactosuero, siempre que se establezcan condiciones experimentales que minimicen los efectos inhibitorios del precursor.

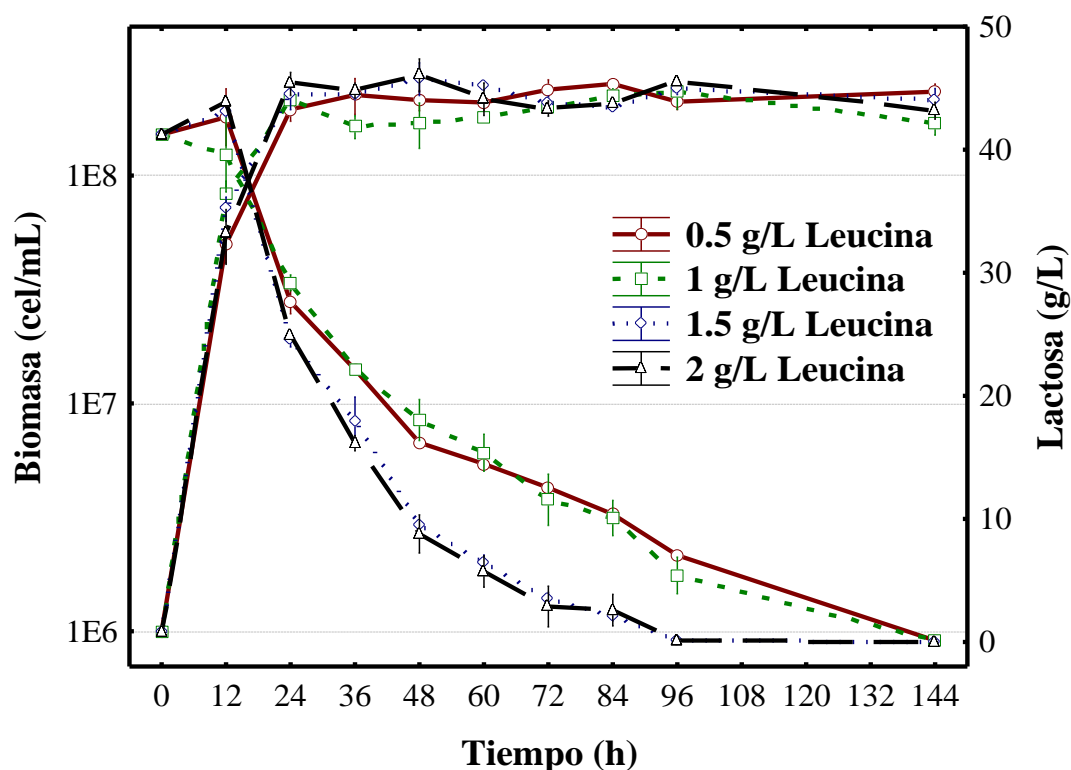
### **8.3.2 Cinéticas de fermentación en lactosuero crudo con la adición de L-leucina**

La incorporación de L-leucina en los procesos de fermentación que involucran a *Kluyveromyces marxianus* se basa en el uso de la vía de Ehrlich, un proceso metabólico que convierte aminoácidos con cadenas ramificadas en alcoholes superiores, como el isoamílico. Esto ocurre a través de una serie de reacciones: descarboxilación, transaminación y reducción. Esta perspectiva posibilita que la síntesis de compuestos aromáticos se genere de forma endógena, sin requerir la inclusión directa de los alcoholes precursores, lo cual puede resultar beneficioso en procesos regulados por criterios de "producto natural".



### 8.3.2.1 Crecimiento de los microorganismos y el consumo de lactosa

En esta etapa, se evaluó la adición de L-leucina en cuatro concentraciones (0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 g/L) y se monitorearon sus efectos sobre el crecimiento microbiano, el consumo de lactosa y la dinámica del pH. Los hallazgos indican que la adición del aminoácido no alteró de manera significativa la cinética de crecimiento celular y en todos los tratamientos se observó una etapa exponencial a lo largo de las primeras 24 h, con concentraciones por encima de 8 log cel/mL (ver Figura 17). Este patrón es muy similar al mostrado en las cinéticas de fermentación del lactosuero sin la adición de precursores y coincide con lo reportado por Chua y Liu (2020), quienes mencionan que la suplementación individual con valina, L-leucina o fenilalanina en suero de soya, resultó en una cinética de crecimiento de *Torulaspora delbrueckii* comparable a la del tratamiento control.



**Figura 17.** Cinéticas de crecimiento de *K. marxianus* y consumo de lactosa durante las fermentaciones de lactosuero con adición de L-leucina a distintas concentraciones.

Aunque el crecimiento celular fue comparable entre los tratamientos, la tasa de consumo de lactosa sí se vio influenciada por la concentración de L-leucina. Como se muestra en la Figura 17, las condiciones con 1.5 y 2 g/L de L-leucina adicionada, mostraron una conversión más eficiente del disacárido, para el crecimiento y la producción de los metabolitos de interés, ya que *K. marxianus* cuenta con el perfil nutricional adecuado para

su metabolismo. La adición de 0.5 y 1 g/L de L-leucina también presentan un consumo de lactosa, sin embargo, este es menos eficiente.

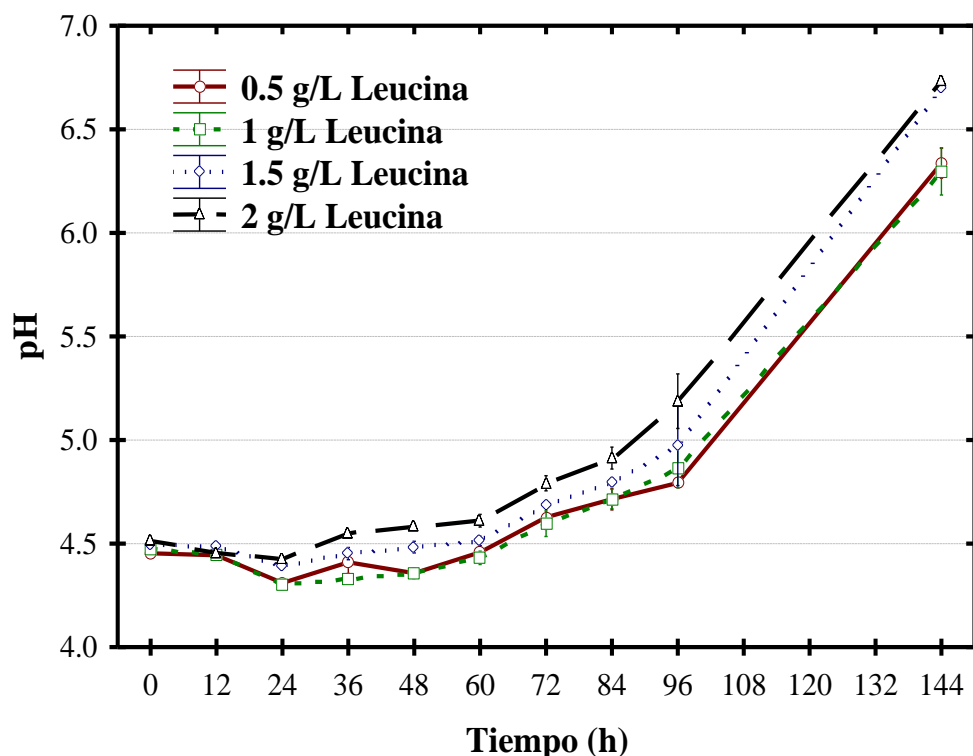
Este escenario también se observó a las 24 h, donde la concentración de lactosa se redujo de  $\approx 41.23$  g/L a  $27.64 \pm 0.98$ ,  $29.19 \pm 0.65$ ,  $24.59 \pm 0.63$  y  $24.90 \pm 0.21$  g/L, en las cinéticas de lactosuero con la adición de 0.5, 1, 1.5 y 2 g/L de L-leucina, respectivamente. Se identificaron diferencias significativas entre las concentraciones de 1.5 y 2 g/L en comparación con las de 0.5 y 1 g/L. A partir de este punto, se mantuvo una tendencia similar, donde la velocidad de consumo de lactosa en cinéticas con la adición de L-leucina en concentraciones de 1.5 y 2 g/L, fue significativamente mayor con respecto a las cinéticas con la adición de 0.5 y 1 g/L.

Se destaca que, a las 96 h de fermentación, las cinéticas con 1.5 y 2 g/L de L-leucina mostraron una conversión más eficiente del disacárido, alcanzando reducciones superiores al 99%, mientras que en los tratamientos con 0.5 y 1 g/L, se detectaron aún concentraciones de 7.04 y 5.40 g/L, respectivamente, equivalentes a cerca del 15% de lactosa inicial. Esto indica el efecto de las distintas concentraciones de L-leucina adicionadas y su relación directa con el metabolismo de la conversión de la lactosa presente en el lactosuero. Esta diferencia podría explicarse por una mayor disponibilidad del nitrógeno utilizable, lo cual favorecería la expresión de los genes relacionados con el transporte y el catabolismo de los carbohidratos, así como una regulación positiva de las enzimas claves en el metabolismo fermentativo. Estos resultados son similares a los reportados por Chua & Liu (2020), quienes señalan que la suplementación con aminoácidos acelera la utilización de los carbohidratos y reduce los niveles de azúcares residuales en comparación con el suero sin suplementar.

El monitoreo del pH fue muy similar entre los 4 tratamientos: una ligera disminución del pH inicial de 4.45-4.51 a  $\approx 4.3$  en un periodo de 24 h, seguida de un incremento gradual (Figura 18). Esta dinámica indica un metabolismo mixto, en el que la producción de ácidos orgánicos es compensada más tarde por el uso de aminoácidos que basifican el medio. Esto se logra a través de la liberación de amonio o de la desaminación de compuestos nitrogenados. Procopio et al. (2015), han caracterizado previamente este comportamiento en fermentaciones con medios proteicos complejos y levaduras no tradicionales.

En conjunto, los datos indican que, aunque la L-leucina no modifica sustancialmente el crecimiento celular, sí impacta la eficiencia en el consumo de la lactosa y en la evolución

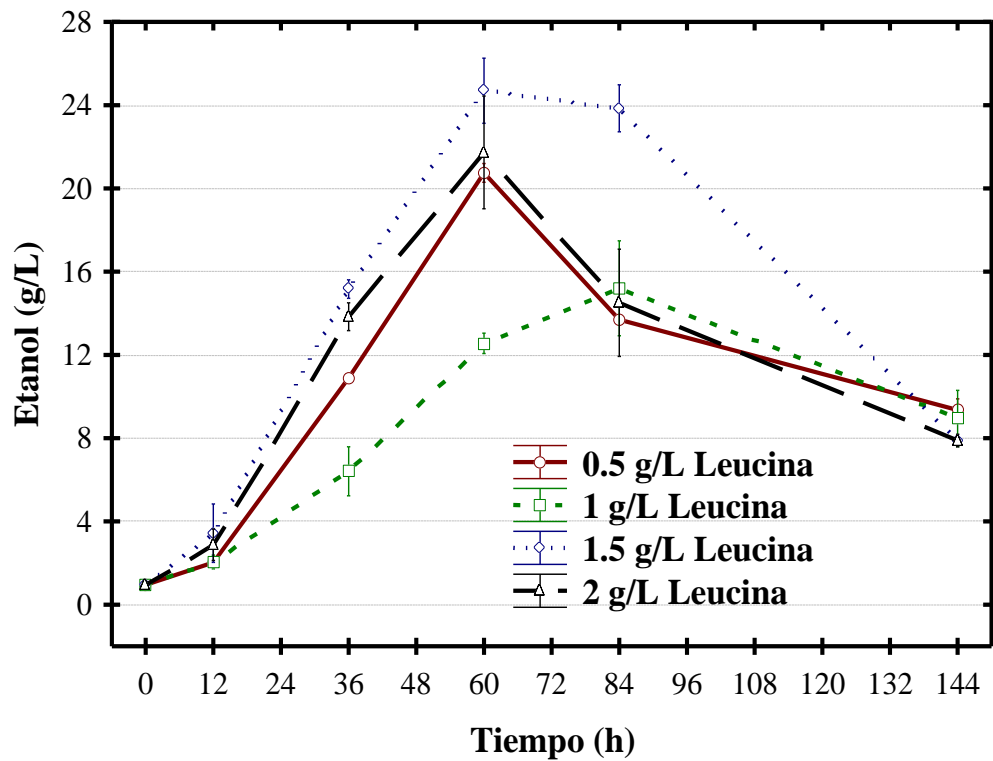
del pH, favoreciendo condiciones fermentativas óptimas cuando se emplean concentraciones de entre 1.5 y 2 g/L.



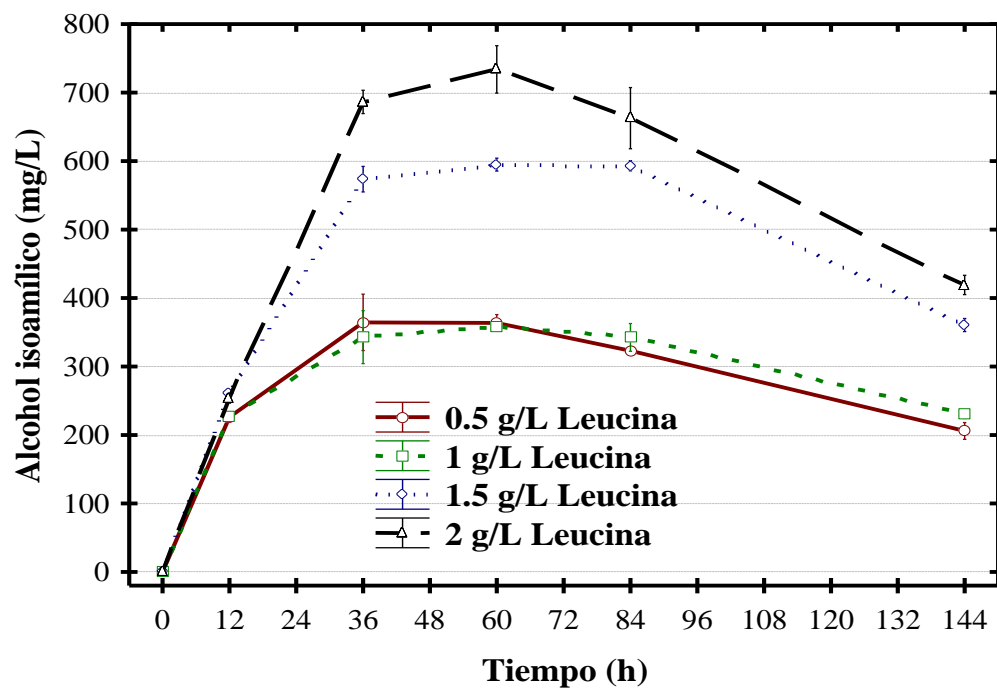
**Figura 18.** Cinética de pH durante las fermentaciones de lactosuero con adición de L-leucina a distintas concentraciones.

### 8.3.2.2 Producción de etanol, de alcohol isoamílico y de acetato de isoamilo

La adición de las diferentes concentraciones de L-leucina no solo mejora la eficiencia del metabolismo primario (que se observa en el consumo de lactosa), sino que actúa como modulador clave del metabolismo secundario involucrado en la síntesis de etanol, de alcoholes fusel y de sus derivados. En las condiciones evaluadas, la mayor producción de etanol se registró con 1.5 g/L de L-leucina ( $24.69 \pm 1.57$  g/L a las 60 h), seguida por 2 g/L ( $21.73 \pm 2.71$  g/L a las 60 h), 0.5 g/L ( $20.75 \pm 0.45$  g/L a las 60 h) y 1 g/L ( $15.20 \pm 2.28$  g/L a las 84 h) (Figura 19). Los valores obtenidos confirman que la suplementación nitrogenada puede potenciar la actividad fermentativa de *K. marxianus*, incrementando el rendimiento alcohólico, incluso en ausencia de otras fuentes externas de nitrógeno. En relación con esto, Chua & Liu (2020), mencionan que la adición de un aminoácido específico no genera una producción significativamente superior al tratamiento control. No obstante, como se aprecia en la Figura 19, la producción de etanol muestra una clara dependencia respecto a la concentración de L-leucina.



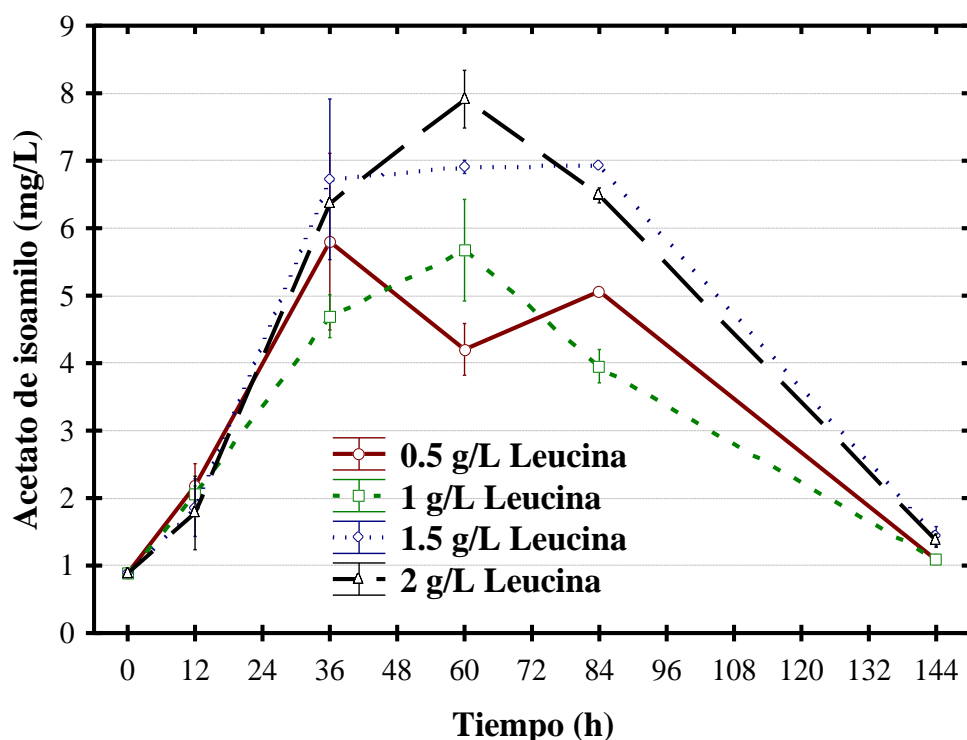
**Figura 19.** Cinéticas de producción de etanol durante las fermentaciones del lactosuero con *K. marxianus* con adición de L-leucina a distintas concentraciones.



**Figura 20.** Cinéticas de producción del alcohol isoamílico durante las fermentaciones del lactosuero con *K. marxianus* con la adición de L-leucina a distintas concentraciones.

En cuanto al alcohol isoamílico, se observó una relación directa entre su síntesis y la concentración de L-leucina. Los experimentos con 1.5 y 2 g/L de L-leucina resultaron en niveles de  $594.83 \pm 9.35$  mg/L y  $733.90 \pm 34.63$  mg/L, respectivamente, a las 60 h. Por su parte, las condiciones con 0.5 y 1 g/L alcanzaron producciones similares con  $363.42 \pm 12.30$  mg/L y  $359.08 \pm 0.85$  mg/L, respectivamente (Figura 20), lo que indica que existe un umbral de concentración del aminoácido a partir del cual se activa de forma más eficiente la vía de Ehrlich. Estos hallazgos están en concordancia con lo reportado por Chua y Liu (2020), quienes observaron una mayor acumulación de alcoholes superiores en medios suplementados con aminoácidos ramificados.

La producción del acetato de isoamilo no alcanzó los niveles esperados en todas las condiciones evaluadas. La producción máxima se registró con la adición de 2 g/L de L-leucina ( $7.91 \pm 0.43$  mg/L a las 60 h), mientras que las demás condiciones mostraron valores inferiores (Figura 21).



**Figura 21.** Cinéticas de producción del acetato de isoamilo durante las fermentaciones del lactosuero con *K. marxianus* con la adición de L-leucina a distintas concentraciones.

Aunque esta producción es baja comparada con valores reportados en fermentaciones optimizadas (160 mg/L según Hernández-Cruz et al., 2024), la tendencia confirma la importancia de una adecuada concentración del precursor para favorecer la actividad de

las enzimas alcohol acetil transferasas (AATs), responsables de la formación del éster. Esta baja eficiencia puede atribuirse a múltiples factores: competencia metabólica por la acetil-CoA, la represión enzimática de las enzimas AAT o de las limitaciones en la disponibilidad de los cofactores como NADH/NAD<sup>+</sup> en condiciones parcialmente anaerobias (Hazelwood et al., 2008; Styger et al., 2011).

Desde el punto de vista fisiológico, la eficacia en el transporte intracelular de L-leucina, la conversión a  $\alpha$ -cetoisocaproato por medio de la transaminación y su reducción posterior a alcohol isoamílico, determinan el rendimiento de la vía Ehrlich. Si no se metabolizan de manera apropiada, la acumulación intermedia de  $\alpha$ -cetoácidos puede resultar citotóxica. Esto implica que es fundamental regular con precisión la incorporación del precursor para preservar el equilibrio metabólico del sistema. Asimismo, el empleo de la L-leucina como nutriente y como precursor metabólico al mismo tiempo, tiene el potencial de provocar interacciones no lineales en la fisiología celular, especialmente con respecto a la expresión de las enzimas biosintéticas (Chen et al., 2015).

Desde una perspectiva tecnológica, estos resultados evidencian que la suplementación con L-leucina en concentraciones de 1.5 a 2 g/L puede mejorar significativamente la producción del alcohol isoamílico sin afectar negativamente la cinética fermentativa. Aunque la síntesis del acetato de isoamilo fue baja (menores a 8 mg/L), los datos justifican su potencial de optimización mediante estrategias como co-adición de precursores, modulación de la aireación o ingeniería genética dirigida a la sobreexpresión de AATs. Asimismo, este enfoque permite mantener la integridad del etiquetado “natural” del producto final, ya que los compuestos aromáticos son generados endógenamente a partir de precursores considerados GRAS (Por sus siglas en inglés: Generally Recognized As Safe).

Las Tablas 16 y 17 presentan los parámetros cinéticos de la adición individual de los precursores evaluados. Se observa que la adición de 0.25% de alcohol isoamílico y de concentraciones de L-leucina entre 1.5 y 2 g/L proporcionan los mejores resultados en términos de la producción del aroma y en la reducción de lactosa en el lactosuero. A partir de estos resultados, se planteó un Diseño Central Compuesto Rotable (DCCR) mediante el software Design-Expert, como se detalla en la siguiente sección.

### **8.3.3 Análisis comparativo y discusión cinético-metabólica**

El estudio comparativo de las cinéticas de fermentación del lactosuero crudo empleando *Kluyveromyces marxianus*, con la adición de precursores exógenos como el alcohol

isoamílico y la L-leucina, evidencia diferencias sustanciales en la dinámica del crecimiento microbiano, el consumo de lactosa y en la biosíntesis de compuestos aromáticos, particularmente en la síntesis del acetato de isoamilo. Estas diferencias se explican a partir de la naturaleza química de cada precursor, su ruta metabólica de transformación y en los mecanismos fisiológicos de tolerancia del microorganismo frente a dichos compuestos.

Desde el punto de vista cinético, la tasa de crecimiento celular fue inhibida totalmente en concentraciones iguales o mayores al 0.75% de alcohol isoamílico; mientras que la incorporación de L-leucina no tuvo un impacto sobre la viabilidad, ni sobre la tasa de crecimiento, incluso a 2 g/L. *K. marxianus* mostró adaptaciones metabólicas distintas bajo condiciones con 0.25 y 0.5% de alcohol isoamílico. De acuerdo con la Tabla 16, a una concentración de 0.25%, la fase exponencial empezó a las 12 h y llegó hasta un  $\mu$  de 0.205  $\text{h}^{-1}$ ; en cambio, con una concentración de 0.5%, la fase adaptativa se prolongó por 72 h y tuvo un  $\mu$  de 0.360  $\text{h}^{-1}$ . Estos valores indican que, pese a que el precursor es estresante en un principio, puede ser utilizado después de una adaptación fisiológica, mientras su concentración no exceda el umbral de toxicidad.

Por otro lado, los tratamientos con L-leucina presentaron tasas de crecimiento similares ( $\mu \approx 0.22\text{--}0.23 \text{ h}^{-1}$ ), aunque hubo variaciones significativas en la producción de metabolitos y en el consumo de la lactosa. Con 1.5 y 2 g/L de lactosa, se registró la conversión más alta, con disminuciones del 99.6% y el 99.7%, respectivamente, a las 96 h (Tabla 17). Estos resultados sugieren que la disponibilidad de nitrógeno fácilmente asimilable, proporcionado por la L-leucina, mejora el metabolismo central, sin alterar el balance redox, ni generar un estrés notable.

En cuanto a la producción de etanol, las condiciones con L-leucina fueron superiores. La concentración más alta se registró con 1.5 g/L (23.740 g/L), seguido por 2 g/L (20.776 g/L), en comparación con los 13.696 g/L alcanzados con 0.25% de alcohol isoamílico. Esto puede explicarse por la modulación positiva que ejerce la L-leucina sobre las rutas fermentativas, al favorecer tanto la glucólisis, como la regeneración del  $\text{NAD}^+$ , mediante la conversión de piruvato a etanol. El rendimiento Yp/s de etanol también fue más elevado en estas condiciones, especialmente con 0.5 g/L de L-leucina (0.739 g/g a 60 h), lo cual indica una alta eficiencia de conversión del sustrato a producto alcohólico.

**Tabla 16.** Parámetros cinéticos de fermentación de *K. marxianus* en el lactosuero evaluando el efecto de la adición del alcohol isoamílico.

<b>Parámetros</b>	<b>Adición de alcohol isoamílico</b>			
	<b>0.25%</b>	<b>0.5%</b>	<b>0.75%</b>	<b>1%</b>
$\mu$ ( $h^{-1}$ )	$0.205 \pm 0.007^a$	$0.360 \pm 0.019^b$	NA	NA
$tg$ (h)	$3.381 \pm 0.112^a$	$1.926 \pm 0.102^b$	NA	NA
$\mu_{max}$ ( $h^{-1}$ )	$0.232 \pm 0.010^a$	$0.360 \pm 0.019^b$	NA	NA
$Y_{x/s}$ (cel L g L)	$9.79 \times 10^9 \pm 3.14 \times 10^9^a$	$1.09 \times 10^{10} \pm 2.78 \times 10^9^a$	NA	NA
<i>E</i> tanol (g L)	$8.421 \pm 0.429_{36 h}$	0	0	0
<i>E</i> tanol (prod max) (g L)	$13.696 \pm 0.379_{60 h}^a$	$7.467 \pm 1.109_{144 h}^a$	0	0
$Y_{p/s}$ etanol (g/g)	$0.394 \pm 0.023_{36 h}$	$0.289 \pm 0.066_{144 h}$	NA	NA
	$0.512 \pm 0.053_{60 h}$			
Alcohol isoamílico (g L)	NA	NA	NA	NA
Alcohol isoamílico (prod max) (g L)	NA	NA	NA	NA
<b>Acetato de isoamilo (mg L)</b>	<b><math>20.564 \pm 3.662_{36 h}^a</math></b>	$0.979 \pm 1.695_{36 h}^b$	NA	NA
Acetato de isoamilo (prod max) (mg L)	$85.144 \pm 3.521_{144 h}^a$	$87.094 \pm 3.039_{144 h}^a$	NA	NA
<b>Lactosa 24 h (g/L)</b>	<b><math>30.412 \pm 1.497^a</math></b>	<b><math>35.157 \pm 0.439^b</math></b>	NA	NA
<b>Reducción de lactosa 24 h (%)</b>	<b><math>32.334 \pm 5.419^a</math></b>	<b><math>21.855 \pm 2.802^b</math></b>	NA	NA
<b>Lactosa 96 h (g/L)</b>	<b><math>13.489 \pm 0.622^a</math></b>	<b><math>27.053 \pm 0.799^b</math></b>	$42.216 \pm 0.577^c$	$40.671 \pm 1.407^c$
<b>Reducción de lactosa 96 h (%)</b>	<b><math>69.974 \pm 2.612^a</math></b>	<b><math>39.874 \pm 2.485^b</math></b>	$6.182 \pm 2.594^c$	$9.507 \pm 6.605^c$



**Tabla 17.** Parámetros cinéticos de fermentación de *K. marxianus* en el lactosuero evaluando el efecto de la adición de L-leucina.

<b>Parámetros</b>	<b>Adición de L-leucina</b>			
	<b>0.5 g/L</b>	<b>1.0 g/L</b>	<b>1.5 g/L</b>	<b>2.0 g/L</b>
$\mu$ ( $h^{-1}$ )	0.220 $\pm$ 0.005 <sup>a</sup>	0.224 $\pm$ 0.001 <sup>a</sup>	0.226 $\pm$ 0.006 <sup>a</sup>	0.231 $\pm$ 0.005 <sup>a</sup>
<i>tg</i> (h)	3.158 $\pm$ 0.066 <sup>a</sup>	3.098 $\pm$ 0.012 <sup>a</sup>	3.070 $\pm$ 0.079 <sup>a</sup>	3.007 $\pm$ 0.067 <sup>a</sup>
$\mu_{max}$ ( $h^{-1}$ )	0.325 $\pm$ 0.015 <sup>a</sup>	0.368 $\pm$ 0.011 <sup>b</sup>	0.356 $\pm$ 0.010 <sup>ab</sup>	0.333 $\pm$ 0.024 <sup>ab</sup>
<i>Yx/s</i> (cel L g L)	.44 x 10 <sup>10</sup> $\pm$ 2.71 x 10 <sup>9</sup> <sup>a</sup>	78 x 10 <sup>10</sup> $\pm$ 7.38 x 10 <sup>8</sup> <sup>a</sup>	37 x 10 <sup>10</sup> $\pm$ 2.54 x 10 <sup>9</sup> <sup>a</sup>	55 x 10 <sup>10</sup> $\pm$ 1.98 x 10 <sup>9</sup> <sup>a</sup>
<i>Etanol</i> (g L)	9.941 $\pm$ 0.088 <sub>36 h</sub> <sup>a</sup>	5.456 $\pm$ 1.178 <sub>36 h</sub> <sup>b</sup>	14.213 $\pm$ 0.446 <sub>36 h</sub> <sup>c</sup>	12.881 $\pm$ 0.668 <sub>36 h</sub> <sup>c</sup>
<i>Etanol (prod max)</i> (g L)	19.792 $\pm$ 0.453 <sub>60 h</sub> <sup>ab</sup>	14.788 $\pm$ 2.282 <sub>84 h</sub> <sup>a</sup>	23.740 $\pm$ 1.567 <sub>60 h</sub> <sup>b</sup>	20.776 $\pm$ 2.707 <sub>60 h</sub> <sup>ab</sup>
<i>Yp/s etanol</i> (g/g)	0.520 $\pm$ 0.005 <sub>36 h</sub>	0.286 $\pm$ 0.041 <sub>36 h</sub>	<b>0.613 <math>\pm</math> 0.067</b> <sub>36 h</sub>	0.514 $\pm$ 0.032 <sub>36 h</sub>
	0.739 $\pm$ 0.021 <sub>60 h</sub>	0.473 $\pm$ 0.042 <sub>84 h</sub>	<b>0.683 <math>\pm</math> 0.043</b> <sub>60 h</sub>	0.585 $\pm$ 0.046 <sub>60 h</sub>
<b><i>Alcohol isoamílico</i> (g L)</b>	0.364 $\pm$ 0.041 <sub>36 h</sub> <sup>a</sup>	0.343 $\pm$ 0.039 <sub>36 h</sub> <sup>a</sup>	<b>0.574 <math>\pm</math> 0.019</b> <sub>36 h</sub> <sup>b</sup>	<b>0.686 <math>\pm</math> 0.017</b> <sub>36 h</sub> <sup>b</sup>
<i>Alcohol isoamílico (prod max)</i> (g L)	0.364 $\pm$ 0.041 <sub>36 h</sub> <sup>a</sup>	0.359 $\pm$ 0.001 <sub>60 h</sub> <sup>b</sup>	0.595 $\pm$ 0.009 <sub>60 h</sub> <sup>c</sup>	0.734 $\pm$ 0.035 <sub>60 h</sub> <sup>c</sup>
<b><i>Acetato de isoamilo</i> (mg L)</b>	4.913 $\pm$ 1.308 <sub>36 h</sub> <sup>a</sup>	3.808 $\pm$ 0.318 <sub>36 h</sub> <sup>a</sup>	<b>5.836 <math>\pm</math> 1.190</b> <sub>36 h</sub> <sup>a</sup>	<b>5.474 <math>\pm</math> 0.023</b> <sub>36 h</sub> <sup>a</sup>
<i>Acetato de isoamilo (prod max)</i> (mg L)	4.913 $\pm$ 1.308 <sub>36 h</sub> <sup>a</sup>	4.786 $\pm$ 0.752 <sub>60 h</sub> <sup>a</sup>	6.049 $\pm$ 0.012 <sub>84h</sub> <sup>a</sup>	7.024 $\pm$ 0.428 <sub>60 h</sub> <sup>a</sup>
<b><i>Lactosa 24 h</i> (g/L)</b>	27.638 $\pm$ 0.977 <sup>a</sup>	29.187 $\pm$ 0.651 <sup>a</sup>	<b>24.593 <math>\pm</math> 0.630</b> <sup>b</sup>	<b>24.896 <math>\pm</math> 0.210</b> <sup>b</sup>
<b><i>Reducción de lactosa 24 h</i> (%)</b>	32.978 $\pm$ 2.337 <sup>a</sup>	29.221 $\pm$ 1.587 <sup>a</sup>	<b>40.362 <math>\pm</math> 1.538</b> <sup>b</sup>	<b>39.627 <math>\pm</math> 0.487</b> <sup>b</sup>
<i>Lactosa 96 h</i> (g/L)	7.045 $\pm$ 0.118	5.403 $\pm$ 1.493	<b>0.179 <math>\pm</math> 0.294</b>	<b>0.124 <math>\pm</math> 0.189</b>
<b><i>Reducción de lactosa 96 h</i> (%)</b>	82.917 $\pm$ 0.292	86.898 $\pm$ 3.614	<b>99.565 <math>\pm</math> 0.712</b>	<b>99.699 <math>\pm</math> 0.459</b>

En relación con el alcohol isoamílico, su producción fue mucho mayor en los tratamientos que incluyeron L-leucina. A 2 g/L, se llegó a una concentración máxima de 734 mg/L; en contraste, los valores fueron nulos o no cuantificables cuando no había aminoácidos o había alcohol isoamílico exógeno. Esta discrepancia se justifica por la activación de la vía de Ehrlich, donde la L-leucina es transaminada a  $\alpha$ -cetoisocaproato, después descarboxilada y convertida en alcohol isoamílico. Este procedimiento es favorecido por una alta disponibilidad del precursor y una baja presión osmótica del entorno. A diferencia del alcohol añadido directamente, que actúa como factor de estrés, la L-leucina permite una producción regulada y sostenida del alcohol deseado.

La producción de acetato de isoamilo, sin embargo, fue más eficiente en los tratamientos con adición directa de alcohol isoamílico a 0.25% y 0.5%, con valores máximos de 85.144 y 87.094 mg/L, respectivamente. Esto indica que, para la esterificación intracelular, mediada por las AATs, se requiere un mínimo de concentración del alcohol isoamílico en el citosol.

En los tratamientos con L-leucina, a pesar de que se produjo una cantidad significativa de alcohol isoamílico, la esterificación fue escasa (máximo 7.024 mg/L). Esto pudo deberse a las restricciones en la concentración intracelular de la acetil-CoA, a la regulación negativa de las AATs o a la competencia metabólica con las vías lipogénicas. Asimismo, según señalan Hazelwood et al. (2008) y Etschmann et al. (2002), la acumulación de metabolitos intermediarios como los  $\alpha$ -cetoácidos puede alterar el equilibrio redox y tener un impacto en la eficiencia global de la esterificación.

En el campo de la bioquímica, la utilización del alcohol isoamílico exógeno está condicionada por su captación mediante difusión pasiva, por su estabilización en las células y por la disponibilidad de los cofactores. Para que la síntesis del acetato de isoamilo ocurra, no basta con tener solamente alcohol y acetil-CoA; se necesita, además, un ambiente redox propicio y una expresión correcta de las enzimas AATs. Por otro lado, el empleo de la L-leucina, requiere una cadena de transformaciones metabólicas más extensa, lo cual proporciona más flexibilidad al sistema, aunque también incrementa los posibles puntos de regulación o inhibición (Hazelwood et al., 2008; Styger, 2011).

Desde un punto de vista tecnológico, ambos enfoques tienen ventajas y limitaciones. La adición del alcohol isoamílico genera producciones más altas del éster en menor tiempo, aunque también se aumenta el riesgo de toxicidad y se disminuye la viabilidad celular. La suplementación con L-leucina proporciona una producción endógena más confiable y

coherente con los estándares de los productos "naturales", pero tiene un rendimiento limitado durante la fase de esterificación. Según Sainz-Mellado et al. (2023), el suministro progresivo del precursor podría ser una estrategia intermedia para aumentar la productividad sin causar efectos citotóxicos.

Finalmente, el análisis cinético comparativo muestra que *K. marxianus* reacciona de forma distinta a la incorporación de la L-leucina y del alcohol isoamílico. La L-leucina estimula la producción del éster por medio de sus propias rutas biosintéticas, mientras que el precursor alcohólico, favorece directamente la obtención del éster en concentraciones controladas. La síntesis de compuestos volátiles en sistemas de valorización del lactosuero podría ser considerablemente mejorada si se combinan las dos estrategias, además de modelos de diseño experimental y control de parámetros como el suministro escalonado de precursores, la aireación y el pH.

#### 8.4 Cinéticas de fermentación del lactosuero – Diseño central compuesto rotatable

El presente diseño experimental, estructurado bajo un esquema Central Compuesto Rotatable (DCCR), se formuló con base en los resultados obtenidos en el apartado 8.3, considerando dos factores experimentales: la concentración del alcohol isoamílico (0.067-0.63%) y la de la L-leucina (0.33-2.17 g/L).

**Tabla 18.** Diseño experimental de las fermentaciones del lactosuero con la adición del alcohol isoamílico y de la L-leucina.

<i>Tratamiento</i>	<i>Corrida</i>	<i>Factor 1 A</i> <i>Alcohol isoamílico (%)</i>	<i>Factor 2 B</i> <i>L-leucina (g/L)</i>
8	1	0.35	2.16924
2	2	0.55	0.6
9	3	0.35	1.25
12	4	0.35	1.25
10	5	0.35	1.25
11	6	0.35	1.25
4	7	0.55	1.9
7	8	0.35	0.330761
5	9	0.0671573	1.25
1	10	0.15	0.6
3	11	0.15	1.9
13	12	0.35	1.25
6	13	0.632843	1.25

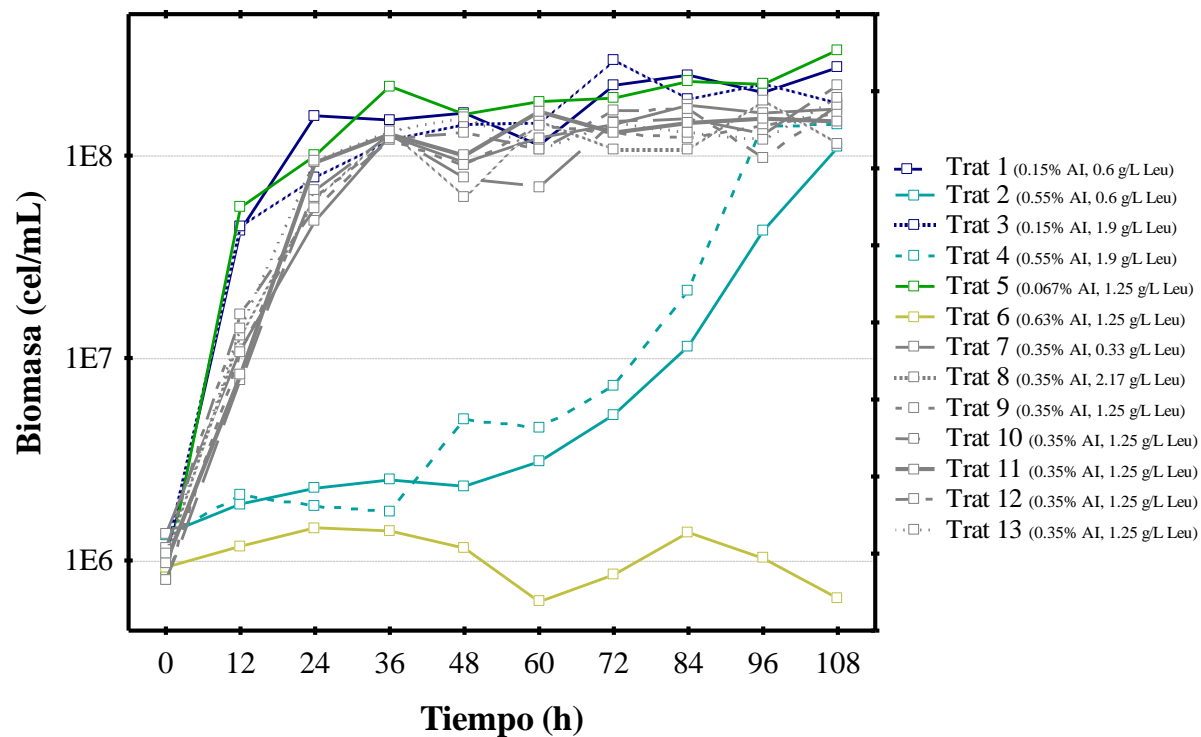
Se evaluaron 13 tratamientos (5 puntos centrales), con seis variables de respuesta: producción de acetato de isoamilo, de alcohol isoamílico y de etanol, consumo de lactosa, crecimiento microbiano y monitoreo del pH. Durante el desarrollo de los experimentos se emplearon dos cepas de *Kluyveromyces marxianus*, denominadas **ITD00262-P** (ya descrita en 8.1) e **ITD00262-C**, obtenida del mismo banco de levaduras en esta etapa de la investigación. A fin de identificar diferencias fisiológicas entre ambas, los resultados se analizaron de forma comparativa en cada tratamiento.

#### **8.4.1 Crecimiento de microorganismos y consumo de lactosa**

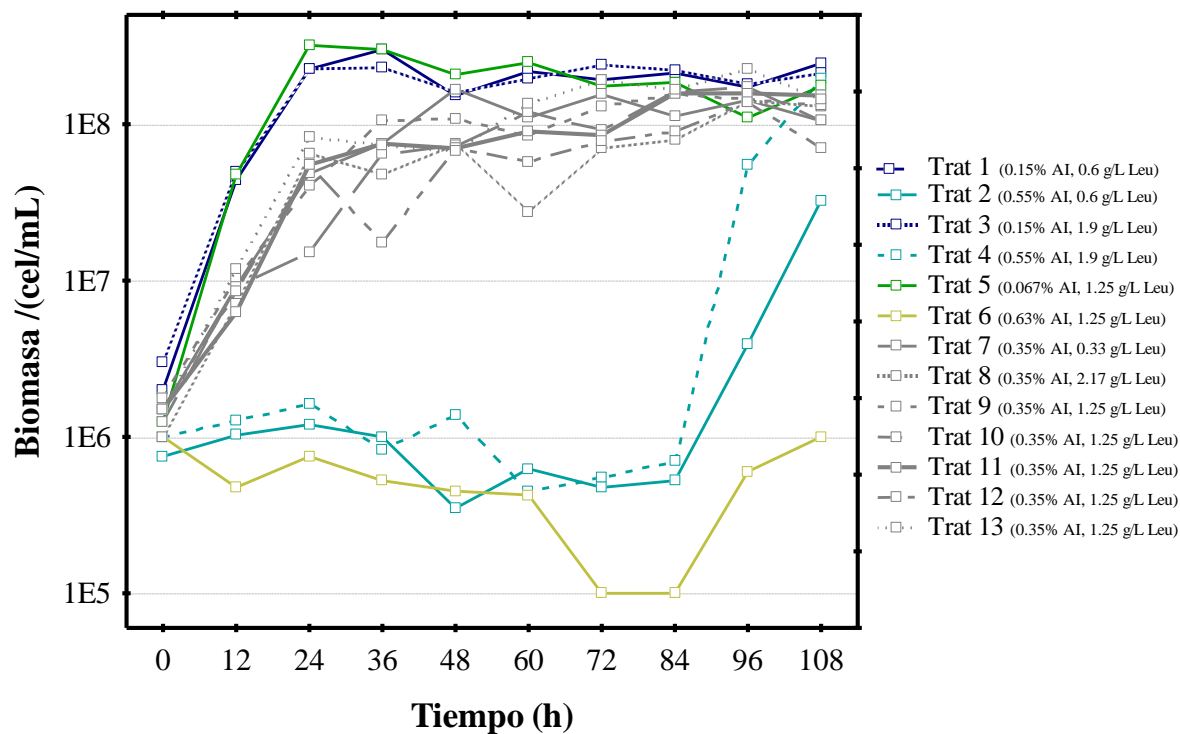
Durante la fase inicial de la fermentación, el crecimiento celular y el consumo de lactosa fueron variables dependientes de la concentración de alcohol isoamílico, actuando este último como principal modulador del metabolismo. La disminución de la lactosa, el cambio en el pH y la cinética de crecimiento se muestran en las Figuras 22 a 27 para los dos cultivos. En términos generales, se observó un comportamiento semejante entre las cepas, con diferencias puntuales atribuibles a su capacidad diferencial de tolerancia al precursor alcohólico.

En los tratamientos 1, 3 y 5, con concentraciones de alcohol isoamílico de 0.15%, 0.15% y 0.067% (es decir las concentraciones más bajas del alcohol adicionado) y de 0.6, 1.9 y 1.25 g/L de la L-leucina, respectivamente, ambas cepas mostraron las mayores tasas de crecimiento y de consumo de lactosa. Se alcanzaron conteos celulares entre 7 y 8 log cel/mL en las primeras 12 h, acompañados de una reducción de lactosa de 5 a 8 g/L. Esta actividad microbiana intensa se reflejó en una acidificación temprana del medio, atribuida a la producción de ácidos orgánicos derivados del metabolismo fermentativo. Las concentraciones de L-leucina en estos tratamientos oscilaron entre 0.6 y 1.9 g/L, pero no se detectó un efecto diferencial asociado a su variación.

En contraste, los tratamientos con 0.35% de alcohol isoamílico (T7, T8, T9, T10, T11, T12 y T13) exhibieron un crecimiento celular similar (~7 log cel/mL), pero con menor consumo de lactosa durante las primeras 12 h (2–4 g/L). La variación en las concentraciones de L-leucina en este grupo (0.33–2.17 g/L) tampoco mostró un impacto claro en los parámetros cinéticos, lo que sugiere que el efecto inhibitorio inicial estuvo principalmente vinculado a la concentración alcohólica y no a la del aminoácido.



**Figura 22.** Comportamiento cinético de la generación de biomasa de *Kluyveromyces marxianus* ITD00262-P en respuesta a los tratamientos del diseño experimental.



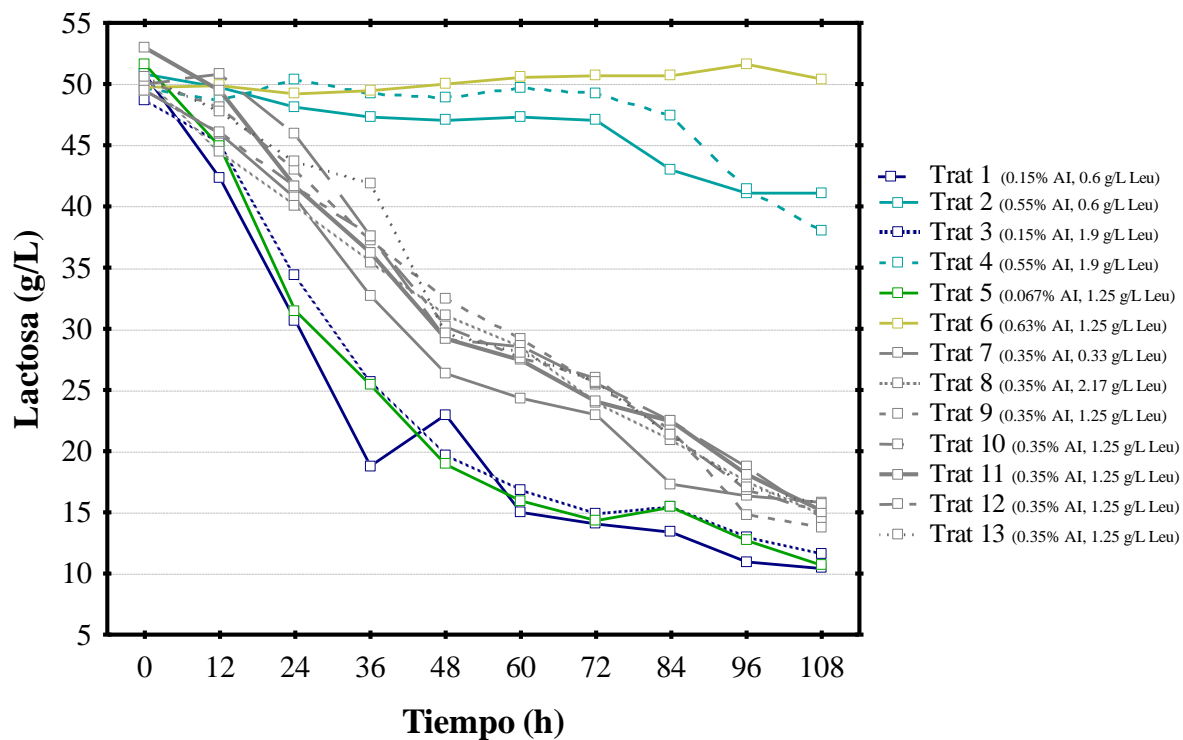
**Figura 23.** Comportamiento cinético de la generación de biomasa de *Kluyveromyces marxianus* ITD00262-C en respuesta a los tratamientos del diseño experimental.

Por otro lado, los tratamientos 2 y 4 (ambos con 0.55% de alcohol isoamílico, y con 0.6 y 1.9 g/L de L-leucina, respectivamente) mostraron una fase de adaptación prolongada. En la cepa ITD00262-P, dicha fase se extendió de 36 a 48 h, mientras que en ITD00262-C se alcanzó a las 84 h, evidenciando una menor tolerancia al precursor en esta última. Estas diferencias se reflejaron en la estabilidad del pH durante la fase de latencia y en el lento consumo de lactosa, que se mantuvo casi constante durante el periodo adaptativo.

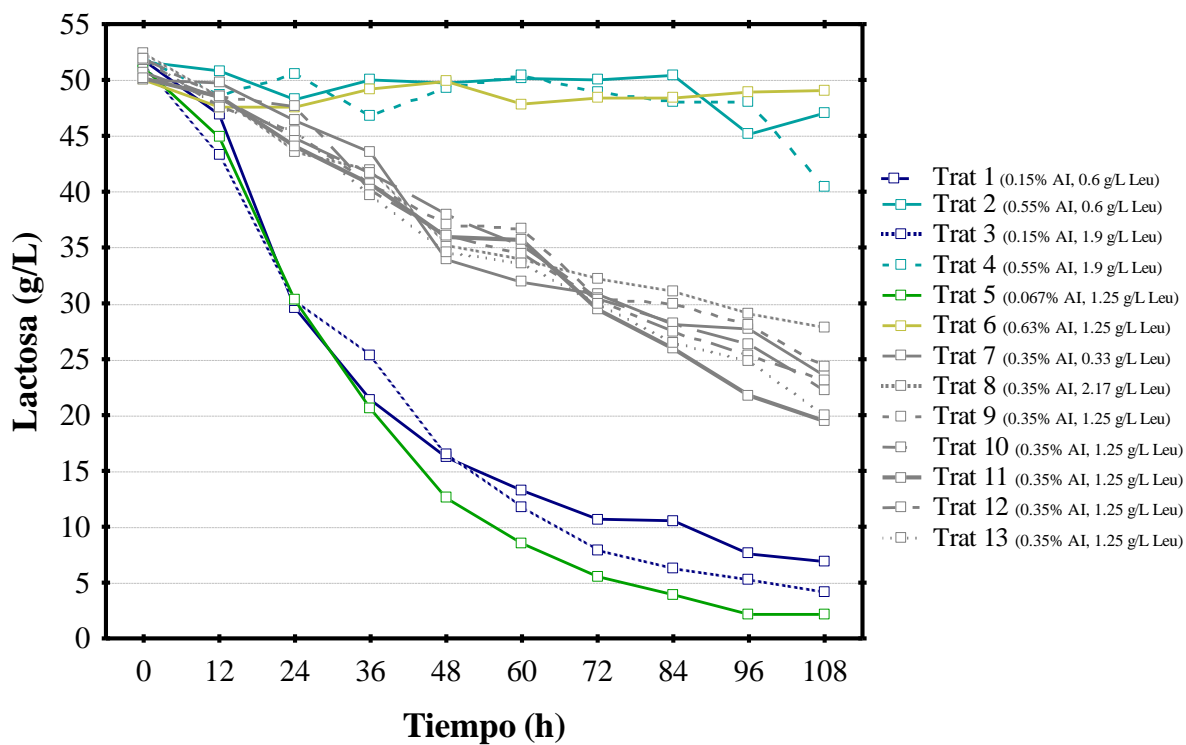
En el tratamiento 6, la condición más restrictiva del diseño, que corresponde a la adición de 0.63% del alcohol isoamílico y de 1.25 g/L de L-leucina, se registró una clara inhibición del crecimiento en ambas cepas, observándose un descenso en la concentración de biomasa generada y una ausencia prácticamente total de consumo de lactosa. Estos hallazgos confirman el efecto citotóxico del alcohol isoamílico a concentraciones superiores a 0.6 %, independientemente de la cepa empleada o del contenido de L-leucina.

Posterior a la fase exponencial, las condiciones en las que se logró un crecimiento estable condujeron a una fase estacionaria entre las 24 y las 36 h. A partir de este punto, se identificaron diferencias importantes en la capacidad de consumo de la lactosa. En particular, los tratamientos 1, 3 y 5 mostraron la mayor eficiencia de conversión del disacárido. En estos casos, la cepa ITD00262-C, redujo la concentración de lactosa en el medio a valores cercanos a 5 g/L, partiendo de un valor inicial de 50–52 g/L, mientras que la cepa ITD00262-P, sólo logró una reducción hasta ~10 g/L. Este patrón sugiere que, bajo condiciones de bajo estrés alcohólico, la cepa ITD00262-C presenta una mayor tasa de asimilación de lactosa.

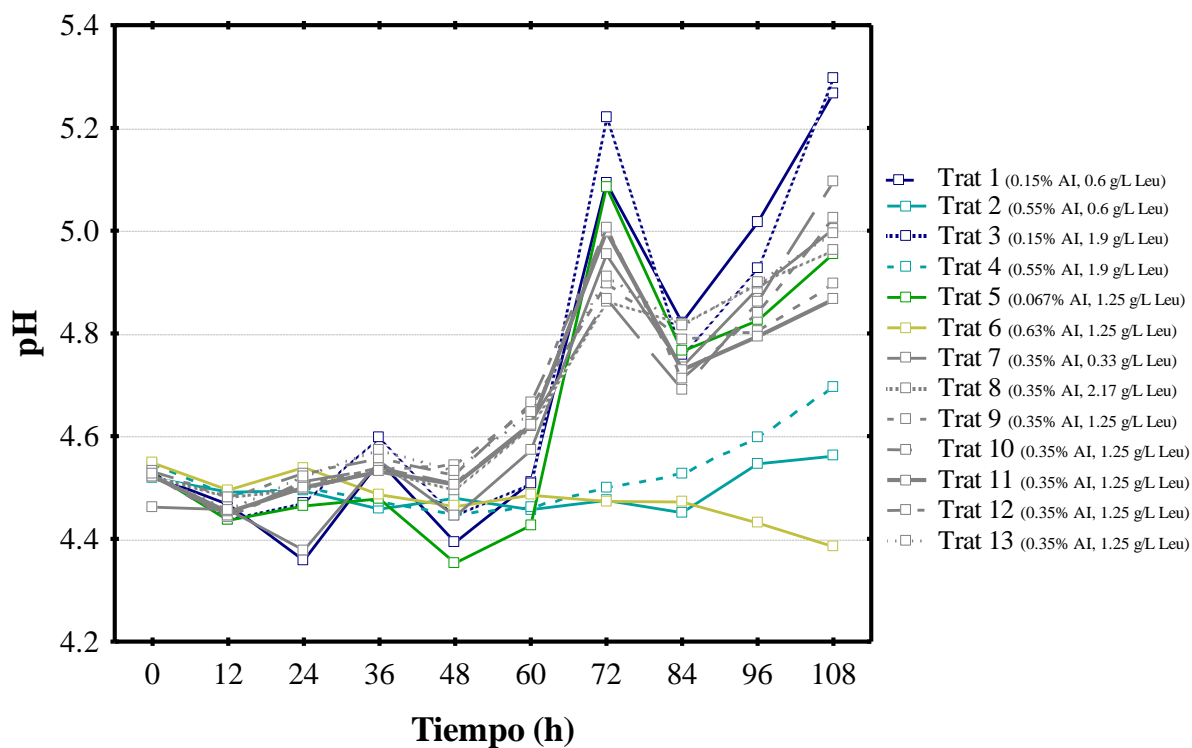
Por el contrario, en los tratamientos con 0.35 % de alcohol isoamílico, la cepa ITD00262-P superó en desempeño a la ITD00262-C. En estas condiciones, la cepa ITD00262-P logró reducir la lactosa a ~15 g/L, mientras que la cepa ITD00262-C sólo alcanzó entre 20 y 25 g/L. Esta observación respalda la hipótesis de que la cepa ITD00262-P posee una mayor capacidad de adaptación en escenarios de estrés moderado inducido por el alcohol isoamílico, mientras que la cepa ITD00262-C es más eficiente en condiciones menos restrictivas. El análisis del crecimiento microbiano y del consumo de la lactosa en el diseño DCCR muestra una influencia crítica de la concentración del alcohol isoamílico sobre la fisiología de ambas cepas de *K. marxianus*, con respuestas específicas en cada cepa que se manifiestan tanto en la velocidad de adaptación, así como en la eficiencia metabólica global.



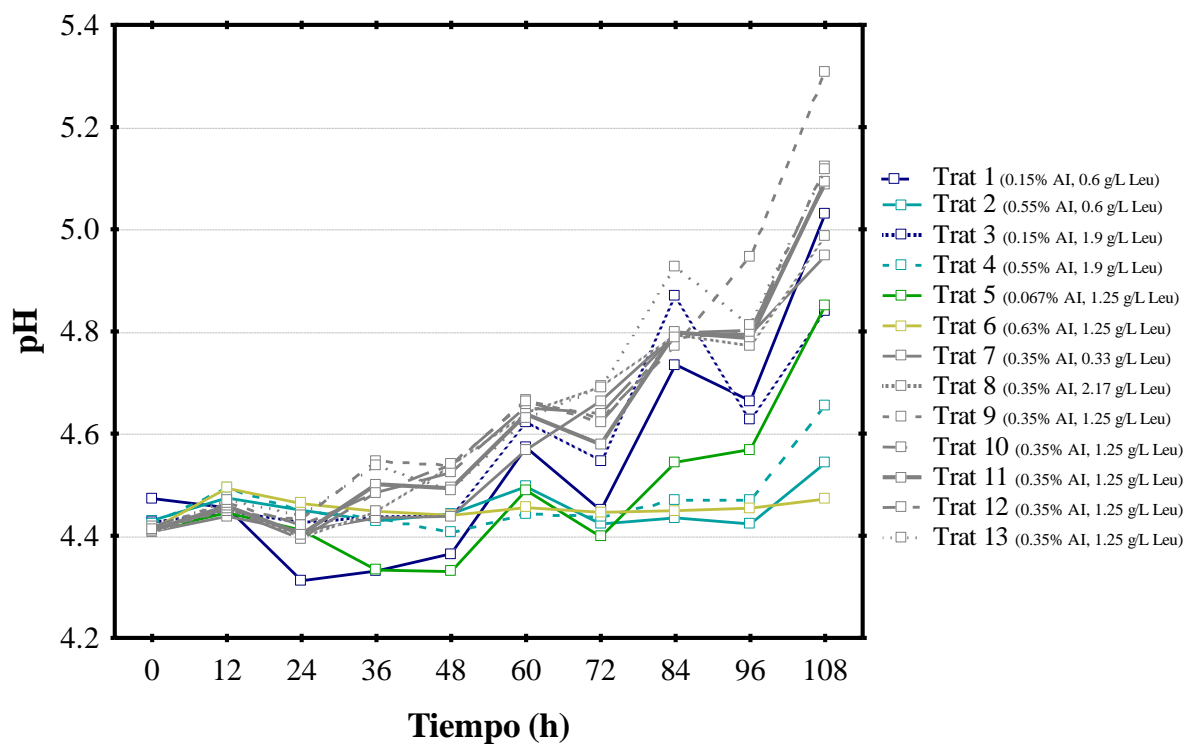
**Figura 24.** Cinética de consumo de la lactosa por *Kluyveromyces marxianus* ITD00262-P en los tratamientos del diseño experimental.



**Figura 25.** Cinética de consumo de la lactosa por *Kluyveromyces marxianus* ITD00262-C en los tratamientos del diseño experimental.



**Figura 26.** Monitoreo del pH en el medio de fermentación por *Kluyveromyces marxianus* ITD00262-P durante los tratamientos del diseño experimental.

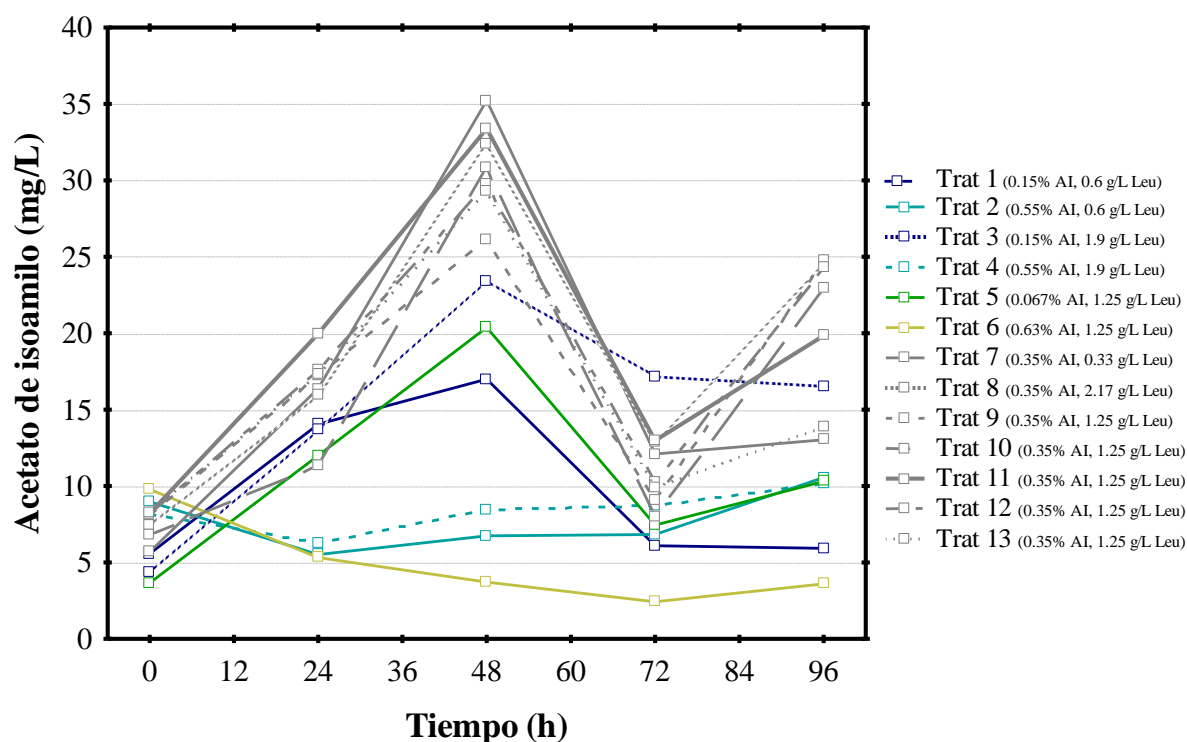


**Figura 27.** Monitoreo del pH en el medio de fermentación por *Kluyveromyces marxianus* ITD00262-C durante los tratamientos del diseño experimental.



### 8.4.2 Producción de acetato de isoamilo

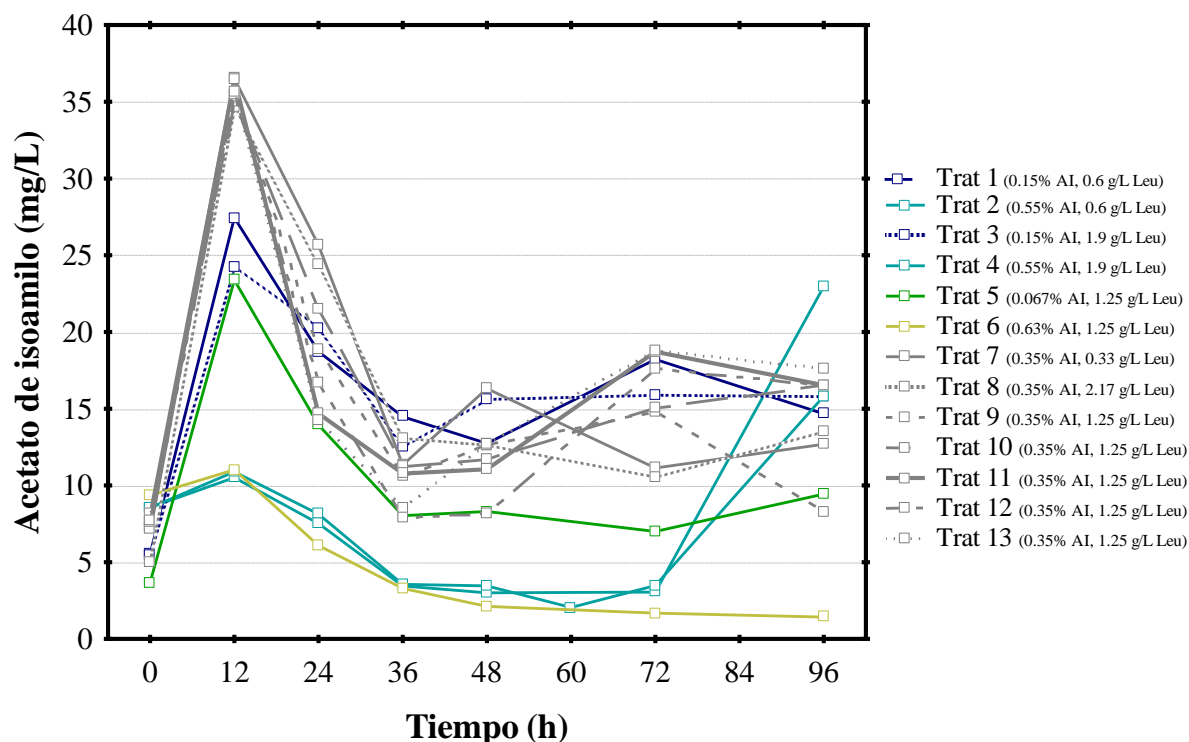
Con respecto a la síntesis del éster, los distintos tratamientos del diseño experimental mostraron diferencias (Figuras 28 y 29). Los tratamientos 2 y 4, que incluyeron 0.55% de alcohol isoamílico combinado con 0.6 y 1.9 g/L de L-leucina, respectivamente, no mostraron síntesis detectable de acetato de isoamilo durante las primeras 72 h en ninguna de las dos cepas. Posteriormente, la cepa ITD00262-C, presentó un incremento en la concentración del éster, alcanzando valores de  $\approx 23$  mg/L (T2) y de  $\approx 16$  mg/L (T4), lo cual indica un retardo significativo en la activación de la ruta de esterificación. Cabe destacar que, pese a la inclusión de L-leucina en ambas condiciones, no se observó una correlación positiva entre su concentración y la producción del éster, lo que sugiere que este aminoácido, en dichos tratamientos, no ejerció un efecto relevante sobre la vía metabólica de interés.



**Figura 28.** Producción del acetato de isoamilo por *Kluyveromyces marxianus* ITD00262-P en los tratamientos del diseño central.

Por otro lado, los tratamientos centrales (T9 a T13), todos ellos con 0.35% de alcohol isoamílico y 1.25 g/L de L-leucina, mostraron las mayores tasas de producción de acetato de isoamilo, con concentraciones cercanas a 35 mg/L. Este patrón se observó en ambas cepas, aunque con diferencias marcadas en el tiempo de máxima producción. En la cepa ITD00262-C, el pico de producción se alcanzó a las 12 h, mientras que en la cepa ITD00262-P ocurrió hasta las 48 h. Esta diferencia temporal indica que la cepa ITD00262-

C posee una capacidad de adaptación más rápida a las concentraciones moderadas de alcohol isoamílico (0.06–0.35%), favoreciendo una activación temprana de las rutas de biosíntesis de los compuestos volátiles.



**Figura 29.** Producción de acetato de isoamilo por *Kluyveromyces marxianus* ITD00262-C en los tratamientos del diseño central.

El comportamiento descrito guarda relación directa con los resultados de consumo de lactosa y de crecimiento microbiano observados previamente. En efecto, la síntesis del acetato de isoamilo está estrechamente ligada al metabolismo central y a la disponibilidad de los precursores intracelulares, tales como el alcohol isoamílico y la acetil-CoA, cuya formación depende de la eficiencia del flujo glucolítico y de las rutas secundarias como la vía de Ehrlich. En este sentido, la superioridad de la cepa ITD00262-C en cuanto a la velocidad de producción en etapas tempranas, puede atribuirse a una mayor eficiencia en el uso de los precursores y de los cofactores en condiciones de bajo estrés alcohólico.

Los resultados indican que la síntesis del éster no se ve favorecida en concentraciones altas de alcohol isoamílico ( $\geq 0.55\%$ ), ni por el incremento de la concentración de la L-leucina como único factor. En cambio, se maximiza cuando ambos precursores se encuentran en concentraciones intermedias, particularmente con un suministro de alcohol isoamílico entre 0.25 y 0.35 %. Además, la diferencia en el momento de producción entre

ambas cepas refuerza la importancia del tiempo de adaptación celular y la velocidad de activación metabólica en el rendimiento del proceso.

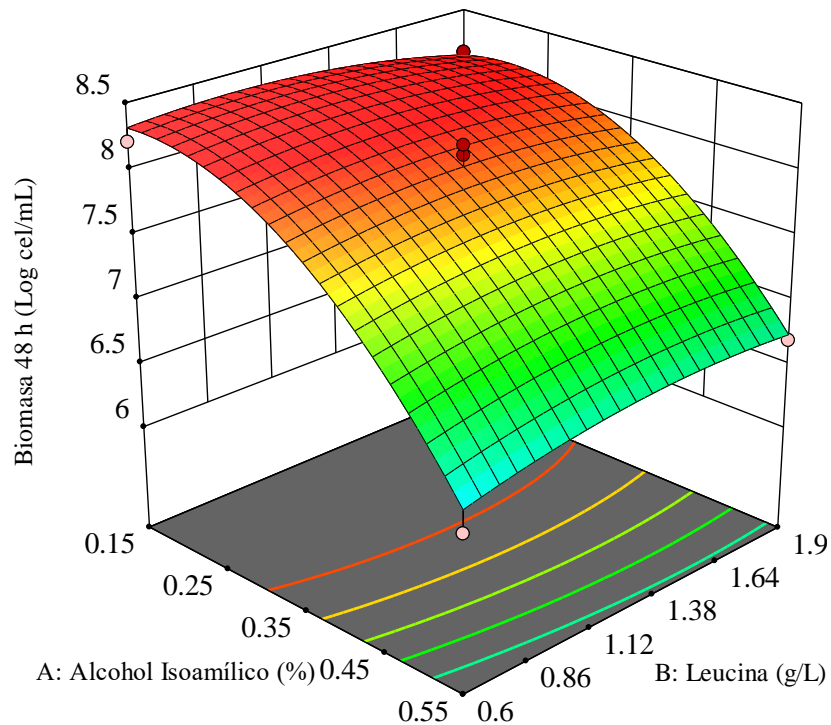
La cepa ITD00262-C demostró una mayor velocidad de respuesta y una mayor eficiencia en la síntesis del acetato de isoamilo bajo condiciones moderadas de precursores, lo cual se alinea con su mejor desempeño en el consumo de la lactosa y en el crecimiento inicial. Esta cepa resulta, por tanto, más adecuada para aplicaciones orientadas a la producción temprana de bioaromas, mientras que la cepa ITD00262-P, podría ser más apropiada en esquemas de producción prolongada o de mayor estabilidad a mediano plazo.

#### **8.4.3 Análisis de superficie de respuesta (ASR)**

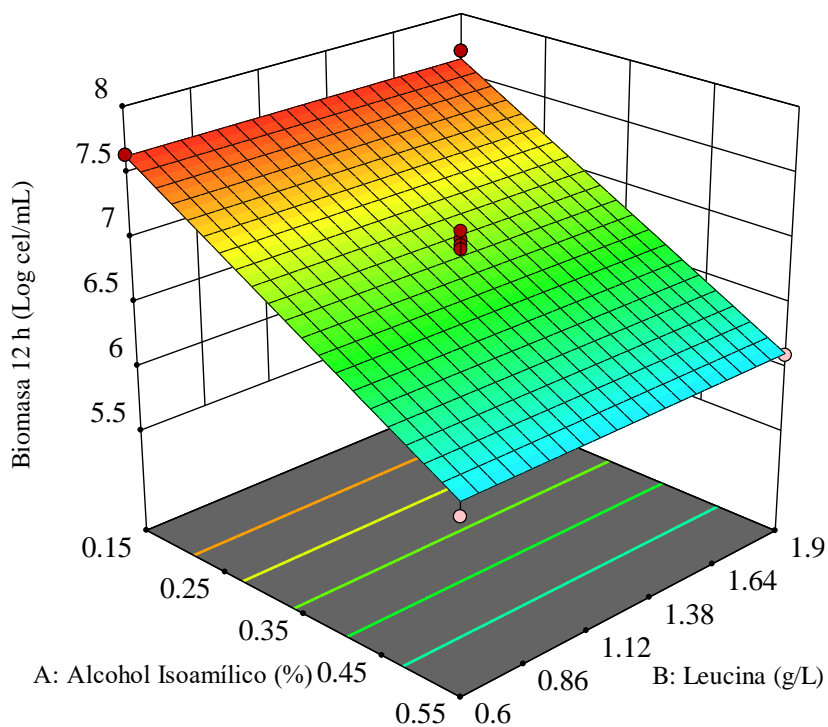
El análisis de superficie de respuesta (ASR) se empleó para comprender las interacciones entre las variables independientes y las de respuesta planteadas en el diseño experimental, así como para identificar las condiciones óptimas de operación del sistema fermentativo. El modelo se aplicó con base en los 13 tratamientos del Diseño Central Compuesto Rotable (DCCR), evaluando el efecto conjunto de las concentraciones del alcohol isoamílico (0.067-0.63%) y de la L-leucina (0.33-2.17 g/L) sobre la producción del acetato de isoamilo, el crecimiento celular y el consumo de lactosa. El análisis se realizó por separado en las dos cepas de *K. marxianus* estudiadas, con base en el tiempo de mayor producción del aroma detectado: 48 h para la cepa ITD00262-P y 12 h para la cepa ITD00262-C.

En la cepa ITD00262-P, la superficie de respuesta mostró una relación inversamente proporcional entre la concentración del alcohol isoamílico y de la biomasa generada (Figura 30), lo cual sugiere un efecto inhibitorio progresivo del precursor a medida que se incrementa su concentración. Este patrón también se reflejó en la cantidad de la lactosa remanente en el medio (Figura 32), que fue mayor en condiciones con alto contenido alcohólico, indicando una disminución en la actividad metabólica global. La adición de L-leucina, en este caso, no mostró una influencia significativa sobre el crecimiento, ni sobre el consumo de lactosa.

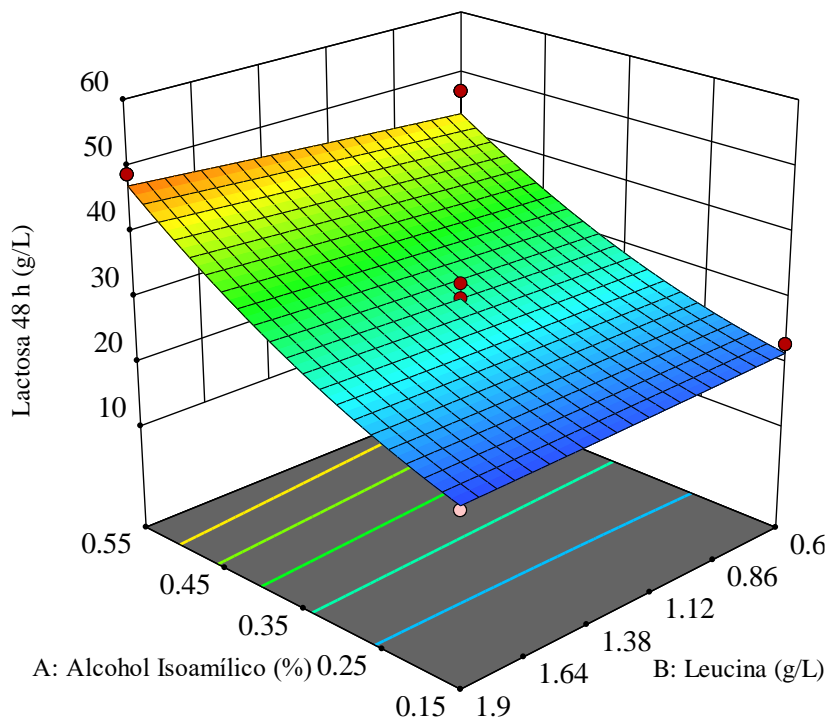
La síntesis de acetato de isoamilo (Figura 34) fue favorecida en un rango intermedio de alcohol isoamílico (0.25–0.35%), evidenciando una ventana metabólica óptima en la que las células disponen de suficiente precursor para la esterificación, sin activar mecanismos de defensa o inducir toxicidad. La leve influencia positiva de la L-leucina sugiere que, aunque su participación en la vía de Ehrlich puede aportar alcohol isoamílico adicional, su efecto no es determinante en la producción del éster bajo las condiciones evaluadas.



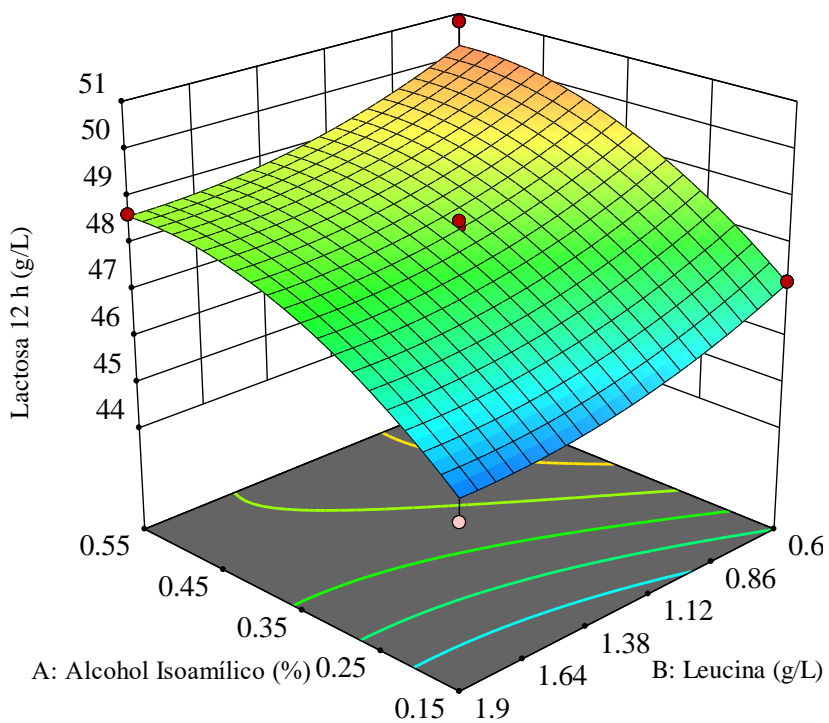
**Figura 30.** Superficie de respuesta de la producción de biomasa en la fermentación del lactosuero a las 48 h empleando la cepa *Kluyveromyces marxianus* ITD00262-P.



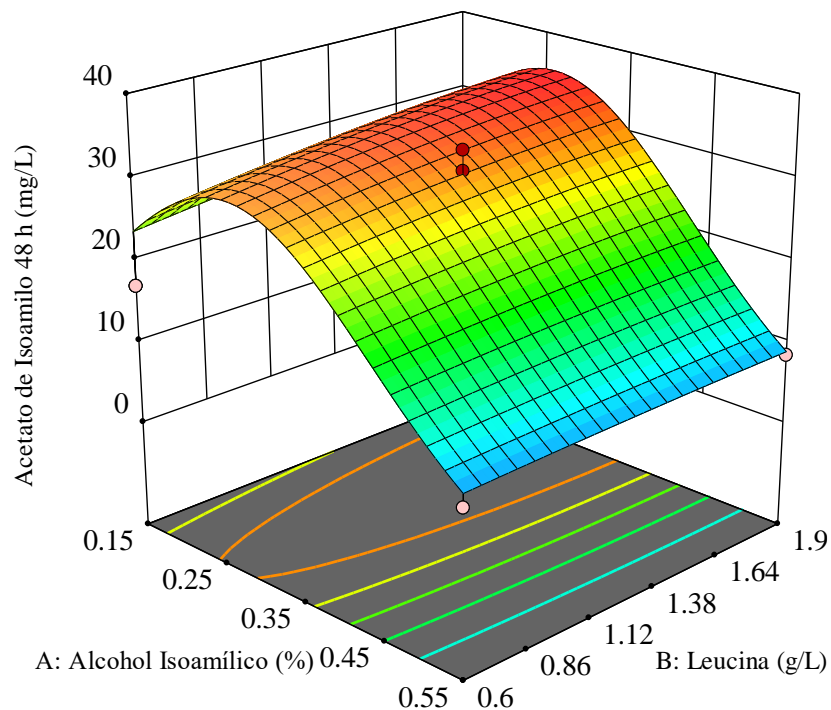
**Figura 31.** Superficie de respuesta de la producción de biomasa en la fermentación del lactosuero a las 12 h empleando la cepa *Kluyveromyces marxianus* ITD00262-C.



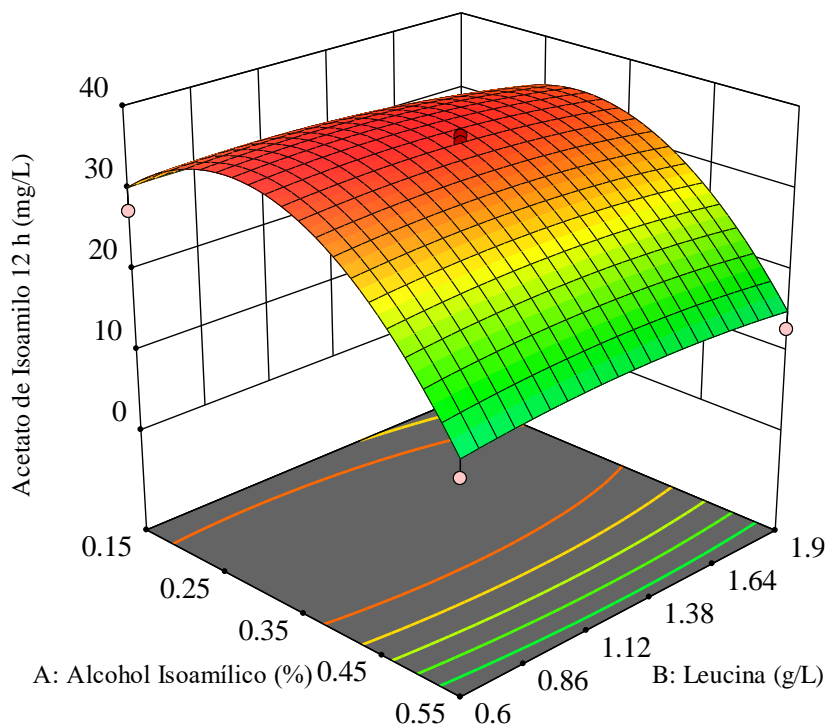
**Figura 32.** Superficie de respuesta de la concentración de lactosa en la fermentación del lactosuero a las 48 h empleando la cepa *Kluyveromyces marxianus* ITD00262-P.



**Figura 33.** Superficie de respuesta de la concentración de lactosa en la fermentación del lactosuero a las 48 h empleando la cepa *Kluyveromyces marxianus* ITD00262-C.



**Figura 34.** Superficie de respuesta de la producción de acetato de isoamilo en la fermentación del lactosuero a las 48 h empleando la cepa *Kluyveromyces marxianus* ITD00262-P.



**Figura 35.** Superficies de respuesta de la producción de acetato de isoamilo en la fermentación del lactosuero a las 12 h empleando la cepa *Kluyveromyces marxianus* ITD00262-C.

En la cepa ITD00262-C, la superficie de respuesta obtenida a las 12 h mostró tendencias similares. La biomasa disminuyó con el aumento de la concentración del alcohol isoamílico (Figura 31), aunque en esta cepa se evidenció una mayor resistencia inicial al precursor. El consumo de lactosa fue más eficiente en condiciones con bajo contenido alcohólico y mayor proporción de L-leucina (Figura 33), lo cual sugiere una mayor capacidad de aprovechamiento de fuentes nitrogenadas en condiciones de bajo estrés. Sin embargo, al igual que con la cepa ITD00262-P, no se observaron efectos significativos de la L-leucina sobre el crecimiento celular.

Respecto a la síntesis del éster (Figura 35), el patrón fue coincidente con el de la cepa ITD00262-P, la máxima producción se alcanzó con concentraciones intermedias del alcohol isoamílico (0.20 y 0.35%), sin una contribución marcada por parte de la concentración de la L-leucina. Es importante destacar que, en ambas cepas, la esterificación se comportó como una función dependiente del equilibrio entre la concentración de precursor, la disponibilidad de la acetil-CoA y el estado metabólico de las células.

En conjunto, el ASR permitió identificar las zonas de máxima respuesta del sistema. La producción del acetato de isoamilo fue óptima en un intervalo estrecho de concentración del alcohol isoamílico y se vio fuertemente afectada por aumentos más allá del 0.55%, que inhibieron tanto el crecimiento como la síntesis del compuesto. La L-leucina, si bien no tuvo un efecto significativo directo sobre la producción del éster, podría aportar en procesos indirectos como la formación del alcohol isoamílico o la estabilización metabólica bajo ciertas condiciones.

Estos hallazgos se alinean con estudios previos sobre fermentaciones de levaduras no convencionales en medios ricos en lactosa, donde se ha observado que la formación de compuestos volátiles está condicionada por el balance entre las rutas biosintéticas y su degradación por las enzimas éster hidrolasas (Plata et al., 2004; Rojas et al., 2001). Asimismo, se ha documentado que la etapa de crecimiento exponencial es crítica para la producción máxima de aromas, ya que en ella se alcanza el máximo flujo de precursores, la mayor actividad enzimática y el mejor balance redox (Sainz-Mellado et al., 2023; Dhanker et al., 2019).

La aplicación de un diseño experimental basado en superficie de respuesta permitió establecer lo siguiente:

1. Concentraciones moderadas de alcohol isoamílico (0.25–0.35 %) favorecen la producción de acetato de isoamilo en ambas cepas de *K. marxianus*.
2. La L-leucina no ejerce un efecto directo significativo sobre la producción del éster, aunque sí puede contribuir indirectamente al metabolismo energético y a la formación del alcohol isoamílico.
3. La cepa ITD00262-C presenta una mayor capacidad de adaptación inicial, así como una mayor eficiencia metabólica y una mayor velocidad de respuesta en condiciones moderadas de precursores, lo que la posiciona como candidata preferente para aplicaciones biotecnológicas orientadas a la síntesis de bioaromas.
4. El control preciso de los factores de operación, especialmente la dosificación del alcohol isoamílico, así como el momento de su adición, son determinantes para maximizar el rendimiento del proceso y evitar efectos inhibitorios.

Estos hallazgos son consistentes con la bibliografía existente acerca de las levaduras aromatizantes enológicas y respaldan el planteamiento de emplear *K. marxianus* como una plataforma microbiana flexible para la valorización biotecnológica del lactosuero, lo cual está en sintonía con las tácticas de economía circular y con la producción sostenible de compuestos que aportan valor añadido.

#### **8.4.4 Optimización**

La condición experimental que combinó la adición simultánea del alcohol isoamílico y de la L-leucina, promovió una producción sinérgica del acetato de isoamilo, alcanzando una concentración de 36 mg/L, bajo las mejores condiciones registradas. Esta sinergia puede explicarse mediante dos mecanismos interrelacionados: (1) acumulación intracelular del alcohol isoamílico por doble vía, ya que el alcohol añadido se transforma directamente, mientras que la L-leucina se degrada por la vía Ehrlich, elevando así su concentración intracelular y (2) estimulación de la actividad de las enzimas alcohol acetiltransferasas (AATs), enzimas cuya expresión puede inducirse o desinhibirse por la presencia sostenida de alcoholes superiores en el medio, lo que favorece la formación de ésteres en lugar de su excreción o redireccionamiento hacia otras rutas metabólicas (Etschmann et al., 2002).

Esta interacción metabólica posiciona a *Kluyveromyces marxianus* como un sistema modelo de biotransformación, capaz de operar más allá de la simple producción de biomasa o etanol, hacia una conversión dirigida de precursores específicos, bajo condiciones ajustadas al perfil químico del medio.



El diseño experimental permitió identificar la combinación óptima de variables para maximizar la síntesis de acetato de isoamilo. Los resultados de la optimización se presentan a continuación, obtenidos en el momento de máxima producción del compuesto. En el caso de la cepa *K. marxianus* ITD00252-P a las 48 h, se identificaron ocho soluciones con una deseabilidad de 0.991, de las cuales se seleccionó una, debido a la similitud en sus resultados (Tabla 19). Para la cepa *K. marxianus* ITD00252-C, evaluada a las 12 h, se obtuvieron 98 soluciones con una deseabilidad de 1.0. Se seleccionaron dos condiciones: la de mayor y de menor concentración de alcohol isoamílico, dada la alta influencia de esta variable sobre la producción del éster (Tabla 20).

**Tabla 19.** Optimización de la producción de acetato de isoamilo a las 48 h en la fermentación del lactosuero con adición del alcohol isoamílico y de L-leucina con la cepa *K. marxianus* ITD00252-P.

<b>Óptimo</b>		<b>Predicción</b>			
<b>Alcohol isoamílico (%)</b>	<b>L-leucina (g/L)</b>	Biomasa (Log cel/mL)	pH	Lactosa (g/L)	Acetato de isoamilo (mg/L)
<b>0.269</b>	<b>1.900</b>	8.124	4.494	25.820	35.389

**Tabla 20.** Optimización de la producción de acetato de isoamilo a las 12 h en la fermentación del lactosuero con adición del alcohol isoamílico y L-leucina con la cepa *K. marxianus* ITD00252-C.

<b>Óptimo</b>		<b>Predicción</b>			
<b>Alcohol isoamílico (%)</b>	<b>L-leucina (g/L)</b>	Biomasa (Log cel/mL)	pH	Lactosa (g/L)	Acetato de isoamilo (mg/L)
<b>0.311</b>	<b>1.197</b>	7.022	4.462	48.088	36.562
<b>0.267</b>	<b>0.958</b>	7.191	4.456	48.009	36.546

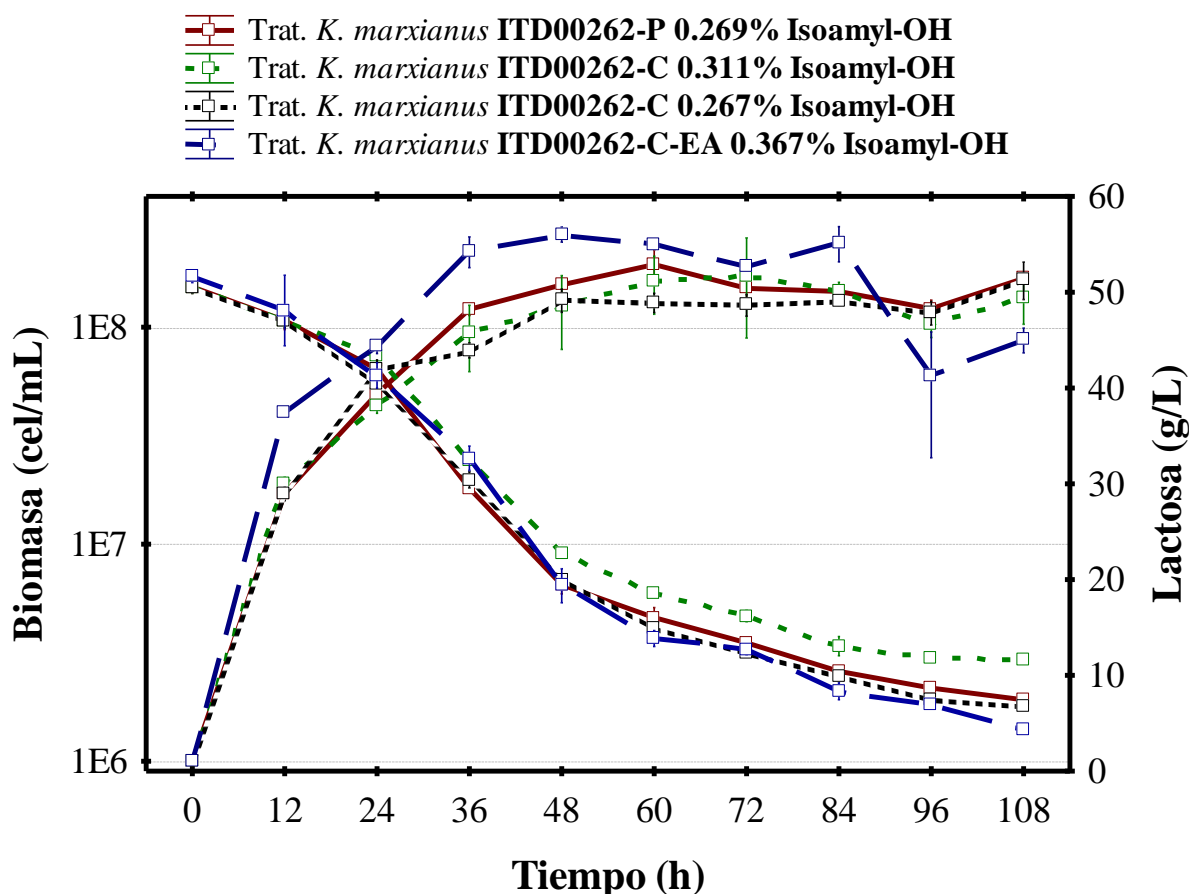
#### 8.4.5 Validación de la optimización y de las cinéticas de fermentación del lactosuero por la cepa *K. marxianus* ITD00262-C posterior a una fase de adaptación

La validación del proceso optimizado incluyó el monitoreo integral de los parámetros clave como el crecimiento microbiano, el consumo de lactosa y la producción de acetato de isoamilo y de etanol. Este análisis es fundamental para corroborar la eficacia del diseño experimental, evaluando si las condiciones óptimas propuestas reproducen los efectos esperados en condiciones reales. Además, se incluyó una comparación con fermentaciones

en las que la cepa *K. marxianus* ITD00252-C (EA) fue previamente adaptada a una de las condiciones óptimas, lo que puede permitir evaluar posibles mejoras por adaptación fisiológica.

#### 8.4.5.1 Crecimiento de microorganismos y consumo de lactosa

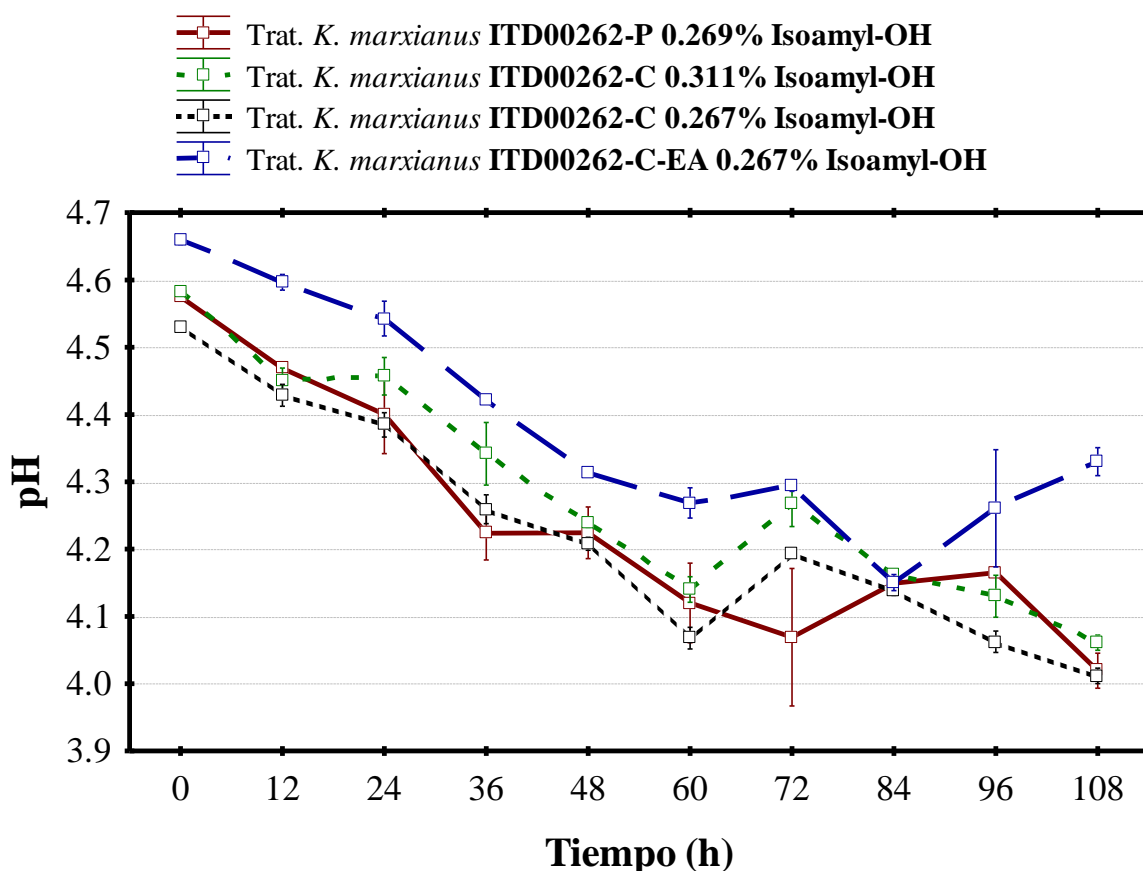
La producción de la biomasa actúa como un indicador indirecto de la eficiencia metabólica de *K. marxianus*. Los datos obtenidos, presentados en las Figuras 36 y 37, muestran tendencias consistentes y relevantes en las tres validaciones realizadas, utilizando ambas cepas evaluadas. Estos resultados indican que las condiciones optimizadas no sólo maximizan la síntesis de los compuestos aromáticos, sino que también mantienen un entorno propicio para la proliferación celular.



**Figura 36.** Cinéticas de generación de biomasa y del consumo de lactosa durante la validación de la optimización de la fermentación del lactosuero, comparadas con la cinética de fermentación utilizando *K. marxianus* adaptada.

La reducción progresiva de la concentración de la lactosa en el medio constituye un indicador de la eficiencia en la conversión del sustrato. Las tasas de consumo observadas

fueron consistentes con las predicciones del modelo, lo que refuerza la validez del mismo. En particular, la cepa *K. marxianus* ITD00252-P presentó una concentración de lactosa residual inferior a la estimada por el modelo, lo que sugiere una posible subestimación de su capacidad catabólica bajo ciertas condiciones.



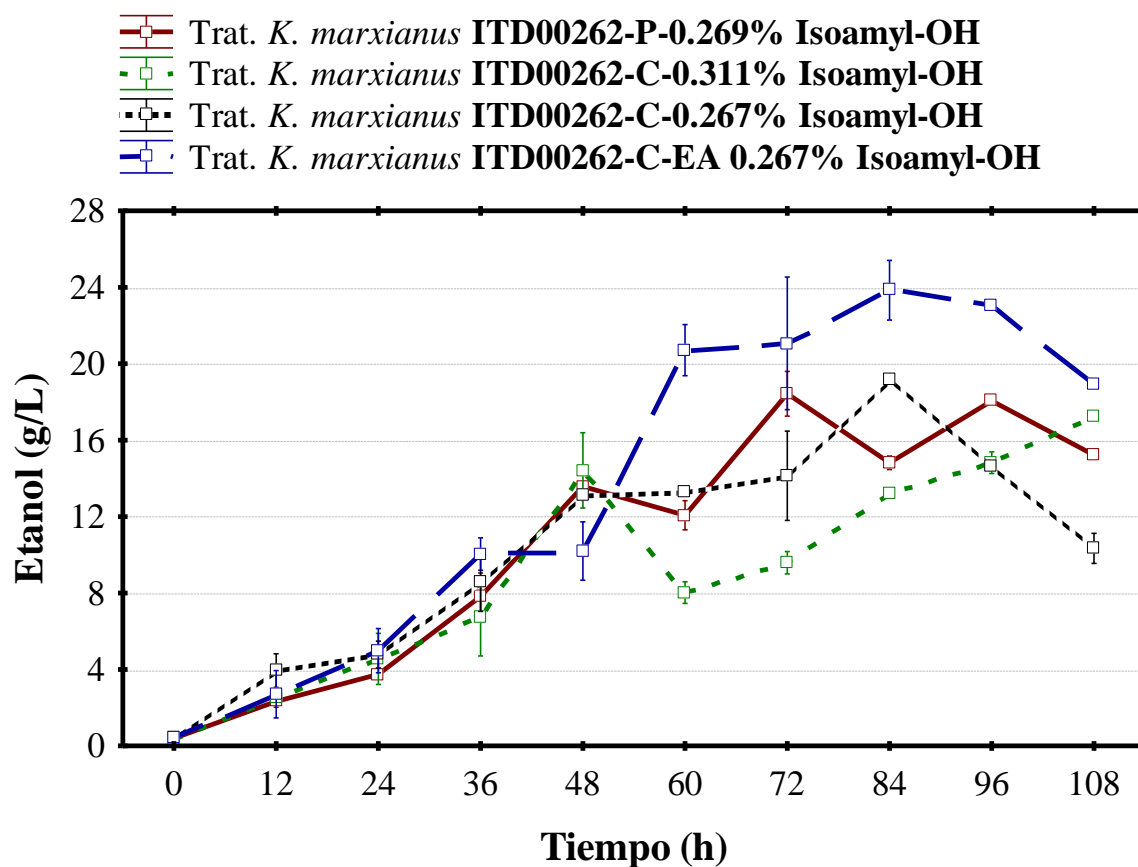
**Figura 37.** Cinéticas del pH en la validación de la optimización de la fermentación del lactosuero, comparada con la cinética de fermentación utilizando *K. marxianus* adaptada.

El pH del medio, factor determinante en la actividad enzimática y de la estabilidad del proceso fermentativo, mostró valores alineados con los proyectados por el modelo en el caso de la cepa *K. marxianus* ITD00252-C. Sin embargo, la cepa ITD00252-P presentó un pH final de 4.22, ligeramente por debajo del valor predicho de 4.49. Esta desviación podría estar relacionada con pequeñas variaciones operacionales, errores de medición o diferencias en el metabolismo ácido de la cepa.

#### 8.4.5.2 Producción de acetato de isoamilo

Los resultados obtenidos confirmaron que las concentraciones alcanzadas de acetato de isoamilo y etanol son coherentes con las predicciones del modelo optimizado (Figuras 38 y

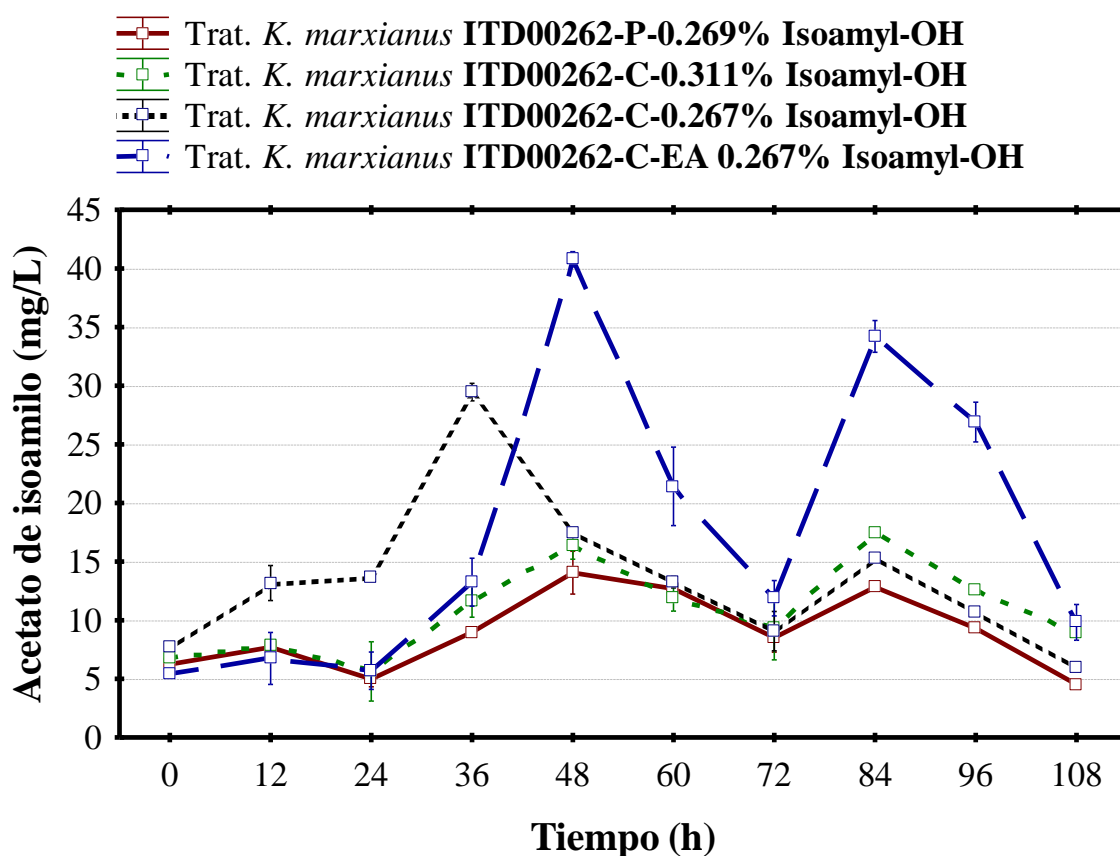
39). La correlación entre los datos experimentales y los valores teóricos predichos por el modelo respaldan la robustez del diseño estadístico, validando la respuesta de las cepas ante la manipulación de las variables seleccionadas. Cabe señalar que, en la condición con mayor concentración de alcohol isoamílico (0.311% v/v), utilizada con *K. marxianus* ITD00252-C, se observó un menor consumo de lactosa, lo que sugiere que concentraciones elevadas de este precursor pueden generar un efecto inhibitorio sobre la absorción de azúcares.



**Figura 38.** Cinéticas de la producción de etanol durante la validación de la optimización de la fermentación del lactosuero, comparada con la cinética de fermentación utilizando *K. marxianus* adaptada.

A diferencia de otros procesos fermentativos donde la levadura sintetiza *de novo* el alcohol superior a partir de aminoácidos, este sistema se basa en la biotransformación directa de compuestos exógenos, en particular del alcohol isoamílico, mediante esterificación intracelular. En este contexto, *K. marxianus* actúa como un biocatalizador especializado, cuya función principal no es la síntesis de precursores, sino su conversión eficiente bajo condiciones controladas.

El mecanismo clave es la esterificación acética del alcohol isoamílico en presencia de la acetil-CoA, catalizada por las enzimas alcohol acetiltransferasas. La acumulación intracelular de la acetil-CoA es favorecida en condiciones del metabolismo glucolítico activo, pero con un flujo restringido hacia el ciclo de Krebs, lo que ocurre típicamente en ambientes microaeróbicos o con relaciones C/N ajustadas. Este redireccionamiento metabólico ha sido ampliamente documentado (Styger et al., 2011; Morrissey; et al., 2015; Gamero et al., 2016).



**Figura 39.** Cinéticas de la producción de acetato de isoamilo durante la validación de la optimización de la fermentación del lactosuero, comparada con la cinética de fermentación utilizando *K. marxianus* adaptada.

Las cepas de *K. marxianus* muestran diferencias fisiológicas relevantes. Por ejemplo, la cepa ITD00252-C presentó mejor correlación entre el pH, el consumo de lactosa y la producción de éster, que la cepa ITD00252-P. La actividad de las enzimas alcohol acetiltransferasas, en particular ATF1 y ATF2 en modelos como *S. cerevisiae*, o sus homólogos funcionales en *K. marxianus*, se ve regulada por la concentración de alcoholes superiores en el medio, por el pH intracelular y por la disponibilidad de acetil-CoA. Se ha

reportado que la adición del alcohol isoamílico puede inducir la sobreexpresión de ATF y, en consecuencia, aumentar la producción de acetato de isoamilo (Gantumur et al., 2022; Campos-García et al., 2018; Reyes-Sánchez et al., 2019). Este fenómeno es coherente con lo observado en esta investigación, donde la condición con mayor concentración de alcohol isoamílico (0.31% v/v) y de L-leucina (1.197 g/L) produjo el mayor rendimiento del éster.

El pH del medio, cuidadosamente ajustado y mantenido en valores cercanos a 5.5, fue crucial para maximizar la actividad de las enzimas AATases. Estudios en matrices fermentativas complejas han demostrado que estas enzimas presentan una actividad óptima entre pH 5.0 y 5.8, con caídas significativas de eficiencia en condiciones más alcalinas o ácidas (Dragone et al., 2009; Styger et al., 2011). El diseño experimental consideró esta variable como un factor crítico, lo que permitió mantener un ambiente enzimáticamente favorable durante la ventana de máxima producción.

La combinación de alta productividad, conversión eficiente de precursores y crecimiento celular controlado sugiere que el sistema fermentativo optimizado con *K. marxianus* puede ser escalado a condiciones semipiloto o piloto con mínima modificación. El uso del lactosuero crudo como sustrato base, sin necesidad de pretratamiento, representa una ventaja técnica considerable, tanto en términos de costo, así como de reducción de residuos adicionales.

La estrategia basada en el uso de levaduras como catalizadores de biotransformación permite una modulación precisa de los perfiles aromáticos del producto, simplemente ajustando las concentraciones de los precursores añadidos. Esta flexibilidad es especialmente valiosa para aplicaciones en las industrias alimentaria y de fragancias, donde el cumplimiento de las normas sensoriales y regulatorias es indispensable.

#### **8.4 Estrés adaptativo**

La exposición de las cepas de *Kluyveromyces marxianus* a condiciones estresantes controladas durante fases previas al proceso fermentativo constituye una estrategia efectiva para inducir una reprogramación metabólica transitoria, sin alterar permanentemente el genoma. Este pre-acondicionamiento bajo estrés adaptativo, induce una respuesta celular que modifica la expresión génica, la dinámica de los cofactores redox y la asignación de recursos bioquímicos, favoreciendo la producción de metabolitos secundarios, como los ésteres volátiles (Lane & Morrissey, 2010; Saldoval-Núñez et al., 2023). La exposición inicial

a compuestos como la L-leucina y el alcohol isoamílico activa rutas específicas, incluyendo la vía de Ehrlich y la biosíntesis de ésteres por medio de las enzimas alcohol acetiltransferasas, que son inducidas por la presencia de precursores y por el estrés osmótico o tóxico (Gantumur et al., 2022; Acosta-Cuevas et al., 2025).

Se ha observado una sobreexpresión de ATF1 y ADH2 en condiciones de estrés, la cual ha sido correlacionada con una mayor conversión de alcohol isoamílico a acetato de isoamilo (Hazelwood et al., 2008; Gantumur et al., 2022). Además, el balance redox intracelular es clave en este proceso, ya que la esterificación requiere la participación de la acetil-CoA y de cofactores como el NAD<sup>+</sup>, cuya disponibilidad se ve favorecida en células adaptadas mediante una mejora en las vías de reoxidación del NADH (Li et al., 2021).

La resistencia celular frente a compuestos inhibitorios como los alcoholes superiores y los ácidos débiles se incrementa gracias a las modificaciones en la composición lipídica de la membrana y a una mayor expresión de bombas de eflujo, lo que permite a la célula mantener tasas de crecimiento más estables bajo condiciones de estrés, reduciendo la fase lag, conservando la viabilidad y redirigiendo el flujo metabólico hacia productos deseados (Hong et al., 2007; Tocantins et al., 2019; Pal & Vij 2022).

En este marco adaptativo, el pre-acondicionamiento del cultivo en un medio con lactosuero sin diluir, junto con la exposición inicial a concentraciones controladas de L-leucina y de alcohol isoamílico, plantea un desafío metabólico que obliga a la célula a reorganizar sus recursos bioquímicos. Esta reorganización se traduce en una mejora del transporte de nutrientes, así como una mayor expresión de las enzimas clave en rutas metabólicas secundarias y una priorización de las vías catabólicas que facilitan la transformación de compuestos tóxicos en metabolitos menos dañinos o incluso funcionales, como los ésteres volátiles.

Durante las fermentaciones post-estrés adaptativo, las curvas de crecimiento mostraron una cinética modificada: una fase lag más corta, así como una tasa de crecimiento ( $\mu$ ) ligeramente reducida (probablemente debido a la carga metabólica de la adaptación), pero una fase estacionaria más sostenida, con mayor acumulación de producto. Asimismo, se ha observado un uso más eficiente de la lactosa, posiblemente mediado por una mejor regulación del sistema LAC12-LAC4, acompañado de una menor producción de etanol y una canalización más efectiva del piruvato hacia acetil-CoA (Fonseca et al., 2008; Etschmann et al., 2002; Styger et al., 2011).

Estas respuestas fisiológicas permiten a *K. marxianus* maximizar la producción de compuestos aromáticos, sin recurrir a la ingeniería genética, lo que resulta ventajoso en contextos industriales con restricciones regulatorias (Pattanakittivorakul et al., 2022). La implementación del estrés adaptativo puede realizarse mediante cultivos secuenciales o preinóculos en biorreactores, ofreciendo una vía sostenible para aumentar la robustez celular y la eficiencia metabólica, sin introducir mutaciones heredables.

#### **8.4.1 Relevancia biotecnológica del uso del estrés adaptativo**

El uso del estrés adaptativo como herramienta de mejora fermentativa se alinea con los principios de la biotecnología sostenible y del diseño racional de procesos microbianos. A diferencia de la mutagénesis o de la ingeniería genética, esta estrategia no altera directamente el genoma del microorganismo, sino que promueve cambios evolutivos naturales bajo presión selectiva controlada, lo cual resulta ventajoso en aplicaciones donde la trazabilidad, la naturalidad del proceso y la aceptabilidad regulatoria son críticas (por ejemplo, alimentos etiquetados como “libres de OGM”) (Vidra & Németh, 2024).

Además, permite conservar la robustez de la cepa madre y minimizar los riesgos asociados a mutaciones no deseadas, al tiempo que se mejora la eficiencia productiva. Este enfoque ha demostrado ser eficaz en la mejora de la tolerancia a estrés térmico, etanólico y osmótico en diversas cepas industriales sin recurrir a técnicas transgénicas (Zhang et al., 2019; Fernandes et al., 2023; Pal et al., 2023; Xu et al., 2024).

La implementación de fases de estrés adaptativo puede integrarse en el escalamiento mediante biorreactores secuenciales o cultivos de preinóculo con condiciones ajustadas, generando un impacto mínimo en los costos operacionales y mejorando la estabilidad del proceso fermentativo (Tekarslan-Sahin et al., 2022; Lu et al., 2022).

Desde el punto de vista de la ingeniería metabólica, estas respuestas fisiológicas reafirman el valor del estrés adaptativo como una estrategia no transgénica para optimizar procesos fermentativos. En contextos industriales donde la regulación es estricta y se busca evitar la modificación genética, esta aproximación representa una solución robusta, sostenible y tecnológicamente viable (Pattanakittivorakul, et al., 2022).



## 8.5 Validación del modelo de superficie de respuesta: predicción y ajuste experimental

El uso de metodologías estadísticas multivariantes, como los diseños de superficie de respuesta (Response Surface Methodology, RSM), representa una herramienta fundamental en la optimización de procesos fermentativos complejos. Estos modelos permiten identificar, con alta precisión, las condiciones óptimas de operación mediante la evaluación simultánea de múltiples variables, sus efectos individuales y sus posibles interacciones, sin requerir una exploración exhaustiva de todo el espacio experimental.

En el presente estudio, se empleó un diseño central compuesto rotatable para modelar la producción de acetato de isoamilo por la cepa *Kluyveromyces marxianus* ITD00262-P. Se definieron como variables independientes la concentración de alcohol isoamílico (% v/v), la concentración de L-leucina (g/L) y el tiempo de fermentación (h). El objetivo del modelo fue maximizar la producción del éster aromático bajo condiciones catalíticas, donde la levadura actúa como transformador de los precursores exógenos y no como biosintetizador total de estos.

Los experimentos se realizaron de forma aleatoria para minimizar el efecto de los factores de ruido y para minimizar errores sistemáticos. El diseño central compuesto rotatable aplicado para la cepa *K. marxianus* ITD00252-P se ajustó en términos a un modelo cuadrático completo en las tres variables de respuesta: generación de biomasa, consumo de lactosa y producción de acetato de isoamilo. El análisis de los resultados obtenidos de cada variable de respuesta presentó valores de  $R^2$  ajustada superiores al 90%, lo que indica que el modelo explica adecuadamente el sistema. Asimismo, el análisis mostró valores de  $R^2$  cercanos a la unidad y una diferencia entre los valores de  $R^2$  ajustada y  $R^2$  predicha menores a 0.2 en las primeras dos variables de respuesta. Esto se relaciona con el poder de predicción del modelo propuesto sobre el comportamiento de la producción de biomasa y del consumo de lactosa en la fermentación de lactosuero con la cepa *K. marxianus* ITD00252-P a las 48 h (Tablas 21 y 22).

El modelo muestra los efectos de las variables independientes sobre cada variable de respuesta, determinadas utilizando los datos experimentales ajustados a una ecuación polinómica de segundo orden de la Ecuaciones 1, 2 y 3 para biomasa, consumo de lactosa y producción de acetato de isoamilo, respectivamente, considerando una significancia con

valor de  $p < 0.05$ . Donde  $y$  es la respuesta experimental y  $b_0 \dots b_4$  corresponden a la intersección y los demás términos del modelo planteado.

**Tabla 21.** Importancia de los modelos de regresión (valor de F) y de los efectos de las variables de respuesta en la optimización de la producción de acetato de isoamilo en la fermentación de lactosuero con la cepa *K. marxianus* ITD00252-P a las 48 h.

Modelo	Biomasa	Lactosa	Acetato de isoamilo
<b>Naturaleza del modelo con mejor ajuste</b>	Cuadrático	Cuadrático	Cuadrático
$R^2$	0.9787	0.9652	0.9453
$R^2$ ajustada	0.9634	0.9403	0.9063
$R^2$ predicha	0.8963	0.7837	0.6394
<b>Términos</b>	<b>valor F</b>		
A-Alcohol isoamílico	240.020	182.996	49.176
B-L-leucina	0.0063	0.5228	0.4629
AB	1.800	1.073	0.0515
$A^2$	78.680	9.265	70.597
$B^2$	4.160	0.0044	0.0656
<b>Falta de ajuste</b>	1.96**	6.88**	13.00**
<b>Modelo</b>	64.26***	38.790***	24.20***
<b>valor p</b>	< 0.0001	< 0.0001	0.0003

\* $p < 0.05$ , \*\*3 grados de libertad, \*\*\*5 grados de libertad, los términos manejan 1 grado de libertad.

$$y = b_0 - b_1A + b_2B + b_3AB - b_4A^2 - b_5B^2$$

**Ecuación 1.** Ecuación polinómica del modelo cuadrático para la generación de Biomasa en la producción de acetato de isoamilo en la fermentación del lactosuero empleando la cepa *K. marxianus* ITD00252-P a las 48 h.

$$y = b_0 + b_1A + b_2B + b_3AB + b_4A^2 + b_5B^2$$

**Ecuación 2.** Ecuación polinómica del modelo cuadrático para el consumo de lactosa en la producción de acetato de isoamilo en la fermentación del lactosuero empleando la cepa *K. marxianus* ITD00252-P a las 48 h.

$$y = b_0 - b_1A + b_2B - b_3AB - b_4A^2 - b_5B^2$$

**Ecuación 3.** Ecuación polinómica del modelo cuadrático para la producción de acetato de isoamilo en la fermentación del lactosuero empleando *K. marxianus* ITD00252-P a las 48 h.

La optimización multirespuesta priorizó la máxima producción de acetato de isoamilo, así como el mayor consumo de lactosa, con el objetivo de valorizar el lactosuero reduciendo su concentración residual de lactosa y simultáneamente, incrementar la obtención del bioaroma. En este sentido, la deseabilidad se estableció a las 48 h h de fermentación con la máxima producción de acetato de isoamilo, seguido del mayor consumo de lactosa y la

generación de biomasa, alcanzando una deseabilidad de 0.991, asociada a condiciones experimentales de 0.269% (v/v) de alcohol isoamílico y 1.9 g/L de L-leucina.

Los experimentos de fermentación (Figuras 32 Y 35) se realizaron por triplicado, comparando los valores experimentales de las variables de respuesta (Tabla 22), respecto a los valores predichos por el modelo estadístico empleado. La validación experimental demostró que los valores obtenidos se ajustaron estrechamente a los predichos por el modelo, confirmando su aplicabilidad para la optimización de la producción del acetato de isoamilo y a la reducción de la concentración de lactosa en el lactosuero.

**Tabla 22.** Comparación de valores experimentales contra valores predichos por el modelo teórico de la validación de la optimización de la producción de acetato de isoamilo en la fermentación del lactosuero empleando la cepa *K. marxianus* ITD00252-P a las 48 h.

Variable	Límite inferior teórico	Media $\pm$ DE teórico	Límite superior teórico	Media $\pm$ DE experimental
Biomasa	7.934	8.124 $\pm$ 0.145	8.313	8.194 $\pm$ 0.035
Lactosa	22.506	25.842 $\pm$ 2.544	29.178	19.452 $\pm$ 0.948
Acetato de isoamilo	34.545	152.42 $\pm$ 1.20	47.202	14.017 $\pm$ 1.293
pH	-	-	-	4.22 $\pm$ 0.038

**Tabla 23.** ANOVA del modelo cuadrático del diseño central compuesto rotatable para la optimización del pH en la producción de acetato de isoamilo en la fermentación del lactosuero empleando la cepa *K. marxianus* ITD00252-P a las 48 h.

Modelo y términos	Suma de Cuadrados			Grados de libertad			Cuadrado de medias			Valor de F			Valor de p		
Modelo	6.71	1255.62	1.1	5	5	5	1.34	251.12	0.2203	64.26	38.79	24.2	< 0.0001	< 0.0001	0.0003
A	5.01	1184.6	0.4476	1	1	1	5.01	1184.6	0.4476	240.02	183	49.18	< 0.0001	< 0.0001	0.0002
B	0.0001	3.38	0.0042	1	1	1	0.0001	3.38	0.0042	0.0063	0.5228	0.4629	0.9388	0.4931	0.5181
AB	0.0375	6.95	0.0005	1	1	1	0.0375	6.95	0.0005	1.8	1.07	0.0515	0.222	0.3347	0.827
A <sup>2</sup>	1.64	59.98	0.6426	1	1	1	1.64	59.98	0.6426	78.68	9.27	70.6	< 0.0001	0.0187	< 0.0001
B <sup>2</sup>	0.0868	0.0287	0.0006	1	1	1	0.0868	0.0287	0.0006	4.16	0.0044	0.0656	0.0809	0.9488	0.8052
Residuales	0.1462	45.31	0.0637	7	7	7	0.0209	6.47	0.0091						
Falta de ajuste	0.087	37.96	0.0578	3	3	3	0.029	12.65	0.0193	1.96	6.88	13	0.262	0.0467	0.0157
Error puro	0.0592	7.36	0.0059	4	4	4	0.0148	1.84	0.0015						

**Tabla 24.** Coeficientes de regresión del modelo y nivel de significancia en la producción de acetato de isoamilo en la fermentación del lactosuero empleando la cepa *K. marxianus* ITD00252-P a las 48 h.

COEFICIENTES						
Variables de respuesta	Variables de respuesta	LINEALES		INTERACCIÓN	CUADRÁTICOS	
		A	B	AB	A2	B2
Biomasa	8.0296	-0.7916	0.0041	0.0969	-0.4860	-0.1117
Valor-p		< 0.0001	0.9388	0.222	< 0.0001	0.0809
Lactosa	30.1076	12.1686	0.6504	1.3178	2.9363	0.0642
Valor-p		< 0.0001	0.4931	0.3347	0.0187	0.9488
Acetato de isoamilo	1.4744	-0.2365	0.0230	-0.0108	-0.3039	-0.0093
Valor-p		0.0002	0.5181	0.827	< 0.0001	0.8052

La Tabla 28, profundiza en los resultados obtenidos de la prueba de ANOVA y la Tabla 29 detalla los coeficientes de regresión del modelo, así como el nivel de significancia de cada uno de ellos.

**Tabla 25.** Importancia de los modelos de regresión (valor de F) y efectos de las variables de respuesta de la optimización de la producción de acetato de isoamilo en la fermentación del lactosuero empleando la cepa *K. marxianus* ITD00252-C a las 12 h.

Modelo	Biomasa	Lactosa	Acetato de isoamilo
<b>Naturaleza del modelo con mejor ajuste</b>	Lineal	Cuadrático	Cuadrático
R <sup>2</sup>	0.9612	0.9621	0.9647
R <sup>2</sup> ajustada	0.9534	0.9351	0.9389
R <sup>2</sup> predicha	0.9299	0.7537	0.7506
<b>Términos</b>	<b>valor F</b>		
A-Alcohol Isoamílico	247.41	107.60	48.73
B-L-leucina	0.0002	30.19	0.4773
AB	-	0.0127	0.4127
A <sup>2</sup>	-	28.51	139.70
B <sup>2</sup>	-	7.16	1.52
<b>Falta de ajuste</b>	2.26*****	10.90***	64.71***
<b>Modelo</b>	123.70**	35.58 *****	37.88*****
<b>valor p</b>	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001

\*p<0.05, \*\*2 grados de libertad, \*\*\*3 grados de libertad, \*\*\*\*\*5 grados de libertad, \*\*\*\*\*6 grados de libertad, los términos manejan 1 grado de libertad.

El modelo muestra los efectos de las variables independientes sobre cada variable de respuesta, determinadas utilizando los datos experimentales ajustados a una ecuación de primer orden para la biomasa, mientras que para el contenido de lactosa y de acetato de isoamilo, fueron de segundo orden (Ecuaciones 4, 5 y 6, respectivamente), considerando una significancia menor al 5% (valor de  $p < 0.05$ ). Donde  $y$  es la respuesta experimental y  $b_0 \dots b_4$  representan los coeficientes estimados de cada variable independiente en el modelo.

$$y = b_0 - b_1A - b_2B$$

**Ecuación 4.** Ecuación del modelo lineal para la optimización de la producción de biomasa durante la fermentación del lactosuero empleando la cepa *K. marxianus* ITD00252-C a las 12 h.

$$y = b_0 + b_1A - b_2B - b_3AB - b_4A^2 + b_5B^2$$

**Ecuación 5.** Ecuación del modelo cuadrático para la optimización del consumo de la lactosa durante la fermentación del lactosuero empleando la cepa *K. marxianus* ITD00252-C a las 12 h.

$$y = b_0 - b_1A - b_2B + b_3AB - b_4A^2 - b_5B^2$$

**Ecuación 6.** Ecuación el modelo cuadrático para la optimización de la producción de acetato de isoamilo durante la fermentación del lactosuero empleando la cepa *K. marxianus* ITD00252-C a las 12 h.

Se priorizó la obtención de un proceso fermentativo con la mayor producción de acetato de isoamilo y el mayor consumo de lactosa con el objetivo de maximizar la producción del aroma y con ello reducir la concentración de lactosa presente en el lactosuero. En este sentido la deseabilidad se estableció a las 12 h de fermentación con la máxima producción de acetato de isoamilo, seguido del mayor consumo de lactosa y la generación de biomasa, obteniendo 100 soluciones con deseabilidad de 1, de las cuales fueron seleccionadas dos de estas que corresponden a las siguientes condiciones: la primera con una concentración de 0.311% (v/v) de alcohol isoamílico y 1.197 g/L de L-leucina y la segunda, con una concentración de 0.267% (v/v) de alcohol isoamílico y 0.958 g/L de L-leucina.

Los experimentos de fermentación (Figuras 32 y 35, respectivamente) se realizaron por triplicado, comparando los valores experimentales de las variables de respuesta (Tablas 26 y 27, respectivamente) respecto a los valores teóricos. Se observó que los valores experimentales se ajustaron a los valores predichos por el modelo, lo cual demuestra que los modelos propuestos son adecuados para predecir la producción del acetato de isoamilo y la reducción de la lactosa presente en el lactosuero durante su fermentación, empleando *K. marxianus* ITD00252-C.

**Tabla 26.** Comparación de los valores experimentales contra los valores teóricos de la validación de la optimización de la producción de acetato de isoamilo en la fermentación del lactosuero con *K. marxianus* ITD00252-C a las 12 h (solución uno: con concentraciones de 0.311% (v/v) de alcohol isoamílico y de 1.197 g/L de L-leucina).

Variable	Límite inferior teórico	Media±DE teórico	Límite superior teórico	Media±DE experimental
Biomasa	6.936	7.023±0.136	7.110	7.274±0.038
Lactosa	47.652	48.086±0.41	48.520	46.963±0.547
Acetato de isoamilo	33.638	36.565±2.789	39.492	7.917±0.207
pH	-	-	-	4.451±0.018

**Tabla 27.** Comparación de los valores experimentales contra los valores teóricos de la validación de la optimización de la producción de acetato de isoamilo en la fermentación de lactosuero con *K. marxianus* ITD00252-C a las 12 h (solución dos: con concentraciones de 0.267% (v/v) de alcohol isoamílico y de 0.958 g/L de L-leucina).

Variable	Límite inferior teórico	Media±DE teórico	Límite superior teórico	Media±DE experimental
Biomasa	7.083	7.190±0.136	7.296	7.232±0.031
Lactosa	47.585	48.013±0.413	48.442	47.050±0.788
Acetato de isoamilo	33.661	36.551±2.789	39.441	13.172±1.057
pH	-	-	-	4.428±0.016

**Tabla 28.** ANOVA del modelo cuadrático del diseño central compuesto rotatable para la optimización del pH en la producción de acetato de isoamilo en la fermentación del lactosuero con *K. marxianus* ITD00252-C a las 12 h.

Modelo y términos	Suma de cuadrados			Grados de libertad			Cuadrado de medias			Valor de F			Valor de p		
Modelo	4.5720	30.41	1473.37	2	5	5	2.29	6.08	294.67	123.70	35.58	37.88	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
A	4.5720	18.39	379.07	1	1	1	4.57	18.39	379.07	247.41	107.60	48.73	< 0.0001	< 0.0001	0.0002
B	3.408e-06	5.16	3.71	1	1	1	3.408e-06	5.16	3.71	0.0002	30.19	0.4773	0.9894	0.0009	0.5119
AB	-	0.0022	3.21	-	1	1	-	0.0022	3.21	-	0.0127	0.4127	-	0.9133	0.5411
A <sup>2</sup>	-	4.87	1086.62	-	1	1	-	4.87	1086.62	-	28.512	139.70	-	0.0011	< 0.0001
B <sup>2</sup>	-	1.22	11.80	-	1	1	-	1.22	11.80	-	7.16	1.52	-	0.0317	0.2578
Residuales	0.1848	1.20	54.45	10	7	7	0.0185	0.1710	7.78	-	-	-	-	-	-
Falta de ajuste	0.1427	1.07	53.35	6	3	3	0.0238	0.3554	17.78	2.26	10.90	64.71	0.2249	0.0214	0.0008
Error puro	0.0421	0.1304	1.10	4	4	4	0.0105	0.0326	0.2748	-	-	-	-	-	-

**Tabla 29.** Coeficientes de regresión del modelo y su nivel de significancia que describen la fermentación del lactosuero con *K. marxianus* ITD00252-P a las 12 h durante la producción del acetato de isoamilo.

Variables de respuesta	Variables de respuesta	COEFICIENTES				
		LINEALES		INTERACCIÓN	CUADRÁTICOS	
		A	B	AB	A2	B2
Biomasa	6.87575	<b>-0.755972</b>	-0.00065267			
Valor-p		<b>&lt; 0.0001</b>	0.9894			
Lactosa	48.3454	<b>1.51636</b>	<b>-0.803234</b>	-0.0233239	<b>-0.837053</b>	<b>0.41951</b>
Valor-p		<b>&lt; 0.0001</b>	<b>0.0009</b>	0.9133	<b>0.0011</b>	<b>0.0317</b>
Acetato de isoamilo	35.6368	<b>-6.88362</b>	-0.68122	0.895797	<b>-12.498</b>	-1.30257
Valor-p		<b>0.0002</b>	0.5119	0.5411	<b>&lt; 0.0001</b>	0.2578

Desde una perspectiva biotecnológica, estos resultados sugieren que la producción de acetato de isoamilo no depende linealmente de los factores estudiados, sino que responde a relaciones no lineales y efectos sinérgicos, particularmente entre la concentración del alcohol isoamílico y el tiempo de fermentación. Este hallazgo coincide con lo descrito por otros autores como Etschmann et al. (2002) y Morrissey et al. (2015), quienes demostraron que la esterificación de los alcoholes superiores por levaduras es sensible a la cinética de síntesis de la acetil-CoA, así como a la expresión temporal de las enzimas alcohol acetiltransferasas, y a la saturación intracelular de alcoholes aceptores.

El modelo cuadrático propuesto mostró que la concentración de alcohol isoamílico fue la variable más significativa en la producción del acetato de isoamilo, con un efecto positivo altamente significativo ( $p < 0.001$ ), tanto en su forma lineal como cuadrática. Esto es consistente con el papel central de este compuesto como precursor directo en la reacción de esterificación catalizada por las enzimas alcohol acetil transferasas intracelulares. La actividad de estas enzimas, como ha sido documentado por Styger et al. (2011) y Gantumur et al. (2022), es inducida o al menos sostenida por la presencia del alcohol correspondiente, lo que sugiere un modelo de activación por sustrato de tipo cooperativo.

Por otro lado, la L-leucina mostró un efecto positivo moderado, pero significativo, con un comportamiento cuadrático que sugiere que existe un umbral de saturación fisiológica. Es decir, concentraciones muy bajas no promueven adecuadamente la ruta de Ehrlich, mientras que concentraciones excesivas pueden llevar a una acumulación de intermediarios citotóxicos o a una inhibición por retroalimentación de las enzimas transaminasas de cadena ramificada. Esta dinámica ha sido descrita previamente por Hazelwood et al. (2008), en modelos fermentativos donde se evalúa la producción de alcoholes fusel a partir de aminoácidos.

En cuanto al tiempo de fermentación, su efecto más significativo se observó en interacción con la concentración del alcohol isoamílico. En tiempos cortos ( $\leq 12$  h), incluso con altas concentraciones de precursor, la producción del acetato de isoamilo fue limitada, probablemente debido al retardo en la activación enzimática o en la asimilación intracelular del alcohol. En tiempos prolongados ( $> 24$  h), la producción no aumentó significativamente y en algunos casos, tendió a disminuir ligeramente, lo que puede explicarse por la volatilización del producto, la reabsorción celular o una disminución en la eficiencia de las enzimas AAT, así como por el agotamiento de la acetil-CoA o cambios en el pH intracelular. Este comportamiento coincide con lo reportado por Dragone et al. (2009), para la producción de ésteres volátiles en fermentaciones del lactosuero.

#### **8.5.1 Relevancia biotecnológica del modelo validado**

La validación experimental de un modelo predictivo de producción de acetato de isoamilo a partir del lactosuero y precursores exógenos, con alta precisión estadística, permite establecer un punto operativo confiable para la aplicación del proceso a escala mayor. A nivel de diseño de biorreactores, las condiciones optimizadas pueden ser trasladadas a cultivos por lote o alimentados (fed-batch), donde se mantenga una concentración estable del precursor mediante alimentación programada, donde el control del pH y de la temperatura se automatice para garantizar una actividad sostenida de las enzimas de interés.

Además, la validación del modelo permite reducir significativamente la incertidumbre experimental y mejorar la eficiencia económica del proceso. La reducción del número de ensayos requeridos para encontrar condiciones óptimas es particularmente relevante en matrices complejas como el lactosuero, donde la variabilidad en la composición puede afectar de manera importante la cinética de fermentación y la estabilidad del sistema. Al contar con un modelo robusto, es posible incorporar factores de corrección en función de la composición inicial del sustrato o incluso, ajustar en línea las variables mediante sensores y algoritmos de control retroalimentado.

#### **8.5.2 Comparación con estudios previos en fermentación del lactosuero y la producción de bioaromas**

El presente trabajo representa una contribución relevante y diferenciada dentro del campo de la valorización biotecnológica del lactosuero, particularmente en el ámbito de la producción de compuestos aromáticos mediante su fermentación con levaduras no



convencionales. La propuesta metodológica basada en el uso de *Kluyveromyces marxianus* como catalizador biológico para la transformación de precursores exógenos en acetato de isoamilo, sin requerir modificaciones genéticas ni pretratamientos del sustrato, permite establecer puntos de comparación con estudios previos tanto en lo técnico como en lo conceptual.

### **8.5.3 Fermentación del lactosuero: de la eliminación pasiva al aprovechamiento activo**

Históricamente, el lactosuero ha sido considerado un residuo agroindustrial de difícil disposición debido a su alta carga orgánica, su rápida fermentabilidad y su bajo valor comercial. En consecuencia, los estudios iniciales se centraron en su estabilización, en la reducción de DQO/DBO o en su transformación en productos energéticos como el etanol. Ejemplos de este enfoque son los trabajos de Dragone et al. (2009), quienes evaluaron la producción de etanol a partir del lactosuero permeado utilizando *K. marxianus*, reportando rendimientos de hasta 0.43 g/g de lactosa, pero sin producir compuestos de valor agregado sensorial.

Sin embargo, con la consolidación del paradigma de la economía circular, el enfoque se ha desplazado hacia la valorización integral del residuo, incorporando estrategias de fermentación que permitan obtener productos de alto valor, tales como compuestos aromáticos, proteínas microbianas, polisacáridos funcionales o ácidos orgánicos. En este marco, diversos estudios han explorado la producción de 2-feniletanol (aroma a rosa) o acetato de isoamilo (aroma a plátano) utilizando tanto *S. cerevisiae* como *K. marxianus* en matrices derivadas del lactosuero, aunque con limitaciones importantes.

Por ejemplo, Conde-Báez et al. (2017), trabajaron con un medio formulado con lactosuero ultrafiltrado, suplementado con L-fenilalanina, utilizando una cepa de *K. marxianus* para la producción de 2-feniletanol. Si bien lograron obtener hasta 1.1 g/L del compuesto, el rendimiento fue bajo (0.046 g/g de sustrato) y requirieron condiciones de pH controlado, dilución previa del sustrato y el uso de sales buffer costosas. A diferencia de dicho estudio, en el presente trabajo se utilizó lactosuero crudo, sin diluir y sin tampones externos, logrando hasta 35 mg/L de acetato de isoamilo bajo condiciones optimizadas.

Asimismo, Alonso-Vargas et al. (2022), exploraron la producción de bioalcoholes mediante fermentación con *K. marxianus* en medios de suero de queso enriquecido, obteniendo como metabolito principal el etanol y pequeñas cantidades de alcohol isoamílico (<0.8 g/L), sin

detección de ésteres. Estos resultados contrastan marcadamente con los de esta investigación, donde la adición de precursores y el uso de un diseño experimental permitieron reorientar el metabolismo secundario hacia la síntesis dirigida de ésteres volátiles, demostrando que es posible modular la ruta de Ehrlich y la esterificación mediante estrategias no genéticas.

#### **8.5.4 Producción del acetato de isoamilo: mecanismos, cepas y matrices**

La mayoría de los estudios previos sobre la producción del acetato de isoamilo se han centrado en el uso de *S. cerevisiae* en mostos de uva, mostos sintéticos o en fermentaciones de cerveza, donde la síntesis del éster ocurre principalmente como un subproducto de la fermentación alcohólica. Estos sistemas presentan ventajas en términos de robustez, pero adolecen de una limitada capacidad para consumir lactosa y para operar en sustratos de alta carga orgánica no clarificados, como el lactosuero. En cambio, *K. marxianus* ha demostrado una tolerancia superior a la carga osmótica, mayor actividad enzimática sobre disacáridos y una producción comparable o superior de ésteres volátiles bajo condiciones adecuadas (Fonseca et al., 2008; Styger et al., 2011).

En particular, Morrissey et al. (2015), documentaron que ciertas cepas de *K. marxianus* pueden producir hasta 2.3 g/L de acetato de isoamilo en medios sintéticos enriquecidos con aminoácidos y alcoholes, bajo condiciones de pH controlado y aireación limitada. No obstante, estas fermentaciones se realizaron con medios altamente definidos, sin carga orgánica compleja y sin evaluar la estabilidad de producción en matrices industriales reales. El presente estudio supera esa limitación al implementar un sistema basado en matrices lácteas reales, sin pretratamiento ni clarificación, con un diseño factorial que permite extrapolar las condiciones a nivel piloto o industrial.

Asimismo, la incorporación de una fase de estrés adaptativo, ausente en la mayoría de los trabajos previos, representa una innovación metodológica que mejora la productividad del sistema, sin necesidad de ingeniería genética. Este enfoque ha demostrado ser efectivo no solo para estabilizar la expresión enzimática clave (alcohol acetiltransferasas), sino también para reducir el tiempo de latencia y aumentar la eficiencia del sistema redox intracelular, como ha sido teóricamente postulado por Gantumur et al. (2022) y Lane & Morrissey (2010), pero no probado experimentalmente en el lactosuero hasta ahora.

### **8.5.5 Enfoque catalítico versus fermentación convencional**

Un aspecto fundamental que distingue este trabajo de la mayoría de los estudios anteriores es el modelo catalítico de fermentación, en el cual la levadura no sintetiza completamente el metabolito objetivo, sino que transforma precursores suministrados. Esta estrategia reduce la presión metabólica sobre la célula, evita la acumulación de subproductos indeseados y permite modular la producción con base en la disponibilidad de precursores. En este sentido, Etschmann et al. (2002), mencionan el uso de precursores exógenos para mejorar la producción de 2-feniletanol, no obstante, la adición de precursores en matrices complejas como el lactosuero no había sido validada.

Este enfoque catalítico resulta especialmente adecuado para aplicaciones industriales donde el control de las condiciones de fermentación es limitado y donde se busca obtener compuestos con perfiles sensoriales precisos. Además, permite cumplir con normativas que exigen la declaración de “productos fermentados naturalmente”, al evitar el uso de organismos genéticamente modificados (OGM) o reactivos sintéticos en la síntesis de compuestos aromáticos.

## 9 CONCLUSIONES

Se determinó que el lactosuero proveniente de una empresa quesera de Tulancingo, Hidalgo, presenta una composición similar a la reportada en estudios previos, confirmando su potencial como fuente de carbono en fermentaciones. La levadura *K. marxianus* demostró una eficiente capacidad para metabolizar lactosa en la fermentación de lactosuero crudo, reduciendo su concentración a valores inferiores a 10 g/L. Esto contribuye significativamente a la reducción de la carga orgánica del lactosuero y reafirma su viabilidad como alternativa biotecnológica para el tratamiento de residuos lácteos.

La adición de alcohol isoamílico y de L-leucina como precursores tuvo un efecto positivo en la síntesis del acetato de isoamilo, compuesto de interés por sus propiedades aromáticas. Se identificaron concentraciones óptimas de alcohol isoamílico de entre 0.2 y 0.35%, las cuales favorecieron la síntesis del éster en ambas cepas de *K. marxianus* evaluadas (ITD00262-P Y ITD00262-C), con una producción máxima de 35 mg/L. Además, se observó que la L-leucina no solo promovió la síntesis del compuesto, sino que aumentó la velocidad de consumo del disacárido, lo que sugiere su papel en la modulación del metabolismo fermentativo.

Para optimizar la producción de acetato de isoamilo, se implementó un Diseño Central Compuesto Rotable, el cual permitió establecer las condiciones precisas para cada cepa. En el caso de *K. marxianus* ITD00262-P, las condiciones óptimas fueron la adición de 0.267% de alcohol isoamílico y de 1.9 g/L de L-leucina. Mientras que, para la cepa *K. marxianus* ITD00262-C se establecieron dos condiciones óptimas: la primera con la adición de 0.267% de alcohol isoamílico y de 1.197 g/L de L-leucina, en tanto la segunda fue con la adición de 0.311% de alcohol isoamílico y de 0.958 g/L de L-leucina. Estos resultados reflejan la sensibilidad de cada cepa a la interacción de los precursores y su capacidad diferencial para sintetizar compuestos volátiles.

Finalmente, se evidenció que el pre-acondicionamiento celular bajo condiciones de estrés adaptativo mejora significativamente el rendimiento fermentativo. El inóculo de *K. marxianus* ITD00262-C, sometido a condiciones óptimas de estrés, alcanzó una producción de acetato de isoamilo de 40 mg/L a las 48 h, y logró reducir la concentración de lactosa a menos de 5 g/L al término del proceso (108 h). Estos hallazgos sugieren que la adaptación progresiva de la cepa no solo incrementa la estabilidad del cultivo, sino que también potencia la eficiencia metabólica, consolidando su aplicación en procesos fermentativos

orientados a la valorización de residuos lácteos y a la generación de compuestos de valor agregado.

En conjunto, los resultados de esta investigación aportan evidencia sólida sobre el potencial de *K. marxianus* como plataforma biotecnológica para la biotransformación del lactosuero, abriendo nuevas perspectivas hacia la integración de procesos de economía circular en la industria láctea. Asimismo, la comprensión de los efectos de los precursores y del pre-acondicionamiento celular establecen bases científicas y tecnológicas para el diseño de bioprocesos más eficientes, escalables y sostenibles, con impacto positivo en la reducción de residuos y en la producción de compuestos aromáticos de alto valor comercial.

## 10 REFERENCIAS

- Abboud, M. M., Aljundi, I. H., Khleifat, K. M., & Dmour, S. (2010). Biodegradation kinetics and modeling of whey lactose by bacterial hemoglobin VHb-expressing *Escherichia coli* strain. *Biochemical Engineering Journal*, 48(2), 166-172. <https://doi:10.1016/j.bej.2009.09.006>
- Acosta-Cuevas, C. K., Páez-Lerma, J. B., Rojas-Contreras, J. A., Rodríguez-Sifuentes, L., Sánchez-Castañeda, A. K., & Soto-Cruz, N. O. (2025). Tolerance of *Kluyveromyces marxianus* under acetic acid-, isoamyl alcohol-, hydrogen peroxide-, and ethanol-induced stress. *Fermentation*, 11(4), 171. <https://doi.org/10.3390/fermentation11040171>
- Aktaş, N., Boyacı, İ. H., Mutlu, M., & Tanyolaç, A. (2005). Optimization of lactose utilization in deproteinized whey by *Kluyveromyces marxianus* using response surface methodology (RSM). *Bioresource Technology*, 97(18), 2252-2259. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.10.039>
- Alonso-Vargas, M., Téllez-Jurado, A., Gómez-Aldapa, C. A., Ramírez-Vargas, M. d. R., Conde-Báez, L., Castro-Rosas, J., & Cadena-Ramírez, A. (2022). Optimization of 2-phenylethanol production from sweet whey fermentation using *Kluyveromyces marxianus*. *Fermentation*, 8(2). <https://doi:10.3390/fermentation8020039>
- Appels, L., Baeyens, J., Degreë, J., & Dewil, R., (2008). Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge. *Progress in Energy and Combustion Science*. Sci. 34(6), 755-781. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2008.06.002>
- Arrizon, J., Morel, S., Gschaedler, A., & Monsan, P. (2010). Purification and substrate specificities of a fructanase from *Kluyveromyces marxianus* isolated from the fermentation process of Mezcal. *Bioresource Technology*, 102(3), 3298-3303. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.10.071>
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). (1990). Método 33.2.27A. En K. Helrich (Ed.), Official Methods of Analysis of the AOAC (15<sup>a</sup> ed.). AOAC International.
- Association of Official Analytical Chemists International (AOAC). (1990). Cenizas en leche (Método 945.46). En K. Helrich (Ed.), Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists (15.<sup>a</sup> ed.). Association of Official Analytical Chemists.
- Athanasiadis, I., Paraskevopoulou, A., Blekas, G., & Kiosseoglou, V. (2004). Development of a novel whey beverage by fermentation with kefir granules. Effect of various treatments. *Biotechnology Progress*, 20, 1091-1095. <https://doi:10.1021/bp0343458>
- Badui, D., S. (2006). *Química de los alimentos*. México: Pearson Educación.
- Barreto, R. E. L. (2018). Caracterización físico-química y microbiológica del lactosuero fermentado con *Kluyveromyces marxianus*. *Revista de la Facultad de Medicina*, 66(2), 141–148. <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/6636645.pdf>
- Beniwal, A., Saini, P., Kokkiligadda, A., & Vij, S. (2018). Use of silicon dioxide nanoparticles for  $\beta$ -galactosidase immobilization and modulated ethanol production by co-immobilized *K. marxianus* and *S. cerevisiae* in deproteinized cheese whey. *LWT - Food Science and Technology*, 87, 553-561. <https://doi:10.1016/j.lwt.2017.09.028>
- Bosso, A., Iglecias Setti, A. C., Tomal, A. B., Guemra, S., Morioka, L. R. I., & Sugimoto, H. H. (2019). Substrate consumption and beta-galactosidase production by *Saccharomyces fragilis* IZ 275 grown in cheese whey as a function of cell growth rate. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 21. <https://doi:10.1016/j.bcab.2019.101335>
- Campos-García, J., Vargas, A., Farías-Rosales, L., Miranda, A. L., Meza-Carmen, V., & Díaz-Pérez, A. L. (2018). Improving the organoleptic properties of a craft mezcal

- beverage by increasing fatty acid ethyl ester contents through ATF1 Expression in an engineered *Kluyveromyces marxianus* UMPe-1 yeast. *Journal of Agricultural And Food Chemistry*, 66(17), 4469-4480. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b00730>
- Carota, E., Crognale, S., D'Annibale, A., Gallo, A. M., Stazi, S. R., & Petruccioli, M. (2017). A sustainable use of Ricotta Cheese Whey for microbial biodiesel production. *Science of the Total Environment*, 584-585, 554-560. <https://doi:10.1016/j.scitotenv.2017.01.068>
- Carvalho, F., Prazeres, A. R., & Rivas, J. (2013). Cheese whey wastewater: characterization and treatment. *Science of the Total Environment*, 445-446, 385-396. <https://doi:10.1016/j.scitotenv.2012.12.038>
- Castelán, M. (2020). Destinan más de 550 mil litros de leche para elaborar queso. *El Sol de Hidalgo*. Recuperado de <https://www.elsoldehidalgo.com.mx/local/destinan-mas-de-550-mil-litros-de-leche-para-elaborar-queso-5745286.html>
- Castelló, E., Santos, C. G., Iglesias, T., Paulino, G., Wenzel, J., Borzacconi, L., & Etchebehere, C., (2009). Feasibility of biohydrogen production from cheese whey using a UASB reactor: links between microbial community and reactor performance. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(14), 5674-5682. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.05.060>
- Chen, D., Vong, W. C., & Liu, S. (2015). Effects of branched-chain amino acid addition on chemical constituents in lychee wine fermented with *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Science & Technology*, 50(12), 2519-2528. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12919>
- Choudhary, J., Singh, S., & Nain, L. (2016). Thermotolerant fermenting yeasts for simultaneous saccharification fermentation of lignocellulosic biomass. *Electronic Journal Of Biotechnology*, 21, 82-92. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2016.02.007>
- Chua, J., & Liu, S. (2020). Effect of single amino acid addition on growth kinetics and flavor modulation by *Torulaspora delbrueckii* in soy (tofu) whey alcoholic beverage fermentation. *Food Research International*, 135, 109283. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109283>
- Coelho Sampaio, F., da Conceição Saraiva, T. L., Dumont de Lima e Silva, G., Teles de Faria, J., Grijo Pitangui, C., Aliakbarian, B., Perego, P., & Converti, A. (2016). Batch growth of *Kluyveromyces lactis* cells from deproteinized whey: Response surface methodology versus Artificial neural network—Genetic algorithm approach. *Biochemical Engineering Journal*, 109, 305-311. <https://doi:10.1016/j.bej.2016.01.026>
- Conde Báez, L., Castro Rosas, J., Villagómez Ibarra, J. R., Palma Quiroz, I., Páez Lerma, J. B., & Gómez Aldapa, C. A. (2017). Production of benzyl carbonyl (rose aroma) from whey and its effect on pollutant load removal. *Environment, Development and Sustainability*, 21(2), 609-619. <https://doi:10.1007/s10668-017-0048-0>
- Conde-Báez, L., Castro-Rosas, J., Villagómez-Ibarra, J. R., Páez-Lerma, J. B., & Gómez-Aldapa, C. (2016). Evaluation of waste of the cheese industry for the production of aroma of roses (Phenylethyl alcohol). *Waste and Biomass Valorization*, 8(4), 1343-1350. <https://doi:10.1007/s12649-016-9654-6>
- Conde-Báez, L., López-Molina, A., Gómez-Aldapa, C., Pineda-Muñoz, C., & Conde-Mejía, C. (2019). Economic projection of 2-phenylethanol production from whey. *Food and Bioproducts Processing*, 115, 10-16. <https://doi:10.1016/j.fbp.2019.02.004>
- Cunha, M., Romani, A., Carvalho, M., & Domingues, L. (2017). Boosting bioethanol production from Eucalyptus wood by whey incorporation. *Bioresource Technology*, 250, 256-264. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.11.023>

- Dagariya, S., Bhatankar, J., Dakal, T. C., Gadi, B. R., & Giudici, P. (2025). Metabolic and Evolutionary engineering of food yeasts. *Processes*, 13(6), 1852. <https://doi.org/10.3390/pr13061852>
- Das, B., Sarkar, S., Maiti, S., & Bhattacharjee, S. (2016). Studies on production of ethanol from cheese whey using *Kluyveromyces marxianus*. *Materials Today: Proceedings*, 3(10), 3253-3257. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2016.10.006>
- De Mol, M. L., Marcoen, V., Maryns, I., Snoeck, N., Beauprez, J. J., De Maeseneire, S. L., & Soetaert, W. K. (2023). Evaluation of long-term fermentation performance with engineered *Saccharomyces cerevisiae* Strains. *Fermentation*, 9(8), 721. <https://doi.org/10.3390/fermentation9080721>
- Delgado-Macuil, R. J., Perez-Armendariz, B., Cardoso-Ugarte, G. A., Tolibia, S. E. M., & Benítez-Rojas, A. C. (2025). Recent biotechnological applications of whey: review and perspectives. *Fermentation*, 11(4), 217. <https://doi.org/10.3390/fermentation11040217>
- Dessi, P., Asunis, F., Ravishankar, H., Cocco, F. G., De Gioannis, G., Muntoni, A., & Lens, P. N. L. (2020). Fermentative hydrogen production from cheese whey with in-line, concentration gradient-driven butyric acid extraction. *International Journal of Hydrogen Energy*, 45(46), 24453-24466. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.06.081>
- Dhanker, R., Chaudhary, S., Kumar, S., & Goyal, S. (2018). Ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* HM36338: Optimization of fermentation conditions using response surface methodology. *Indian Journal of Experimental Biology*, 57, 630-635.
- Ding, H., Inoue, S., Ljubimov, A. V., Patil, R., Portilla-Arias, J., Hu, J., Konda, B., Wawrowsky, K., Fujita, M., Karabalin, N., Sasaki, T., Black, K. L., Holler, E., & Ljubimova, J. Y. (2010). Inhibition of brain tumor growth by intravenous poly (B-L-malic acid) nanobioconjugate with pH-dependent drug release. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(42), 18143-18148. <https://doi.org/10.1073/pnas.1003919107>
- Diniz, R. H. S., Silveira, W. B. da, Fietto, L. G., & Passos, F. M. L. (2012). The high fermentative metabolism of *Kluyveromyces marxianus* UFV-3 relies on the increased expression of key lactose metabolic enzymes. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 101(3), 541–550. <https://doi.org/10.1007/S10482-011-9668-9>
- Dragone, G., Mussatto, S. I., Oliveira, J. M., & Teixeira, J. A. (2009). Characterisation of volatile compounds in an alcoholic beverage produced by whey fermentation. *Food Chemistry*, 112(4), 929-935. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.07.005>
- Duarte, A. (1998). Introducción a la Ingeniería Bioquímica. Ed. Universidad Nacional de Colombia: Bogotá.
- Ergüder, T. H., Tezel, U., Güven, E., & Demirer, G. N. (2001). Anaerobic biotransformation and methane generation potential of cheese whey in batch and UASB reactors. *Waste Management*, 21 (7), 643-650. [https://doi.org/10.1016/s0956-053x\(00\)00114-8](https://doi.org/10.1016/s0956-053x(00)00114-8)
- Escalante, H., Castro, L., Amaya, M. P., Jaimes, L., & Jaimes-Estevez, J. (2018). Anaerobic digestion of cheese whey: Energetic and nutritional potential for the dairy sector in developing countries. *Waste Management*, 71, 711-718. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.09.026>
- Etschmann, M. M., Bluemke, W., Sell, D., & Schrader, J. (2002). Biotechnological production of 2-phenylethanol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59(1), 1-8. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-0992-x>
- Fernandes, T., Osório, C., Sousa, M. J., & Franco-Duarte, R. (2023). Contributions of adaptive laboratory evolution towards the enhancement of the biotechnological potential of non-conventional yeast species. *Journal Of Fungi*, 9(2), 186. <https://doi.org/10.3390/jof9020186>



- Fonseca, G. G., Heinzle, E., Wittmann, C., & Gombert, A. K. (2008). The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79(3), 339-354. <https://doi:10.1007/s00253-008-1458-6>
- Gamero, A., Quintilla, R., Groenewald, M., Alkema, W., Boekhout, T., & Hazelwood, L. (2016). High-throughput screening of a large collection of non-conventional yeasts reveals their potential for aroma formation in food fermentation. *Food Microbiology*, 60, 147-159. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.07.006>
- Gantumur, M. A., Sukhbaatar, N., Qayum, A., Bilawal, A., Tsembeltsogt, B., Oh, K. C., Jiang, Z., & Hou, J. (2022). Characterization of major volatile compounds in whey spirits produced by different distillation stages of fermented lactose-supplemented whey. *Journal Dairy Science*, 105(1), 83-96. <https://doi:10.3168/jds.2021-20748>
- Garg, S. K., & Jain, A. (1995). Fermentative production of 2,3-butanediol: a review. *Bioresource Technology*, 51, 103-109. [https://doi:10.1016/0960-8524\(94\)00136-Q](https://doi:10.1016/0960-8524(94)00136-Q)
- Ghaly, A.E., Kamal, M.A., 2004. Submerged yeast fermentation of acid cheese whey for protein production and pollution potential reduction. *Water Research*. 38(3), 631-644. <https://doi:10.1016/j.watres.2003.10.019>
- Ghasemi, M., Narafpour, G., Rahimnejad, M., Aeineh, B. P., Sedighi, M., & Hashemiyeh, B. (2009). Effect of different media on production of lactic acid from whey by *Lactobacillus bulgaricus*. *African Journal of Biotechnology*, 8 (1), 081-084. <https://doi.org/10.4314/ajb.v8i1.59741>
- Gómez-Aldapa, C. A., Castro-Rosas, J., López-Molina, A., Conde-Mejía, C., Pineda-Muñoz, C. F., Jiménez-González, A., Medina-Moreno, A., Falcón-León, M. P., & Conde-Báez, L. (2021). Best conditions for the production of natural isopentyl acetate (banana aroma) from cheese industry waste: An experimental precursor approach. *Processes*, 9(11). <https://doi:10.3390/pr9111880>
- González-Siso, M. I. (1996). The biotechnological utilization of cheese whey: A review. *Bioresource Technology*, 57, 1-11. [https://doi:10.1016/0960-8524\(96\)00036-3](https://doi:10.1016/0960-8524(96)00036-3)
- Grba, S., Stehlik-Tomas, V., Stanzer, D., Vahëia, N., & Škrin, A. (2002). Selection of yeast strain *Kluyveromyces marxianus* for alcohol and biomass production on whey. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 16 (1), 13-16.
- Guimaraes, P. M., Teixeira, J. A., & Domingues, L. (2010). Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey. *Biotechnology Advances*, 28(3), 375-384. <https://doi:10.1016/j.biotechadv.2010.02.002>
- Guneser, O., Karagul-Yuceer, Y., Wilkowska, A., & Kregiel, D. (2016). Volatile metabolites produced from agro-industrial wastes by Na-alginate entrapped *Kluyveromyces marxianus*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(4), 965-972. <https://doi:10.1016/j.bjm.2016.07.018>
- Guo, X., Wang, Y., Guo, J., Wang, Q., Zhang, Y., Chen, Y., Zhang, C., & Xiao, D. (2017). Efficient production of 2,3-butanediol from cheese whey powder (CWP) solution by *Klebsiella pneumoniae* through integrating pulsed fed-batch fermentation with a two-stage pH control strategy. *Fuel*, 203, 469-477. <https://doi:10.1016/j.fuel.2017.04.138>
- Hazelwood, L. A., Daran, J. M., van Maris, A. J., Pronk, J. T., & Dickinson, J. R. (2008). The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(8), 2259–2266. <https://doi.org/10.1128/aem.02625-07>
- Hensing, M. C. M., Rouwenhorst, R. J., Heijnen, J. J., van Dijken, J. P., & Pronk, J. T. (1995). Physiological and technological aspects of large-scale heterologous protein production with yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek*, 67, 261-279. <https://doi:10.1007/BF00873690>

- Hernández-Cruz, M. Á., Vázquez-Cuevas, G. M., Castro-Rosas, J., Hernández-Juárez, M., & Gómez-Aldapa, C. A. (2023). *Kluyveromyces marxianus*, sus aplicaciones en lactosuero. *Pädi Boletín Científico de Ciencias Básicas e Ingenierías del ICBI*, 10(20), 1–9. <https://doi.org/10.29057/icbi.v10i20.9362>
- Hernández-Cruz, M. Á., Cadena-Ramírez, A., Castro-Rosas, J., Páez-Lerma, J. B., Ramírez-Vargas, M. R., Rangel-Vargas, E., Romo-Gómez, C., Lara-Gómez, A. B., Conde-Baéz, L., & Gómez Aldapa, C. A. (2024). Comparative analysis of three types of whey as substrate for fermentation by *Kluyveromyces marxianus* and its influence on isoamyl acetate synthesis. *Waste and Biomass Valorization*, 15, 3413–3424. <https://doi.org/10.1007/s12649-023-02380-5>
- Hong, J., Wang, Y., Kumagai, H., & Tamaki, H. (2007). Construction of thermotolerant yeast expressing thermostable cellulase genes. *Journal of Biotechnology*, 130(2), 114–123. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.03.008>
- Hortsch, R., Löser, C., & Bley, T. (2008). A two-stage CSTR cascade for studying the effect of inhibitory and toxic substances in bioprocesses. *Engineering in Life Sciences*, 8(6), 650–657. <https://doi:10.1002/elsc.200800072>
- Hua, D., & Xu, P. (2011). Recent advances in biotechnological production of 2-phenylethanol. *Biotechnology Advances*, 29(6), 654–660. <https://doi:10.1016/j.biotechadv.2011.05.001>.
- INEGI. (2019). Estadísticas del Sector Lácteo. Retrieved from <https://www.canilec.org.mx/estadisticas%20lacteas%202019.pdf>
- Ingledeu, W., & Lin, Y. (2011). Ethanol from starch-based feedstocks. *Comprehensive Biotechnology* (Second Edition), 3, 37–49. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-088504-9.00457-8>
- Jalil, R., & Nixona, J. R. (1990). Biodegradable poly (lactic acid) and poly (lactide-co-glycolide) microcapsule:s problems associated with preparative techniques and release properties. *J. Microencapsulation*, 7(3), 297–325. <https://doi:10.3109/02652049009021842>
- Jelen, P. (2002). Whey processing. Utilization and products. In *Encyclopedia of Dairy Sciences* (pp. 2739–2745).
- Ji, X. J., Huang, H., & Ouyang, P. K. (2011). Microbial 2,3-butanediol production: a state-of-the-art review. *Biotechnology Advances*, 29(3), 351–364. <https://doi:10.1016/j.biotechadv.2011.01.007>
- Jin, Y., Parashar, A., Mason, B., & Bressler, D. C. (2016). Simultaneous hydrolysis and co-fermentation of whey lactose with wheat for ethanol production. *Bioresource Technology*, 221, 616–624. <https://doi:10.1016/j.biortech.2016.09.063>
- Kadyan, S., Rashmi, H. M., Pradhan, D., Kumari, A., Chaudhari, A., & Deshwal, G. K. (2021). Effect of lactic acid bacteria and yeast fermentation on antimicrobial, antioxidative and metabolomic profile of naturally carbonated probiotic whey drink. *LWT*, 142, 111059. <https://doi:10.1016/j.lwt.2021.111059>
- Kang, J. H., Lee, M. K., Kim, K. L., & Hahm, K. S. (1996). Structure–biological activity relationships of 11-residue highly basic peptide segment of bovine lactoferrin. *International Journal of Peptide & Protein Research*, 48(4), 357–363. <https://doi:10.1111/j.1399-3011.1996.tb00852.x>
- Karim, A., & Aider, M. (2022). Bioconversion of electro-activated lactose, whey and whey permeate to produce single cell protein, ethanol, aroma volatiles, organic acids and fat by *Kluyveromyces marxianus*. *International Dairy Journal*, 129, 105334. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2022.105334>
- Kavšček, M., Stražar, M., Curk, T., Natter, K., & Petrovič, U. (2015). Yeast as a cell factory: current state and perspectives. *Microbial Cell Factories*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0281-x>

- Kong, S., Pan, H., Liu, X., Li, X., & Guo, D. (2020). De novo biosynthesis of 2-phenylethanol in engineered *Pichia pastoris*. *Enzyme and Microbial Technology*, 133, 109459. <https://doi.org/10.1016/j.enzmitec.2019.109459>
- Koukoumaki, D. I., Papanikolaou, S., Ioannou, Z., Mourtzinou, I., & Sarris, D. (2024). Single-cell protein and ethanol production of a newly isolated *Kluyveromyces marxianus* strain through cheese whey valorization. *Foods*, 13(12), 1892. <https://doi.org/10.3390/foods13121892>
- Lane, M. M., & Morrissey, J. P. (2010). *Kluyveromyces marxianus*: A yeast emerging from its sister's shadow. *Fungal Biology Reviews*, 24(1-2), 17-26. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2010.01.001>
- Lane, M. M., Burke, N., Karremann, R., Wolfe, K. H., O'Byrne, C. P., & Morrissey, J. P. (2011). Physiological and metabolic diversity in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 100(4), 507-519. <https://doi.org/10.1007/s10482-011-9606-x>
- Lech, M. (2020). Optimisation of protein-free waste whey supplementation used for the industrial microbiological production of lactic acid. *Biochemical Engineering Journal*, 157, 107531. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107531>
- Li, P., Tan, X., Fu, X., Dang, Y., & Li, S. (2021). Metabolomic analysis reveals *Kluyveromyces marxianus*'s stress responses during high-temperature ethanol fermentation. *Process Biochemistry*, 102, 386-392. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2021.01.024>
- Ling, C. (2008). Whey to ethanol: A biofuel role for dairy cooperatives? *Agricultural Economist*. USDA Rural Development. Research Report 214. <https://ageconsearch.umn.edu/record/280102/files/RR214.pdf>
- Liu, J. J., Zhang, G. C., Oh, E. J., Pathanibul, P., Turner, T. L., & Jin, Y. S. (2016). Lactose fermentation by engineered *Saccharomyces cerevisiae* capable of fermenting cellobiose. *Journal of Biotechnology*, 234, 99-104. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.07.018>
- Liu, N., Qin, L., Hu, L., & Miao, S. (2023). Formation mechanisms of ethyl acetate and organic acids in *Kluyveromyces marxianus* L1-1 in Chinese acid rice soup. *Food Science and Human Wellness*, 12(1), 45-56. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2022.07.017>
- Lobs, A. K., Schwartz, C., & Wheeldon, I. (2017). Genome and metabolic engineering in non-conventional yeasts: Current advances and applications. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2(3), 198-207. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2017.08.002>
- Lu, Q., Zhou, X., & Liu, J. (2022). Adaptive laboratory evolution and shuffling of *Escherichia coli* to enhance its tolerance and production of astaxanthin. *Biotechnology For Biofuels And Bioproducts*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s13068-022-02118-w>
- Lukjanenko, J., Kovtuna, K., Grube, M., & Vigants, A. (2015). Enhancement of protein content in ("*Kluyveromyces marxianus*") biomass produced on cheese whey lactose. *Journal of Biotechnology*, 208:S76. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.06.232>
- Lukondeh, T., Ashbolt, N. J., & Rogers, P. L. (2005). Fed-batch fermentation for production of *Kluyveromyces marxianus* FII 510700 cultivated on a lactose-based medium, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 32(1), 284-288, <https://doi.org/10.1007/s10295-005-0245-y>
- Ma, C., Wang, A., Qin, J., Li, L., Ai, X., Jiang, T., Tang, H., & Xu, P. (2009). Enhanced 2,3-butanediol production by *Klebsiella pneumoniae* SDM. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82(1), 49-57. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1732-7>

- Madureira, A. R., Pereira, C. I., Gomes, A. M. P., Pintado, M. E., & Xavier Malcata, F. (2007). Bovine whey proteins – Overview on their main biological properties. *Food Research International*, 40(10), 1197-1211. <https://doi:10.1016/j.foodres.2007.07.005>
- Maguire, N. A. P., Kuhmann, T., Gerlach, D., Fan, R., & Czermak, P. (2022). Statistical mixture designs for media development with agro-industrial residues – Supporting the circular bioeconomy. *EFB Bioeconomy Journal*, 2, 100023. <https://doi:10.1016/j.bioeco.2022.100023>
- Mamani Condori, M. A., Montesinos Pachapuma, K. A., Gomez Chana, M. P., Quispe Huillca, O., Veliz Llayqui, N. E., López-Rosales, L., & García-Camacho, F. (2024). An environmentally sustainable approach for raw whey treatment through sequential cultivation of macrophytes and microalgae. *Applied Sciences*, 14(18), 8139. <https://doi.org/10.3390/app14188139>
- Martinez-Avila, O., Sanchez, A., Font, X., & Barrena, R. (2018). Bioprocesses for 2-phenylethanol and 2-phenylethyl acetate production: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(23), 9991-10004. <https://doi:10.1007/s00253-018-9384-8>
- Mo, W., Wang, M., Zhan, R., Yu, Y., He, Y., & Lu, H. (2019). *Kluyveromyces marxianus* developing ethanol tolerance during adaptive evolution with significant improvements of multiple pathways. *Biotechnology for Biofuels*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1393-z>
- Morrissey, J. P., Etschmann, M. M. W., Schrader, J., & de Billerbeck, G. M. (2015). Cell factory applications of the yeast *Kluyveromyces marxianus* for the biotechnological production of natural flavour and fragrance molecules. *Yeast*, 32(1), 3–16. <https://doi.org/10.1002/yea.3054>
- Mounier, J., & Coton, M. (2022). Yeast and molds-*Kluyveromyces* spp. In *Encyclopedia of Dairy Sciences* (pp. 569-574). <https://10.1016/b978-0-12-818766-1.00054-4>
- Murari, C. S., Machado, W. R. C., Schuina, G. L., & Del Bianchi, V. L. (2019). Optimization of bioethanol production from cheese whey using *Kluyveromyces marxianus* URM 7404. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 20, 101182. <https://doi:10.1016/j.bcab.2019.101182>
- Murari, C. S., Moraes, D. C., Bueno, G. F., & Bianchi, V. L. D. (2013). Avaliação da redução na poluição dos laticínios, a partir da fermentação do soro de leite em etanol pela levedura *Kluyveromyces marxianus* 229. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*. 68(393), 42–50. <https://doi.org/10.5935/2238-6416.20130034>
- Nasseri, A. T., Rasoul-Ami, S., Morowvat, M. H., & Ghasemi, Y. (2011). Single cell protein: Production and process. *American Journal of Food Technology*, 6(2), 103-116. <https://doi:10.3923/ajft.2011.103.116>
- Nath, A., Mondal, S., Kanjilal, T., Chakraborty, S., Curcio, S., & Bhattacharjee, C. (2015). Synthesis and functionality of proteinacious nutraceuticals from casein whey—A clean and safe route of valorization of dairy waste. *Chemical Engineering Research and Design*, 97, 192-207. <https://doi:10.1016/j.cherd.2015.03.017>
- National Center for Biotechnology Information. (s.f.). *Kluyveromyces marxianus*. Recuperado el 6 de octubre de 2025, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=4911>
- National Library of Medicine National Center for Biotechnology Information. Retrieved from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Isoamyl-acetate>
- NORMEX (2013). NMX-F-317-NORMEX-2013, Alimentos - Determinación de pH en Alimentos y Bebidas no Alcohólicas - Método Potenciométrico - Método de Prueba. México: NORMEX (Sociedad Mexicana de Normalización y Certificación, S.C.).
- Nout, M.J.R. (2024). Fermentation. En G. W. Smithers (Ed.), *Encyclopedia of Food Safety* (2ª ed., Vol. 3, pp. 499-509). Elsevier. <https://10.1016/B978-0-12-822521-9.00130-1>



- OECD & FAO. (2021). Lacteos y sus productos. In OECD-FAO Agricultural Outlook 2021-2030. OECD Publishing: Paris. <https://doi:10.1787/02b800e9-es>
- OECD & FAO. (2024). Agricultural Outlook 2025–2034: Dairy and dairy products. OECD Publishing. Recuperado de [https://www.oecd.org/en/publications/oecd-fao-agricultural-outlook-2025-2034\\_601276cd-en/full-report/dairy-and-dairy-products\\_1dd2e5a6.html](https://www.oecd.org/en/publications/oecd-fao-agricultural-outlook-2025-2034_601276cd-en/full-report/dairy-and-dairy-products_1dd2e5a6.html)
- Ohstrom, A. M., Buck, A. E., Du, X., & Wee, J. (2023). Evaluation of *Kluyveromyces* spp. for conversion of lactose in different types of whey from dairy processing waste into ethanol. *Frontiers in Microbiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1208284>
- Ozarslan, S., & Taş, T. K. (2022). Treatment of lactose by fermentation: Production process on  $\beta$ -galactosidase using *Kluyveromyces marxianus* isolated from kefir grains. *International Food Research Journal*, 29(4), 864-871. <https://doi.org/10.47836/ifrj.29.4.13>
- Ozmihci, S., & Kargi, F. (2007). Effects of feed sugar concentration on continuous ethanol fermentation of cheese whey powder solution (CWP). *Enzyme and Microbial Technology*, 41(6-7), 876-880. <https://doi:10.1016/j.enzmictec.2007.07.015>
- Pal, U., & Vij, S. (2022). Adaptive evolution of *Kluyveromyces marxianus* MTCC1389 for high ethanol tolerance. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 45, 102533. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102533>
- Pal, U., Pal, S., & Vij, S. (2023). *Kluyveromyces marxianus* MTCC 1389 augments multi-stress tolerance after adaptation to ethanol stress. *Indian Journal of Microbiology*, 63(4), 483-493. <https://doi.org/10.1007/s12088-023-01102-8>
- Panesar, P., & Kennedy, J. F. (2012). Biotechnological approaches for the value addition of whey. *Critical Reviews in Biotechnology*, 32(4), 327-348. <https://doi:10.3109/07388551.2011.640624>
- Panesar, P., Kennedy, J., Gandhi, D., & Bunko, K. (2007). Bioutilisation of whey for lactic acid production. *Food Chemistry*, 105(1), 1-14. <https://doi:10.1016/j.foodchem.2007.03.035>
- Parrondo, J., García, L. A., & Díaz, M. (2009). Nutrient balance and metabolic analysis in a *Kluyveromyces marxianus* fermentation with lactose-added whey. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 26(3), 445–456. <https://doi.org/10.1590/S0104-66322009000300001>
- Pasotti, L., De Marchi, D., Casanova, M., Massaiu, I., Bellato, M., Cusella De Angelis, M. G., Calvio, C., & Magni, P. (2020). Engineering endogenous fermentative routes in ethanologenic *Escherichia coli* W for bioethanol production from concentrated whey permeate. *New Biotechnology*, 57, 55-66. <https://doi:10.1016/j.nbt.2020.02.004>
- Pattanakittivorakul, S., Tsuzuno, T., Kosaka, T., Murata, M., Kanesaki, Y., Yoshikawa, H., Limtong, S., & Yamada, M. (2022). Evolutionary adaptation by repetitive long-term cultivation with gradual increase in temperature for acquiring multi-stress tolerance and high ethanol productivity in *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042. *Microorganisms*, 10(4), 798. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10040798>
- Pattnaik, R., Yost, R. S., Porter, G., Masunagab, T., & Attanandanac, T. (2007). Improving multi-soil-layer (MSL) system remediation of dairy effluent. *Ecological Engineering*, 32, 1-10. <https://doi:10.1016/j.ecoleng.2007.08.006>
- Pires, A. F., Marnotes, N. G., Rubio, O. D., Garcia, A. C., & Pereira, C. D. (2021). Dairy by-products: A review on the valorization of whey and second cheese whey. *Foods*, 10(5). <https://doi:10.3390/foods10051067>
- Plata, C., Millán, C., Mauricio, J., & Ortega, J. (2004). Formation of ethyl acetate and isoamyl acetate by various species of wine yeasts. *Food Microbiology*, 20(2), 217-224. [https://doi.org/10.1016/s0740-0020\(02\)00101-6](https://doi.org/10.1016/s0740-0020(02)00101-6)

- Plutowska, B., & Wardencki, W. (2008). Application of gas chromatography–olfactometry (GC–O) in analysis and quality assessment of alcoholic beverages – A review. *Food Chemistry*, 107 (1), 449-463. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.058>
- Pope, D. H., Karlsson, J. O., Baker, P., & McCoy, D. (2021). Examining the environmental impacts of the dairy and baby food industries: Are first-food systems a crucial missing part of the healthy and sustainable food systems agenda now underway? *International Journal Of Environmental Research And Public Health*, 18(23), 12678. <https://doi.org/10.3390/ijerph182312678>
- Prazeres, A. R., Carvalho, F., & Rivas, J. (2012). Cheese whey management: A review. *Journal of Environmental Management*, 110, 48-68. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.05.018>
- Procopio, S., Sprung, P., & Becker, T. (2015). Effect of amino acid supply on the transcription of flavour-related genes and aroma compound production during lager yeast fermentation. *LWT - Food Science and Technology*, 63(1), 211–219. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.007>
- Qiu, Z., & Jiang, R. (2017). Improving *Saccharomyces cerevisiae* ethanol production and tolerance via RNA polymerase II subunit Rpb7. *Biotechnology for Biofuels*, 10, 125. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0806-0>
- Remón, J., García, L., & Arauzo, J. (2016). Cheese whey management by catalytic steam reforming and aqueous phase reforming. *Fuel Processing Technology*, 154, 66-81. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2016.08.012>
- Reyes-Sánchez, F. J., Páez-Lerma, J. B., Rojas-Contreras, J. A., López-Miranda, J., Soto-Cruz, N. Ó., & Reinhart-Kirchmayr, M. (2019). Study of the enzymatic capacity of *Kluyveromyces marxianus* for the synthesis of esters. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 29(1-6), 1-9. <https://doi.org/10.1159/000507551>
- Risner, D., Shayevitz, A., Haapala, K., Meunier-Goddik, L., & Hughes, P. (2018). Fermentation and distillation of cheese whey: Carbon dioxide-equivalent emissions and water use in the production of whey spirits and white whiskey. *Journal of Dairy Science*, 101(4), 2963-2973. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13774>
- Risner, D., Tomasino, E., Hughes, P., & Meunier-Goddik, L. (2019). Volatile aroma composition of distillates produced from fermented sweet and acid whey. *Journal of Dairy Science*, 102(1), 202-210. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14737>
- Rodrigues, B., Lima-Costa, M. E., Constantino, A., Raposo, S., Felizardo, C., Goncalves, D., Fernandes, T., Dionísio, L., & Peinado, J. M. (2016). Growth kinetics and physiological behavior of co-cultures of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces lactis*, fermenting carob sugars extracted with whey. *Enzyme and Microbial Technology*, (92), 41-48. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2016.06.012>
- Rodríguez, C. F. (2016). Procesos biológicos para el tratamiento de lactosuero con microorganismos. *Revista de la Facultad de Medicina*, 64(1), 5–12. <https://doi.org/10.15446/revfacmed.v64n1.46605>
- Rojas, V., Gil, J. V., Piñaga, F., & Manzanares, P. (2001). Studies on acetate ester production by non-*Saccharomyces* wine yeasts. *International Journal of Food Microbiology*, 70(3), 283-289. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(01\)00552-9](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(01)00552-9)
- Romero, M. D., Calvo, L., Alba, C., Daneshfar, A., & Ghaziaskar, H. S. (2005). Enzymatic synthesis of isoamyl acetate with immobilized *Candida antarctica* lipase in n-hexane. *Enzyme and Microbial Technology*, 37(1), 42-48. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.12.033>
- Rubio-Teixeira, M. (2006). Endless versatility in the biotechnological applications of *Kluyveromyces* LAC genes. *Biotechnology Advances*, 24(2), 212-225. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.10.001>

- Saini, P., Beniwal, A., Kokkiligadda, A., & Vij, S. (2017). Evolutionary adaptation of *Kluyveromyces marxianus* strain for efficient conversion of whey lactose to bioethanol. *Process Biochemistry*, 62, 69-79. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.07.013>
- Sainz-Mellado, D. C., Méndez-Hernández, J. E., López-Miranda, J., Páez-Lerma, J. B., Aguilar, C. N., & Soto-Cruz, N. O. (2023). Gradually supply of isoamyl alcohol increases the isoamyl acetate production in solid-state fermentation. *Letters In Applied Microbiology*, 76(2). <https://doi.org/10.1093/lambio/ovac061>
- Sampaio, F. C., de Faria, J. T., da Silva, M. F., de Souza Oliveira, R. P., & Converti, A. (2020). Cheese whey permeate fermentation by *Kluyveromyces lactis*: A combined approach to wastewater treatment and bioethanol production. *Environmental Technology*, 41(24), 3210-3218. <https://doi.org/10.1080/09593330.2019.1604813>
- Sánchez-Moya, T., Hidalgo, A. M., Ros-Berrueto, G., & López-Nicolás, R. (2020). Screening ultrafiltration membranes to separate lactose and protein from sheep whey: application of simplified model. *Journal Of Food Science And Technology*, 57(9), 3193-3200. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04350-4>
- Sandoval-Núñez, D., Romero-Gutiérrez, T., Gómez-Márquez, C., Gshaedler, A., Arellano-Plaza, M., & Amaya-Delgado, L. (2023). Physiological and transcriptome analyses of *Kluyveromyces marxianus* reveal adaptive traits in stress response. *Applied Microbiology And Biotechnology*, 107(4), 1421-1438. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-12354-7>
- Sar, T., Harirchi, S., Ramezani, M., Bulkan, G., Akbas, M. Y., Pandey, A., & Taherzadeh, M. J. (2022). Potential utilization of dairy industries by-products and wastes through microbial processes: A critical review. *Science of the Total Environment*, 810, 152253. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152253>
- Silveira, W. B. da, Passos, F. J. V., Mantovani, H. C., & Passos, F. M. L. (2005). Ethanol production from cheese whey permeate by *Kluyveromyces marxianus* UFV-3: A flux analysis of oxido-reductive metabolism as a function of lactose concentration and oxygen levels. *Enzyme and Microbial Technology*, 36(7), 930–936. <https://doi.org/10.1016/J.ENZMICTEC.2005.01.018>
- Smith, W. P. (1996). Epidermal and dermal effects of topical lactic acid. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 35 (3–1), 388–391. [https://doi.org/10.1016/s0190-9622\(96\)90602-7](https://doi.org/10.1016/s0190-9622(96)90602-7)
- Smithers, G. W. (2015). Whey-ing up the options – Yesterday, today and tomorrow. *International Dairy Journal*, 48, 2-14. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.01.011>
- Srivastava, A., & Gupta, S. (2011). Fed-Batch fermentation – design strategies. *Comprehensive Biotechnology* (Second Edition). En Elsevier, 2, 515-526. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-088504-9.00112-4>
- Styger, G. (2011). Elucidating the metabolic pathways responsible for higher alcohol production in *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertation presented for the degree of Doctor of Philosophy (Science).
- Tai, S. L., Boer, V. M., Daran-Lapujade, P., Walsh, M. C., De Winde, J. H., Daran, J., & Pronk, J. T. (2004). Two-dimensional transcriptome analysis in chemostat cultures. *Journal Of Biological Chemistry*, 280(1), 437-447. <https://doi.org/10.1074/jbc.m410573200>
- Tekarslan-Sahin, S. H. (2022). Adaptive laboratory evolution of yeasts for aroma compound production. *Fermentation*, 8(8), 372. <https://doi.org/10.3390/fermentation8080372>
- Tocantins, M. C., Vital, C. E., Barros, E., Vieira, N. M., Da Silveira, F. A., Balbino, T. R., Diniz, R. H. S., Brito, A. F., Bazzolli, D. M. S., De Oliveira Ramos, H. J., & Da Silveira, W. B. (2019). Ethanol stress responses of *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735

- revealed by proteomic and metabolomic analyses. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 112(6), 827-845. <https://doi.org/10.1007/s10482-018-01214-y>
- Trigueros, D. E. G., Fiorese, M. L., Kroumov, A. D., Hinterholz, C. L., Nadai, B. L., & Assunção, G. M. (2016). Medium optimization and kinetics modeling for the fermentation of hydrolyzed cheese whey permeate as a substrate for *Saccharomyces cerevisiae* var. bouldarii. *Biochemical Engineering Journal*, 110, 71-83. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.02.014>
- Trip, D. S. L., & Youk, H. (2020). Yeasts collectively extend the limits of habitable temperatures by secreting glutathione. *Nature Microbiology*, 5(7), 943-954. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0704-2>
- United State Department of Agriculture (USDA) Foreign Agricultural Service. (2025). Dairy and Products Semi-Annual Report: Mexico 2025 (MX2025-0024). Washington, D.C: USDA. Recuperado de <https://apps.fas.usda.gov/newgainapi/api/Report/DownloadReportByFileName?fileName=Dairy+and+Products+Semi-annual+Mexico+City+Mexico+MX2025-0024.pdf>
- Varela, J. A., Gethins, L., Stanton, C., Ross, P., & Morrissey, J. P. (2017). Applications of *Kluyveromyces marxianus* in Biotechnology. in: Satyanarayana, T., Kunze, G. (eds) *Yeast Diversity in Human Welfare*. Springer, Singapore, 439-453. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-2621-8\\_17](https://doi.org/10.1007/978-981-10-2621-8_17)
- Venetsaneas, N., Antonopoulou, G., Stamatelatou, K., Kornaros, M., & Lyberatos, G. (2009). Using cheese whey for hydrogen and methane generation in a two-stage continuous process with alternative pH controlling approaches. *Bioresource Technology*, 100(15), 3713-3717. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.01.025>
- Vidra, A., & Németh, Á. (2024). Stress modulation strategies in *Kluyveromyces marxianus*: Unravelling the effects of shear force and aeration for enhanced specific ergosterol production. *Acta Alimentaria*, 53(2), 281-291. <https://doi.org/10.1556/066.2024.00034>
- Walker, G. M., & O'Neill, J. D. (1990). Morphological and metabolic changes in the yeast *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* NRRLy2415 during fermentation of lactose. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 49(1), 75-89. <https://doi.org/10.1002/JCTB.280490108>
- Xia, J., He, J., Xu, J., Liu, X., Qiu, Z., Xu, N., & Su, L. (2021). Direct conversion of cheese whey to polymalic acid by mixed culture of *Aureobasidium pullulans* and permeabilized *Kluyveromyces marxianus*. *Bioresource Technology*, 337, 125443. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125443>
- Xu, P., Lin, N., Zhang, Z., & Liu, J. (2024b). Strategies to increase the robustness of microbial cell factories. *Advanced Biotechnology*, 2(9). <https://doi.org/10.1007/s44307-024-00018-8>
- Yadav, J. S., Bezawada, J., Elharche, S., Yan, S., Tyagi, R. D., & Surampalli, R. Y. (2014). Simultaneous single-cell protein production and COD removal with characterization of residual protein and intermediate metabolites during whey fermentation by *K. marxianus*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 37, 1017-1029. <https://doi.org/10.1007/s00449-013-1072-6>
- Yadav, J. S., Yan, S., Ajila, C. M., Bezawada, J., Tyagi, R. D., & Surampalli, R. Y. (2016). Food-grade single-cell protein production, characterization and ultrafiltration recovery of residual fermented whey proteins from whey. *Food and Bioprocess Processing*, 99, 156-165. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2016.04.012>
- Zafar, S., & Owais, M. (2006). Ethanol production from crude whey by *Kluyveromyces marxianus*. *Biochemical Engineering Journal*, 27(3), 295-298. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2005.05.009>



- Zapata, J. E., Hoyos, M. R. & Quinchía, B. (2005). Parámetros cinéticos de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en presencia de un campo magnético variable de baja intensidad y alta frecuencia. *Vitae*, 12(1), 39-44. <https://www.redalyc.org/pdf/1698/169815869005.pdf>
- Zhang, Q., Jin, Y., Fang, Y., & Zhao, H. (2019). Adaptive evolution and selection of stress-resistant *Saccharomyces cerevisiae* for very high-gravity bioethanol fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology*, 41, 88-94. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2019.06.003>
- Zhao, W., Shu, Q., He, G., & Qihe, C. (2020). Reducing antigenicity of bovine whey proteins by *Kluyveromyces marxianus* fermentation combined with ultrasound treatment. *Food Chemistry*, 311, 125893. <https://doi:10.1016/j.foodchem.2019.125893>
- Zhu, Y.-J., Zhou, H.-T., Hu, Y.-H., Tang, J.-Y., Su, M.-X., Guo, Y.-J., Chen, Q.-X., & Liu, B. (2011). Antityrosinase and antimicrobial activities of 2-phenylethanol, 2-phenylacetaldehyde and 2-phenylacetic acid. *Food Chemistry*, 124(1), 298-302. <https://doi:10.1016/j.foodchem.2010.06.036>
- Zotta, T., Solieri, L., Iacumin, L., Picozzi, C., & Gullo, M. (2020). Valorization of cheese whey using microbial fermentations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(7), 2749-2764. <https://doi:10.1007/s00253-020-10408-2>