

**Revisión de los procesos de obtención de ácido acético mediante fermentación del  
lactosuero**

Diana Carolina Ariza Vargas

Gonzalo Andrés Gómez Saldaña

Universidad Nacional Abierta y a Distancia UNAD

Escuela de Ciencias Básicas, Tecnología e Ingeniería ECBTI

Maestría en biotecnología alimentaria

2022

**Revisión de los procesos de obtención de ácido acético mediante fermentación del  
lactosuero**

Diana Carolina Ariza Vargas

Gonzalo Andrés Gómez Saldaña

Monografía presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Biotecnología Alimentaria

Directora:

Liliana Londoño Hernández.

Universidad Nacional Abierta y a Distancia UNAD

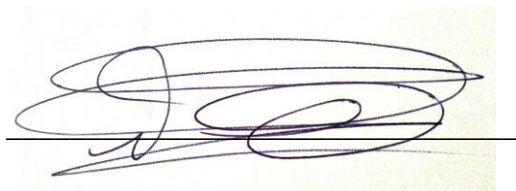
Escuela de Ciencias Básicas, Tecnología e Ingeniería ECBTI

Maestría en biotecnología alimentaria

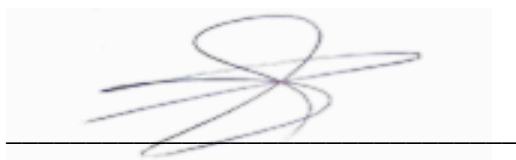
2022

### **Declaración de Derechos de Propiedad Intelectual**

Los autores de la presente propuesta manifestamos que conocemos el contenido del Acuerdo 06 de 2008, Estatuto de Propiedad Intelectual de la UNAD, Artículo 39 referente a la cesión voluntaria y libre de los derechos de propiedad intelectual de los productos generados a partir de la presente propuesta. Asimismo, conocemos el contenido del Artículo 40 del mismo Acuerdo, relacionado con la autorización de uso del trabajo para fines de consulta y mención en los catálogos bibliográficos de la UNAD.

A handwritten signature in dark ink, consisting of several overlapping loops and a horizontal line at the bottom, positioned above a horizontal line.

Diana Carolina Ariza Vargas.

A handwritten signature in dark ink, featuring a large loop at the top and several horizontal strokes below, positioned above a horizontal line.

Gonzalo Andres Gomez Saldaña.

### **Agradecimientos**

Expresamos nuestros agradecimientos a: la Doctora Liliana Hernández por su constante apoyo, observaciones pertinentes y la gran disposición que tiene para ofrecer su colaboración en la construcción de la monografía. También se hace un agradecimiento a los profesores y profesoras MsC Alexis García, MsC. Ibeth Rodríguez y la Doctora Laura María Reyes por sus oportunos aportes y observaciones en los cursos académicos Seminario de Investigación I, II y III.

*Dedicado a Dios por ayudarnos en todo.*

*También a nuestro hijo David, ahijado Felipe y padres por creer siempre en nosotros y por acompañarnos en todo momento de nuestras vidas.*

*Diana Ariza.*

*Andrés Gómez.*

## Resumen

Durante el proceso para la obtención de cualquier tipo de queso se obtienen subproductos como el lactosuero, el cual contiene algunos compuestos de interés industrial, sin embargo, este es desaprovechado por pequeños productores debido a la falta de conocimiento en el uso de las tecnologías para su valorización generando pérdidas económicas e impacto ambiental negativo. En esta monografía, se realizó una revisión documental para definir las condiciones apropiadas para la obtención de Ácido Acético, por medio de la fermentación del lactosuero, con los microorganismos *Kluyveromyces marxianus* y *Acetobacter pasteurianus*; lo anterior se hace con el fin de generar un procedimiento económico y viable a nivel técnico para la producción de ácido acético. La metodología que se empleó para la revisión documental es una búsqueda de artículos científicos, usando motores de búsqueda y se limitó a los años 2015-2022, donde se establecieron 5 ecuaciones de búsqueda y se encontraron en total 2206 artículos de los que se seleccionaron 39. Adicionalmente se consultaron métodos confiables y tradicionales para la cuantificación de la concentración de ácido acético presente en el producto resultante de la fermentación. Los resultados obtenidos indicaron que las condiciones de fermentación del lactosuero para la producción de vinagre fueron 30-38°C por un tiempo de 96 horas y para la cuantificación del ácido acético se recomienda seguir el procedimiento tradicional de titulación volumétrica. Este proceso permitirá apoyar a los productores de queso artesanal teniendo alternativas para aprovechar los subproductos generados, además de disminuir el impacto ambiental. Por lo anterior, se dejará campo abierto a futuras investigaciones ya que es importante buscar procesos para el aprovechamiento del lactosuero.

**Palabras clave:** Vinagre, etanol, cuantificación, *Kluyveromyces marxianus* y *Acetobacter pasteurianus*.

### Abstract

During the process to obtain any type of cheese, by-products such as whey are obtained, which contains some compounds of industrial interest, however, this is wasted by small producers due to the lack of knowledge in the use of technologies for its production. recovery generating economic losses and negative environmental impact. In this monograph, a documentary review was carried out to define the appropriate conditions for obtaining Acetic Acid, through whey fermentation, with the microorganisms *Kluyveromyces marxianus* and *Acetobacter pasteurianus*; the foregoing is done to generate an economical and technically viable procedure to produce acetic acid. The methodology used for the documentary review is a search for scientific articles, using search engines and this was limited from the year 2015-2022, where 5 search equations were established and a total of 2206 articles were found from which they were selected. 39. Additionally, reliable, and traditional methods were consulted for the quantification of the concentration of acetic acid present in the product resulting from fermentation. The results obtained indicated that the whey fermentation conditions for vinegar production were 30-38 °C for 96 hours, and for acetic acid quantification it is recommended that the traditional volumetric titration procedure be followed. This process will support artisanal cheese producers by providing alternatives to take advantage of the byproducts generated, in addition to reducing the environmental impact. Therefore, the field will be left open for future research since it is important to look for processes for the use of whey.

**Keywords: Vinegar, ethanol, quantification, *Kluyveromyces marxianus* and *Acetobacter pasteurianus*.**

## Tabla de contenido

	<b>Pág.</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>15</b>
<b>Planteamiento del problema</b> .....	<b>17</b>
<b>Justificación</b> .....	<b>19</b>
<b>Objetivos</b> .....	<b>21</b>
General .....	21
Específicos .....	21
<b>Marco teórico</b> .....	<b>22</b>
Suero o Lactosuero del Queso.....	22
Ácido Acético y Vinagre.....	22
<i>Kluyveromyces marxianus</i> .....	23
<i>Acetobacter pasteurianus</i> .....	24
<b>Metodología</b> .....	<b>26</b>
<b>Resultados y análisis de resultados</b> .....	<b>37</b>
Análisis y Comportamiento de la Ecuación 1 .....	38
Análisis y Comportamiento de la Ecuación 2 .....	40
Análisis y Comportamiento de la Ecuación 3 .....	42
Análisis y Comportamiento de la Ecuación 4 .....	44
Análisis y Comportamiento de la Ecuación 5 .....	46
<b>Condiciones de Fermentación con la Aplicación de los Microorganismos <i>Kluyveromyces Marxianus</i> y <i>Acetobacter Pasteurianus</i></b> .....	<b>47</b>
<i>Kluyveromyces marxianus</i> .....	48



Resistencia de <i>Kluyveromyces marxianus</i> a Medios Concentrados de Etanol.....	55
Consumo de Azucres por <i>Kluyveromyces marxianus</i> Para la Producción de Etanol.....	58
<i>Acetobacter pasteurianus</i> .....	63
<b>Cuantificación de Ácido Acético.....</b>	<b>82</b>
<b>Propuesta de un Procedimiento Para la Producción de Vinagre del Suero a Través de la Fermentación del Lactosuero con <i>Kluyveromyces Marxianus</i> y <i>Acetobacter Pasteurianus</i> y la Cuantificación del Ácido Acético.....</b>	<b>87</b>
Procedimiento Para la Producción de Vinagre del Suero a Través de la Fermentación del Lactosuero con <i>Kluyveromyces marxianus</i> y <i>Acetobacter pasteurianus</i> .....	87
Procedimiento Para la Cuantificación del Ácido Acético en el Vinagre del Suero .....	90
<b>Conclusiones .....</b>	<b>91</b>
<b>Referencias bibliográficas .....</b>	<b>92</b>

## Lista de figuras.

	Pág.
.....	
<b>Figura 1:</b> Observación microscópica de la levadura <i>K. marxianus</i> , donde se observa en colonias teñidas en color azul intenso a un campo de 100X.....	24
<b>Figura 2:</b> Numero de publicaciones para la ecuación de búsqueda 1 desde el año 2015-2021....	38
<b>Figura 3:</b> Numero de publicaciones por país para la ecuación de búsqueda 1. ....	39
<b>Figura 4:</b> Documentos por área temática para la ecuación de búsqueda 1. ....	39
<b>Figura 5:</b> Numero de publicaciones para la ecuación de búsqueda 2 desde el año 2015-2021. ....	40
<b>Figura 6:</b> Numero de publicaciones por país para la ecuación de búsqueda 2. ....	41
<b>Figura 7:</b> Documentos por área temática para la ecuación de búsqueda 2. ....	41
<b>Figura 8:</b> Numero de publicaciones para la ecuación de búsqueda 3 desde el año 2016-2022. ....	42
<b>Figura 9:</b> Numero de publicaciones por país para la ecuación de búsqueda 3. ....	43
<b>Figura 10:</b> Documentos por área temática para la ecuación de búsqueda 3. ....	43
<b>Figura 11:</b> Numero de publicaciones para la ecuación de búsqueda 4 desde el año 2016-2022. ....	44
<b>Figura 12:</b> Numero de publicaciones por país para la ecuación de búsqueda 4. ....	45
<b>Figura 13:</b> Documentos por área temática para la ecuación de búsqueda 4. ....	45
<b>Figura 14:</b> Crecimiento de <i>Kluyveromyces marxianus</i> en diferentes sustratos a base de suero a 30°C durante 96h de fermentación. ....	53
<b>Figura 15:</b> Producción de etanol, durante la fermentación de varios medios. ....	54
<b>Figura 16:</b> Crecimiento y uso de fuentes de carbono en fermentaciones de monocultivos.....	71

<b>Figura 17:</b> Comparación de la fermentación de ácido acético entre cepas parentales y adaptadas a 30, 37 y 40,4°C.....	76
<b>Figura 18:</b> Relación entre la señal del GC y la cantidad añadida de H <sup>+</sup> .....	84
<b>Figura 19:</b> Cromatograma en análisis HS-GC de una muestra de vinagre. ....	85
<b>Figura 20:</b> Propuesta para la obtención de vinagre a partir del lactosuero del queso.....	87
<b>Figura 21:</b> Propuesta para la valoración o titulación del ácido acético en el vinagre a partir del lactosuero del queso.....	90

## Lista de tablas

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 1:</b> Capacidad fermentativa y tolerancia al etanol de las levaduras ensayadas. ....	57
<b>Tabla 2:</b> Concentraciones de ácidos orgánicos, etanol y azúcares (medias y desviaciones estándar) en suero ácido de yogur al inicio y al final de las fermentaciones por <i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ( <i>Hornindal kveik</i> ), <i>Brettanomyces bruxellens</i> , <i>Brettanomyces claussenii</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ( <i>IOCBF</i> ). ....	59
<b>Tabla 3:</b> Consumo de lactosa y producción de etanol utilizando cepas de <i>Kluyveromyces marxianus</i> durante ciclos sucesivos de fermentación. ....	61
<b>Tabla 4:</b> Parámetros de calidad de la cerveza con leche producida con diferentes cepas de levaduras aisladas de granos de kéfir. ....	63
<b>Tabla 5:</b> Microorganismos aislados de la fermentación con ácido acético de diferentes tipos de vinagre. ....	64
<b>Tabla 6:</b> Diferentes métodos de fermentación en la producción de vinagre. ....	64
<b>Tabla 7:</b> Comparación de la producción de ácido acético en cepas modificadas de <i>A. pasteurianus</i> y <i>A. aceti</i> . ....	70
<b>Tabla 8:</b> Cambios en el pH, acidez titulable (%), alcohol (%) y contenido de ácido acético en vinagre producido a partir de raíces de campanilla fermentadas. ....	75

## Lista de Símbolos y abreviaturas

### Abreviaturas

Abreviatura	Término
<i>AAB</i>	Bacterias del ácido acético
<i>ADN</i>	Ácido desoxirribonucleico
<i>ATC</i>	Ácido tricarboxílico
<i>BAL</i>	Bacterias del ácido láctico
<i>CAA</i>	Concentración de ácido acético
<i>DANE</i>	Departamento Nacional de Estadística
<i>DBO</i>	Demanda biológica de oxígeno
<i>DQO</i>	Demanda química de oxígeno
<i>EA</i>	Lactosa electroactivada
<i>EA-S</i>	Suero electroactivado
<i>FAA</i>	Fermentación del ácido acético
<i>FSS</i>	Fermentación en estado sólido
<i>HMF</i>	Hidroxi Metil Furfural
<i>HT</i>	Hidrólisis ácida hipertérmica
<i>IUPAC</i>	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
<i>PIB</i>	Producto interno bruto
<i>PS</i>	Permeado de suero
<i>PS-EA</i>	Permeado de suero electroactivado
<i>ROS</i>	Especies reactivas de oxígeno

<b>Abreviatura</b>	<b>Término</b>
<i>(SPME)-MS/FID</i>	Cromatografía de gases de microextracción en fase sólida de espacio de cabeza
<i>SHF</i>	Hidrólisis y fermentación separadas
<i>SQ</i>	Suero de queso
<i>SSF</i>	Sacarificación y fermentación simultáneas
<i>SSCF</i>	Sacarificación y cofermentación
<i>UNAD</i>	Universidad Nacional Abierta y a Distancia.
<i>WPC</i>	Proteína de suero
<i>WPI</i>	Aislado de proteína del suero
<i>YM</i>	Caldo (medio levadura-moho)
<i>YPD</i>	medio (2 % extracto de levadura, 1 % peptona y 2 % glucosa (p/v))

## Introducción

En la elaboración de quesos, se produce una gran cantidad de lactosuero (por cada kilogramo de leche se produce 920g de lactosuero y 80g de queso). Los productores artesanales de queso no cuentan con la tecnología para poder aprovechar el lactosuero por ejemplo la separación por membranas, concentración por evaporación, fermentación, secado por atomización, microparticulación, etc; ya que se requiere del uso de equipos costosos y la cantidad de lactosuero producido no justifica su adquisición, por lo que es más económico desechar el mismo en los efluentes hídricos generando problemas ambientales (Reddy et al., 2022).

Una forma de aprovechar el lactosuero es en la elaboración de vinagre del suero por fermentación, por lo cual es importante evaluar un método para la cuantificación del ácido acético en el vinagre, ya que de acuerdo con la resolución 775 de 2008 Capítulo V, Artículo 10 “Requisitos fisicoquímicos del vinagre”, la acidez expresada en g/L de ácido acético para vinagres distintos al “Vinagre de vino” debe ser mínimo 50g/L (Ministerio de la Protección Social, 2008), teniendo en cuenta que quien debe hacer esta cuantificación es un productor artesanal, se debe establecer un método de fácil implementación para los pequeños productores de poder valorar la concentración del ácido acético en vinagre, sin necesidad de laboratorios ni equipos especializados y sin materias primas difíciles de adquirir.

Con este trabajo se busca avanzar en el campo del aprovechamiento de subproductos en la producción de vinagre del suero por fermentación, reduciendo el impacto ambiental que este genera y el valor agregado que este puede significar para el productor artesanal de queso.

Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo es realizar una revisión documental para poder evaluar el aprovechamiento del lactosuero en la producción de vinagre por medio de los microorganismos *Kluyveromyces marxianus* y *Acetobacter pasteurianus*. Para el

aprovechamiento se debe garantizar que se genere la fermentación en las condiciones ambientales en las que se encuentra normalmente el productor de quesos en Colombia.



### **Planteamiento del problema**

Para el año 2017, la participación en el producto interno bruto (PIB) de la producción de leche y derivados lácteos en Colombia fue del 3,48%, de este total el comercio formal tuvo una participación del 48% (3.380 millones de litros de leche), y en el comercio informal, tuvo una participación del 45% (3.187 millones de litros de leche); la producción de quesos tuvo una participación del 50% (Chen et al., 2016)(Gonzalez, 2020). Según el Departamento Nacional de Estadística DANE, (2020), la producción de queso fue 92.506.701 kilogramos que incluye los quesos blandos (69.376.951kg), madurados (7.396.673kg), cuajada (4.643.377kg) y queso crema (11.089.700 kg); de suero lácteo fue 1.228.694 litros. Los pequeños productores de derivados lácteos en las regiones, no tienen acceso a tecnologías suficientes para poder procesar y aprovechar el lactosuero, por lo que generalmente descartan este subproducto en los cuerpos hídricos naturales, ocasionando un gran impacto ambiental por la carga de biomoléculas presentes tales como proteínas hidrosolubles, ácidos grasos, lactosa y algunas vitaminas y minerales (Valk-Weeber et al., 2020).

El contenido de lactosa (4,5% aproximadamente), proteínas (1%) y grasas (1-2%) del SQ eleva la demanda química de oxígeno (DQO), lo cual indica la cantidad de sustancias disponibles para ser oxidadas por medios químicos, el cual la cantidad que se encuentra en el suero es del 6-8% aproximadamente (González-Amado et al., 2021). El SQ tiene una alta demanda biológica de oxígeno (DBO) (35.000-45.000mg/L) y DQO (60.000-80.000mg/L), por lo cual al no ser tratado previo a su disposición en los efluentes hídricos genera un problema grave de contaminación disminuyendo drásticamente el oxígeno del agua donde es vertido (Dos Santos et al., 2017). Es importante hacer una revisión documental para el aprovechamiento del lactosuero y específicamente en la producción de vinagre por fermentación y la medición de la concentración

de ácido acético. De lo anterior, surge la siguiente pregunta: ¿Cuál es la factibilidad técnico-científica para la producción y determinación de la concentración de ácido acético a partir de la fermentación de lactosuero? La anterior pregunta contribuirá a desarrollar estudios para la optimización de producción de ácido acético a partir del SQ y estimular a demás investigadores de la Universidad Nacional Abierta y a Distancia UNAD en la validación de los resultados teóricos que se obtienen de la revisión bibliográfica para la producción industrial de este subproducto de grado alimentario.

## Justificación

El lactosuero derivado de la producción de quesos representa el 80 - 90% de volumen total de la leche procesada y destinada para tal fin, este lactosuero contiene el 50% de los nutrientes iniciales de la leche de origen bovino, en los cuales están presentes las proteínas solubles, lactosa, vitaminas y sales minerales (Dianela, 2015). Los productores artesanales de quesos en Colombia, no cuentan con recursos económicos para implementar la infraestructura y tecnología suficiente para el aprovechamiento del lactosuero ya que en la actualidad existe procesos como la pulverización del suero para la obtención de proteínas aisladas del suero, pero requiere de equipos especializados e infraestructura demasiado costosos, por lo que se arroja a los cuerpos hídricos sin ningún tipo de tratamiento, ocasionando un impacto ambiental considerable en los ríos y quebradas (Valk-Weeber et al., 2020). La producción de lactosuero en todo el mundo supera los 160 millones de toneladas por año y aumenta continuamente (Sharma et al., 2018). Los productores artesanales de quesos y cuajadas de Colombia, en su mayoría no cuentan con conocimiento ni instrumentos de fácil adquisición para cuantificar o determinar la pureza de un producto de interés como contenido de proteína, lactosa y demás biomoléculas presentes en el SQ para tener una idea de su aprovechamiento. El lactosuero tiene un 4,5% de lactosa, el cual es un componente importante para los procesos de fermentación, por lo tanto es viable obtener un subproducto del lactosuero (González-Amado et al., 2021).

Algunos productos derivados del suero lácteo aplicados en los productos anteriormente mencionados son la proteína de suero (WPC 30-80% de proteína), aislado de proteína del suero (WPI >90% de proteína), suero de leche desmineralizado, lactosa, ácido láctico, etanol y ácido acético. Los usos del lactosuero en polvo son su adición en productos como helados, embutidos cárnicos, panadería y el lactosuero líquido como en la elaboración de bebidas lácteas con el fin

de aumentar su valor nutricional, organoléptico y mejorar el rendimiento final (extensor) aumentando ingresos económicos (Królczyk et al., 2016). El ácido acético (ácido etanoico) tiene una gran importancia comercial y es un aditivo clave para productos de valor agregado en la industria textil, la industria alimentaria, pinturas y adhesivos; la demanda de ácido acético está aumentando a nivel mundial. Según el informe reciente, se espera que el mercado mundial de ácido acético aumente del 4,30% al 6,8% al año 2022 (Pal & Nayak, 2017).

El DANE, (2020) reportó que en el año 2020 se produjeron en Colombia 11.079.538 litros de vinagre blanco a partir de la fermentación del alcohol de caña de azúcar, maíz o malta (Prada, 2015). El proceso de producción vinagre chino tradicional incluye principalmente la elaboración de Daqu (una bebida alcohólica que tiene entre 55-64% de etanol) para la fermentación alcohólica y fermentación de ácido acético (Kim et al., 2021).

Es importante generar una revisión bibliográfica para el uso y el aprovechamiento del lactosuero de forma tal que se apunte a la elaboración de un procedimiento de fácil implementación para la fermentación y cuantificación de productos de interés aprovechando su naturaleza química. Además de generar un ingreso adicional para los productores artesanales de quesos, también se contribuye a la disminución del impacto ambiental que este genera al aprovecharse el lactosuero. Además de lo anterior, permitirá que estudiantes de pregrado y postgrado de diferentes Instituciones Universitarias a futuro generen proyectos de investigación en el campo de optimización de procesos fermentativos en la Industria Alimentaria.

## Objetivos

### General

Revisar las diferentes metodologías empleadas para la producción de vinagre por fermentación del lactosuero, subproducto de quesos frescos a partir de un escaneo científico.

### Específicos

Revisar las condiciones de fermentación del lactosuero usando los microorganismos *Kluyveromyces marxianus* y *Acetobacter pasteurianus* para la producción de ácido acético.

Realizar la revisión bibliográfica para la cuantificación de la concentración de ácido acético.

Realizar un análisis de la información y establecer algún criterio para definir cuál es el procedimiento más adecuado para fermentar y cuantificar el ácido acético obtenido.

## Marco teórico

### Suero o Lactosuero del Queso.

El suero lácteo o lactosuero es uno de los principales subproductos agroindustriales en el proceso de producción de queso o caseína. El suero es el residuo líquido que queda después de que la leche ha sido cuajada y escurrida. La producción mundial de suero se estima en  $190 \times 10^6$  toneladas por año. Típicamente, se genera un volumen aproximado de 9 kg de suero en el proceso de producción de 1 kg de queso (Ramos et al., 2021). Los principales constituyentes del suero de leche son lactosa, minerales, proteínas solubles como  $\alpha$ -lactoalbúmina y  $\beta$ -lactoglobulina, así como otras moléculas pequeñas como péptidos y aminoácidos libres (Yadav et al., 2015).

### Ácido Acético y Vinagre.

La fórmula química del ácido acético es  $\text{CH}_3\text{-COOH}$ . De acuerdo con la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC), se denomina sistemáticamente ácido etanoico; su punto de fusión es  $16,6\text{ }^\circ\text{C}$  y el punto de ebullición es  $117,9\text{ }^\circ\text{C}$ . En disolución acuosa, puede perder un hidrogeno del grupo carboxilo para dar su base conjugada, el anión acetato. Su  $\text{pK}_{\text{aCH}_3\text{-COOH}} = 4,8$  a  $25\text{ }^\circ\text{C}$ , lo cual significa, que, a pH ligeramente ácido de 4,8, la mitad de la solución se habrá disociado en  $\text{CH}_3\text{-COO}^- + \text{H}^+$ . Esto hace que sea un ácido débil y en concentraciones adecuadas, pueda formar soluciones buffer con su base conjugada. La constante de disociación a  $20\text{ }^\circ\text{C}$  es  $K_{\text{a}} = 1,75 \cdot 10^{-5}$  (Verevkin, 2000).

El vinagre se usa ampliamente en la industria alimentaria como aditivo acidificante. El ácido acético es el principal componente del vinagre de frutas junto a otros ácidos orgánicos en menor proporción. El ácido acético es importante en la nutrición humana para la transformación completa de los azúcares y las grasas en energía y puede usarse de manera eficaz para evitar la

acumulación excesiva de estos materiales energéticos en el cuerpo. Además, el ácido acético puede promover el ablandamiento de los vasos sanguíneos y controlar el nivel de colesterol en la sangre. Los ácidos orgánicos se utilizan para mantener el equilibrio y la estabilidad del pH *in vivo* para funciones metabólicas y fisiológicas normales (Naziroğlu et al., 2014).

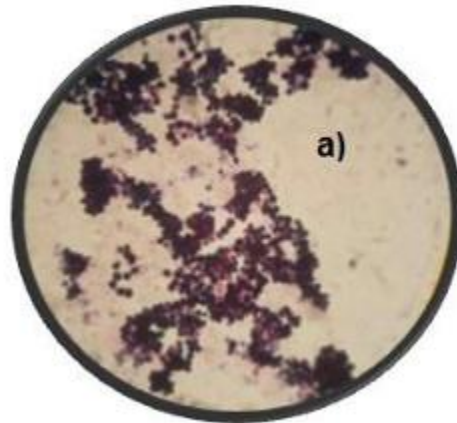
### ***Kluyveromyces marxianus.***

La levadura *Kluyveromyces marxianus* pertenece al género *Kluyveromyces* fue descrita por primera vez en 1888 por E.C. Hansen, y fue llamada en algún momento *Saccharomyces marxianus*; se ha aislado a partir de las uvas, sin embargo, también puede aislarse a partir de bebidas fermentadas como el kéfir, yogurt, así como el queso, la leche y fermentaciones espontáneas. Entre algunas de sus características, se encuentra que crece en una amplia variedad de sustratos y a altas temperaturas que oscilan entre 20° C hasta 39°C, un pH óptimo de entre 6-7, fermenta galactosa, sacarosa, rafinosa, lactosa. En la industria se ha empleado en el aprovechamiento del lactosuero y en la producción de etanol, pero tiende a producir una menor cantidad cuando existe un exceso de azúcares (Mendoza, 2013).

La lactosa del lactosuero puede ser fermentable por algunos microorganismos como *Kluyveromyces marxianus* evitando su presencia en los efluentes hídricos, pudiendo servir como materia prima para la fermentación alcohólica, en procesos masivos. La lactosa es un buen medio de cultivo para realizar procesos biotecnológicos (Padin & Diaz, 2009). *K. marxianus* también se usa para producir proteína unicelular a partir del lactosuero, en su caracterización microscópica presenta una forma circular como se muestra en la siguiente figura:

**Figura 1**

*Observación microscópica de la levadura K. marxianus, donde se observa en colonias teñidas en color azul intenso a un campo de 100X.*



Fuente (Mendoza, 2013).

***Acetobacter pasteurianus.***

Las bacterias acéticas provenientes del vinagre, también llamadas miembros del género *Acetobacter* se caracterizan por convertir el alcohol etílico ( $C_2H_5OH$ ) en ácido acético ( $CH_3CO_2H$ ) a través de una oxidación. El ácido acético se forma a partir de una reacción multipasos que incluye la transformación del almidón a azúcares a través de amilasas, la conversión anaeróbica de azúcares a etanol por medio de la fermentación con levaduras, la transformación de etanol a acetaldehído hidratado y la deshidrogenación por medio de la enzima aldehído deshidrogenasa para obtener ácido acético (Rodríguez & Sarabia, 2012).

Las bacterias del ácido acético (AAB), son una clase de bacterias Gramnegativas, estrictamente aeróbicas, que normalmente pertenecen a los géneros *Acetobacter*, *Gluconoacetobacter* y *Gluconobacter*, causan una rápida oxidación del etanol en ácido acético. Por lo tanto, se aplican ampliamente para la producción de vinagre. La producción moderna de



vinagre generalmente se lleva a cabo en fermentación sumergida con etanol como sustrato. La tasa de crecimiento de AAB depende en gran medida de las concentraciones de etanol y generalmente se inhibe por encima de 40 g/L (Chen et al., 2016).

El etanol afecta principalmente a la membrana plasmática mediante la alteración de la estructura de la membrana, la permeabilidad y el flujo de protones, lo que da como resultado un crecimiento celular lento y un bajo rendimiento de ácido acético. Sin embargo, cabe señalar que la fermentación para la obtención de ácido acético utilizando una alta concentración de etanol puede mejorar la concentración y la calidad del vinagre; Las especies de *Acetobacter*, especialmente *Acetobacter pasteurianus*, se utilizan en procesos tradicionales para la producción de vinagre donde la concentración de ácido acético no supera el 6% (v/v) (Matsutani et al., 2013).

## Metodología

Etapas para la recolección de la información o datos.

Primera fase: Revisión bibliográfica sobre la fermentación del lactosuero aplicando microorganismos.

Segunda fase: Revisión bibliográfica para la cuantificación de la concentración de ácido acético.

Tercera fase: Análisis de datos para proponer un procedimiento sencillo para la fermentación del lactosuero y la cuantificación de la concentración del ácido acético a obtener.

Las ecuaciones de búsqueda son:

Ecuación 1 (búsqueda de la fermentación del lactosuero y obtención de ácido acético): en esta ecuación se buscó referencias con palabras clave como fermentación acética, suero, ácido acético, y cuantificación desde el año 2015 hasta el año 2021.

Los criterios que se tuvieron en cuenta para la selección de artículos aplicando la ecuación 1 fue que la matriz agroalimentaria en la que se implementaron las fermentaciones fue lactosuero, los microorganismos usados *Kluyveromyces marxianus* y *Acetobacter pasteurianus*; lo que se revisó en cada artículo fueron los resultados obtenidos de las condiciones de fermentación como tiempo, temperatura optima de producción de etanol y ácido acético, rendimiento, afinidad de los microorganismos por el lactosuero. Se realizó una descripción de los resultados de cada artículo incluyendo imágenes, cuadros comparativos enunciados como tablas.

Acetic AND fermentation AND whey AND acetic AND acid AND lactose AND acetic AND acid AND quantification AND ( LIMIT-TO ( PUBYEAR , 2021 ) OR LIMIT-TO ( PUBYEAR , 2020 ) OR LIMIT-TO ( PUBYEAR , 2019 ) OR LIMIT-TO ( PUBYEAR , 2018 ) OR LIMIT-TO ( PUBYEAR , 2017 ) OR LIMIT-TO ( PUBYEAR , 2016 ) OR

LIMIT-TO ( PUBYEAR , 2015 )) AND ( LIMIT-TO ( SUBJAREA , "AGRI" ) OR LIMIT-TO ( SUBJAREA , "BIOC" ) OR LIMIT-TO ( SUBJAREA , "ENGI" ) OR LIMIT-TO ( SUBJAREA , "IMMU" ) OR LIMIT-TO ( SUBJAREA , "CENG" ) OR LIMIT-TO ( SUBJAREA , "CHEM" ) OR LIMIT-TO ( SUBJAREA , "ENVI" ) ).

Ecuación 2 (búsqueda de la cuantificación del ácido acético): con palabras clave como cuantificación de ácido acético, se realizó la consulta desde el año 2015 hasta el año 2021.

El criterio que se tuvo en cuenta para la selección de artículos aplicando la ecuación 2 fue la cuantificación de ácido acético producido por fermentación de lactosuero exclusivamente; lo que se revisó en cada artículo fueron las metodologías y los resultados obtenidos para la cuantificación del ácido mencionado anteriormente. Se realizó una descripción de los resultados de cada artículo incluyendo imágenes, cuadros comparativos enunciados como tablas.

Quantification AND acetic AND acid AND ( LIMIT-TO ( PUBYEAR , 2021 ) OR LIMIT-TO ( PUBYEAR , 2020 ) OR LIMIT-TO ( PUBYEAR , 2019 ) OR LIMIT-TO ( PUBYEAR , 2018 ) OR LIMIT-TO ( PUBYEAR , 2017 ) OR LIMIT-TO ( PUBYEAR , 2016 ) OR LIMIT-TO ( PUBYEAR , 2015 )) AND ( LIMIT-TO ( DOCTYPE , "ar" ) OR LIMIT-TO ( DOCTYPE , "re" )) AND ( LIMIT-TO ( SUBJAREA , "BIOC" ) OR LIMIT-TO ( SUBJAREA , "CHEM" ) OR LIMIT-TO ( SUBJAREA , "AGRI" ) OR LIMIT-TO ( SUBJAREA , "ENVI" ) OR LIMIT-TO ( SUBJAREA , "CENG" ) OR LIMIT-TO ( SUBJAREA , "IMMU" ) OR LIMIT-TO ( SUBJAREA , "ENGI" )) AND ( LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Food Chemistry" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Journal Of Chromatography B Analytical Technologies In The Biomedical And Life Sciences" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Frontiers In Microbiology" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Molecules" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "International

Journal Of Molecular Sciences" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Science Of The Total Environment" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Journal Of Agricultural And Food Chemistry" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Applied Microbiology And Biotechnology" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Food Research International" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Analytical Methods" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Environmental Science And Technology" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Chemical Reviews" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Food Analytical Methods" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Analytical And Bioanalytical Chemistry" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Chemical Engineering Journal" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Analytical Chemistry" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Foods" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Food Control" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Journal Of The Science Of Food And Agriculture" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "European Food Research And Technology" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Critical Reviews In Food Science And Nutrition" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "3 Biotech" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Trac Trends In Analytical Chemistry" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Analytical Letters" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Journal Of Dairy Science" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Green Chemistry" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Food And Function" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Journal Of Analytical Methods In Chemistry" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Journal Of Food Science" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Journal Of Food Science And Technology" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Trends In Food Science And Technology" ) OR LIMIT-TO (

EXACTSRCTITLE , "Analytical Biochemistry" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE ,  
"Journal Of Biotechnology" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Journal Of The  
American Chemical Society" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Applied Biochemistry  
And Biotechnology" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Biocatalysis And Agricultural  
Biotechnology" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "World Journal Of Microbiology And  
Biotechnology" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Biochemical Engineering Journal" )  
OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Biotechnology Advances" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE ,  
"Journal Of Chemical Technology And Biotechnology" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE ,  
"Journal Of Food Processing And Preservation" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE ,  
"Flavour And Fragrance Journal" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Frontiers In Bioengineering And Biotechnology" ) ) AND ( LIMIT-TO ( EXACTKEYWORD , "Chemistry" ) OR LIMIT-TO ( EXACTKEYWORD , "Acetic Acid" ) OR LIMIT-TO ( EXACTKEYWORD , "Limit Of Detection" ) OR LIMIT-TO ( EXACTKEYWORD , "Fermentation" ) OR LIMIT-TO ( EXACTKEYWORD , "Limit Of Quantitation" ) OR LIMIT-TO ( EXACTKEYWORD , "Volatile Organic Compounds" ) OR LIMIT-TO ( EXACTKEYWORD , "Isolation And Purification" ) OR LIMIT-TO ( EXACTKEYWORD , "Lactic Acid" ) OR LIMIT-TO ( EXACTKEYWORD , "Quantitative Analysis" ) OR LIMIT-TO ( EXACTKEYWORD , "Chemical Analysis" ) OR LIMIT-TO ( EXACTKEYWORD , "Volatile Organic Compound" ) OR LIMIT-TO ( EXACTKEYWORD , "Biomass" ) OR LIMIT-TO ( EXACTKEYWORD , "Chemical Structure" ) OR LIMIT-TO ( EXACTKEYWORD , "Food Analysis" ) OR LIMIT-TO ( EXACTKEYWORD , "Quality Control" ) OR LIMIT-TO ( EXACTKEYWORD , "Organic Acids" ) OR LIMIT-TO ( EXACTKEYWORD , "Sensitivity And Specificity" ) OR LIMIT-TO ( EXACTKEYWORD ,

"Principal Component Analysis" ) OR LIMIT-TO ( EXACTKEYWORD , "Concentration (parameters)" ) OR LIMIT-TO ( EXACTKEYWORD , "Chemical Composition" ) OR LIMIT-TO ( EXACTKEYWORD , "Analytic Method" ) OR LIMIT-TO ( EXACTKEYWORD , "Bacterial Growth" ) OR LIMIT-TO ( EXACTKEYWORD , "Microorganisms" ) OR LIMIT-TO ( EXACTKEYWORD , "Food Microbiology" ) OR LIMIT-TO ( EXACTKEYWORD , "Food Safety" ) ).

Para ampliar la búsqueda de información, se implementa la siguiente ecuación de búsqueda en SCOPUS, donde solamente se tendrá en cuenta como criterio de búsqueda el microorganismo *Kluyveromyces marxianus*:

Ecuación 3 (búsqueda del microorganismo *Kluyveromyces marxianus*): en esta ecuación se busca principalmente los estudios realizados con *Kluyveromyces marxianus* en suero lácteo desde 2016 hasta 2022.

El criterio que se tuvo en cuenta para la selección de artículos aplicando la ecuación 3 fue que el uso de *Kluyveromyces marxianus* para fermentación de lactosuero o lactosa; lo que se revisó en cada artículo fueron los resultados obtenidos de las condiciones de fermentación como tiempo, temperatura optima de producción de etanol, rendimiento, afinidad del microorganismo por el lactosuero. Se realizo una descripción de los resultados de cada artículo incluyendo imágenes, cuadros comparativos enunciados como tablas.

*Kluyveromyces* AND *marxianus* AND ( LIMIT-TO ( PUBYEAR , 2022 ) OR LIMIT-TO ( PUBYEAR , 2021 ) OR LIMIT-TO ( PUBYEAR , 2020 ) OR LIMIT-TO ( PUBYEAR , 2019 ) OR LIMIT-TO ( PUBYEAR , 2018 ) OR LIMIT-TO ( PUBYEAR , 2017 ) OR LIMIT-TO ( PUBYEAR , 2016 ) ) AND ( LIMIT-TO ( DOCTYPE , "ar" ) OR LIMIT-TO ( DOCTYPE , "re" ) ) AND ( LIMIT-TO ( SUBJAREA , "BIOC" ) OR LIMIT-

TO ( SUBJAREA , "IMMU" ) OR LIMIT-TO ( SUBJAREA , "CENG" ) OR LIMIT-TO ( SUBJAREA , "CHEM" ) OR LIMIT-TO ( SUBJAREA , "ENGI" )) AND ( LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Applied Microbiology And Biotechnology" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Foods" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Food Chemistry" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Applied Biochemistry And Biotechnology" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Food Microbiology" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "International Dairy Journal" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Journal Of Food Processing And Preservation" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "International Journal Of Dairy Technology" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Microbial Biotechnology" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Applied Food Biotechnology" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Food And Bioproducts Processing" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Shengwu Gongcheng Xuebao Chinese Journal Of Biotechnology" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Food Biotechnology" )) AND ( LIMIT-TO ( PUBSTAGE , "final" ) ).

Ecuación 4 (búsqueda para el *Acetobacter pasteurianus*): en esta ecuación se buscaron principalmente los estudios realizados con *Acetobacter pasteurianus* en suero lácteo desde 2016 hasta 2022.

El criterio que se tuvo en cuenta para la selección de artículos aplicando la ecuación 4 fue que el uso de *Acetobacter pasteurianus* para la oxidación de etanol producido de lactosuero; lo que se revisó en cada artículo fueron los resultados obtenidos de las condiciones de oxidación como tiempo, temperatura optima de producción de ácido acético, rendimiento, afinidad del microorganismo por el lactosuero. Se realizo una descripción de los resultados de cada artículo incluyendo imágenes, cuadros comparativos enunciados como tablas.

acetobacter AND pasteurianus AND ( LIMIT-TO ( PUBYEAR , 2022 ) OR LIMIT-TO ( PUBYEAR , 2021 ) OR LIMIT-TO ( PUBYEAR , 2020 ) OR LIMIT-TO ( PUBYEAR , 2019 ) OR LIMIT-TO ( PUBYEAR , 2018 ) OR LIMIT-TO ( PUBYEAR , 2017 ) OR LIMIT-TO ( PUBYEAR , 2016 ) ) AND ( LIMIT-TO ( SUBJAREA , "AGRI" ) OR LIMIT-TO ( SUBJAREA , "CENG" ) OR LIMIT-TO ( SUBJAREA , "CHEM" ) OR LIMIT-TO ( SUBJAREA , "ENGI" ) ) AND ( LIMIT-TO ( DOCTYPE , "ar" ) OR LIMIT-TO ( DOCTYPE , "re" ) ) AND ( LIMIT-TO ( PUBSTAGE , "final" ) ) AND ( LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "International Journal Of Food Microbiology" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Food Microbiology" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Food Research International" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Lwt" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Food Chemistry" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Journal Of The Korean Society Of Food Science And Nutrition" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Journal Of Biotechnology" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Korean Journal Of Food Preservation" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Bioscience Biotechnology And Biochemistry" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Biotechnology Advances" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "European Food Research And Technology" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Fermentation" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "3 Biotech" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Foods" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Frontiers In Bioengineering And Biotechnology" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Food Science And Biotechnology" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Journal Of Chemical Technology And Biotechnology" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Applied Biochemistry And Biotechnology" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Journal Of Industrial Microbiology And Biotechnology" ) OR LIMIT-



TO ( EXACTSRCTITLE , "Biotechnology Letters" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Current Opinion In Biotechnology" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "International Food Research Journal" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Systematic And Applied Microbiology" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Trends In Food Science And Technology" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Analytical Chemistry" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Biocatalysis And Agricultural Biotechnology" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Biotechnology And Applied Biochemistry" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Chemical Society Reviews" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Critical Reviews In Food Science And Nutrition" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Current Opinion In Food Science" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Current Research In Nutrition And Food Science" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Food And Bioproducts Processing" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Food Technology And Biotechnology" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Journal Of Food Science" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Microbial Biotechnology" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Applied Food Biotechnology" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "International Dairy Journal" ) ) AND ( LIMIT-TO ( LANGUAGE , "English" ) ).

Ecuación 5 para la cuantificación de ácido acético: en esta ecuación se buscaron referencias para los métodos de cuantificación de ácido acético desde 2016 hasta 2022.

El criterio que se tuvo en cuenta para la selección de artículos aplicando la ecuación 5 fue la cuantificación de ácido acético producido por fermentación de lactosuero; lo que se revisó en

cada artículo fueron las metodologías y los resultados obtenidos para la cuantificación del ácido mencionado anteriormente.

acetic AND acid AND titration AND ( LIMIT-TO ( PUBYEAR , 2022 ) OR LIMIT-TO ( PUBYEAR , 2021 ) OR LIMIT-TO ( PUBYEAR , 2020 ) OR LIMIT-TO ( PUBYEAR , 2019 ) OR LIMIT-TO ( PUBYEAR , 2018 ) OR LIMIT-TO ( PUBYEAR , 2017 ) ) AND ( LIMIT-TO ( SUBJAREA , "BIOC" ) OR LIMIT-TO ( SUBJAREA , "CHEM" ) OR LIMIT-TO ( SUBJAREA , "CENG" ) OR LIMIT-TO ( SUBJAREA , "ENGI" ) ) AND ( LIMIT-TO ( DOCTYPE , "ar" ) OR LIMIT-TO ( DOCTYPE , "re" ) ) AND ( LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Food Chemistry" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Journal Of Chromatography B Analytical Technologies In The Biomedical And Life Sciences" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Journal Of Chromatography A" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Journal Of Agricultural And Food Chemistry" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Analytica Chimica Acta" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Applied Microbiology And Biotechnology" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Chemical Reviews" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Microchemical Journal" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Analytical And Bioanalytical Chemistry" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Metabolites" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Analytical Chemistry" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Chemical Engineering Journal" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Food Additives And Contaminants Part A Chemistry Analysis Control Exposure And Risk Assessment" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Journal Of The Science Of Food And Agriculture" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Water Research" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Analytical Methods" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Critical Reviews In Food Science And Nutrition" ) OR

LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "3 Biotech" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Fermentation" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Journal Of AOAC International" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Journal Of Dairy Science" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Food Control" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Journal Of Analytical Methods In Chemistry" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Journal Of Food Processing And Preservation" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Journal Of Biotechnology" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Analytical Biochemistry" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Biotechnology Advances" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Biotechnology And Bioengineering" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "International Journal Of Food Science And Technology" ) OR LIMIT-TO ( EXACTSRCTITLE , "Journal Of Chemical Technology And Biotechnology" ) ) AND ( LIMIT-TO ( EXACTKEYWORD , "Chemistry" ) OR LIMIT-TO ( EXACTKEYWORD , "Procedures" ) OR LIMIT-TO ( EXACTKEYWORD , "Acetic Acid" ) OR LIMIT-TO ( EXACTKEYWORD , "Fermentation" ) OR LIMIT-TO ( EXACTKEYWORD , "Isolation And Purification" ) OR LIMIT-TO ( EXACTKEYWORD , "Metabolites" ) OR LIMIT-TO ( EXACTKEYWORD , "Chemical Analysis" ) OR LIMIT-TO ( EXACTKEYWORD , "Chemical Structure" ) OR LIMIT-TO ( EXACTKEYWORD , "Analytic Method" ) OR LIMIT-TO ( EXACTKEYWORD , "Ethanol" ) OR LIMIT-TO ( EXACTKEYWORD , "Oxidation" ) OR LIMIT-TO ( EXACTKEYWORD , "Chemical Composition" ) OR LIMIT-TO ( EXACTKEYWORD , "Acetic Acid Derivative" ) OR LIMIT-TO ( EXACTKEYWORD , "Organic Acids" ) ).

La ecuación 5 no generó ningún resultado, por lo cual se recurre a la metodología de búsqueda tradicional para la cuantificación de ácido acético teniendo en cuenta los criterios de búsqueda anteriormente descritos.

## Resultados y análisis de resultados

Se realizó una amplia consulta bibliográfica, donde se seleccionó el motor de búsqueda SCOPUS como la herramienta principal para la búsqueda de artículos científicos y de revisión referentes a la producción de etanol por fermentación aplicando el microorganismo *Kluyveromyces marxianus*; también se realizó la búsqueda para la producción de ácido acético aplicando el microorganismo *Acetobacter pasteurianus*, el cual toma como sustrato el etanol producido por *Kluyveromyces marxianus*; también se realizó una búsqueda para diferentes métodos de cuantificación de ácido acético de fácil implementación, los cuales fuesen adecuados para que sea aplicado por cualquier persona sin muchos conocimientos del tema. Para lo anterior, se tuvo en cuenta la información publicada desde el año 2015. Las revistas y áreas temáticas que se tuvieron en cuenta fueron las siguientes: Food Chemistry, Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, Journal of Agricultural and Food Chemistry, Analytica Chimica Acta, Applied Microbiology and Biotechnology, Chemical Reviews, Microchemical, Analytical and Bioanalytical Chemistry, Metabolites, Analytical, Chemical Engineering, Food Additives and Contaminants Part A Chemistry Analysis Control Exposure and Risk Assessment, Journal of the Science of Food and Agriculture, Water Research, Analytical Methods, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, Biotech, Fermentation, Journal of AOAC, Journal of Dairy Science, Food Control, Journal of Analytical Methods in Chemistry, Journal of Food Processing and Preservation, Journal of Biotechnology, Analytical Biochemistry, Biotechnology Advances, Biotechnology and Bioengineering, International Journal of Food Science and Technology, Journal of Chemical Technology and Biotechnology.

A continuación, se presenta los resultados obtenidos al aplicar las ecuaciones 1, 2, 3, 4 y 5, de los cuales se encontraron 39 artículos en total como se describe a continuación:

Ecuación 1 y 2: 1531 artículos de los cuales se seleccionaron 5.

Ecuación 3: 342 artículos de los cuales se seleccionaron 18.

Ecuación 4: 196 artículos de los cuales se seleccionaron 16.

Ecuación 5: 48 artículos de los cuales se seleccionaron 0.

Los 39 artículos se seleccionaron debido a que tenían relación con la fermentación del lactosuero, los microorganismos de interés, producción de etanol usando como sustrato lactosa, producción de ácido acético usando como fuente de sustrato etanol y la caracterización de ácido acético mediante diferentes técnicas de análisis.

### **Análisis y Comportamiento de la Ecuación 1**

Al observar el análisis estadístico suministrado por SCOPUS para la ecuación de búsqueda 1, en las figuras 2, 3 y 4 se obtuvo lo siguiente:

#### **Figura 2**

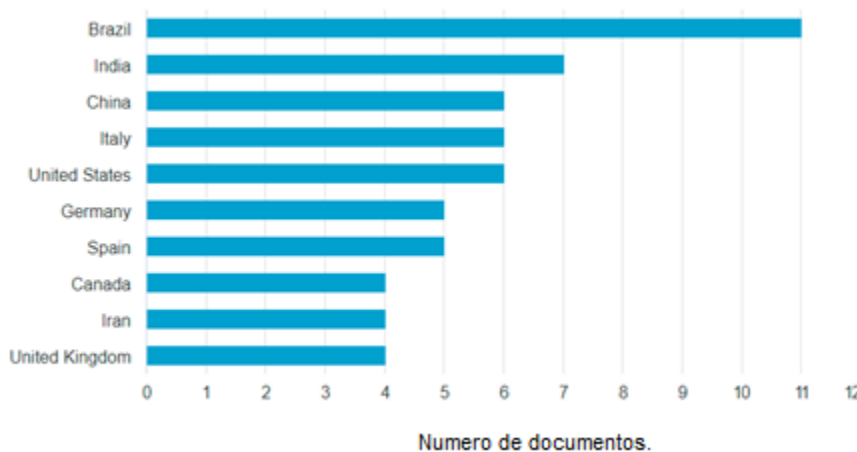
*Numero de publicaciones para la ecuación de búsqueda 1 desde el año 2015-2021.*



Fuente SCOPUS.

### Figura 3

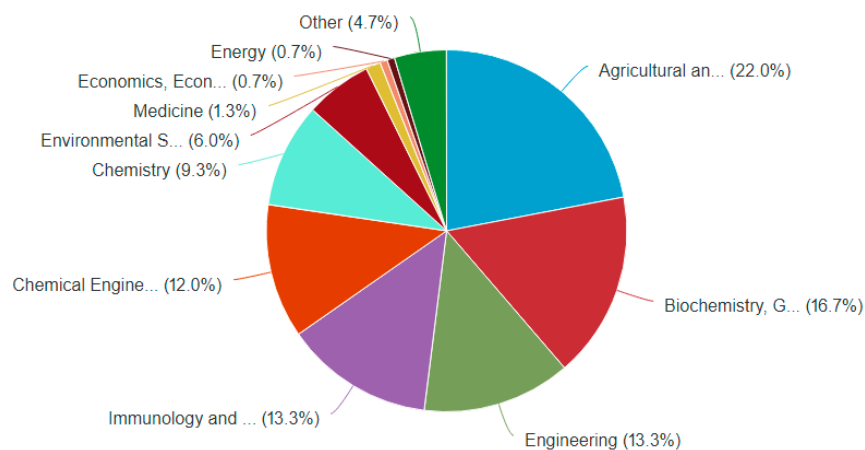
*Numero de publicaciones por país para la ecuación de búsqueda 1.*



Fuente SCOPUS.

### Figura 4

*Documentos por área temática para la ecuación de búsqueda 1.*



Fuente SCOPUS.

De acuerdo con la figura 2, se observó que el año 2018 fue el año en el que más se publicaron artículos referentes a la fermentación del lactosuero y obtención de ácido acético (15 artículos); la figura 3 indico que el país que más público fue Brasil (11 artículos) y según la

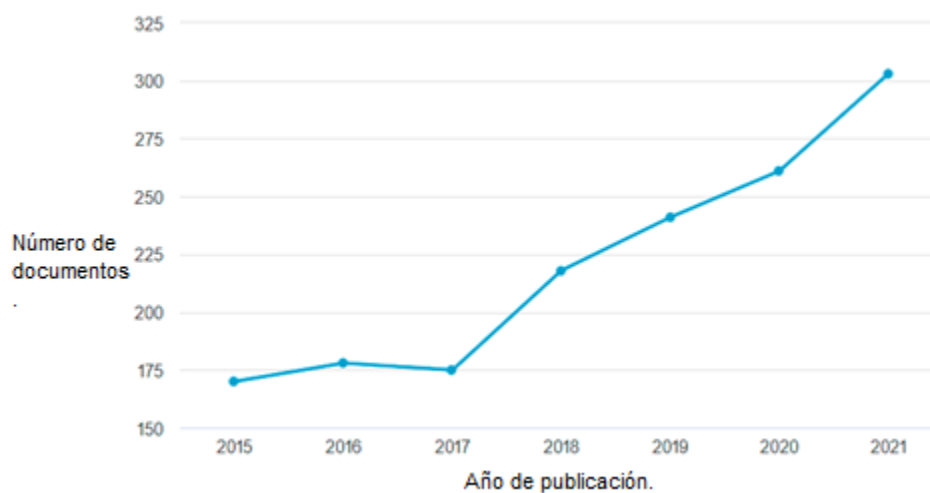
figura 4, el área temática con mayor impacto fue el de Ciencias Agrícolas y Biológicas (22,0%) seguido de Bioquímica, Genética y Biología Molecular (16,7%), ingeniería (16,7%), Bioquímica, Genética y Biología Molecular (16,7%). Con respecto a la cantidad de publicaciones, sucedió probablemente a que en el primer trimestre del año 2018 en la región de América del Sur se sufrió bastante por el fenómeno de la niña y los expertos afirmaron que durante todo este año se duplicaría la producción de leche por lo cual se generaron más investigaciones en la agroindustria láctea en cuanto al aprovechamiento de subproductos especialmente en Brasil.

### **Análisis y Comportamiento de la Ecuación 2.**

Observando el análisis estadístico suministrado por SCOPUS para la ecuación de búsqueda 2, en las figuras 5, 6 y 7 se obtuvo lo siguiente:

#### **Figura 5**

*Numero de publicaciones para la ecuación de búsqueda 2 desde el año 2015-2021.*

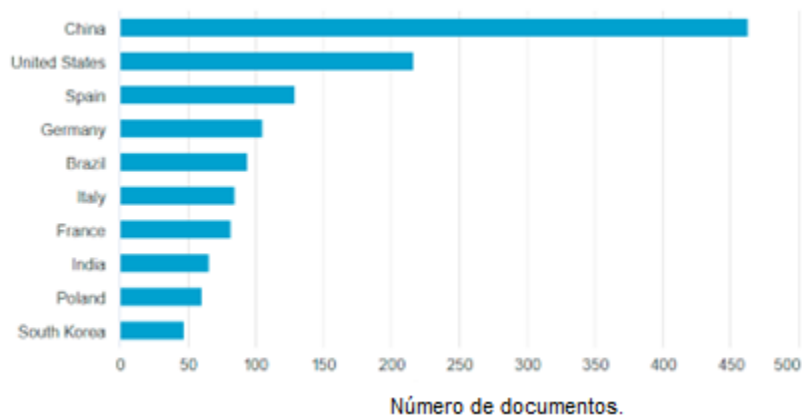


Fuente SCOPUS.



**Figura 6**

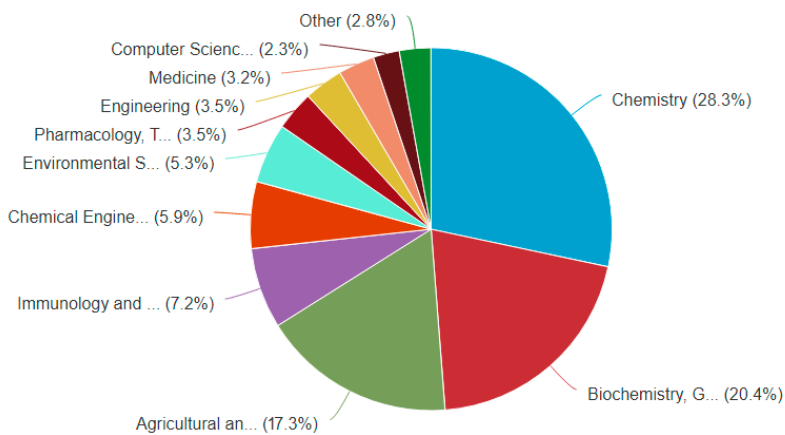
*Numero de publicaciones por país para la ecuación de búsqueda 2.*



Fuente SCOPUS.

**Figura 7**

*Documentos por área temática para la ecuación de búsqueda 2.*



Fuente SCOPUS.

Basándose en la figura 5, se observó que el año 2021 fue el año en el que más se publicaron artículos referentes a la cuantificación de ácido acético (303 artículos); según la figura 6, el país que más publicó fue China (462 artículos) y de acuerdo con la figura 7, el área temática con mayor impacto fue el de Química (28,3%) seguido de Bioquímica, Genética y

Biología Molecular (20,4%), Ciencias Agrícolas y Biológicas (17,3%). Respecto a la cantidad de publicaciones del año 2021 durante la pandemia se buscaron nuevos desinfectantes de superficies para combatir el COVID-19, por lo cual el ácido acético fue una opción explorada mayoritariamente en China por ser el epicentro de origen de la enfermedad.

### **Análisis y Comportamiento de la Ecuación 3**

Al observar el análisis estadístico suministrado por SCOPUS para la ecuación de búsqueda 3, en las figuras 8, 9 y 10 se generó lo siguiente:

#### **Figura 8**

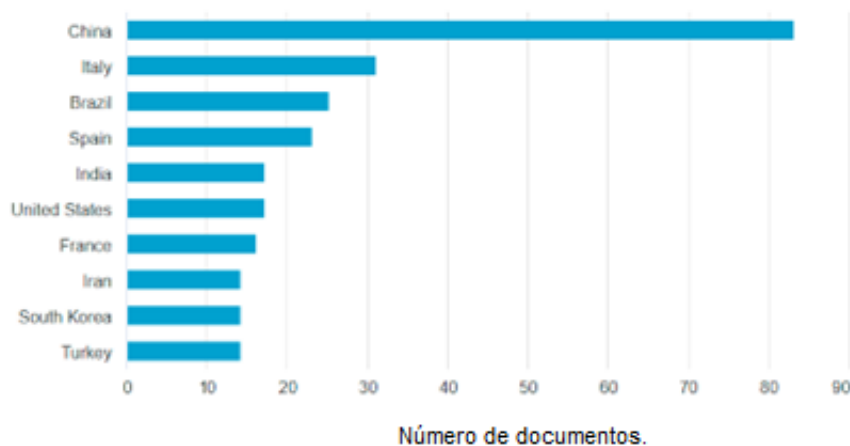
*Numero de publicaciones para la ecuación de búsqueda 3 desde el año 2016-2022.*



Fuente SCOPUS.

### Figura 9

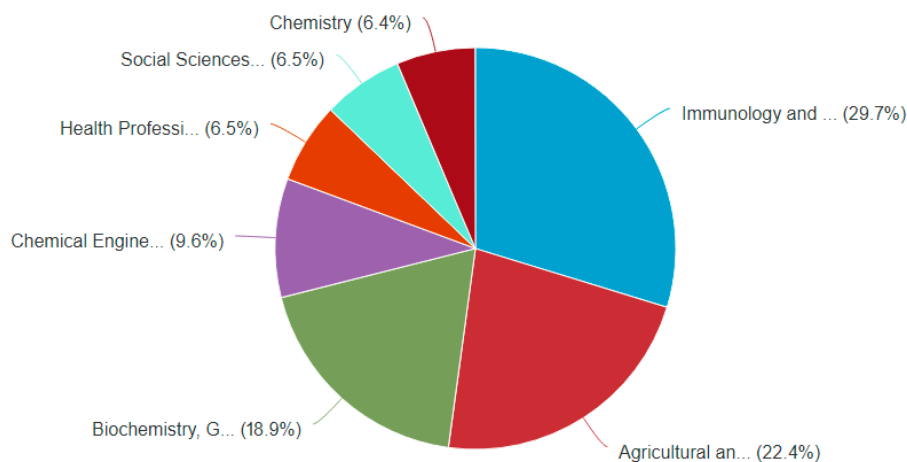
Numero de publicaciones por país para la ecuación de búsqueda 3.



Fuente SCOPUS.

### Figura 10

Documentos por área temática para la ecuación de búsqueda 3.



Fuente SCOPUS.

De acuerdo con la figura 8, el año 2021 fue en el que más se publicaron artículos referentes al uso del microorganismo *Kluyveromyces marxianus* (81 artículos); el país que más publicó fue China (83 artículos) y el área temática con mayor impacto fue el de Inmunología y

Microbiología (29,7%) seguido de Ciencias Agrícolas y Biológicas (22,4%) y Bioquímica, Genética y Biología Molecular (18,9%). Durante el año 2021, se generó una fuerte tendencia en el consumo y producción de cervezas artesanales, por lo cual la ciencia investigó sobre levaduras no convencionales para su producción y *Kluyveromyces marxianus* fue uno de los microorganismos más estudiados y esta puede ser una de las razones por la cual se publicó mayoritariamente, desde el año 2016 la tendencia es creciente.

#### **Análisis y Comportamiento de la Ecuación 4**

Observando el análisis estadístico suministrado por SCOPUS para la ecuación de búsqueda 4, en las figuras 11, 12 y 13 se generó la siguiente información:

#### **Figura 11**

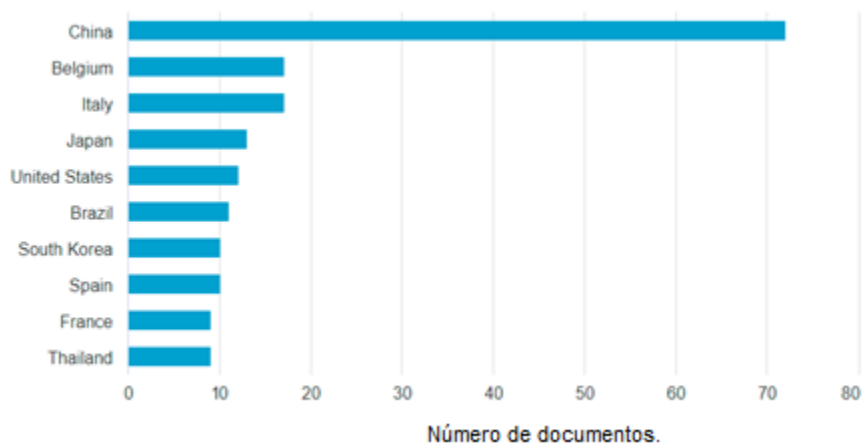
*Numero de publicaciones para la ecuación de búsqueda 4 desde el año 2016-2022.*



Fuente SCOPUS.

**Figura 12**

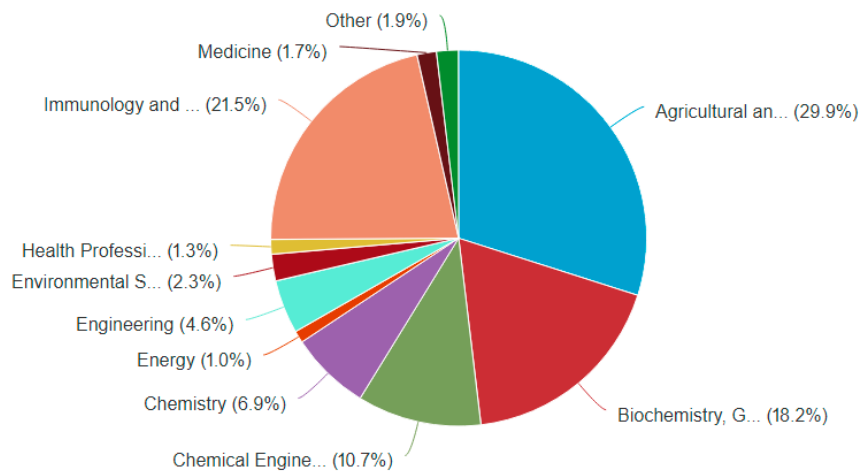
Numero de publicaciones por país para la ecuación de búsqueda 4.



Fuente SCOPUS.

**Figura 13**

Documentos por área temática para la ecuación de búsqueda 4.



Fuente SCOPUS.

De acuerdo con la figura 11, se observó que el año 2021 fue en el que más se publicaron artículos referentes al uso del microorganismo *Acetobacter pasteurianus* (46 artículos); el país que más publicó fue China (72 artículos) y el área temática con mayor impacto fue el Ciencias

Agrícolas y Biológicas (29,9%) seguido de Inmunología y Microbiología (21,5%) y Bioquímica, Genética y Biología Molecular (18,2%). En el año 2021 se realizaron investigaciones sobre alternativas para la producción de ácido acético usando biotecnología como la fermentación con *Acetobacter pasteurianus*, lo anterior con el fin de usar diferentes agentes desinfectantes para inhibir el COVID-19, lo que posiblemente estimulo la investigación de este microorganismo.

### **Análisis y Comportamiento de la Ecuación 5**

Debido a que no se obtuvieron artículos referentes a la cuantificación de ácido acético, no se realiza el análisis de la información encontrada con esta ecuación.

## **Condiciones de Fermentación con la Aplicación de los Microorganismos *Kluyveromyces***

### ***Marxianus y Acetobacter Pasteurianus***

A continuación, se realizará una breve descripción de los procesos de fermentación, la aplicación de los microorganismos *Kluyveromyces marxianus* y *Acetobacter pasteurianus* y sus condiciones generales para la producción de etanol y vinagre respectivamente, aprovechando el lactosuero y analizando estudios en otros sustratos como la lactosa que podrían ser útiles para establecer los parámetros fisicoquímicos de elaboración de vinagre del suero.

La fermentación es un proceso metabólico que generalmente transforma bioquímicamente glúcidos en ácidos, gases o en alcoholes para extraer una parte de la energía química mientras reoxida las coenzimas reducidas por sus reacciones; las condiciones para que suceda el proceso de fermentación son: humedad del medio, sustrato o alimento base (por lo general son azúcares), temperatura óptima de crecimiento microbiano la cual va a depender del microorganismo a usar en la fermentación y el tiempo óptimo de crecimiento microbiano (Tortora et al., 2007).

La fermentación usa microorganismos principalmente para la obtención de productos de valor añadido (Sadh et al., 2018) y puede utilizarse para promover la hidrólisis de polímeros a partir de azúcares, sintetizar moléculas bioactivas, degradar factores tóxicos o antinutricionales (Verardo et al., 2020). Esto puede suceder de la siguiente forma: los microorganismos producen grandes cantidades de metabolitos primarios o secundarios, aumentando el valor nutricional y los microorganismos pueden excretar enzimas y ácidos que se aplican a los polímeros, descomponiéndolos en unidades más pequeñas, mejorando su digestibilidad y biodisponibilidad (Septembre-Malaterre et al., 2018).

### *Kluyveromyces marxianus*

Es importante resaltar que el *K. marxianus* se usa como productor de enzimas, por lo que se relacionan estudios referentes a la producción de etanol en sustratos similares y no similares al SQ donde se realizó una breve descripción teniendo en cuenta otros microorganismos.

El estudio de la producción de bioetanol de Chupaza et al., (2021) afirmó que se produjo etanol por hidrólisis separada y fermentación utilizando *Azolla filiculoides* como biomasa. La hidrólisis ácida térmica y la sacarificación enzimática se utilizaron como métodos de pretratamiento para producir monosacáridos a partir de *Azolla*. La producción de etanol con sus respectivos coeficientes de rendimiento a partir del hidrolizado de la maleza *Azolla* utilizando *Kluyveromyces marxianus*, *Candida lusitanae*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia stipitis* fueron de 26,8 g/L ( $Y_{EtOH} = 0,43$ ), 23,2 g/L ( $Y_{EtOH} = 0,37$ ), 18,2 g/L ( $Y_{EtOH} = 0,29$ ) y 13,7 g/L ( $Y_{EtOH} = 0,22$ ), respectivamente. El bioetanol a partir de hidrolizado de maleza *Azolla* se puede producir con éxito utilizando *Kluyveromyces marxianus* porque consumió la mezcla de glucosa y xilosa por completo en 60h.

Según el estudio de Marcus et al., (2021) del aprovechamiento del permeado de suero por fermentaciones generadas por levaduras y mohos en condiciones anóxicas y óxicas, *K. marxianus* utilizó la lactosa de manera más eficiente, en presencia y en ausencia de oxígeno resultó un valor cero (0) de cada azúcar medido después de la fermentación (lactosa, glucosa y galactosa principalmente); por lo cual, en medio anaeróbico se produjo 4,52% de etanol siendo el valor más alto comparándose con los demás microorganismos de interés en el estudio (*Kluyveromyces lactis*, *Dekkera anomala*, *Brettanomyces claussenii*, *Brettanomyces bruxellensis*); las especies de moho (*Mucor genevensis* y *Aureobasidium pullulans*) en medio aerobio, se generó una concentración de etanol de 0,68%.



En la revisión de Nurcholis et al., (2020) sobre la integración de datos y herramientas biotecnológicas para aplicaciones industriales de *Kluyveromyces marxianus*, indico que esta levadura tiene características especiales para su posterior uso en la industria. De hecho, se ha utilizado para la producción de diversas enzimas, productos químicos y macromoléculas, además del uso de biomasa celular como materiales nutricionales, piensos y probióticos. La levadura es un productor de etanol con ventajas sobre *Saccharomyces cerevisiae* en términos de alta tasa de crecimiento, termotolerancia y un amplio espectro de consumo de azúcares. Los resultados de los análisis exhaustivos de su genoma y transcriptoma pueden acelerar los estudios de aplicaciones de la levadura y pueden aumentar aún más su potencial mediante la combinación con herramientas biotecnológicas recientes. El estudio no genera datos numéricos sobre la concentración de etanol producido.

El estudio referente al Factor de Severidad y Eliminación de Hidroxi Metil Furfural (HMF) de Sukwong et al., (2019), indica que la *Gracilaria verrucosa*, es un alga roja adecuada para la producción de bioetanol por su alto contenido de azúcares. Las condiciones para optimizar hidrólisis ácida hipertérmica (HT) fueron *G. verrucosa* al 12% (p/v) con 0,2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 130°C durante 15 min. Esta HT produce 50,7 g/L de monosacáridos. La concentración máxima de monosacáridos fue de 58,0g/L, donde se logró el 96,6% de la producción teórica de monosacáridos a partir de 120 g/L de peso seco de suspensión de *G. verrucosa* después de HT y sacarificación enzimática. La fermentación se realizó eliminando un compuesto inhibidor, mediante la adaptación de las levaduras *Pichia stipitis* y *Kluyveromyces marxianus* a la galactosa, las cuales produjeron etanol, con un rendimiento (Y<sub>EtOH</sub>) de 0,50 y 29,0 g/L respectivamente. La productividad de bioetanol con *Pichia stipitis* adaptada a galactosa es superior a la de *Kluyveromyces marxianus* adaptada a galactosa, con una tasa de 0,81 y 0,35

g/L/h, respectivamente. Los resultados de este estudio se pueden aplicar a la producción de bioetanol a escala industrial a partir de algas marinas.

El estudio de É. de P. Alves et al., (2019) donde se comparó la producción de bioetanol y beta-galactosidasa por cepas de *K. marxianus* y *Saccharomyces fragilis* en SQ, las condiciones para la fermentación en 50g/L (3,3% lactosa) y 150g/L (8,8% lactosa) en SQ fueron a 100 rpm durante 24 h a 30, 35 y 40 °C. *Saccharomyces fragilis* IZ 275 en lactosa al 8,8 % a 40 °C dio como resultado etanol al 3,90%. Para la cepa de *Kluyveromyces marxianus* CCT 3172 en lactosa al 8,8 % a 40 °C dio como resultado etanol al 0,41% y mostró mayor beta-galactosidasa, 1,10 U/mg, a 30 °C. Por lo tanto, la cepa de *Kluyveromyces marxianus* CCT 1821 no es adecuada para producir etanol a escala industrial o por lo menos para producir vinagre.

El estudio de Du et al., (2019) sobre la producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica aplicando algunas levaduras informo que la bioconversión eficiente del sustrato anteriormente descrito es uno de los desafíos prometedores a futuro para la producción de bioetanol y otros productos químicos. El proceso de fermentación mostró que *Kluyveromyces marxianus* CICC 1727-5 pudo producir etanol a partir de glucosa a una velocidad de 4,2 g/L/h, superando la productividad de 0,258 g/L/h de *S. passalidarum* ATCC MYA-4345. La concentración máxima de etanol con *K. marxianus* CICC 1727-5 y *S. passalidarum* ATCC MYA-4345 fue de 42,6 y 31,9 g/L, respectivamente. En el proceso de sacarificación y cofermentación (SSCF) utilizando mazorca de maíz no detoxificada, *K. marxianus* CICC 1727-5 mostró un mejor desempeño, además fue más tolerante en presencia de ácido fórmico, ácido acético e inhibidores mixtos e incluso creció en el medio con una concentración de ácido acético de hasta 15 g/L. *K. marxianus* CICC 1727-5 es una cepa candidata prometedora para implementar

ingeniería metabólica con el fin de desarrollar cepas industriales robustas para la producción de etanol lignocelulósico.

El estudio de Varela et al., (2017) afirmó que las especies *Kluyveromyces lactis* y *Kluyveromyces marxianus*, son levaduras fermentadoras de lactosa, gracias a los genes *LAC12* y *LAC4*, que codifican la lactosa permeasa y  $\beta$ -galactosidasa intracelular, respectivamente; ambas levaduras se extraen de alimentos, frutas y plantas, así como de derivados lácteos fermentados. *K. marxianus* genera un óptimo metabolismo fermentativo que la levadura *K. lactis*, incluso a altas temperaturas (45-50°C), por tanto, se prefiere a *K. marxianus* para la conversión de lactosa a bioetanol.

De acuerdo con el estudio de Rodrigues et al., (2016) sobre la producción de etanol a partir de bagazo de manzana de anacardo utilizando procesos de hidrólisis y fermentación separadas (SHF) y sacarificación y fermentación simultáneas (SSF), realizaron un cribado de cepas de *Kluyveromyces* por SHF y se obtuvo una concentración máxima de etanol de 24,1gL<sup>-1</sup> utilizando la cepa de *Kluyveromyces marxianus ATCC36907*, que presentó características similares al compararse con los resultados obtenidos por una cepa de *Saccharomyces*. El autor investigó el efecto de la temperatura en la producción de etanol conducida por SHF usando *K. marxianus ATCC36907*, y se obtuvo el máximo rendimiento de etanol ( $Y_{E/G}=0,46g$ ) a 40°C utilizando un medio sintético. En el SHF con hidrolizado de CAB-OH, la máxima concentración de etanol obtenida fue de 24,9gL<sup>-1</sup>, una tasa de crecimiento de 5,92gL<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> y un rendimiento de etanol de 0,43g a 40 °C. Posteriormente se usó *K. marxianus ATCC36907* en la bioconversión de CAB-OH por SSF, se obtuvo una concentración de etanol de 41.41gL<sup>-1</sup> usando 10 % de CAB-OH a 40°C, 150 rpm y 24h, resultando en una  $Y'_{E/G}$  de 0.50g y una eficiencia de 98.4%, en el proceso realizado suplementando con celobiosa.

A continuación, se presenta estudios referentes al rendimiento en la producción de etanol usando *K. marxianus*, teniendo en cuenta las condiciones como tiempos, temperatura de crecimiento microbiano y en algunos casos la comparación del rendimiento con otros microorganismos en SQ. También se describen estudios de la resistencia al etanol y consumo de azúcares de *K. marxianus* en SQ y medios distintos.

El *K. marxianus* puede expresar una gran variedad de cepas para la fermentación de lactosa, por lo que la selección de alguna cepa es esencial para optimizar los rendimientos en la producción de etanol. Las cepas seleccionadas deben expresar tolerancia y termo-tolerancia al etanol para evitar efectos inhibidores sobre el crecimiento de levaduras debido a la represión de catabolitos y reducir la tasa de enfriamiento en los bioprocesos de producción de etanol. El lactosuero después de la fermentación alcohólica puede alcanzar un contenido de etanol alrededor del 6% (v/v), lo que permite la producción tanto de vinagre como de algunas bebidas a base ácido acético de baja concentración como el brebaje, kombucha entre otros (Zotta et al., 2020).

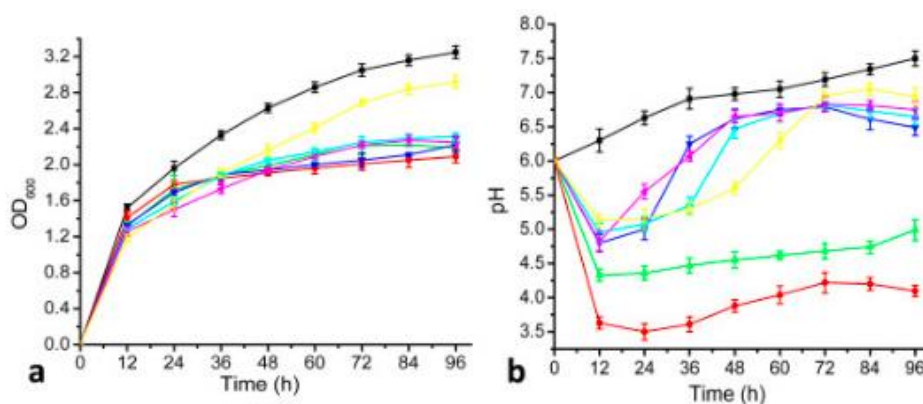
El estudio de Kokkiligadda et al., (2016) sobre el uso del SQ con inmovilización sinérgica de  $\beta$ -galactosidasa y células de *Saccharomyces cerevisiae*, indica que la lactosa presente en el SQ se considera un contaminante ambiental y su uso para la producción de enzimas y combustibles puede ser eficiente en la inactivación bioquímica del suero. Se ensayaron cinco cepas para la producción de  $\beta$ -galactosidasa usando suero. La actividad máxima de  $\beta$ -galactosidasa de 1,74 UI/mg en peso seco del SQ se logró utilizando *K. marxianus* MTCC 1389 y mostro una actividad optima a 35°C. Se logró aproximadamente un 89 % de la hidrólisis de lactosa para el suero concentrado (100 g/L) y se mantuvo una actividad catalítica del 89 %

después de 15 ciclos de reutilización. Se logró una concentración máxima de etanol de 28,9 g/L durante el proceso de fermentación.

De acuerdo con el estudio de Karim & Aider, (2022), se evaluó el crecimiento microbiano y la producción de biomasa de la cepa *K. marxianus* usando varios medios a base de suero y los resultados obtenidos se presentan en la siguiente figura:

### Figura 14

*Crecimiento de Kluyveromyces marxianus en diferentes sustratos a base de suero a 30°C durante 96h de fermentación.*



*Nota.* (a) Perfil de crecimiento de biomasa y (b) evolución del pH (■, caldo YM (medio levadura-moho); ■, lactosa; ■, permeado de suero ; ■, suero; ■, lactosa electroactivada; ■, permeado de suero de leche electroactivado; ■, suero de leche electroactivado); (■, 24 horas; ■, 48 horas; ■, 72 horas; ■, 96 h) (abreviaturas: EA= lactosa electroactivada; PS= permeado de suero; PS-EA= permeado de suero electroactivado; EA-S= suero electroactivado). Tomado de (Karim & Aider, 2022)

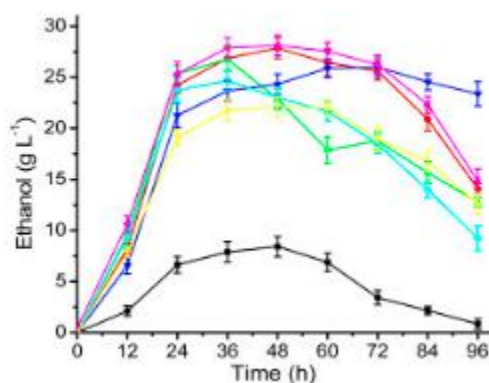
La figura 14a muestra que la cinética de crecimiento celular siguió tendencias similares para todos los sustratos, donde el caldo YM logró el mayor crecimiento seguido del medio de (EA-S). No se observaron diferencias significativas en la cinética de crecimiento en (PS), (PS-EA), lactosa y (EA). Sin embargo, se notó una diferencia significativa entre el crecimiento de *K.*

*marxianus* en medios como el suero y EA-S. Como puede verse en la figura 14b, el pH disminuyó significativamente dentro de las 12h de fermentación para todos los medios a base de suero. Esto se debe a que la levadura produce las enzimas para fermentar la lactosa o la glucosa; se han adaptado a las condiciones ácidas del medio con la producción de ácidos orgánicos, incluidos los ácidos láctico y acético u otros productos ácidos (C. S. J. Alves et al., 2020). Aunque el crecimiento inicial del *K. marxianus* se caracterizó por un mayor crecimiento en medios de lactosa en comparación con SQ, el crecimiento se vio obstaculizado después de cierto tiempo, lo que generó un descenso del pH de los medios ricos en lactosa (Karim & Aider, 2022).

Con respecto a la producción de etanol, Karim & Aider, (2022) obtuvieron los siguientes resultados:

### Figura 15

*Producción de etanol, durante la fermentación de varios medios.*



Nota. (■), caldo YM (medio levadura-moho); (■), lactosa; (■), permeado de suero ; (■), suero; (■), lactosa electroactivada; (■), permeado de suero de leche electroactivado; (■), suero de leche electroactivado) a 30 °C. Tomado de (Karim & Aider, 2022).

De acuerdo con la figura 15, se muestra que el caldo YM obtuvo la menor producción de etanol de 8.42 gL<sup>-1</sup> a las 48 h mientras que la mayor producción de etanol (28.13 gL<sup>-1</sup> a las 48 h)

en el suero no electroactivado seguido de lactosa (27,85 gL<sup>-1</sup> a las 48 h), EA (26,77 gL<sup>-1</sup> a las 36 h), PS (25,99 gL<sup>-1</sup> a las 72 h), EA-WP (24,66 gL<sup>-1</sup> a las 36 h), y EA-S (22,06 gL<sup>-1</sup> a las 48 horas) (Karim & Aider, 2022). Lo anterior indica que *K. marxianus* es un microorganismo que se adapta de manera eficiente con SQ no electroactivado.

### **Resistencia de *Kluyveromyces marxianus* a Medios Concentrados de Etanol**

El estudio de de Moura Ferreira et al., (2022) de respuesta al estrés por altas concentraciones de etanol, indico que las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* como PE<sub>2</sub> y CA1185 toleran altas concentraciones de etanol, ya que más del 85% de las células aún son viables hasta 140 g L<sup>-1</sup> de etanol. Por lo contrario, con las cepas de *K. marxianus* CCT 7735 en medio permeado de SQ se deterioraron en concentraciones de etanol superiores a 50 gL<sup>-1</sup>. En general, el crecimiento del *K. marxianus* CCT 7735, se vio afectado en concentraciones de etanol que oscilaban entre el 5 y el 10% (v/v) a 30 °C en medio YPD (2 % extracto de levadura, 1 % peptona y 2 % glucosa (p/v)). Se puede afirmar que la cepa de *K. marxianus* CCT 7735 es apta para la producción de etanol en la elaboración de vinagre del suero.

En estudio de la tolerancia al etanol de 4 cepas de *Kluyveromyces marxianus* CCT<sub>7735</sub> (ETS<sub>1</sub>, ETS<sub>2</sub>, ETS<sub>3</sub> y ETS<sub>4</sub>) por evolución adaptativa en laboratorio de da Silveira et al., (2020), indican que las anteriores mostraron potencial para producir etanol a partir de lactosa; sin embargo, su baja tolerancia al etanol fue un inconveniente para su aplicación industrial. La ETS<sub>4</sub> fue seleccionada por mostrar una tasa de crecimiento específica superior a la cepa parental bajo estrés por etanol (122 %) y una tasa específica de producción de etanol (0,26g/h) superior a las presentadas por la ETS<sub>1</sub> (0,22g/h), ETS<sub>2</sub> (0,17g/h) y ETS<sub>3</sub> (0,17g/h) en condiciones sin estrés. Además, los contenidos de ésteres metílicos de ácidos grasos y ergosterol fueron mayores en la ETS<sub>4</sub> que en la cepa parental, contribuyendo a mejorar la tolerancia al etanol en el ETS<sub>4</sub>.

El estudio de Diniz et al., (2017) sobre el análisis del transcriptoma de *Kluyveromyces marxianus* CCT7735 bajo estrés por etanol, donde se indica que a diferencia de *Saccharomyces cerevisiae*, *K. marxianus* no puede tolerar altas concentraciones de etanol. Reportaron las alteraciones del perfil genómico en *K. marxianus* bajo estrés por etanol para obtener información sobre los mecanismos involucrados en la respuesta al etanol. Los cambios dependientes del tiempo se caracterizaron bajo la exposición de etanol al 6% y se compararon con las células no estresadas antes de la adición de etanol. Los resultados revelaron que el flujo metabólico a través de las vías metabólicas centrales se ve afectado por el estrés debido a las altas concentraciones de etanol. Sorprendentemente, la expresión de algunas enzimas codificantes de genes relacionadas con la biosíntesis de ácidos grasos insaturados y ergosterol disminuye con la exposición al etanol, las mediciones de ácidos grasos libres y ergosterol demuestran que su contenido en *K. marxianus* no cambia bajo este estrés. Estos resultados indican que la composición de la estructura de la membrana de *S. cerevisiae* y *K. marxianus* son distintas difieren, lo cual sirve para comprender la baja tolerancia al etanol de *K. marxianus* en comparación con *S. cerevisiae*.

El estudio de Fu et al., (2019), indicaron que el *Kluyveromyces marxianus* fue un candidato potencial para la producción de etanol mediante fermentación a altas temperaturas. Aunque *K. marxianus* mostro una alta producción de etanol a 45 °C durante la etapa temprana de fermentación, se observó una detención de la fermentación debido a inhibidores acumulados. Las respuestas al estrés de *K. marxianus* durante la fermentación a alta temperatura se mostraron en función de la integración de la secuenciación de ARN (RNA-Seq) y los datos de metabolitos. Las altas temperaturas estimularon la respiración mitocondrial, pero reprimieron el ciclo del ácido tricarboxílico (ATC), lo que llevó a una mayor generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), a una menor proporción de dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido



(NADH)/dinucleótido de nicotinamida y adenina oxidado (NAD<sup>+</sup>). La producción de glicerol aumentó durante la etapa temprana de fermentación, lo que podría contribuir a la reoxidación de NADH y la generación de ROS. Además, se observaron respuestas de estrés después de la detención de la fermentación a 45°C. Los genes relacionados con la actividad de la peroxidasa, el ensamblaje de grupos de hierro y azufre y la unión del mononucleótido de flavina (FMN) se regularon a la baja, mientras que los genes asociados con la reparación del ácido desoxirribonucleico (ADN) y la composición de lípidos del plasma se regularon al alza. La levadura también produjo más ergosterol para lidiar con el estrés del etanol.

Con respecto al estudio de Nuñez-Guerrero et al., (2016) sobre el comportamiento de mezclas de levaduras nativas durante la fermentación alcohólica del jugo de *Agave duranguensis*, las levaduras aisladas durante la fermentación de *Torulaspora delbrueckii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus* ITD-00185 y 25% *T. delbrueckii* ITD-00014a) y dos cepas puras (100% *K. marxianus* ITD-00147 y 100% *S. cerevisiae* ITD-00185), demuestran capacidad fermentativa y tolerancia al etanol de acuerdo con la siguiente tabla:

**Tabla 1**

*Capacidad fermentativa y tolerancia al etanol de las levaduras ensayadas.*

Levadura y cepa		Productividad de etanol (g/L·h)	Producción de ácido acético (g/L)	Tolerancia al 8% de etanol
<i>Torulaspora</i>	ITD-00014a	0,674 ± 0,003	0,034 ± 0,001	+
<i>delbrueckii</i>	ITD-00055	0,637 ± 0,003	0,541 ± 0,018	-
<i>Kluyveromyces</i>	ITD-00002	0,535 ± 0,017	0,096 ± 0,081	-
<i>marxianus</i>	ITD-00147	0,564 ± 0,005	0,216 ± 0,047	+
	ITD-00007	0,916 ± 0,001	0,575 ± 0,007	-

Levadura y cepa	Productividad de etanol (g/L•h)	Producción de ácido acético (g/L)	Tolerancia al 8% de etanol
<i>ITD-00185</i>	1,389± 0,008	0,409± 0,007	+
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>ITD-00200</i>	0,612 ±0,025	0,170 ± 0,238	+
<i>ITD-00227</i>	0,562 ±0,005	0,380 ± 0,269	-

Fuente (Nuñez-Guerrero et al., 2016).

De acuerdo con la tabla 1, se observa que la cepa de *Saccharomyces cerevisiae ITD-00185* tiene la mejor productividad de etanol por hora (1,389± 0,008 g/L•h). en este estudio, las cepas de *Kluyveromyces marxianus* reporta la producción más baja de etanol por hora en comparación con todos los microorganismos del estudio, pero la cepa de *Kluyveromyces marxianus ITD-00147* presenta resistencia a concentraciones de etanol al 8% (Nuñez-Guerrero et al., 2016).

### Consumo de Azúcares por *Kluyveromyces marxianus* Para la Producción de Etanol

El estudio de Luo et al., (2021), sobre perfiles sensoriales y bebidas de suero de leche fermentadas con las siguientes levaduras: *Kluyveromyces marxianus*, *Brettanomyces bruxellensis*, *Brettanomyces claussenii*, *Saccharomyces cerevisiae* (cepa: *Hornindal kveik*) y *IOC Be Fruits (IOCBF) S. cerevisiae*. Los prototipos fueron evaluados en 26 atributos sensoriales, los cuales fueron generados a través de una sesión de entrenamiento con 14 participantes. *S. cerevisiae (IOCBF)* experimentó la fermentación más rápida (8 días) y *B. claussenii* la más lenta (21 días), *K. marxianus* y *S. cerevisiae (Hornindal kveik)* mostró tasas de fermentación similares, finalizando el día 20. El cambio en el pH del fermentado fue similar para las cinco cepas (entre 4,25 y 4,31). Los recuentos de células se mantuvieron estables durante la fermentación para las cinco cepas (alrededor de 6 unidades logarítmicas formadoras de colonias (UFC/mL), con respecto a la producción de etanol y otros metabolitos, se produjo la

fermentación variando las concentraciones iniciales de lactosa, galactosa y glucosa, dependiendo de la cepa inoculada como se indica en la tabla 2:

**Tabla 2**

*Concentraciones de ácidos orgánicos, etanol y azúcares (medias y desviaciones estándar) en suero ácido de yogur al inicio y al final de las fermentaciones por Kluyveromyces marxianus, Saccharomyces cerevisiae (Hornindal kveik), Brettanomyces bruxellensis, Brettanomyces clausenii y Saccharomyces cerevisiae (IOCBF).*

	Ácido cítrico (g/L)	Ácido Láctico (g/L)	Ácido acético (g/L)	Etanol (%)	Lactosa (g/L)	Galactosa (g/L)	Glucosa (g/L)
Comienzo de la fermentación							
<i>K. marxianus</i>	2,00 ± 0,28	6,60 ± 0,55	1,18 ± 0,34	0,15 ± 0,08 **	32,85 ± 6,65 **	3,13 ± 0,13 **	1,06 ± 1,83
<i>S. cerevisiae</i> (Hornindal kveik)	2,00 ± 0,27	6,48 ± 0,42	1,04 ± 0,37	0,14 ± 0,08 **	4,13 ± 3,33	19,12 ± 3,43 **	14,31 ± 1,55 **
<i>B. bruxellensis</i>	2,02 ± 0,27	6,52 ± 0,37	1,07 ± 0,26	0,12 ± 0,10 **	4,01 ± 3,11	19,06 ± 2,84	14,73 ± 1,67 **
<i>B. clausenii</i>	2,01 ± 0,27	6,58 ± 0,48	1,14 ± 0,42	0,12 ± 0,10 **	33,26 ± 6,51 **	4,22 ± 1,61 **	nd
<i>S. cerevisiae</i> (IOCBF)	2,02 ± 0,28	6,58 ± 0,55	1,18 ± 0,65	0,13 ± 0,11 **	3,70 ± 3,12	19,38 ± 3,35 **	14,91 ± 2,09 **
Fin de la fermentación							
<i>K. marxianus</i>	1,95 ± 0,25	5,97 ± 0,84	1,78 ± 0,60	2,33 ± 0,42 **	nd **	nd **	nd

	Ácido cítrico (g/L)	Ácido Láctico (g/L)	Ácido acético (g/L)	Etanol (%)	Lactosa (g/L)	Galactosa (g/L)	Glucosa (g/L)
<i>S. cerevisiae</i> (Homidal kveik)	1,94 ± 0,21	6,01 ± 0,41	0,53 ± 0,24	2,28 ± 0,30 **	nd	nd **	nd **
<i>B. bruxellensis</i>	1,99 ± 0,31	6,30 ± 0,37	1,26 ± 0,12	1,07 ± 0,04 **	nd	20,28 ± 4,91	nd **
<i>B. clausenii</i>	1,99 ± 0,40	6,47 ± 1,09	1,16 ± 0,13	2,41 ± 0,37 **	nd **	nd **	nd
<i>S. cerevisiae</i> (IOCB F)	2,01 ± 0,28	6,11 ± 0,46	0,91 ± 0,37	2,30 ± 0,40 **	nd	nd **	nd **

*Nota.* nd = no detectado. “\*\*” indica la diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ )

observada al comparar las concentraciones al inicio y al final de la fermentación para cada cepa de levadura. Fuente: (Luo et al., 2021).

Se observa en la tabla 2 que la producción de etanol al final del proceso de fermentación es más alta para *B. clausenii* (2,41%), mientras que *K. marxianus* es la segunda levadura productora de etanol (2,33%), demostrando que si es posible tener un buen rendimiento de etanol; *K. marxianus* consume en su totalidad el contenido de sustratos como la lactosa que es ideal para el aprovechamiento del lactosuero.

En la tabla 3, se muestra una parte del estudio de Pendón et al., (2021) para la producción de etanol con el uso de diferentes cepas de *K. marxianus* (*CIDCA 81111*, *CIDCA 9121*, *NCYC 2907*, *NCYC 1429*), se observa que dependiendo de la cepa que se seleccione para la fermentación de la lactosa, se va a generar una determinada producción de etanol; la cepa que mejor produce es *Kluyveromyces marxianus CIDCA 9121* (39,7 g/L de etanol) y la que más

consume lactosa es *Kluyveromyces marxianus* NCYC 1429 (1,09 g/L de lactosa residual), por lo cual la más apropiada para el uso en lactosuero es *Kluyveromyces marxianus* NCYC 1429, por el mayor aprovechamiento del contenido de lactosa.

### Tabla 3

*Consumo de lactosa y producción de etanol utilizando cepas de Kluyveromyces marxianus durante ciclos sucesivos de fermentación.*

Cepa	Lactosa inicial (g/L)	Lactosa residual (g/L)	Etanol producido (g/L) <sup>a</sup>	Tiempo (horas)
CIDCA 81111	111.6	1,38 ± 0,02	35,5 ± 0,5	10.0
CIDCA 9121	111.6	1,28 ± 0,01	39,7 ± 0,5	10.0
NCYC 2907	111.6	1,13 ± 0,01	34,8 ± 0,3	10.0
NCYC 1429	111.6	1,09 ± 0,03	39,5 ± 0,5	10.0

Fuente: (Pendón et al., 2021).

El estudio de Zinjanab et al., (2021), reportó que el *Kluyveromyces marxianus* NCYC 1425 se utilizó para producir etanol *in situ* en cocultivos con *Lactobacillus fermentum* PCC o *Lactobacillus paracasei* L26. Los efectos del cocultivo sobre la viabilidad celular y la evolución de la fermentación se evaluaron mediante el conteo de células viables y la medición del pH en muestras a las 0, 24h (adición de palatasa) y 48h (final de la fermentación). Se utilizó cromatografía de gases de microextracción en fase sólida de espacio de cabeza (SPME)-MS/FID, para análisis de ésteres, etanol y ácidos grasos libres al principio y al final de la fermentación. Es importante resaltar que al comparar la producción de etanol en cocultivos y de forma independiente, el *Kluyveromyces marxianus* NCYC 1425 produce una mayor cantidad de etanol (405,48) que los microorganismos *Lactobacillus fermentum* PCC (6,58), *Lactobacillus paracasei* L26 (1,35) o en cocultivos después de 24 horas de fermentación; el resultado se encuentra

reportado en áreas de pico del detector del cromatógrafo tipo FID. El autor no reporto concentraciones y para ello se sugiere realizar una curva de calibración para poder cuantificar el etanol en función del área de pico reportada por el cromatógrafo de gases.

En estudio de Kityo et al., (2020) de la producción de bioetanol mediante ultrasonido utilizando tres especies de levaduras, donde la hierba Kariba (*Salvinia molesta*) se usó como biomasa para la producción de etanol por hidrólisis y fermentación separadas (SHF). Las condiciones óptimas para la hidrólisis ácida térmica del 12 % (p/v) de hierbas Kariba se evaluaron con ácido nítrico  $\text{HNO}_3$  200mM a  $121^\circ\text{C}$  durante 60 min, lo que produjo 10,2g/L de monosacáridos. El ultrasonido aplicado durante 45 min antes de la sacarificación enzimática produjo hasta 18,7g/L de monosacáridos. La fermentación se realizó utilizando *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus* o *Pichia stipitis* con hidrolizado de hierbas Kariba con aplicación de ultrasonido. Las fermentaciones de control se llevaron a cabo usando hidrolizado de hierbas Kariba sin ultrasonido. La mejora de la producción de etanol a partir de hidrolizado de Kariba con ultrasonido utilizando *P. stipitis* produjo 15,9 g/L de etanol con un coeficiente de rendimiento de etanol  $Y_{\text{EtOH}} = 0,45$ , *K. marxianus* produjo 14,7 g/L de etanol con  $Y_{\text{EtOH}} = 0,41$ . *S. cerevisiae* produjo el rendimiento más bajo de 13,2 g/L de etanol con  $Y_{\text{EtOH}} = 0,37$  ya que utilizó solo glucosa no xilosa. La aplicación de ultrasonido en la hierba Kariba fue esencial en la producción de etanol para mejorar la producción de los monosacáridos. Se determinó *P. stipitis* como la mejor especie de levadura utilizando hidrolizados con la mezcla de glucosa y xilosa para producir etanol.

En estudio de L. Wang et al., (2018) sobre el cribado de cepas de levadura para la producción de cerveza de leche, las pruebas de identificación y aislamiento celular revelaron que las 17 cepas de levaduras pertenecían a cuatro especies diferentes [*Kluyveromyces*

*marxianus* (4/17), *Pichia kudriavzevii* (6/17), *Dekkera anomala* (1/17), *Kazachstania unispora* (6/17)]. A través de pruebas físicas y químicas de las 17 cepas de muestra de fermentación, cinco cepas cumplieron con el estándar para la producción de cerveza con leche como se muestra en la siguiente tabla:

**Tabla 4**

*Parámetros de calidad de la cerveza de leche producida con diferentes cepas de levaduras aisladas de granos de kéfir.*

Levaduras	Proteína, (%)	Sólidos totales, (%)	pH	Contenido de etanol, (g/L)	Recuento de colonias, (UFC/mL)	Recuento de coli, (MPN/mL)	Recuento de moho, (UFC/mL)	Recuento de levaduras, (UFC/mL)
NJ1	0.81	8.0	4.39	2.65	$3,5 \times 10^3$	0.21	18	23
NJ2	0.8	8.1	4.61	3.78	$1,3 \times 10^4$	0.15	21	62
NJ3	0.8	8.2	4.55	2.54	$2,1 \times 10^4$	0.20	22	53
NJ4	0.8	8.0	4.56	4.33	$1,9 \times 10^4$	0.22	24	57
NJ5	0.8	8.3	4.45	3.76	$3,2 \times 10^3$	0.29	21	47
NJ6	0.88	8.2	4.25	2.88	$1,5 \times 10^3$	0.18	19	27
MJ1	0.93	8.6	4.25	3.88	$1,4 \times 10^3$	0.19	17	23
MJ2	0.82	8.2	4.07	5.19	$3,4 \times 10^3$	0.17	19	21
MJ3	0.8	7.9	4.58	4.78	$1,9 \times 10^4$	0.22	24	59
MJ4	0.8	8.1	4.45	2.78	$1,7 \times 10^4$	0.18	30	56
BJ1	0.8	8.0	4.42	2.45	$9,2 \times 10^3$	0.27	21	57
BJ2	0.8	8.0	4.42	2.45	$9,2 \times 10^3$	0.27	21	57
BJ3	0.8	8.1	4.43	1.48	$9,7 \times 10^3$	0.24	25	52
BJ4	0.8	8.0	4.48	2.33	$9,5 \times 10^3$	0.27	23	59
BJ5	0.8	8.1	4.47	3.56	$9,2 \times 10^3$	0.25	30	54
BJ6	0.8	8.1	4.58	2.44	$9,4 \times 10^3$	0.23	23	55
YJ1	0.82	8.1	4.31	2.56	$2,4 \times 10^3$	0.19	19	26

Fuente: (L. Wang et al., 2018)

De acuerdo con la tabla 4, la cepa MJ2 (*K. marxianus*) tuvo el mejor rendimiento respecto a la mayor producción de etanol (5,19g/L), adecuado para aplicarlo en el lactosuero para la producción de vinagre del suero.

#### *Acetobacter pasteurianus*

A continuación, se presentan investigaciones referentes a la fermentación acética con *Acetobacter pasteurianus* usando como sustrato etanol.

De acuerdo con Li et al., (2015), la fermentación acética es la oxidación aeróbica del etanol a ácido acético, que es un proceso de biotransformación realizado por AAB. Esta etapa es un proceso de fermentación abierta, bastante lenta, y debe proporcionar un hábitat adecuado para las especies de *Acetobacter*, por lo que no se emplea tanques de fermentación cerrados en la etapa de la fermentación del ácido acético (FAA). El vinagre es el producto de doble fermentación, que se lleva a cabo por diferentes tipos de microorganismos como se describe en la siguiente tabla:

**Tabla 5**

*Microorganismos aislados de la fermentación con ácido acético de diferentes tipos de vinagre.*

Tipo de vinagre	Microorganismos involucrados.
Vinagre de suero	<i>S. cerevisiae</i> , <i>K. marxianus</i> , <i>K. fragilis</i> , <i>St thermophilus</i> , <i>Lb delbruekii</i> , <i>Lb lactis</i> , <i>Lb helveticus</i> , <i>Ac. pasterianus</i>

Fuente: (Li et al., 2015).

En la siguiente tabla, se muestran los dos métodos en la producción de vinagre:

**Tabla 6**

*Diferentes métodos de fermentación en la producción de vinagre.*

Método de fermentación.	Ventajas	Desventajas
Fermentación superficial tradicional.	Obtención de vinagre de alta calidad.	Lento.
Cultivo sumergido.	Alta tasa de fermentación y mejor rendimiento de ácido acético.	Control preciso de la fermentación.

Fuente: (Li et al., 2015).



El metabolismo de los microorganismos estimula efectos sobre las propiedades fisicoquímicas del vinagre, disminuyen el pH y aumentan la acidez debido a la acumulación de la acidez secretada por las poblaciones de AAB, levaduras y mohos, afectando la diversidad microbiana involucrada en la producción de vinagre porque el efecto de las propiedades, como el pH y la acidez, son responsables de la actividad microbiana. Por ejemplo, después del inicio de FAA, el crecimiento de *A. pasteurianus* aumenta inmediatamente la acidez, lo que puede inhibir la multiplicación de otras especies de AAB. (Li et al., 2015).

Desde el punto de vista biotecnológico, el proceso básico de la bioconversión de azúcares en etanol mediante levaduras *Kluyveromyces* fermentadoras de lactosa, convierten estas en ácido acético mediante acción de las bacterias del ácido acético (AAB). Las AAB son capaces de producir ácido acético en líquidos fermentados, en los que el contenido de etanol varía entre el 2-18%, según el sistema de fermentación y la cepa microbiana utilizada (Gullo et al., 2014). Estas posibilidades permiten diseñar bioprocesos versátiles obteniendo vinagres y bebidas con contenido variable de ácido acético y etanol residual. La conversión del SQ en vinagre representa una opción valiosa para aprovechar el suero en la cadena alimentaria fermentada tradicional y evitar la principal desventaja de la baja productividad de bioetanol a partir del suero. (Zotta et al., 2020).

Con una cantidad de etanol superior al 5–6% podría inhibir las AAB, las levaduras *Kluyveromyces* cultivadas en permeado de suero con lactosa hasta 200g/L, garantizan una concentración adecuada de alcohol para la producción de ácido acético sin que las levaduras se vean afectadas. Las cepas de *K. marxianus* fermentaron suero con el triple de concentración, produciendo un licor de suero que contenía un 8% de etanol. Se diluyó dos veces antes de la oxidación del etanol a ácido acético por *A. pasteurianus* IFO 14814. El vinagre del suero

resultante contenía ácido acético al 5,2% y exhibía un ligero olor a leche de vaca, así como un sabor ácido suave. El vinagre de suero también se propuso como ingrediente nutritivo estable en la dieta del ganado lechero. (Zotta et al., 2020).

La AAB *Acetobacter pasteurianus* desempeña un papel importante en la fermentación del ácido acético, que implica la oxidación del etanol a ácido acético a través de la cadena respiratoria del etanol en condiciones específicas. Con el fin de obtener bacterias adecuadas para la industria del vinagre, *A. pasteurianus JST-S* fue seleccionada por el autor en el laboratorio y fue comparado con *A. pasteurianus CICC 20001*, una cepa industrial actual en China, para determinar los parámetros óptimos de fermentación bajo diferentes niveles de estrés ambiental. El contenido máximo de ácido total de *A. pasteurianus JST-S* fue de 57,14g/L, mientras que el de *A. pasteurianus CICC 20001* alcanzó 48,24g/L en un tanque de agitación de 15L; El medio de siembra (YG<sub>1</sub>) contenía 11g/L de glucosa, 11g/L de extracto de levadura, 1,1g/L de MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 3,3 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 2 % (v/v) de etanol. El medio de fermentación (YG<sub>2</sub>) contenía 5g/L de glucosa, 5g/L de extracto de levadura, 1,1g/L de MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 3,3 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y diferentes concentraciones de etanol. El medio YPG contenía 5g/L de extracto de levadura, 5g/L de peptona, 5g/L de glucosa, 17g/L de agar y diferentes concentraciones de etanol y ácido acético. Las células se sembraron en YG<sub>1</sub> y se cultivaron en una incubadora con agitación termostática inteligente a 30°C durante 36h a 150 rpm. El cultivo de fermentación se realizó en medio YG<sub>2</sub> a 32°C a 150 rpm. La acidez del medio de fermentación se midió utilizando NaOH 0,1M con fenolftaleína como indicador de pH (Wu et al., 2018). En el caso de la producción de vinagre a partir del lactosuero del queso, es importante resaltar que se puede aplicar la oxidación del etanol hasta ácido acético con la cepa *A. pasteurianus JST-S*.

El estudio de Matsumoto et al., (2021) de la adaptación térmica de las AAB para la obtención de vinagre a altas temperaturas, afirmó que se obtuvieron varias cepas de *Acetobacter pasteurianus* térmicamente resistentes y adaptadas. *A. pasteurianus* K-1034, originalmente fue capaz de realizar la producción de ácido acético en arroz moromi, fue adaptado térmicamente mediante evolución experimental utilizando un cultivo de arroz. Se confirmó que las cepas adaptadas crecían bien en tales medios pobres en nutrientes en cultivo en matraz o fermentador en jarra entre 39-40°C; también se determinaron los sitios de mutación de las cepas. También se demostró que la capacidad de fermentación a alta temperatura es comparable con una cepa adaptada con una baja cantidad de nutrientes obtenida previamente. Utilizando el sistema de fermentación “*Acetofermentador*”, se comparó la producción de ácido acético en el cultivo de moromi; los resultados mostraron que las cepas adaptadas realizan eficientemente la producción práctica de vinagre en condiciones de alta temperatura. En este estudio no se logró verificar la cantidad de ácido acético producido ya que el autor no reporta este dato, pero es factible realizar el proceso de fermentación del etanol hasta ácido acético en un Acetofermentador a temperaturas de trabajo entre 39-40°C.

El estudio de Wu et al., (2017), sobre la producción de vinagre a partir de camote morado en un proceso de fermentación líquida, evaluó *Acetobacter pasteurianus* JST-S a partir de granos sólidos fermentados en China, se identificó mediante análisis molecular y se usó para la producción de vinagre de batata morada usándola como sustrato. A nivel experimental, la concentración máxima de ácido total (4,26% (v/v)) se logró en condiciones optimizadas de la siguiente manera: tiempo de fermentación, 3,5 días; contenido de etanol, 9% (v/v) y tamaño del inóculo, 8% (v/v). El ácido acético y otros antioxidantes no fenólicos en el vinagre de batata morada pueden haber contribuido a las actividades antioxidantes. Para la fermentación acética, se

cultivó primero en medio sólido a 30°C durante 48h, seguido de su inoculación en un matraz de 250mL que contenía 50mL de medio de precultivo esterilizado. La cepa se cultivó en un agitador rotatorio a una velocidad de 150 rpm a 30°C durante 24h como semilla líquida. Se usó 1mL de líquido de semilla para inocular 50mL de vino de camote morado esterilizado (105°C por 5min) con 9% (v/v) de etanol. El cultivo se incubó en las mismas condiciones durante 4 días para obtener vinagre de camote morado. Después de la fermentación, el vinagre de batata púrpura se esterilizó mediante pasteurización. Los resultados de estos estudios pueden proporcionar una referencia para la producción industrial de vinagre por fermentación líquida de lactosuero ya que se establecen condiciones necesarias para el uso de *Acetobacter pasteurianus* JST-S en la oxidación del etanol hasta ácido acético.

La investigación de Farrera et al., (2021) de un cultivo iniciador para la fermentación del cacao con AAB, se aislaron 130 bacterias del ácido acético de tres países productores de cacao y se identificaron en función de su secuencia del gen 16S rRNA. Las cepas predominantes se cultivaron en un medio de simulación de pulpa de cacao (CPSM-BAA) para comparar sus características fisiológicas con respecto a su tasa de crecimiento específica, consumo de etanol y ácido láctico, producción de ácido acético y preferencias relativas de fuentes de carbono. Finalmente, se evaluó la diversidad intraespecífica de las cepas mediante el análisis de su polimorfismo genómico por (GTG)<sub>5</sub> -Toma de huellas PCR. Los resultados indicaron que *Acetobacter pasteurianus* fue la especie más recuperada en todos los orígenes, con 86 de 130 cultivos. Se observó una gran similitud entre las cepas según su caracterización fisiológica y polimorfismos genómicos. Sin embargo, los resultados del agrupamiento multiparamétrico en diversos grupos destacaron algunas diferencias en su metabolismo básico, como su eficiencia para convertir sustratos de carbono en acetato y su afinidad relativa por el ácido láctico y el

etanol. Las cepas de *A. pasteurianus* mostraron diferentes comportamientos en cuanto a su capacidad para oxidar etanol y ácido láctico hasta ácido acético, y en su preferencia relativa por cada sustrato.

Según el estudio de Zheng et al., (2022) sobre la caracterización de la cinética en la fermentación multimicroorganismos afirma que la fermentación en estado sólido (FSS) de múltiples microorganismos es una técnica tradicional para la elaboración de productos alimenticios fermentados. Sin embargo, la cinética de fermentación es bastante dispendiosa de establecer debido a los perfiles irregulares, sistemas complejos de crecimiento y metabolismo de los microorganismos. La FSS del vinagre fue descrita y predicha usando una cinética de dos etapas. La cinética *in situ* e *in vitro* del crecimiento celular, la formación de productos y el uso de sustratos de los microorganismos predominantes *Acetobacter* y *Lactobacillus*. Se encontró que el etanol, el ácido láctico y el ácido acético son los principales factores responsables de la variación temporal de los perfiles de fermentación. Se demostró que el ácido acético producido por *Acetobacter* es el principal factor para los perfiles de dos etapas y su función moduladora del crecimiento y metabolismo microbiano fue más importante que la del ácido láctico y el etanol. Las concentraciones de ácido acético con respecto a la tasa de crecimiento fueron 3,05 y 1,68 g/100 g de muestras de FAA para *A. pasteurianus* y *L. helveticus*, respectivamente, lo cual indica que *A. pasteurianus* es adecuado para usar en la producción de vinagre a partir del SQ.

Según el estudio de Gao et al., (2021), sobre el ajuste de las enzimas en la ruta de oxidación del etanol y el cofactor PQQ coordina el conflicto entre la aptitud y la producción de ácido acético por *Acetobacter pasteurianus*, muestra que la regulación sinérgica de la expresión de alcohol/aldehído deshidrogenasa y el nivel de cofactor PQQ no solo podría reducir de manera eficiente el conflicto entre el aumento de la producción de ácido acético y la aptitud celular

comprometida, sino que también mejoraría la tolerancia al ácido acético de *Acetobacter pasteurianus* a una concentración inicial (3% v/v) de ácido acético. Gao et al., (2021) indicaron que la expresión combinatoria de *adhA* y *pqqABCDE* acorta considerablemente la duración del proceso de inicio de la fermentación de 116 a 99h, lo que lleva a un rendimiento de  $69\text{gL}^{-1}$  de ácido acético en fermentación semicontinua. Como resultado final, la producción media de ácido acético se elevó a  $0,99\text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ , que fue un 32 % superior a la del parental *A. pasteurianus*. Este estudio fue de gran importancia para disminuir el costo de la fermentación semicontinua para producir a escala industrial ácido acético de alta concentración. De acuerdo con la tabla 7:

**Tabla 7**

*Comparación de la producción de ácido acético en cepas modificadas de A. pasteurianus y A. aceti.*

Huéspedes de microorganismos	Temperatura de fermentación (°C)	Ácido total ( $\text{gL}^{-1}$ )	Productividad ( $\text{gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ )	fuelle de carbono.	Modo de fermentación
<i>A. pasteurianus JST-S/pBBR-adhA-adhB</i>	30	61.4	0.71	Etanol	Matraz de agitación
<i>A. pasteurianus /pMV24- uvrA</i>	30	85	1.57	Etanol	Matraz de agitación
<i>A. aceti 10-8S2/pACO300</i>	30	105	0.76	Etanol	Lote
<i>A. aceti 10-8S2/pABC101</i>	30	111.7	0.89	Etanol	Matraz de agitación
<i>A. aceti WK</i>	30	100	$9,57\text{gL}^{-1}\text{día}^{-1}$	Etanol	Semicontinuo (nueve lotes repetidos)
<i>A. pasteurianus UMCC 2951</i>	30	80	$6\text{gL}^{-1}\text{día}^{-1}$	Etanol	Semicontinuo (cinco lotes repetidos)
<i>A. pasteurianus CV01</i>	38	100	1.08	Etanol	Semicontinuo (un lote repetido)
<i>A. pasteurianus CICIM B7003-02</i>	30	93.1	1.83	Etanol	Semicontinuo (optimización de la relación descarga/carga y estrategia de aireación, cuatro lotes repetidos)

Fuente: (Gao et al., 2021).

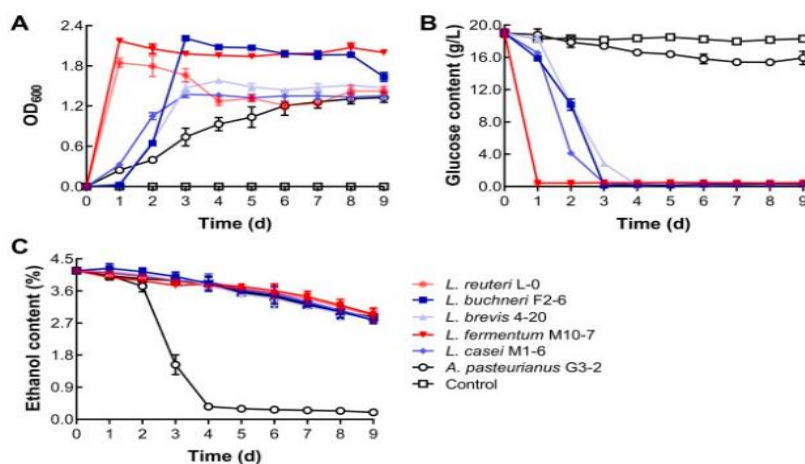
Se puede afirmar que la temperatura de crecimiento y producción de ácido acético del *Acetobacter pasteurianus* oscila entre 30-38°C y 61,4-g/L respectivamente; la fuente principal de carbono fue el etanol, lo cual es importante resaltar que se puede aplicar en la producción de vinagre del SQ por el rendimiento de producción y la temperatura de trabajo es alcanzable.

Según Wang et al., (2015), el etanol y la glucosa son las principales fuentes de carbono disponibles para la obtención de ácido acético en estado sólido del vinagre aromático de Zhenjiang. El *A. pasteurianus* G3-2 prefirió usar etanol para el crecimiento y la concentración de glucosa en la fermentación sufrió una ligera disminución, principalmente cuando el etanol estaba casi agotado (día 4-7).

De acuerdo con la figura 16, se observa las fuentes de carbono, producción de metabolitos en función del tiempo de diferentes microorganismos:

### Figura 16

Fuentes de carbono, producción de metabolitos en función del tiempo de diferentes microorganismos.



*Nota.* (A) Las curvas de crecimiento de las cepas estudiadas. Cambio de los sustratos de (B) glucosa y (C) etanol. Tomado de (Chai et al., 2020).

Con respecto a las fermentaciones en mezcla de cultivos con cepas de *Lactobacillus* y *A. pasteurianus* G3-2, la biomasa de *A. pasteurianus* G3-2 en todos los grupos fue similar a la de su monocultivo, lo que reveló que *A. pasteurianus* G3-2 casi no se vio afectada en la presencia de *Lactobacillus*. Sin embargo, las depresiones de crecimiento significativas de las cepas de *Lactobacillus* en sistemas bicultivos posiblemente se debieron a la intolerancia al ácido acético producido por *A. pasteurianus* G3-2, sugiriendo una relación de amensalismo entre ellos (Chai et al., 2020). Al observar la figura 16c, se observa que después de 4 días se consume una gran cantidad de etanol por *A. pasteurianus* G3-2, lo cual es ideal al aplicar este microorganismo en el lactosuero después de la producción de etanol por una levadura.

El estudio de Charee et al., (2020) sobre la caracterización de bacterias de ácido acético termotolerantes aisladas de varias bebidas vegetales, afirman que *Acetobacter pasteurianus* y *Acetobacter tropicalis* fueron AAB termotolerantes dominantes en la bebida vegetal fermentada. Dos aislamientos de *Acetobacter pasteurianus*, de bebidas vegetales fermentadas 2-3 y 2-16, produjeron ácido acético de manera eficaz a 39°C, en comparación con lo que hizo la cepa de *Acetobacter pasteurianus* SKU1108 como control superior para las bacterias termotolerantes al ácido acético. La bebida vegetal fermentada 2-3 fue capaz de oxidar completamente el 5% (v/v) de etanol a ácido acético a 39°C. Además, este aislado mostró una excelente resistencia al ácido acético a altas temperaturas, en comparación con otras 2 cepas en medios líquidos y sólidos, lo cual se puede aplicar en la producción de vinagre a partir del SQ, ya que 39°C es una temperatura de trabajo para la fermentación de la lactosa para obtención de etanol.

El estudio de Song et al., (2019) de aplicación de *Saccharomyces cerevisiae* para mejorar el proceso de fermentación del vinagre de frambuesa negra (*Rubus coreanus* Miquel), indicó que con el fin de mejorar la fermentación lenta de etanol durante el proceso de fermentación con



ácido acético del vinagre de frambuesa negra, se examinaron los aspectos microbiológicos y fisicoquímicos de los efectos de *Saccharomyces cerevisiae* JBCC-21A; además mostró mejores tasas de crecimiento y producción de etanol que las cepas de levadura comercial. La producción de ácido acético con *S. cerevisiae* JBCC-21A alcanzó hasta 60g/L. Los recuentos bacterianos indicaron que *Acetobacter pasteurianus* fue la única especie dominante a lo largo de la producción del ácido acético. El artículo no reporta la cantidad de ácido acético producido por *Acetobacter pasteurianus*, por lo cual se puede afirmar que este es dominante sobre *S. cerevisiae* JBCC-21A en la producción de ácido acético.

De acuerdo con la investigación de Ouattara & Niamké, (2021) sobre el mapeo de la diversidad funcional y de cepas de la principal microbiota involucrada en la fermentación del cacao, analizaron la variabilidad de la microbiota del cacao de las doce regiones productoras de Costa de Marfil y describen la distribución geográfica de la microbiota aislada mediante un mapeo. Las especies microbianas se identificaron mediante secuenciación de genes ribosómicos, las cepas se tipificaron mediante RFLP y se investigaron más a fondo sus capacidades técnicas y funcionales. Los resultados mostraron una diversidad restringida de bacterias del ácido láctico (BAL) y AAB con 10 y 5 cepas respectivamente. Las cepas dominantes de BAL y AAB, en particular *Lactobacillus plantarum*, *Acetobacter pasteurianus* y *Acetobacter tropicalis* 3 A, se encontraron en todas las regiones asumiendo que la microbiota ácida era débilmente variable. La gran variación de cepas de levaduras en las diferentes regiones pueden ser los principales factores microbianos responsables de la variación de la calidad del cacao fermentado observado. No se reporta cantidades de ácido acético producido por las cepas analizadas en esta investigación, pero es importante saber que *Acetobacter pasteurianus* predomina en la producción de ácido acético que es importante para su aplicación en el lactosuero.

De acuerdo con la investigación de Zheng et al., (2018) sobre el suministro de oxígeno en dos etapas basada en el análisis del metabolismo energético para mejorar la producción de ácido acético por *Acetobacter pasteurianus*, indicaron que los resultados conllevan a que el suministro adecuado de oxígeno puede mantener el metabolismo energético y la tolerancia celular razonables para mejorar la fermentación del ácido acético. Además, se analizaron las transcripciones de genes que intervienen en la oxidación del etanol, la síntesis de ATP y la expresión de proteínas de tolerancia para limitar el efecto del suministro de oxígeno en el metabolismo celular de *Acetobacter pasteurianus*. Bajo la dirección del marco del metabolismo energético, se estableció una estrategia racional de suministro de oxígeno en dos etapas para liberar el consumo de energía y la volatilización de sustratos durante la fermentación con ácido acético. Se obtuvo una tasa de producción de ácido acético de 1,86g/L/h, que fue un 20,78 % mayor que la tasa de aireación de una etapa de 0,1 vvm; el rendimiento estequiométrico fue 88,5g/L y 94,1%, y 84,6g/L y 89,5% para una tasa de aireación de una etapa de 0,15 vvm.

El estudio de Gil et al., (2020) donde se produce vinagre a partir de raíces peladas y sin pelar de campanillas (*Platycodon grandiflorum*) usando *Acetobacter pasteurianus* A11-2 caracterizaron los principales metabolitos del vinagre de campanilla (VB) de los cuales obtuvieron ácidos orgánicos, siendo los principales compuestos volátiles el acetato de etilo, el acetato de isoamilo, el 1-pentanol, el ácido hidroxipropanoico y el ácido malónico. Cuando se fermentaron VB de raíces sin pelar durante 10 días con un cultivo iniciador, se observaron efectos antibacterianos e inmunopotenciadores significativos en los macrófagos. Por lo tanto, se determinaron las diferencias funcionales y de metabolitos en el vinagre obtenidos de las raíces de campanilla. De acuerdo con la tabla 8:

Tabla 8: Cambios en el pH, acidez titulable (%), alcohol (%) y contenido de ácido acético en vinagre producido a partir de raíces de campanilla fermentadas.

Grupo	Periodo (Días)	pH	Acidez valorable (%)	Alcohol (%)	Ácido acético (ppm)
BV1	0	3,96 ± 0,05	0,23 ± 0,00	6,88 ± 0,00	4,07 ± 0,31
	5	4,18 ± 0,01	0,29 ± 0,01	5,76 ± 0,17	7,41 ± 1,07
	10	3,37 ± 0,04	3,08 ± 0,66	3,53 ± 1,66	47,44 ± 1,93
	15	3,15 ± 0,06	5,41 ± 0,53	0,00 ± 0,00	53,32 ± 4,94
BV2	0	4,05 ± 0,04	0,24 ± 0,00	6,88 ± 0,11	3,94 ± 0,37
	5	4,20 ± 0,00	0,32 ± 0,00	5,76 ± 0,06 <sup>a</sup>	3,89 ± 0,16
	10	3,60 ± 0,13	1,18 ± 0,80	0,20 ± 0,07	15,67 ± 5,47
	15	3,18 ± 0,01	4,80 ± 0,37	0,00 ± 0,00	49,24 ± 4,35
BV3	0	3,85 ± 0,00	0,36 ± 0,00	6,12 ± 0,17	6,43 ± 0,31
	5	3,77 ± 0,09	1,11 ± 0,31	3,74 ± 0,82	15,07 ± 1,83
	10	3,18 ± 0,03	5,59 ± 0,96	0,00 ± 0,00	59,85 ± 0,97
	15	3,19 ± 0,05	4,46 ± 1,99	0,00 ± 0,00	49,76 ± 20,10
BV4	0	3,95 ± 0,01	0,37 ± 0,00	5,84 ± 0,11	6,49 ± 0,31
	5	4,09 ± 0,01	0,42 ± 0,03	3,98 ± 0,65	4,86 ± 0,56
	10	3,31 ± 0,09	3,56 ± 0,27	0,00 ± 0,00	35,18 ± 1,06
	15	3,20 ± 0,11	2,11 ± 1,08	0,00 ± 0,00	18,50 ± 17,75

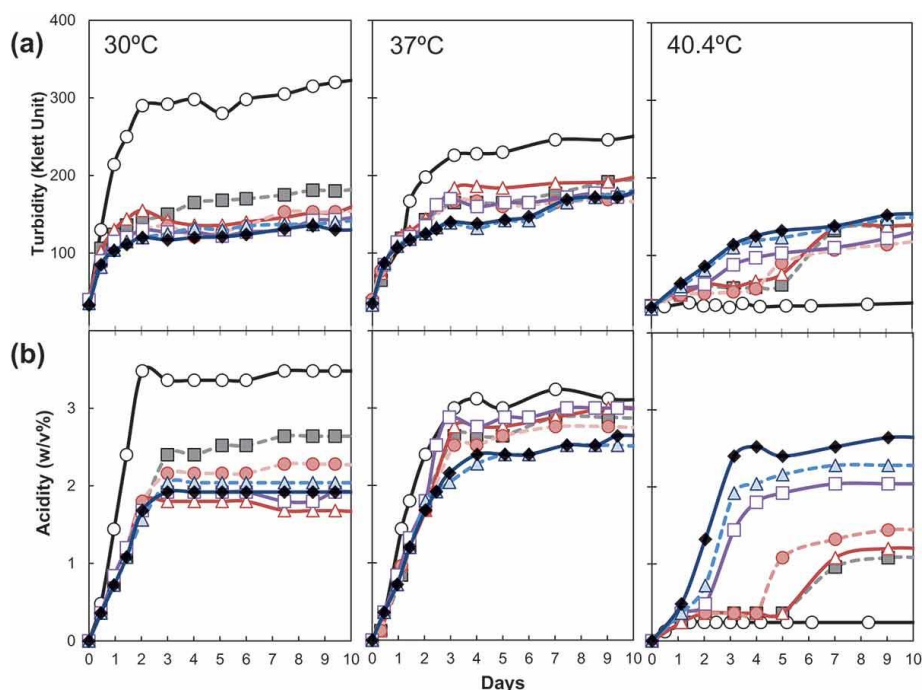
*Nota.* BV1, vinagre de raíz de campanilla sin pelar; BV2, vinagre de raíz de campanilla pelada; BV3, vinagre de raíz de campanilla sin pelar utilizando *Acetobacter pasteurianus* A11-2; BV4, vinagre de raíz de campanilla pelada usando *Acetobacter pasteurianus* A11-2. Fuente (Gil et al., 2020).

Se observó en la tabla 8, que todas las cepas evaluadas de *Acetobacter pasteurianus* consumen en su totalidad el etanol presente en el medio y el *Acetobacter pasteurianus* A11-2 produjo una mayor cantidad de ácido acético en la raíz de campanilla sin pelar (BV3) debido a la disponibilidad de fuentes de carbono y lo ideal sería parar la fermentación a los 10 días; en el caso del lactosuero se podría aplicar estas condiciones de fermentación teniendo en cuenta que consume en su totalidad el etanol producido.

El estudio de Matsumoto et al., (2020), indicó que se realizó la adaptación térmica de *A. pasteurianus* IFO 3283–32 en condiciones de fermentación con ácido acético utilizando un enfoque de evolución experimental de 37°C a 40°C. La cepa adaptada exhibió un mayor crecimiento y capacidad de fermentación de ácido acético a altas temperaturas. De acuerdo con la siguiente figura:

### Figura 17

Comparación de la fermentación de ácido acético entre cepas parentales y adaptadas a 30, 37 y 40,4°C.



*Nota.* El crecimiento (a) y la acidez (b) del padre (○), NM-1 (■), NM-2 (△), NM-3 (●), NM-4 (□), NM-5 (triángulo gris coloreado), y NM-6 (◆). Tomado de (Matsumoto et al., 2020).

Las cepas IFO 3283-32 y NM se precultivaron en medio de papa hasta que su turbidez alcanzó 150 unidades Klett. Se transfirieron 5 mL del precultivo a 100 mL de medio YPGD (5g de extracto de levadura, 5g de polipeptón, 5g de glicerol y 5g de D-glucosa por 1 L de agua destilada) con etanol al 4% (v/v) en un matraz erlenmeyer de 500 mL y se cultivaron a 30, 37 y 40,4°C a 200 rpm. De acuerdo con la figura 17b, se observa que a medida que se eleva la temperatura hasta 40°C, la cepa NM-6 aumenta su producción, también se observa en todas las temperaturas de estudio que entre el día 3 y 4, se obtiene la mayor producción de ácido acético en todas las cepas del *Acetobacter*. A 37°C es la temperatura óptima de producción de ácido acético de las cepas de *Acetobacter* estudiadas (Matsumoto et al., 2020).

La investigación de Qi et al., (2017), se confirmó la lista de nutrientes necesaria para la fermentación acética de *Acetobacter pasteurianus* CICIM B7003. Una estrategia de alimentación de nutrientes que agrega simultáneamente prolina, glutamato, aspartato y triptófano para formar concentraciones finales de 0.02g/L, 0.03g/L, 0.01g/L y 0,005g/L en sidra se logró mediante un diseño de experimento ortogonal. El rendimiento de ácido acético del alcohol alcanzó el 93,3 % y la concentración de la mayoría de los compuestos de sabor volátiles aumentó con la estrategia racional de alimentación de nutrientes. Se utilizaron cuatro tipos de medios. El medio de placa sólido YG<sub>1</sub>(g/L): polvo de extracto de levadura (YEP) 10, glucosa 10, agar 20, CaCO<sub>3</sub> 15 y etanol 32. El medio de semilla YG<sub>2</sub>(g/L): YEP 10, glucosa 10, ácido acético 8 y etanol 24. El medio basal mineral (MM) se preparó con tres soluciones (A, B y C). Solución A(g/L): KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20. Solución B(g/L): MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,8, NaCl 0,4, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,4, MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 0,4. Solución C(g/L): glucosa 4. Las soluciones A y C se esterilizaron a 121°C durante 20 mín.

La solución B se filtró a través de membranas de 0,45µm. Posteriormente, se mezclaron las soluciones A, B y C en una proporción de 1:1:100 (v/v) para obtener la MM. Para el medio nutritivo completo (CM), glucosa, doce aminoácidos (glicina, alanina, glutamato, histidina, triptófano, prolina, tirosina, arginina, cisteína, fenilalanina, lisina y aspartato) y siete vitaminas (tiamina, riboflavina, vitamina B6, biotina, nicotinato, ácido 4-aminobenzoico y ácido pantoténico) se colocaron en MM como fuente de carbono, fuente de nitrógeno y factor de crecimiento. La cantidad de azúcares, aminoácidos y vitaminas se fijó en 1g/L, 0,5g/L y 0,02g/L, respectivamente. Se añadió etanol anhidro estéril a CM antes de la inoculación para formar una concentración final de 32 g/L. En este estudio, se añadió etanol anhidro después de la esterilización media. El cultivo en matraces de agitación se realizó en matraces Erlenmeyer sin deflectores de 250 ml. Se inoculó un asa de *A. pasteurianus* CICIM B7003 de YG<sub>1</sub> en un matraz erlenmeyer sin deflectores que contenía 50ml de YG<sub>2</sub> y se incubó en un banco oscilador de temperatura constante. Luego, 5mL de semillas se centrifugaron a 6000G durante 5 min y el sedimento se lavó tres veces con 5mL de tampón de fosfato de potasio 50mM (pH 6,0). Posteriormente, la suspensión de células se mezcló con 45 mL de CM fresco para fermentar en las condiciones de cultivo anteriores durante 72h.

El estudio de Tanamool et al., (2020) de obtención de vinagre a partir de un subproducto de piña mediante la co-inoculación de levadura y AAB, afirmó que se encontró que *Acetobacter pasteurianus* FPB2-3, fue una posible AAB termotolerante, con propiedades tolerantes al etanol y al ácido acético, es muy eficaz en la producción de vinagre a partir de cáscaras de piña como alternativa, siendo esta una materia prima económica para la fermentación simultánea en vinagre. Posteriormente, se examinaron los efectos de la concentración de azúcar y el tiempo de inoculación de *A. pasteurianus* FPB2-3 sobre la producción de ácido acético. Los resultados

indicaron que el aumento en la concentración de sacarosa condujo a una alta producción de etanol, lo que resultó en la supresión de la producción de ácido acético. Permitir que la levadura inoculada fermente antes de la inoculación de AAB durante 1 o 2 días generó como resultado un retraso prolongado para la oxidación del etanol. Sin embargo, la acumulación de ácido acético comenzó después de 5 días y aumentó gradualmente hasta la concentración máxima de 7,2 % (p/v) en 16 días. Además, la fermentación a gran escala en recipientes de 6L dio como resultado una acumulación de ácido acético de forma lenta, pero aun así logró una concentración máxima de ácido acético del 6,5 % (p/v) después de 25 días; es probable que en lactosuero *Acetobacter pasteurianus* FPB2-3 tenga un comportamiento similar, pero el tiempo de fermentación es bastante prolongado y se debe realizar el proceso de fermentación de manera independiente con otro microorganismo productor de etanol.

La investigación de Chen et al., (2016) sobre la correlación entre la resistencia al etanol y las características de la alcohol deshidrogenasa (ADH) dependiente de PQQ en AAB, afirmó que dos cepas tolerantes al etanol, FY-24 y DY-5, identificadas como *Acetobacter pasteurianus*, fueron aisladas del vinagre chino Pei. FY-24 y DY-5; mantuvieron la capacidad de fermentación y también crecimiento con 12% (v/v) de etanol a 37°C, pero *A. pasteurianus* ASI.41 (ampliamente utilizado en China) solo podría ser resistente al 10% de etanol. Las actividades de ADH de FY-24 (6,13 U/mg) y DY-5 (5,41 U/mg) fueron mucho más altas que las de ASI.41 (1,57 U/mg) con 8 % de etanol. Usando ADH purificada, se demostró que las ADH de FY-24 y DY-5 exhibieron una mayor tolerancia al etanol a medida que el etanol aumentaba del 10 al 40%. La concentración óptima de etanol para las ADH de FY-24 y DY-5 fue del 10%, pero fue del 5% para la de ASI.41. Además, las ADH de FY-24 y DY-5 exhibieron una mayor resistencia a la temperatura y al ácido acético que la de ASI.41. Los medios de cultivo fueron YPGD (glucosa

10g/L, extracto de levadura 10g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,1g/L, polipeptona 5g/L, llenar hasta 1L de agua del grifo) suplementado con o sin etanol o ácido acético se utilizó para el aislamiento bacteriano o la fermentación a 30 o 37°C durante 3 días. Sal agar [0,2 g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , 0,1g/L de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,1g/L de  $\text{Ca}_5(\text{OH})(\text{PO}_4)_3$ , 2mL/L de ácido acético glacial y 15g/L de agar] para el estudio del aprovechamiento de diversas fuentes de carbono. Las fuentes de carbono incluyeron 2% (p/v) de metanol, etanol, n -propanol, glicerol, D -glucosa o D -manitol.

Parrondo et al., (2003) produjo vinagre con una concentración de ácido acético entre 5 y 6% (v/v) por fermentación de *Kluyveromyces marxianus* y *Acetobacter pasteurianus*, usando permeado de suero con 135g/L de lactosa. Se obtuvo un licor de suero con una concentración final de etanol de aproximadamente 55g/L en 48 horas, a una temperatura de 30°C. El etanol fue oxidado hasta ácido acético por *Acetobacter pasteurianus* en 4 días con una eficiencia del 84% aproximadamente. Comparando con una fermentación secuencial de *Kluyveromyces marxianus* y *Acetobacter aceti* condujo a un consumo medio de lactosa del 56%, para un rendimiento de etanol de 6,7g/L por día y producción de ácido acético de 4,35g/L por día, lo cual indica que se obtuvo mejores resultados con el *Acetobacter pasteurianus* que con *Acetobacter aceti*.

Con base en todos los resultados presentados, en el proceso de fermentación para la producción de vinagre, es fundamental realizar en primer lugar la fermentación para la obtención de etanol, en el cual se sugiere usar la cepa de *Kluyveromyces marxianus MJ2*, con un rendimiento del 5,19g/L en una matriz láctea, a una temperatura óptima de incubación de 35-38°C y un tiempo óptimo de 36-48 horas en medio anaeróbico, consumiendo casi por completo en la mayoría de las investigaciones sustratos como la lactosa, glucosa y galactosa; hay que tener en cuenta que la cepa anteriormente mencionada no tolera concentraciones de etanol por encima del 6%, generando un efecto inhibitor. Una opción para evitar la producción de etanol por



encima del 6% sería parar el proceso de fermentación con un proceso de pasteurización a 72°C por 15 segundos seguido de enfriamiento hasta 38°C.

Posterior a la fermentación etílica, se continúa con una fermentación acética con *Acetobacter. pasteurianus*, el cual usa etanol entre el 2% al 10% de concentración como fuente de sustrato para la obtención del vinagre (ácido acético); por lo anterior, la cepa que mejor produce ácido acético es el de *A. pasteurianus CV01* con una producción de 100,00g/L de ácido acético a una temperatura entre 30-38°C por un tiempo de 36-48 horas.

### Cuantificación de Ácido Acético

Según la normatividad colombiana resolución 775 de 2008 Capítulo V, Artículo 10 “Requisitos fisicoquímicos del vinagre”, la acidez expresada en g/L de ácido acético para vinagres distintos al “Vinagre de vino” debe ser mínimo 50g/L (Ministerio de la Protección Social, 2008). Por lo anterior es importante poder cuantificar el ácido acético en el vinagre producido del lactosuero cumpliendo con la normatividad anteriormente mencionada.

Según la Norma Técnica Colombiana 2188 de 2012, para la determinación de la acidez total, se efectúa de acuerdo con la norma Association of Analytical Communities (AOAC) 930.35(J) (Icontec Internacional, 2012).

El estudio de Wu et al., (2017) indicaron que ácido acético se valoró mediante el método de titulación tradicional ácido-base donde se añadió 1 mL de muestra a 50 mL de agua destilada en un vaso de precipitados de 150 mL y se tituló con 0,1M de NaOH utilizando fenolftaleína como indicador hasta que el color de la mezcla fue rosa durante 30s. El consumo de 0,1M NaOH fue  $V_1$ . Se utilizó agua destilada como control y el consumo de 0,1M de NaOH en presencia de agua destilada fue de  $V_2$ . La concentración de ácido acético (CAA) se calculó de la siguiente manera:

$$CAA (\%) = (V_1 - V_2) \times C \times 60 \text{ (ecuación 1).}$$

Donde:

CAA = concentración de ácido acético en la muestra (%).

C = concentración de solución estándar de NaOH (mol/L) (Wu et al., 2017).

De acuerdo con el *Manual of Methods of Analysis of Foods de la India* (Fssai, 2012), para la cuantificación del ácido acético en vinagre se debe diluir 10 mL de muestra con agua recién hervida y enfriada, se adicionan 3 gotas de fenolftaleína, titular con hidróxido de sodio

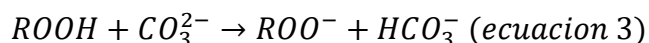
(NaOH 0,5 N) hasta que aparezca una coloración ligeramente rosada. Posterior a ello, se observa y anota el volumen de NaOH gastado y con base en la siguiente ecuación se realiza el cálculo en gramos (g) de ácido acético presente en la muestra:

$$1 \text{ ml de NaOH } 0,5 \text{ N} = 0,0300 \text{ g ácido acético (ecuación 2).}$$

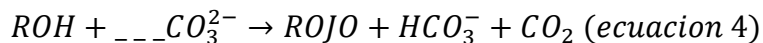
De acuerdo con el trabajo de Xie & Chai, (2016), informa sobre un método simple y eficiente para la determinación del contenido de ácido total en vinagres mediante cromatografía de gases de espacio de cabeza (HS-GC) basada en una reacción de neutralización entre los ácidos del vinagre y la solución de carbonato en un vial de muestra con espacio de cabeza cerrado, a partir del cual se analiza el dióxido de carbono generado por la reacción mediante un cromatógrafo de gases equipado con un detector de conductividad térmica. Este procedimiento propone pipetear 300  $\mu\text{L}$  de solución de muestra problema o vinagre en un vial de muestra de espacio de cabeza sellado, en el que se colocan previamente 2,0 mL de solución de cloruro de sodio (0,200 mol/L) y 2,0 mL de carbonato de sodio (0,100 mol/L). Finalmente, el equilibrio del equipo (HS-GC) se realiza a 60 °C durante 20 min.

De acuerdo con lo anterior, se muestran dos pasos para neutralizar el ácido con carbonato, es decir, con bicarbonato (pH = 8) y luego con carbonato ácido (pH = 4). Se pueden esperar tres situaciones al agregar una cantidad diferente de ácidos en una solución de carbonato dada, es decir,

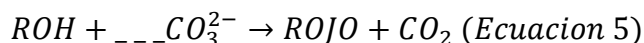
(a) Si la cantidad de ácidos (en moles) es menor que la de carbonato en la solución, básicamente no se forma  $\text{CO}_2$  a partir de la reacción, es decir:



(b) Si la cantidad de ácidos es mayor que el carbonato, pero menor que dos veces el contenido de carbonato en la solución, la reacción se puede escribir como:



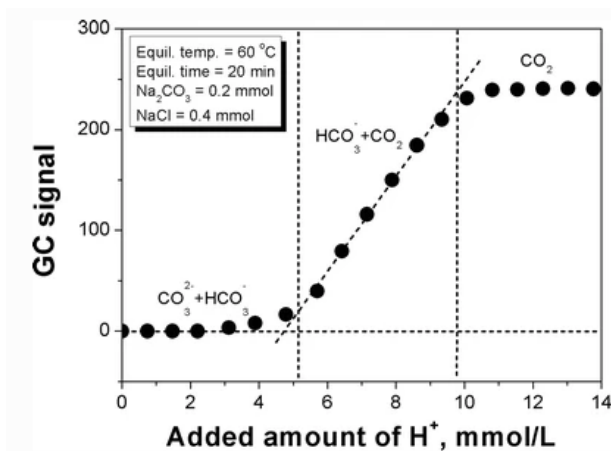
Si la cantidad de ácidos es mayor que dos veces el contenido de carbonato en la solución, es decir, la cantidad de reactivo (carbonato) es insuficiente, la reacción se puede escribir como:



De acuerdo con la figura 18, se muestran los cambios de  $CO_2$  en la solución de carbonato dada al agregar una cantidad diferente de ácido acético. Debido a que existe una relación lineal entre las señales de (HS-GC) y la cantidad de ácido agregado en el rango de 0,220 a 0,380 mmol (cumplir con la segunda situación), la cantidad de ácidos en la muestra se puede cuantificar si se encuentra en este rango. De esta manera, se puede pipetear un volumen mayor (hasta 400  $\mu$ L) de muestra de vinagre en la prueba y, por lo tanto, se puede reducir el error en el muestreo.

### Figura 18

*Relación entre la señal del GC y la cantidad añadida de  $H^+$ .*



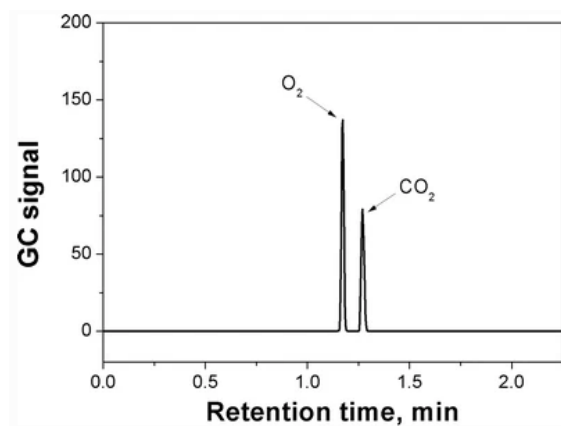
Tomado de (Xie & Chai, 2016).

Como se muestra en la figura 19, el  $CO_2$  formado a partir de la reacción se puede separar bien del oxígeno (en el aire) encerrado en el vial de muestra en las condiciones dadas en el GC. Dado que la reacción puede completarse instantáneamente, el equilibrio de  $CO_2$  en el espacio de

cabeza del vial de muestra es más importante para la medición de HS-GC. En este trabajo se eligió una temperatura moderada (60 °C) como temperatura de equilibrio.

### Figura 19

*Cromatograma en análisis HS-GC de una muestra de vinagre.*



Tomado de (Xie & Chai, 2016).

Otro estudio según Dini et al., (2020) para la cuantificación enzimática de ácido acético en vinagre en un sistema espectrofotométrico automatizado, se analizaron tres tipos de vinagre comercial: vinagre de vino blanco, tinto y balsámico. Las muestras se diluyeron 1:125 antes de los análisis; el equipo que se usó para esta medida fue el analizador iCubio iMagic M9 y se corrió con automatización completa para el ensayo enzimático en la determinación de ácido acético. Se pipetea automáticamente los reactivos y las muestras en la cubeta, lo cual permitió la incubación a una temperatura controlada, se leyó la absorbancia a la longitud de onda específica y calculó la concentración de los analitos con una curva de calibración. Los parámetros utilizados en los sistemas fotométricos automatizados fueron temperatura, 37 °C; longitudes de onda, 340 nm y 415 nm (bicromática); y camino óptico, 1 cm.

Como referencia al anterior método, el autor analizó muestras comerciales de vinagre por titulación para determinar el contenido de ácido acético siguiendo el método de referencia

tradicional. Una solución de NaOH, normalizada con hidrogenoftalato de potasio, se agregó gradualmente a 5,0 mL de la solución de vinagre. La neutralización completa se indicó mediante cambios de color en soluciones de fenolftaleína al 2% en etanol. Se llevaron a cabo análisis por triplicado. El promedio de los tres análisis se utilizó como valor de referencia (Dini et al., 2020).

Para el caso anterior no se reportó una medida exacta de la cuantificación del ácido acético en diferentes tipos de vinagre, ya que el objetivo de la investigación fue validar la cuantificación enzimática del ácido acético en vinagre en un sistema espectrofotométrico automatizado. Pero reporta en sus conclusiones que el método puede considerarse aplicable ya que la precisión y la incertidumbre son inferiores a las del método comunitario (las desviaciones rondan el 10 %) (Dini et al., 2020).

De acuerdo con la información analizada anteriormente, se puede afirmar que para la cuantificación del ácido acético en el vinagre producido, se debe seguir el método indicado (AOAC) 930.35(J) en la NTC 2188 de 2012, el cual es la metodología tradicional con hidróxido de sodio (NaOH) valorado, erlenmeyer, indicador de pH (fenolftaleína) como lo indica (Fssai, 2012), debido a que no requiere elementos ni equipos de difícil adquisición y/o manejo especializado.

**Propuesta de un Procedimiento Para la Producción de Vinagre del Suero a Través de la Fermentación del Lactosuero con *Kluyveromyces Marxianus* y *Acetobacter Pasteurianus* y la Cuantificación del Ácido Acético**

**Procedimiento Para la Producción de Vinagre del Suero a Través de la Fermentación del Lactosuero con *Kluyveromyces marxianus* y *Acetobacter pasteurianus***

**Figura 20**

*Propuesta para la obtención de vinagre a partir del lactosuero del queso.*



Fuente propia.

Descripción del proceso.

Lactosuero del queso: debe estar previamente filtrado con un contenido mínimo de: agua 93,9% lactosa 4,5%, proteína 0,7%, grasa 0,3%, y minerales 0,6%. La acidez máxima debe ser 0,40% p/p expresado como ácido láctico.

Pasteurización: Esta se aplica con el fin de reducir la carga microbiana y desnaturalizar el cuajo adicionado en la elaboración de quesos frescos no ácidos. Se realiza en marmita a 72°C durante 15s. Inmediatamente se baja la temperatura entre 2-6°C. Los desperdicios que se generan en esta fase del proceso son derrames de suero, el suero que queda pegado en la marmita durante el tratamiento térmico.

Fermentador 1 o fermentación 1: Se realiza elevando la temperatura del suero a 30°C en un tiempo de 48 horas para que *K. marxianus* pueda transformar la lactosa del SQ en etanol. Se debe controlar la cantidad de etanol producido que no sobrepase el 5% de etanol evitando la inhibición del *Acetobacter pasteurianus*. Los desperdicios se generan por el producto que se queda en las paredes de la marmita y en la tubería.

Fermentador 2 o fermentación 2: Posterior a la producción de etanol en el suero, elevando la temperatura del fermentado a 38°C en un tiempo de 48 horas para que *Acetobacter pasteurianus* pueda oxidar el etanol en ácido acético. En esta fase se puede realizar una titulación para cuantificar el ácido acético después de las 48 horas para verificar que se tenga una concentración de 50g/L. Se debe realizar esta oxidación en un sistema cerrado. Los desperdicios se generan por el producto que se queda en las paredes de la marmita y en la tubería.

Pasteurización 2: Esta se aplica con el fin de reducir la carga microbiana después de la fermentación. Se realiza en marmita a 72°C durante 15s. Inmediatamente se baja la temperatura



hasta 18°C. Los desperdicios que se generan en esta fase del proceso son derrames de suero, el suero que queda pegado en la marmita durante el tratamiento térmico.

Cuantificación del ácido acético en el vinagre: se procede a realizar una titulación del vinagre y debe contener mínimo 50g/L de vinagre.

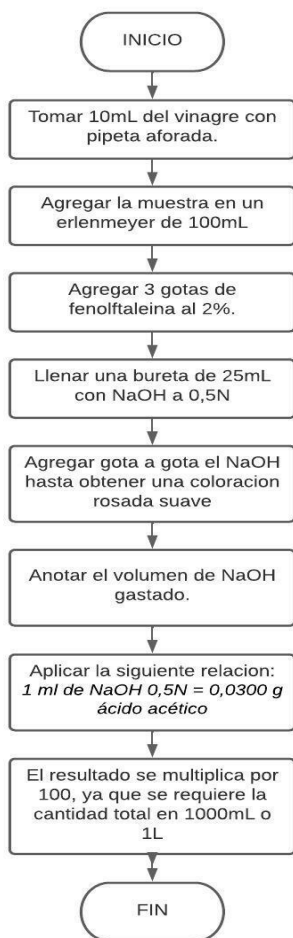
Purificar y envasado del vinagre: Se puede purificar el vinagre por proceso de centrifugación y el envasado se realiza en envases de polietileno de alta densidad o preferiblemente en envases de vidrio.

## Procedimiento Para la Cuantificación del Ácido Acético en el Vinagre del Suero

### Figura 21

*Propuesta para la valoración o titulación del ácido acético en el vinagre a partir del lactosuero del queso.*

#### PROCESO DE VALORACION DEL ACIDO ACETICO EN EL VINAGRE DEL LACTOSUERO POR EL METODO TRADICIONAL.



*Nota.* es importante resaltar que se debe obtener un vinagre con una concentración de ácido acético mínima de 50g/L en cumplimiento con la resolución 775 de 2008 Capítulo V, Artículo 10 “Requisitos fisicoquímicos del vinagre”. Fuente propia. Basado en (Fssai, 2012).

## Conclusiones

Las condiciones de fermentación para la obtención de vinagre usando los microorganismos *Kluyveromyces marxianus* y *Acetobacter pasteurianus* a partir de lactosuero son: temperatura entre 30-38°C en un tiempo de 96 horas para la fermentación total desde lactosa pasando por etanol hasta ácido acético.

Para la cuantificación o valoración de ácido acético obtenido después de la fermentación para la producción de vinagre, se sugiere realizarse por la técnica de titulación ácido – base ya que no se requieren equipos sofisticados ni conocimientos específicos de química, solamente se requiere la implementación de operaciones aritméticas y cuidado con la manipulación de algunos instrumentos de laboratorio.

Se generó una propuesta donde primero se pasteuriza el lactosuero para inactivar el cuajo proveniente de la elaboración de quesos, posteriormente se incuba el lactosuero a 30°C para adicionar el *Kluyveromyces marxianus* por un tiempo de 48 horas de fermentación; a continuación, se eleva la temperatura a 38°C y se adiciona el *Acetobacter pasteurianus* y se incuba a 48 horas más, se cuantifica el vinagre obtenido por el método de titulación ácido base.

### Referencias bibliográficas

- Alves, C. S. J., Floriano, S. A. M., Voltarelli, V. P., De Rensis, C. M. I. V. B., Pimentel, T. C., Costa, G. N., & Vianna, P. C. B. (2020). *Effect of carbonation and probiotic addition on the physicochemical, microbiological and sensory characteristics of whey dairy beverage*. *Journal of Dairy Research*, 87(2), 255–258. <https://doi.org/10.1017/S0022029920000291>
- Alves, É. de P., Morioka, L. R. I., & Suguimoto, H. H. (2019). *Comparison of bioethanol and beta-galactosidase production by Kluyveromyces and Saccharomyces strains grown in cheese whey*. *International Journal of Dairy Technology*, 72(3), 409–415. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12588>
- Chai, L. J., Qiu, T., Lu, Z. M., Deng, Y. J., Zhang, X. J., Shi, J. S., & Xu, Z. H. (2020). *Modulating microbiota metabolism via bioaugmentation with Lactobacillus casei and Acetobacter pasteurianus to enhance acetoin accumulation during cereal vinegar fermentation*. *Food Research International*, 138, 109737. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2020.109737>
- Charee, P., Tanamool, V., Toyama, H., & Soemphol, W. (2020). *Characterization of Thermotolerant Acetic Acid Bacteria Isolated from Various Plant Beverages in Thailand*. *Applied Food Biotechnology*, 7(2), 61–72. <https://doi.org/10.22037/AFB.V7I2.26516>
- Chen, Y., Bai, Y., Li, D., Wang, C., Xu, N., Wu, S., He, S., & Hu, Y. (2016). *Correlation between ethanol resistance and characteristics of PQQ-dependent ADH in acetic acid bacteria*. *European Food Research and Technology*, 242(6), 837–847. <https://doi.org/10.1007/S00217-015-2589-5/FIGURES/7>
- Chupaza, M. H., Park, Y. R., Kim, S. H., Yang, J. W., Jeong, G. T., & Kim, S. K. (2021). *Bioethanol Production from Azolla filiculoides by Saccharomyces cerevisiae, Pichia stipitis, Candida lusitaniae, and Kluyveromyces marxianus*. *Applied Biochemistry and*

- Biotechnology, 193(2), 502–514. <https://doi.org/10.1007/S12010-020-03437-0/FIGURES/6>
- da Silveira, F. A., de Oliveira Soares, D. L., Bang, K. W., Balbino, T. R., de Moura Ferreira, M. A., Diniz, R. H. S., de Lima, L. A., Brandão, M. M., Villas-Bôas, S. G., & da Silveira, W. B. (2020). *Assessment of ethanol tolerance of Kluyveromyces marxianus CCT 7735 selected by adaptive laboratory evolution*. Applied Microbiology and Biotechnology, 104(17), 7483–7494. <https://doi.org/10.1007/S00253-020-10768-9/FIGURES/4>
- DANE. (2020). *Encuesta anual manufacturera (EAM)*. <https://www.dane.gov.co/index.php/estadisticas-por-tema/industria/encuesta-anual-manufacturera-enam>
- de Moura Ferreira, M. A., da Silveira, F. A., & da Silveira, W. B. (2022). *Ethanol stress responses in Kluyveromyces marxianus: current knowledge and perspectives*. Applied Microbiology and Biotechnology 2022 106:4, 106(4), 1341–1353. <https://doi.org/10.1007/S00253-022-11799-0>
- Dianela, P. (2015). *Procesamiento del lactosuero: elaboración de lactosa y aprovechamiento de proteínas*. In Tecnología Láctea Latinoamericana N° (Vol. 87).
- Dini, I., Lorenzo, R. Di, Senatore, A., Coppola, D., & Laneri, S. (2020). *Validation of Rapid Enzymatic Quantification of Acetic Acid in Vinegar on Automated Spectrophotometric System*. Foods 2020, Vol. 9, Page 761, 9(6), 761. <https://doi.org/10.3390/FOODS9060761>
- Diniz, R. H. S., Villada, J. C., Alvim, M. C. T., Vidigal, P. M. P., Vieira, N. M., Lamas-Maceiras, M., Cerdán, M. E., González-Siso, M. I., Lahtvee, P. J., & da Silveira, W. B. (2017). *Transcriptome analysis of the thermotolerant yeast Kluyveromyces marxianus CCT 7735 under ethanol stress*. Applied Microbiology and Biotechnology, 101(18), 6969–6980. <https://doi.org/10.1007/S00253-017-8432-0/FIGURES/6>

- Dos Santos, L. F., Gonçalves, C. M., Ishii, P. L., & Suguimoto, H. H. (2017). *Deproteinization: an integrated-solution approach to increase efficiency in  $\beta$ -galactosidase production using cheese whey powder (CWP) solution*. *Revista Ambiente & Água*, 12(4), 643–651. <https://doi.org/10.4136/AMBI-AGUA.1936>
- Du, C., Li, Y., Zhao, X., Pei, X., Yuan, W., Bai, F., & Jiang, Y. (2019). *The production of ethanol from lignocellulosic biomass by *Kluyveromyces marxianus* CICC 1727-5 and *Spathaspora passalidarum* ATCC MYA-4345*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(6), 2845–2855. <https://doi.org/10.1007/S00253-019-09625-1/TABLES/2>
- Farrera, L., de la Noue, A. C., Strub, C., Guibert, B., Kouame, C., Grabulos, J., Montet, D., & Teyssier, C. (2021). *Towards a Starter Culture for Cocoa Fermentation by the Selection of Acetic Acid Bacteria*. *Fermentation* 2021, Vol. 7, Page 42, 7(1), 42. <https://doi.org/10.3390/FERMENTATION7010042>
- Fssai. (2012). *Manual of Methods of Analysis of Foods*. In *Proceedings of the Nutrition Society* (Vol. 5, Issue 1). <https://doi.org/10.1079/pns19730004>
- Fu, X., Li, P., Zhang, L., & Li, S. (2019). *Understanding the stress responses of *Kluyveromyces marxianus* after an arrest during high-temperature ethanol fermentation based on integration of RNA-Seq and metabolite data*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(6), 2715–2729. <https://doi.org/10.1007/S00253-019-09637-X/FIGURES/6>
- Gao, L., Wu, X., Xia, X., & Jin, Z. (2021). *Fine-tuning ethanol oxidation pathway enzymes and cofactor PQQ coordinates the conflict between fitness and acetic acid production by *Acetobacter pasteurianus**. *Microbial Biotechnology*, 14(2), 643–655. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13703>
- Gil, N. Y., Gwon, H. M., Yeo, S. H., & Kim, S. Y. (2020). *Metabolite Profile and*

- Immunomodulatory Properties of Bellflower Root Vinegar Produced Using Acetobacter pasteurianus A11-2*. Foods 2020, Vol. 9, Page 1063, 9(8), 1063.  
<https://doi.org/10.3390/FOODS9081063>
- González-Amado, M., Tavares, A. P. M., Freire, M. G., Soto, A., & Rodríguez, O. (2021). *Recovery of lactose and proteins from cheese whey with poly(ethylene)glycol/sulfate aqueous two-phase systems*. Separation and Purification Technology, 255, 117686.  
<https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.117686>
- Gonzalez, A. (2020). *Cadena láctea Colombiana*. In Analisis situacional Cadena láctea.  
[http://www.andi.com.co/Uploads/20200430\\_DT\\_AnalSitLecheLarga\\_AndreaGonzalez.pdf](http://www.andi.com.co/Uploads/20200430_DT_AnalSitLecheLarga_AndreaGonzalez.pdf)
- Gullo, M., Verzelloni, E., & Canonico, M. (2014). *Aerobic submerged fermentation by acetic acid bacteria for vinegar production: Process and biotechnological aspects*. Process Biochemistry, 49(10), 1571–1579. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2014.07.003>
- Icontec Internacional. (2012). *NTC 2188 Industrias Alimentarias. Vinagre* (Issue 571).  
<https://docplayer.es/66675044-Norma-tecnica-colombiana-2188.html>
- 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>
- Kim, E. J., Cho, K. M., Kwon, S. J., Seo, S. H., Park, S. E., & Son, H. S. (2021). *Factors affecting vinegar metabolites during two-stage fermentation through metabolomics study*. LWT, 135, 110081. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2020.110081>
- Kityo, M. K., Sunwoo, I., Kim, S. H., Park, Y. R., Jeong, G. T., & Kim, S. K. (2020). *Enhanced Bioethanol Fermentation by Sonication Using Three Yeasts Species and Kariba Weed*

- (Salvinia molesta)* as Biomass Collected from Lake Victoria, Uganda. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 192(1), 180–195. <https://doi.org/10.1007/S12010-020-03305-X/TABLES/2>
- Kokkiligadda, A., Beniwal, A., Saini, P., & Vij, S. (2016). *Utilization of Cheese Whey Using Synergistic Immobilization of  $\beta$ -Galactosidase and *Saccharomyces cerevisiae* Cells in Dual Matrices*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 179(8), 1469–1484. <https://doi.org/10.1007/S12010-016-2078-8/FIGURES/10>
- Królczyk, J. B., Dawidziuk, T., Janiszewska-Turak, E., & Sołowiej, B. (2016). *Use of Whey and Whey Preparations in the Food Industry - A Review*. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 66(3), 157–165. <https://doi.org/10.1515/PJFNS-2015-0052>
- Li, S., Li, P., Feng, F., & Luo, L. X. (2015). *Microbial diversity and their roles in the vinegar fermentation process*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(12), 4997–5024. <https://doi.org/10.1007/S00253-015-6659-1/TABLES/5>
- Luo, S. R., Demarsh, T. A., Deriancho, D., Stelick, A., & Alcaine, S. D. (2021). *Characterization of the Fermentation and Sensory Profiles of Novel Yeast-Fermented Acid Whey Beverages*. *Foods* 2021, Vol. 10, Page 1204, 10(6), 1204. <https://doi.org/10.3390/FOODS10061204>
- Marcus, J. F., Demarsh, T. A., & Alcaine, S. D. (2021). *Upcycling of Whey Permeate through Yeast- and Mold-Driven Fermentations under Anoxic and Oxic Conditions*. *Fermentation* 2021, Vol. 7, Page 16, 7(1), 16. <https://doi.org/10.3390/FERMENTATION7010016>
- Matsumoto, N., Matsutani, M., Azuma, Y., Kataoka, N., Yakushi, T., & Matsushita, K. (2020). *In vitro thermal adaptation of mesophilic *Acetobacter pasteurianus* NBRC 3283 generates thermotolerant strains with evolutionary trade-offs*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 84(4), 832–841. <https://doi.org/10.1080/09168451.2019.1703638>



- Matsumoto, N., Osumi, N., Matsutani, M., Phathanathavorn, T., Kataoka, N., Theeragool, G., Yakushi, T., Shiraishi, Y., & Matsushita, K. (2021). *Thermal adaptation of acetic acid bacteria for practical high-temperature vinegar fermentation*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 85(5), 1243–1251. <https://doi.org/10.1093/BBB/ZBAB009>
- Matsutani, M., Nishikura, M., Saichana, N., Hatano, T., Masud-Tippayasak, U., Theergool, G., Yakushi, T., & Matsushita, K. (2013). *Adaptive mutation of Acetobacter pasteurianus SKU1108 enhances acetic acid fermentation ability at high temperature*. *Journal of Biotechnology*, 165(2), 109–119. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOTEC.2013.03.006>
- Mendoza, A. S. (2013). *Caracterización de la Levadura Kluyveromyces Marxianus como Microorganismo Probiótico*. In *Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53). <http://dgsa.uaeh.edu.mx:8080/bibliotecadigital/handle/231104/1862>
- Ministerio de la Protección Social. (2008). *Resolucion 775 de 2008. Por la cual se establece el reglamento técnico sobre los requisitos sanitarios que deben cumplir las fábricas que procesen, envasen, transporten, expendan, almacenen, importen, exporten y comercialicen vinagre para consumo humano*.
- Naziroğlu, M., Güler, M., Özgül, C., Saydam, G., Küçükayaz, M., & Sözbir, E. (2014). *Apple Cider Vinegar Modulates Serum Lipid Profile, Erythrocyte, Kidney, and Liver Membrane Oxidative Stress in Ovariectomized Mice Fed High Cholesterol*. *The Journal of Membrane Biology* 2014 247:8, 247(8), 667–673. <https://doi.org/10.1007/S00232-014-9685-5>
- Núñez-Guerrero, M. E., Páez-Lerma, J. B., Rutiaga-Quiñones, O. M., González-Herrera, S. M., & Soto-Cruz, N. O. (2016). *Performance of mixtures of Saccharomyces and non-Saccharomyces native yeasts during alcoholic fermentation of Agave duranguensis juice*. *Food Microbiology*, 54, 91–97. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2015.10.011>

- Nurcholis, M., Lertwattanasakul, N., Rodrussamee, N., Kosaka, T., Murata, M., & Yamada, M. (2020). *Integration of comprehensive data and biotechnological tools for industrial applications of Kluyveromyces marxianus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(2), 475–488. <https://doi.org/10.1007/S00253-019-10224-3/TABLES/6>
- Ouattara, H. G., & Niamké, S. L. (2021). *Mapping the functional and strain diversity of the main microbiota involved in cocoa fermentation from Cote d'Ivoire*. *Food Microbiology*, 98, 103767. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2021.103767>
- Padin, C., & Diaz, M. (2009). *Fermentacion alcoholica del lactosuero por Kluyveromyces marxianus y solventes organicos como extractantes*. *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiologia*, 29(2), 110–116. [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1315-25562009000200008](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562009000200008)
- Pal, P., & Nayak, J. (2017). *Acetic Acid Production and Purification: Critical Review Towards Process Intensification*. In *Separation and Purification Reviews* (Vol. 46, Issue 1, pp. 44–61). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/15422119.2016.1185017>
- Parrondo, J., Herrero, M., García, L. A., & Díaz, M. (2003). *A Note — Production of Vinegar from Whey*. *Journal of the Institute of Brewing*, 109(4), 356–358. <https://doi.org/10.1002/J.2050-0416.2003.TB00610.X>
- Pendón, M. D., Madeira, J. V., Romanin, D. E., Rumbo, M., Gombert, A. K., & Garrote, G. L. (2021). *A biorefinery concept for the production of fuel ethanol, probiotic yeast, and whey protein from a by-product of the cheese industry*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(9), 3859–3871. <https://doi.org/10.1007/S00253-021-11278-Y/FIGURES/7>
- Prada, D. C. (2015). *Obtención de vinagre tipo gourmet a partir de la fermentación de uchuva (Physalis peruviana L.)*. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/55382>

- Qi, Z., Dong, D., Yang, H., & Xia, X. (2017). *Improving fermented quality of cider vinegar via rational nutrient feeding strategy*. *Food Chemistry*, 224, 312–319. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2016.12.078>
- Ramos, G. L. de P. A., Guimarães, J. T., Pimentel, T. C., da Cruz, A. G., de Souza, S. L. Q., & Vendramel, S. M. R. (2021). *Whey: generation, recovery, and use of a relevant by-product*. *Valorization of Agri-Food Wastes and By-Products*, 391–414. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824044-1.00030-1>
- Reddy, M. V., Nandan Reddy, V. U., & Chang, Y. C. (2022). *Integration of anaerobic digestion and chain elongation technologies for biogas and carboxylic acids production from cheese whey*. *Journal of Cleaner Production*, 364, 132670. <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2022.132670>
- Rodrigues, T. H. S., de Barros, E. M., de Sá Brígido, J., da Silva, W. M., Rocha, M. V. P., & Gonçalves, L. R. B. (2016). *The Bioconversion of Pretreated Cashew Apple Bagasse into Ethanol by SHF and SSF Processes*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 178(6), 1167–1183. <https://doi.org/10.1007/S12010-015-1936-0/FIGURES/6>
- Rodríguez, C. M., & Sarabia, C. I. (2012). *Efecto del método de fermentación acética en las características físico-químicas y sensoriales en vinagre de naranja agria (Citrus x aurantium) y piña (Ananas comosus)*. <https://bdigital.zamorano.edu/handle/11036/1252?locale=es>
- Sadh, P. K., Kumar, S., Chawla, P., & Duhan, J. S. (2018). *Fermentation: A Boon for Production of Bioactive Compounds by Processing of Food Industries Wastes (By-Products)*. *Molecules* 2018, Vol. 23, Page 2560, 23(10), 2560. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES23102560>
- Septembre-Malaterre, A., Remize, F., & Poucheret, P. (2018). *Fruits and vegetables, as a source*

- of nutritional compounds and phytochemicals: Changes in bioactive compounds during lactic fermentation.* Food Research International, 104, 86–99.  
<https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2017.09.031>
- Sharma, D., Manzoor, M., Yadav, P., Sohal, J. S., Aseri, G. K., & Khare, N. (2018). *Biovalorization of dairy whey for bioethanol by stress-tolerant yeast.* Fungi and Their Role in Sustainable Development: Current Perspective, 349–366. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-0393-7\\_20](https://doi.org/10.1007/978-981-13-0393-7_20)
- Song, N. E., Jeong, D. Y., & Baik, S. H. (2019). *Application of indigenous Saccharomyces cerevisiae to improve the black raspberry (Rubus coreanus Miquel) vinegar fermentation process and its microbiological and physicochemical analysis.* Food Science and Biotechnology, 28(2), 481–489. <https://doi.org/10.1007/S10068-018-0489-8/FIGURES/3>
- Sukwong, P., Sunwoo, I. Y., Lee, M. J., Ra, C. H., Jeong, G. T., & Kim, S. K. (2019). *Application of the Severity Factor and HMF Removal of Red Macroalgae Gracilaria verrucosa to Production of Bioethanol by Pichia stipitis and Kluyveromyces marxianus with Adaptive Evolution.* Applied Biochemistry and Biotechnology, 187(4), 1312–1327. <https://doi.org/10.1007/S12010-018-2888-Y/TABLES/2>
- Tanamool, V., Chantarangsee, M., & Soemphol, W. (2020). *Simultaneous vinegar fermentation from a pineapple by-product using the co-inoculation of yeast and thermotolerant acetic acid bacteria and their physicochemical properties.* 3 Biotech, 10(3), 1–11. <https://doi.org/10.1007/S13205-020-2119-4/FIGURES/5>
- Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2007). *Introducción a la microbiología.* [https://books.google.es/books?id=Nxb3iETuwpIC&pg=PA137&dq=fermentación+proceso&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjgt8\\_N5ormAhWh3OAKHaI0B84Q6AEIQDAD#v=onepag](https://books.google.es/books?id=Nxb3iETuwpIC&pg=PA137&dq=fermentación+proceso&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjgt8_N5ormAhWh3OAKHaI0B84Q6AEIQDAD#v=onepag)

e&q=fermentación proceso&f=false

- Valk-Weeber, R. L., Eshuis-de Rooter, T., Dijkhuizen, L., & van Leeuwen, S. S. (2020). *Quantitative analysis of bovine whey glycoproteins using the overall N-linked whey glycoprofile*. *International Dairy Journal*, 110, 104814. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104814>
- Varela, J. A., Montini, N., Scully, D., Van der Ploeg, R., Oreb, M., Boles, E., Hirota, J., Akada, R., Hoshida, H., & Morrissey, J. P. (2017). *Polymorphisms in the LAC12 gene explain lactose utilisation variability in Kluyveromyces marxianus strains*. *FEMS Yeast Research*, 17(3). <https://doi.org/10.1093/FEMSYR/FOX021>
- Verardo, V., Gómez-Caravaca, A. M., & Tabanelli, G. (2020). *Bioactive Components in Fermented Foods and Food By-Products*. *Foods* 2020, Vol. 9, Page 153, 9(2), 153. <https://doi.org/10.3390/FOODS9020153>
- Verevkin, S. P. (2000). *Measurement and prediction of the monocarboxylic acids thermochemical properties*. *Journal of Chemical and Engineering Data*, 45(5), 953–960. <https://doi.org/10.1021/jc990282m>
- Wang, L., Gao, E., Hu, M., Oladejo, A., Gong, X., Wang, J., & Zhong, H. (2018). *Isolation, identification and screening of high-quality yeast strains for the production of milk beer*. *International Journal of Dairy Technology*, 71(4), 944–953. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12530>
- Wang, Z. M., Lu, Z. M., Yu, Y. J., Li, G. Q., Shi, J. S., & Xu, Z. H. (2015). *Batch-to-batch uniformity of bacterial community succession and flavor formation in the fermentation of Zhenjiang aromatic vinegar*. *Food Microbiology*, 50, 64–69. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2015.03.012>

- Wu, X., Yao, H., Cao, X., Liu, Q., Cao, L., Mu, D., Luo, S., Zheng, Z., Jiang, S., & Li, X. (2017). *Production of vinegar from purple sweet potato in a liquid fermentation process and investigation of its antioxidant activity*. *3 Biotech*, 7(5), 1–10. <https://doi.org/10.1007/S13205-017-0939-7/TABLES/6>
- Wu, X., Yao, H., Liu, Q., Zheng, Z., Cao, L., Mu, D., Wang, H., Jiang, S., & Li, X. (2018). *Producing Acetic Acid of Acetobacter pasteurianus by Fermentation Characteristics and Metabolic Flux Analysis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 186(1), 217–232. <https://doi.org/10.1007/S12010-018-2732-4/TABLES/3>
- Xie, W. Q., & Chai, X. S. (2016). *Determination of Total Acid Content in Vinegars by Reaction-Based Headspace Gas Chromatography*. *Food Analytical Methods* 2016 10:2, 10(2), 419–423. <https://doi.org/10.1007/S12161-016-0595-2>
- Yadav, J. S. S., Yan, S., Pilli, S., Kumar, L., Tyagi, R. D., & Surampalli, R. Y. (2015). *Cheese whey: A potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides*. In *Biotechnology Advances* (Vol. 33, Issue 6, pp. 756–774). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.07.002>
- Zheng, Y., Chang, Y., Zhang, R., Song, J., Xu, Y., Liu, J., & Wang, M. (2018). *Two-stage oxygen supply strategy based on energy metabolism analysis for improving acetic acid production by Acetobacter pasteurianus*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 45(9), 781–788. <https://doi.org/10.1007/S10295-018-2060-2>
- Zheng, Y., Zhao, C., Li, X., Xia, M., Wang, X., Zhang, Q., Yan, Y., Lang, F., Song, J., & Wang, M. (2022). *Kinetics of predominant microorganisms in the multi-microorganism solid-state fermentation of cereal vinegar*. *LWT*, 159, 113209. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2022.113209>

- Zinjanab, M. S., Golmakani, M. T., Eskandari, M. H., Toh, M., & Liu, S. Q. (2021). *Yeast-Lactobacillus Co-Cultures as in situ Ethanol Producers for Flavor Ester Synthesis using Lipase in Fermented Milks*. *Applied Food Biotechnology*, 8(2), 151–160. <https://doi.org/10.22037/AFB.V8I2.30873>
- Zotta, T., Solieri, L., Iacumin, L., Picozzi, C., & Gullo, M. (2020). *Valorization of cheese whey using microbial fermentations*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2020 104:7, 104(7), 2749–2764. <https://doi.org/10.1007/S00253-020-10408-2>