



UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO
DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BÁSICAS



**INTERACCIONES MICROBIANAS EN LA FERMENTACIÓN OSCURA
DEL SUERO DE QUESO ÁCIDO EN SISTEMAS CONTINUOS:
EFECTO DE LA MICROBIOTA NATIVA Y DEL LODO ANAEROBIO
GRANULAR**

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS EN QUÍMICA APLICADA

PRESENTA:

L.Q. ANDREA LIZBETH FERIA LARA

BAJO LA DIRECCIÓN DE:

DR. DURVEL DE LA CRUZ ROMERO

EN CODIRECCIÓN DE:

DR. ELÍAS RAZO FLORES

CUNDUACÁN, TABASCO, A 10 DE NOVIEMBRE DEL 2025

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD

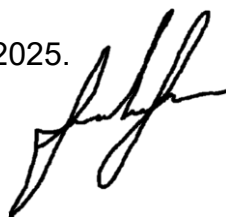
En la Ciudad de Cunduacán, el día 10 del mes de noviembre del año 2025, el que suscribe **C. Andrea Lizbeth Feria Lara** alumna del **Programa de Maestría en Ciencias en Química Aplicada** con número de matrícula **232A27007**, adscrito a la División Académica de Ciencias Básicas, de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, como autora de la Tesis presentada para la obtención del grado de Maestría en Química Aplicada y titulada "INTERACCIONES MICROBIANAS EN LA FERMENTACIÓN OSCURA DEL SUERO DE QUESO ÁCIDO EN SISTEMAS CONTINUOS: EFECTO DE LA MICROBIOTA NATIVA Y DEL LODO ANAEROBIO GRANULAR", dirigida por el **Dr. Durvel de la Cruz Romero** en codirección con el **Dr. Elías Razo Flores**.

DECLARO QUE:

La Tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la LEY FEDERAL DEL DERECHO DE AUTOR (Decreto por el que se reforman y adicionan diversas disposiciones de la Ley Federal del Derecho de Autor del 01 de Julio de 2020 regularizando y aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad o contenido de la Tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

Villahermosa, Tabasco a 10 de noviembre del 2025.



Andrea Lizbeth Feria Lara

AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN



División
Académica
de Ciencias
Básicas



DIRECCIÓN

22 de octubre de 2025

ANDREA LIZBETH FERIA LARA
EGRESADA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS
EN QUÍMICA APLICADA
PRESENTE

Por medio del presente y de la manera más atenta, me dirijo a Usted para hacer de su conocimiento que se le **AUTORIZA** la impresión del trabajo titulado **"INTERACCIONES MICROBIANAS EN LA FERMENTACIÓN OSCURA DEL SUERO DE QUESO ÁCIDO EN SISTEMAS CONTINUOS: EFECTO DE LA MICROBIOTA NATIVA Y DEL LODO ANAEROBIO GRANULAR"** dirigido por el Dr. Durvel de la Cruz Romero y Dr. Elías Razo Flores (IPICYT), bajo la modalidad de titulación por Tesis.

La Comisión revisora conformada por el Dr. Srinivas Godavarthi, Dr. Raúl García Morales, Dr. Adib Abiu Silahua Pavón, Dr. Adrián Cordero García y Dra. María Antonia Lunagómez Rocha aprobó el documento en virtud de reunir los requisitos para el EXAMEN PROFESIONAL y obtener el grado de **Maestro en Ciencias en Química Aplicada**.

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

ATENTAMENTE



DIVISIÓN ACADÉMICA DE
CIENCIAS BÁSICAS

DRA. HERMICENDA PÉREZ VIDAL
DIRECTORA

C.C.P.- Archivo.

Dir'Dra.HPV/JP'Dra.EAM/fkal *J*

|Km.1 Carretera Cunduacán-Jalpa de Méndez, A.P. 24, C.P. 86690, Cunduacán, Tab., México.
Tel/Fax: (993) 3581500 Ext. 6702,6701 E-Mail: direccion.dacb@ujat.mx

www.ujat.mx

CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS

Villahermosa, Tabasco a 10 de noviembre del 2025.

Por medio de la presente manifestamos haber colaborado como AUTORES en la producción, creación y realización de la obra denominada "INTERACCIONES MICROBIANAS EN LA FERMENTACIÓN OSCURA DEL SUERO DE QUESO ÁCIDO EN SISTEMAS CONTINUOS: EFECTO DE LA MICROBIOTA NATIVA Y DEL LODO ANAEROBIO GRANULAR".

Con fundamento en el artículo 83 de la Ley Federal del Derecho de Autor y toda vez que, la creación o realización de la obra antes mencionada se realizó bajo la comisión de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco; entendemos y aceptamos el alcance del artículo en mención, de que tenemos el derecho al reconocimiento como autores de la obra, y la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco mantendrá en un 100% la titularidad de los derechos patrimoniales por un período de 20 años sobre la obra en la que colaboramos, por lo anterior, cedemos el derecho patrimonial exclusivo en favor de la Universidad.

COLABORADORES



Andrea Lizbeth Feria Lara

Egresada de la Maestría en Ciencias en Química Aplicada



Dr. Durvel de la Cruz Romero
Director de Tesis – UJAT DACB



Dr. Elías Razo Flores
Codirector de Tesis – IPICYT DCA

CARTA DE AUTORIZACIÓN

El que suscribe, autoriza por medio del presente escrito a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco para que utilice tanto física como digitalmente el Trabajo de grado, por Defensa de Tesis, denominado "INTERACCIONES MICROBIANAS EN LA FERMENTACIÓN OSCURA DEL SUERO DE QUESO ÁCIDO EN SISTEMAS CONTINUOS: EFECTO DE LA MICROBIOTA NATIVA Y DEL LODO ANAEROBIO GRANULAR", del cual soy autor y titular de los Derechos de Autor.

La finalidad del uso por parte de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco del Trabajo antes mencionado, será única y exclusivamente para difusión, educación y sin fines de lucro; autorización que se hace de manera enunciativa mas no limitativa para subirla a la Red Abierta de Bibliotecas Digitales (RABID) y a cualquier otra red académica con las que la Universidad tenga relación institucional.

Por lo antes manifestado, libero a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco de cualquier reclamación legal que pudiera ejercer respecto al uso y manipulación del Trabajo mencionado y para los fines estipulados en este documento.

Se firma la presente autorización en la ciudad de Villahermosa, Tabasco, a los 10 días del mes de noviembre del año 2025.

AUTORIZÓ



Andrea Lizbeth Feria Lara

Egresada de la Maestría en Ciencias en Química Aplicada
Matricula: 162A14061



PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

Parte del contenido correspondiente a la metodología, resultados, discusión y conclusiones de esta tesis dio lugar al artículo científico:

Andrea Lizbeth FERIA-LARA, Paola Janet DELGADO-ESPITIA, Durvel DE LA CRUZ-ROMERO, Elías RAZO-FLORES

“ESTRATEGIAS BIOTECNOLÓGICAS PARA LA VALORIZACIÓN Y TRATAMIENTO DEL SUERO DE QUESO ÁCIDO”

Revista Internacional de Contaminación Ambiental (RICA).

Aceptado para publicación, Octubre 2025.



CRÉDITOS INSTITUCIONALES

Esta tesis fue elaborada en los Laboratorios de la División de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Elías Razo Flores.

Este trabajo de investigación fue financiado por el Fondo Sectorial SEP-CONAYCT, proyecto A1-S-37174 “Barreras inhibitorias y termodinámicas de la producción de hidrógeno: Fermentación extractiva como estrategia para mejorar su producción”, asignado al Dr. Elías Razo Flores.



CRÉDITOS INSTITUCIONALES

Esta tesis es producto del proyecto institucional:

“Producción biológica de hidrógeno por fermentación oscura a partir de lactosa”

con clave 20230119, asignado al Dr. Durvel de la Cruz Romero

Registrado en la Dirección de Investigación de la Secretaría de Investigación, Posgrado y Vinculación de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

DEDICATORIA

Dedico el presente trabajo con todo mi amor a:

A mis padres Aura y Mauricio, porque todo se lo debo a ellos. Especialmente a mi mamá Aura, por inculcarme la importancia de estudiar, el apoyo incondicional en todo momento y por ser la inspiración para finalizar esta etapa.

A Martin, por su invaluable apoyo y motivación constante a lo largo de este proceso, por tu compañía y aliento incondicional que han sido un pilar que me permitió mantenerme firme y avanzar con determinación. Gracias, amor.

A mi hermano Mauri, gracias por ser la personita que le da sentido a mi vida, por apoyarme en todo momento y darme muchos ánimos.

A mi hermano Rubén, gracias por siempre creer en mí, que en paz descanses, esto va dedicado a ti, porque la vida nos enseña que debemos vivirla al máximo hasta el último día, tú eres el ejemplo claro. Te quiero, Dios te bendiga.

A mis padrinos Lucia y Manuel, que sin duda han estado conmigo en todo momento apoyándome, gracias por guiarme y aconsejarme, esto va por ti mamita linda.

A la memoria de mis abuelitos Andrea y Catalino que siempre me apoyaron en todo momento, gracias por siempre cuidarme y estar conmigo.

A mis abuelitos María y Rubén por siempre acompañarme en todo mi camino, gracias por creer en mí.

A mis compañeros de generación: Luis, Jhatziry, Luz, Yami, Navarro, Raúl, Sebas; Por compartir este camino de aprendizaje, gracias por las pláticas, el apoyo en momentos difíciles, risas que hicieron más ligeros los días, me siento afortunada de haber coincidido con ustedes.

A mis amigas Chelito, Isa, Itzel y Vini, por acompañarme en toda mi estancia en San Luis Potosí, sin duda me traje a Tabasco no solo grandes recuerdos, sino también una amistad verdadera.

A los “morritos cafeteros del IPICYT”: Andi, Jony, Julián, Pao, Paulina, Quinik, Miguel, Wendy y Chino; Sin ustedes mi estancia en el IPICYT no habría sido divertida. Gracias por brindarme su amistad y por abrirme las puertas de sus casas.

A Dios, gracias por ser mi guía en todo momento, por darme la fortaleza y ser mi refugio en cada momento difícil de mi vida, gracias por darme la vida. Este logro es también tuyo, porque sin Ti, nada soy.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de manera muy especial al Dr. Durvel de la Cruz Romero, por su valiosa orientación, paciencia y compromiso durante todo el posgrado, gracias doctor por creer en mí.

Al Dr. Elías Razo Flores, gracias por su experiencia, exigencia académica y disposición para guiarme en todo el proceso metodológico de la tesis.

Al Dr. Julián Carrillo Reyes, Instituto de Ingeniería, Unidad Académica Juriquilla, por proporcionar el suero de queso y por las discusiones con su grupo de trabajo sobre el tema.

A todos los profesores y técnicos académicos que formaron parte del proyecto de investigación y contribuyeron de diversas formas en el desarrollo de la presente tesis. Especialmente al M.C. Guillermo Vidriales, M.C. Juan Pablo Rodas, Dra. Sonia Arriaga y la Dra. Berenice Celis, gracias por todo su apoyo incondicional, gracias por guiarme en los laboratorios y compartir conmigo sus conocimientos.

Al grupo de Biocombustibles gaseosos de la División de Ciencias Ambientales del IPICYT: Paulina, Julián, Paola y Mayra, gracias por todo su apoyo incondicional y colaboración durante mi estancia en el IPICYT.

Agradezco especialmente a M.C. Paola Delgado por compartir conmigo todo su conocimiento, técnicas en el laboratorio y las observaciones que me ayudaron a mejorar.

A mi comité tutorial, gracias Dra. Hermicenda Pérez Vidal y Dr. Adrián Cervantes Uribe por guiarme durante todo el proceso del proyecto, gracias por su tiempo, disposición y acompañamiento, sus observaciones fueron fundamentales para fortalecer este proyecto.

ÍNDICE

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD.....	ii
AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN.....	iii
CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS.....	iv
CARTA DE AUTORIZACIÓN.....	v
PRODUCCIÓN CIENTÍFICA.....	vi
CRÉDITOS INSTITUCIONALES.....	vii
DEDICATORIA.....	ix
AGRADECIMIENTOS.....	xi
ÍNDICE.....	xii
ÍNDICE DE TABLAS.....	xiv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiv
ABREVIATURAS.....	xvi
RESUMEN.....	1
PALABRAS CLAVES.....	1
ABSTRACT.....	2
KEY WORDS.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
MARCO TEÓRICO.....	6
Digestión anaerobia.....	6
Hidrólisis.....	6
Acidogénesis.....	6
Acetogénesis.....	6
Metanogénesis.....	7
Metanogénesis y producción de biogás.....	7
Fermentación oscura.....	8
Factores que afectan la fermentación oscura.....	10
Suero de queso como sustrato para la digestión anaerobia.....	15
Composición y características del suero de queso.....	15
ANTECEDENTES.....	18
Fermentación oscura en la valorización del suero de queso.....	18

Digestión anaerobia en la valorización del suero de queso.	19
JUSTIFICACIÓN.....	21
PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN.....	22
HIPÓTESIS.....	22
OBJETIVOS.....	23
OBJETIVO GENERAL.....	23
OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	23
METODOLOGÍA.....	24
Caracterización del suero de queso ácido: fresco, autofermentado y autofermentado-filtrado.....	24
Fermentación oscura: efecto de los sólidos y del tiempo de retención hidráulico.....	24
Digestión anaerobia en reactores en lote automatizados para producción de metano.	27
Métodos analíticos.....	29
Métodos estadísticos.....	31
RESULTADOS.....	33
Composición del suero de queso ácido en suero fresco, autofermentado y autofermentado-filtrado.....	33
Producción de ácidos carboxílicos e hidrógeno: Influencia de los sólidos y tiempo de retención hidráulico.....	34
Producción de metano a partir de suero autofermentado, filtrado y efluentes de reactores de fermentación oscura.....	37
DISCUSIÓN.....	40
Valorización del suero de queso mediante la producción de ácidos carboxílicos e hidrógeno.....	40
Metanización del suero de queso autofermentado y doblemente fermentado.....	43
CONCLUSIONES.....	46
RECOMENDACIONES.....	47
REFERENCIAS CITADAS.....	48
ANEXOS.....	53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Caracterización del suero de queso fresco, autofermentado y autofermentado-filtrado.	33
Tabla 2.	Producción de hidrógeno y ácidos carboxílicos mediante la fermentación oscura en los reactores F1 – F4.	36
Tabla 3.	Parámetros cinéticos a partir de los datos experimentales del modelo de Gompertz modificado en la producción de metano.	39
Tabla 4.	Comparación de la producción de hidrógeno y ácidos carboxílicos a partir del suero de queso fermentado.	42
Tabla 5.	Comparación de la producción específica de metano y condiciones operativas en digestión anaerobia.	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Esquema de la digestión anaerobia en la que se prioriza la fermentación oscura por la eliminación de la metanogénesis., PFOR: Piruvato ferredoxina oxidorreductasa, PFL: Piruvato formiato liasa, ACE: vía acetoclastica, HIDRO: vía hidrogenotrófica (BioRender, 2024).	9
Figura 2.	Fermentación natural del suero de queso con bacterias BAL presentes en el medio	16
Figura 3.	Esquema de tratamientos para la valorización del suero de queso autofermentado; F1: suero de queso autofermentado, TRH 10 h; F2: suero autofermentado-filtrado, TRH 10 h; F3: suero autofermentado, TRH 18 h; F4: suero autofermentado-filtrado, TRH 18 h.	25
Figura 4.	Esquema de reactores CSTR F1 – F4, empleados para la fermentación oscura (BioRender, 2024).	26

Figura 5.	Esquema de reactores del AMPTS II del M1 – M4 empleados para la producción de metano	28
Figura 6.	Concentraciones de los ácidos carboxílicos y alcoholes producidos en los reactores F1 – F4 de fermentación oscura en estado estable.	34
Figura 7.	Producción acumulada de metano bajo diferentes tratamientos normalizados al control endógeno. A) M1, B) M2, C) M3 y D) M4. Los datos corresponden a los reactores M1 – M4 (rojo), control positivo (azul) y control endógeno (verde). La línea continua representa el ajuste del modelo de Gompertz modificado para cada caso.	38
Figura A1.1	Fotografía del lodo anaerobio granular fresco A), pretratado térmicamente y molido B).	53
Figura A2.1	Producción de hidrógeno biológico de los cuatro reactores de fermentación oscura (F1 – F4) a partir de las velocidades volumétricas de producción de hidrógeno y los litros obtenidos por día, A) F1, B) F2, C) F3 y D) F4.	54
Figura A2.2	Cinética de la producción de los ácidos carboxílicos de los cuatro reactores de fermentación oscura en comparación con las velocidades de producción de hidrógeno. A) F1, B) F2, C) F3 y D) F4.	55
Figura A2.3	Balance de masas de los estados estables de cada reactor de fermentación oscura. DQO N/D: demanda química de oxígeno no identificada; AT: azúcares totales.	56

ABREVIATURAS

L H ₂ /L-d	Litros de hidrógeno por cada litro de suero de queso agregado al reactor al día
AMPTS II	Sistema automático de prueba de potencial de metano
AT	Azúcares totales
BAL	Bacterias ácido-lácticas
COV	Carga orgánica volumétrica
CSTR	Reactor continuo de tanque agitado
DQO	Demanda química de oxígeno
EGSB	Reactor de lecho de lodos granulares expandidos
EMP	Embden-Mayerhof-Parnas
HPLC	Cromatografía líquida de alto rendimiento
LDH	Lactato deshidrogenasa
PFL	Piruvato formiato liasa
PFOR	Piruvato ferredoxin oxidoreductasa
RID	Índice de refracción
SST	Sólidos suspendidos totales
SSV	Sólidos suspendidos volátiles
TCD	Detector de conductividad térmica
TRH	Tiempo de retención hidráulico
UASB	Reactor anaerobio de flujo ascendente
VVPH	Velocidad volumétrica de producción de hidrógeno
VVPM	Velocidad volumétrica de producción de metano

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN QUÍMICA APLICADA

INTERACCIONES MICROBIANAS EN LA FERMENTACIÓN OSCURA DEL SUERO DE QUESO ACIDO EN SISTEMAS CONTINUOS: EFECTO DE LA MICROBIOTA NATIVA Y DEL LODO ANAEROBIO GRANULAR



RESUMEN

El suero de queso es un subproducto agroindustrial que representa un riesgo ambiental considerable debido a su elevada demanda química de oxígeno (DQO). En México, el suero de queso no es tratado directamente y su manejo implica un proceso de autofermentación que afecta su posterior tratamiento. En este trabajo se usaron estrategias para valorizar el suero de queso fresco autofermentado, autofermentado-filtrado y doblemente fermentado mediante la fermentación oscura y la digestión anaerobia. En la fermentación oscura se operaron cuatro reactores continuos de tanque agitado para analizar el efecto del tiempo de retención hidráulico (TRH), la carga orgánica volumétrica (COV) y la presencia de sólidos sobre la producción de metabolitos e hidrógeno. Se alcanzaron concentraciones totales de ácidos carboxílicos y etanol hasta de 20 g/L, con una velocidad volumétrica de producción de hidrógeno de 2.42 L H₂/L-d (litros de hidrógeno por cada litro de suero de queso agregado al día). Se determinó que los sólidos presentes en el suero de queso autofermentado influyen en la fermentación oscura y sus rutas metabólicas. Dependiendo de los objetivos del proceso de valorización, es posible promover la producción de lactato o caproato, ajustando los valores de TRH y COV. La digestión anaerobia del suero de queso en sus distintas formas fue muy eficiente, alcanzando remociones de DQO superiores a 99 % y una velocidad volumétrica de producción de metano de 0.21 L/L-d. Estos resultados demuestran el potencial de valorización del suero de queso para la producción de ácidos carboxílicos o metano, las cuales son alternativas sostenibles para la industria quesera en un esquema de economía circular.

PALABRAS CLAVES: digestión anaerobia; ácidos carboxílicos; reactor continuo de tanque agitado; fermentación oscura; metanogénesis.

ABSTRACT

Cheese whey is an agro-industrial by-product that poses a high environmental risk due to its high chemical oxygen demand (COD). In Mexico, cheese whey is not typically treated directly, and its management generally involves autofermentation, which influences the treatment process. In this study, we assessed various strategies for valorizing different types of cheese whey: fresh, autofermented, autofermented–filtered, and double-fermented. These were used as the substrates for dark fermentation or anaerobic digestion. Four continuous stirred tank reactors were operated under dark fermentation conditions to analyze how hydraulic retention time (HRT), volumetric organic loading rate (OLR), and solids content affected the production of metabolites and hydrogen. Total carboxylic acids and ethanol concentrations as high as 20 g/L, along with a volumetric hydrogen production rate of 2.42 L H₂/L-d were obtained. The results showed that the content of solids in the autofermented cheese whey directly influenced the dark fermentation metabolic pathways and global outcome. The production of lactate or caproate can be enhanced by selecting appropriate values for HRT and OLR. The anaerobic digestion of the cheese whey (auto fermented, auto fermented–filtered, and double-fermented) proved to be very efficient, achieving over 99 % COD removal in all cases, with volumetric methane production rate of 0.21 L-L-d. These findings underscore the potential of cheese whey to be valorized either through the production of high-value carboxylic acids or methane, suggesting that the cheese industry could become more sustainable within a circular economy framework.

KEY WORDS: anaerobic digestion; carboxylic acids; continuous stirred tank reactor; dark fermentation; methanogenesis.

INTRODUCCIÓN

En México, la industria quesera se constituye por grandes empresas productoras a nivel nacional e internacional hasta medianas y pequeñas queserías regionales o artesanales (Lizárraga-Chaidez et al., 2023). En el año 2023, la producción de leche en México se estimó en 13,333 millones de litros de leche, entre las principales entidades que destacaron por su producción fueron Jalisco, Coahuila, Durango, Chihuahua, Guanajuato y Veracruz (SIAP, 2023a).

La elaboración de quesos en México alcanzó un volumen de 617 mil 726 toneladas, entre las variedades con mayor presencia se encuentran el queso Chihuahua, doble crema, fresco, manchego, Oaxaca y panela, teniendo el último una mayor relevancia productiva con 125 mil 602 toneladas (SIAP, 2023b). Cabe señalar que la transformación láctea hacia queso conlleva la generación de un subproducto considerable debido a que se estima que por cada kilogramo de queso se produce entre 9 y 10 litros de suero (Osorio-González et al., 2018).

El suero de queso es de interés, debido a las implicaciones ambientales asociadas con su generación y disposición. La gran cantidad producida constituye un desafío para la industria, aunque las empresas formalizadas se encuentran obligadas a cumplir con regulaciones específicas para su disposición final, las empresas artesanales y regionales, en la mayoría de los casos, no cumplen con dichas regulaciones. El suero es descargado de manera directa en ríos, arroyos u otros cuerpos de agua, lo que ocasiona impactos ambientales. Esta problemática se debe a que el suero de queso presenta una elevada carga orgánica, con valores de demanda química de oxígeno (DQO) que puede alcanzar hasta 100,000 mg/L. Su composición, se caracteriza por la presencia de lactosa y proteínas, por lo que este subproducto se convierte en un contaminante de alto potencial si no recibe un tratamiento adecuado (Lizárraga-Chaidez et al., 2023; Panghal et al., 2018; Sebastián-Nicolás et al., 2020).

La elevada carga orgánica presente en el suero de queso, favorece la proliferación de procesos microbiológicos capaces de inducir fenómenos de eutrofización (Cabrera et al., 2025). A su vez, las proteínas presentes se pueden degradar y originar compuestos

inorgánicos como amonio, amoniaco, nitratos y nitritos; estos últimos son de especial interés debido a su elevada toxicidad para organismos humanos y animales (Lizárraga-Chaidez et al., 2023; Salas-Vargas et al., 2021). Ante esta problemática, es prioridad el diseño e implementación de estrategias orientadas al aprovechamiento del suero de queso. Dichas estrategias no solo contribuyen a mitigar los impactos ambientales, sino que también impulsan la economía circular y se alinean con los enfoques de sostenibilidad promovidos a nivel nacional e internacional.

La digestión anaerobia es una forma sostenible para el tratamiento del suero de queso, ya que se puede obtener energía renovable a partir de la producción de biogás. Este proceso se basa en el metabolismo de los microorganismos anaerobios, ya que en condiciones de ausencia de oxígeno, estos descomponen la materia orgánica para producir metano y dióxido de carbono (Hasan et al., 2024). Las etapas de la digestión anaerobia son: hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis (Feria et al., 2022).

Dentro de este marco, la fermentación oscura constituye una ruta metabólica específica incluida en la digestión anaerobia, caracterizada por la ausencia de la etapa metanogénica. Este proceso, descompone los sustratos ricos en carbohidratos para fermentarlos y producir ácidos carboxílicos (acetato y butirato, entre otros) e hidrógeno; el cual es un vector energético (Davila-Vazquez et al., 2008).

El suero de queso posee un elevado nivel de compuestos orgánicos, por lo que, si no se trata inmediatamente después de generarse, tiende a autofermentarse. Dicha autofermentación, también conocida como fermentación natural, modifica la concentración inicial de carbohidratos fermentables, además de acumular metabolitos secundarios como por ejemplo el lactato. Además, la autofermentación modifica el balance de los nutrientes y puede llegar a interferir en las rutas metabólicas que ocupan el lugar de predominantes durante la fermentación oscura. El suero debe ser tratado adecuadamente para poder optimizar su funcionamiento tanto en fermentación oscura como en digestión anaerobia.

El objetivo de la presente investigación es evaluar estrategias biotecnológicas orientadas a la valorización del suero de queso autofermentado. En una primera etapa se analizará

su composición química y potencial como sustrato en la fermentación oscura para la generación de compuestos químicos de interés, como ácidos carboxílicos e hidrógeno. En una segunda fase se considerará su aprovechamiento mediante digestión anaerobia con el fin de obtener metano. Para alcanzar los objetivos se llevará a cabo la caracterización fisicoquímica del suero de queso fresco, autofermentado y autofermentado-filtrado, se examinará la influencia de los sólidos presentes en el suero de queso, así como el tiempo de retención hidráulico (TRH), sobre la producción de hidrógeno y ácidos carboxílicos, utilizando un reactor continuo de tanque agitado y por último se evaluará la eficiencia de la digestión anaerobia en sistemas por lote automatizados, empleando como sustrato tanto el suero autofermentado y autofermentado-filtrado como los efluentes seleccionados de la fermentación oscura. Los resultados obtenidos permitirán identificar rutas de valorización adecuadas para este subproducto lácteo.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

MARCO TEÓRICO

Digestión anaerobia.

La digestión anaerobia es un proceso sostenible debido a que a partir de la conversión de residuos orgánicos se puede obtener energía, proporcionando una solución para la gestión de residuos. Este proceso biológico aprovecha el metabolismo de los microorganismos anaerobios para que en ausencia de oxígeno se lleve a cabo la descomposición de la materia orgánica y se obtenga como producto biogás, que se compone de metano y dióxido de carbono (Hasan et al., 2024).

Las etapas de la digestión anaerobia son: hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis.

Hidrólisis.

La hidrólisis es la fase inicial de la digestión anaerobia, en esta etapa los microorganismos hidrolíticos llevan a cabo la descomposición enzimática de polímeros complejos como lípidos, proteínas y carbohidratos a moléculas más simples como aminoácidos y azúcares (Ostos et al., 2024).

Acidogénesis.

Los productos resultantes de la hidrólisis se consumen por bacterias acidogénicas, las cuales convierten los azúcares en ácidos carboxílicos y alcoholes (Ostos et al., 2024). Durante la acidogénesis, los compuestos como el amoníaco y el sulfuro de hidrógeno pueden resultar inhibidores para la digestión anaerobia ya que afectan la actividad y metabolismo de las bacterias (Finn et al., 2023).

Los productos generados de esta etapa son principalmente ácido acético y ácido butírico, en menor proporción se puede obtener ácido propiónico, ácido valérico y alcoholes.

Acetogénesis.

En esta etapa los productos de la acidogénesis se convierten en acetato, hidrógeno y dióxido de carbono a través de bacterias acetogénicas. El ácido acético en esta etapa es un producto crucial para la producción de metano en la siguiente etapa (Ostos et al., 2024).

Metanogénesis.

En este último paso, las arqueas metanogénicas convierten el acetato (a través de la metanogénesis acetoclastica) o el dióxido de carbono con el hidrógeno (a través de la metanogénesis hidrogenotrófica) en metano. Aproximadamente el 70% de metano se produce por la metanogénesis acetoclastica.

Las condiciones que favorecen una vía metanogénica sobre otra dependen de factores ambientales como la temperatura, el grado de degradación de la materia orgánica y los procesos metabólicos activos en un momento dado. Estos elementos influyen en la actividad microbiana y en la eficiencia de las vías metabólicas involucradas en la producción de metano (Bueno de Mesquita et al., 2023).

En la **Ecuación 1**, se presenta la ecuación estequiométrica para la obtención de metano por vía acetoclastica.



La vía acetoclastica, el acetato producido se convierte en metano y dióxido de carbono por arqueas metanogénicas de los géneros *Methanosaeta spp.* y *Methanosarcina spp.*, presentan afinidad y velocidad de crecimiento en función de la concentración de acetato (Zhang et al., 2020). En la vía hidrogenotrófica (**Ecuación 2**) las arqueas metanogénicas utilizan hidrógeno y dióxido de carbono para producir metano en condiciones anaerobias.



Las arqueas hidrogenotróficas como *Methanobacterium spp.* y *Methanococcus spp.*, aprovechan el hidrógeno producido en la etapa de acetogénesis para descomponerlo y al combinarlo con dióxido de carbono genera metano (Ostos et al., 2024; Zhang et al., 2020).

Metanogénesis y producción de biogás.

El metano (CH₄) es un componente energético del biogás y representa la etapa final de la conversión de la materia orgánica bajo condiciones anaerobias. Su generación depende de la actividad de las arqueas metanogénicas, las cuales utilizan principalmente ácido acético, dióxido de carbono e hidrógeno como precursores del proceso. La

eficiencia de esta conversión está ligada a condiciones operacionales como la temperatura, el pH y la carga orgánica volumétrica (COV) (Domínguez-Espinosa et al., 2023; López-Aguilar et al., 2021).

Estudios recientes sobre la valorización de residuos lácteos han demostrado que el suero de queso es un sustrato con potencial para la producción de metano debido a su elevada carga orgánica. Por ejemplo, Ramos-Suárez et al., (2024) reportaron que utilizando digestores de bajo costo con control térmico a 30°C se alcanzan producciones máximas de 565.8 L CH₄/kg sólido suspendido volátil (SSV), mientras que sin control de temperatura la producción se ve afectada siendo de 445.6 L CH₄/kg SSV. Además, de mejorar el rendimiento, el control térmico proporciona estabilidad al proceso, evitando acumulaciones de ácidos carboxílicos y desequilibrios de pH.

Esto es una evidencia de que, la producción de metano a partir del suero de queso es un método sostenible para la utilización de residuos lácteos, así como para la obtención de energía.

Fermentación oscura.

La fermentación oscura forma parte de la digestión anaerobia, excluyendo el paso final de metanogénesis. Para tal efecto, se aplican pretratamientos dirigidos a eliminar o inhibir la actividad de las arqueas metanogénicas, ya que son las responsables de convertir los productos intermedarios de la fermentación en metano.

La fermentación oscura es un proceso biológico que ocurre a partir de la degradación de los carbohidratos. En ausencia de oxígeno los microorganismos llevan a cabo una fermentación en donde no requieren luz, para producir hidrógeno y ácidos carboxílicos (Feria et al., 2022).

La **Figura 1**, presenta las rutas metabólicas implicadas en la fermentación oscura, la primera etapa del metabolismo es la degradación de la molécula inicial hasta piruvato, si la molécula inicial es la glucosa, el proceso se denomina glucolisis, en esta etapa se obtiene ATP, pero en muy bajo rendimiento. La segunda etapa es la respiración aeróbica, la respiración aeróbica es un proceso de degradación total del piruvato en donde se produce ATP con alto rendimiento y necesita al final una molécula de oxígeno que recibe

electrones y protones y se convierte en agua, si la molécula final no es el oxígeno, el proceso se denomina respiración anaeróbica. En ambientes anóxicos, no hay presencia de oxígeno en el medio por lo que algunos microorganismos son capaces de realizar respiración anaeróbica como lo es la fermentación (Yuan et al., 2022).

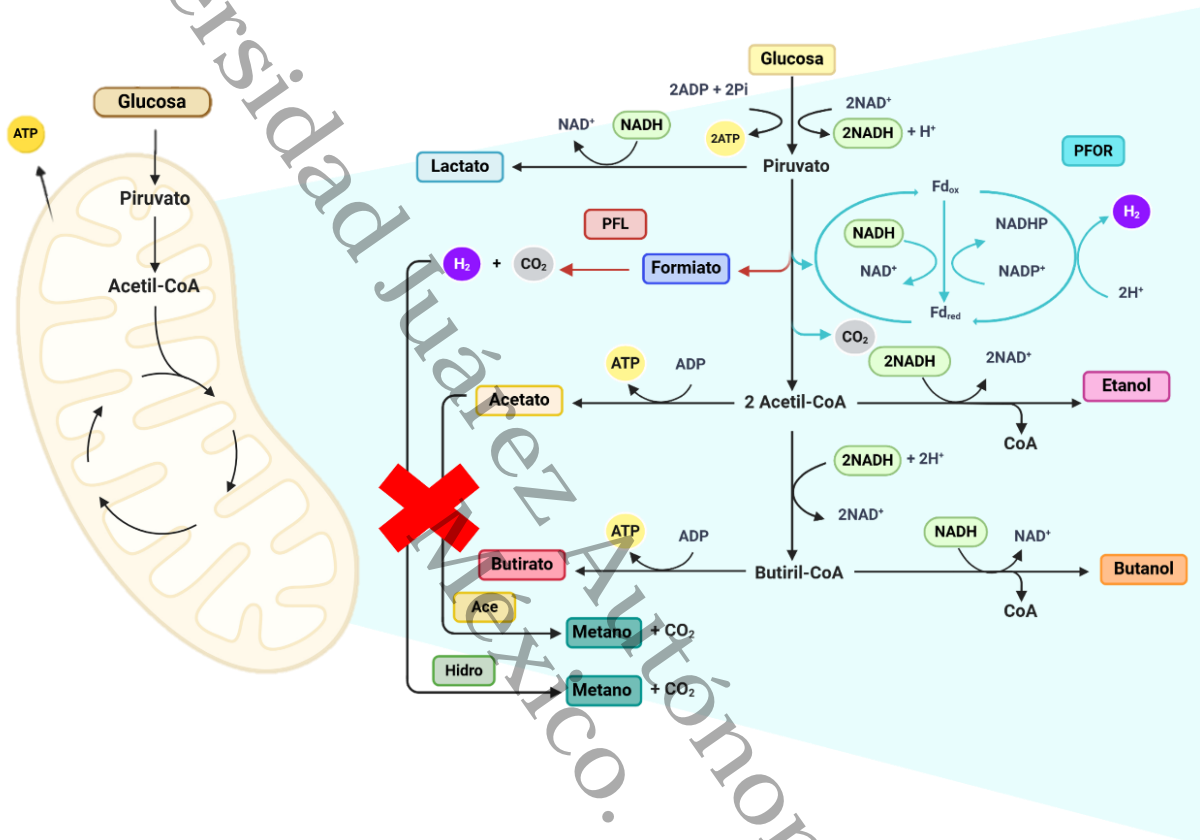


Figura 1. Esquema de la digestión anaerobia en la que se prioriza la fermentación oscura por la eliminación de la metanogénesis., PFOR: Piruvato ferredoxina oxidorreductasa, PFL: Piruvato formiato liasa, ACE: vía acetoclastica, HIDRO: vía hidrogenotrófica (BioRender, 2024).

Los microorganismos fermentadores obtienen el ATP solo en la etapa del glucolisis, pero en esta etapa consumen NAD⁺ y NADP⁺, que se convierten en NADH y NADPH. La fermentación tiene la función de regenerar NAD⁺ y NADP⁺ para continuar con la glucolisis (Sun et al., 2023).

Los productos generados a partir del metabolismo dependen de que microorganismo lo realicé. En la producción de hidrógeno las bacterias más utilizadas son del género

Clostridium y *Enterobacter*, ambos metabolizan la glucosa por lo que comienza su degradación. Los productos de la fermentación son el hidrógeno y el dióxido de carbono, ácido acético y butírico, si el pH del medio es neutro. Dentro del proceso, la degradación de carbohidratos conduce a la formación de ácidos carboxílicos, lo que tiende a acidificar el medio. Para mantener la fermentación activa es necesario controlar el pH y evitar que descienda, ya que valores <4 favorecen la solventogénesis y la producción de etanol en lugar de ácidos carboxílicos (Martínez-Mendoza et al., 2022; Ramos-Suárez et al., 2024).

La enzima piruvato ferredoxina oxidorreductasa (PFOR) es la encargada de catalizar la conversión de piruvato en acetil-CoA y dióxido de carbono, al mismo tiempo que transfiere electrones hacia la ferredoxina. Este proceso es muy importante debido que, a partir de este, se obtiene el hidrógeno (Wang et al., 2022).

La vía del acetato tiene la capacidad de producir 4 moles de hidrógeno por cada mol de glucosa consumido mientras que la vía del butirato produce 2 moles por cada mol de glucosa producido. Esto nos habla de que la vía más rentable para la producción de hidrógeno por fermentación oscura es la vía del acetato, sin embargo, todos los estudios realizados hasta la actualidad no han logrado obtener el rendimiento teórico esperado.

Factores que afectan la fermentación oscura.

La fermentación oscura es un proceso metabólico sensible a diversas condiciones físicas y químicas que pueden afectar su eficiencia y los productos generados. Es por esto, que se requiere de un adecuado ajuste de variables operacionales para optimizar la producción de ácidos carboxílicos de interés e hidrógeno y garantizar la estabilidad del proceso.

pH.

El pH es una variable crítica en la fermentación oscura debido a que afecta directamente la actividad de las comunidades microbianas, las rutas metabólicas predominantes y, por último, los rendimientos de hidrógeno y ácidos carboxílicos.

Se busca tener el rendimiento teórico a partir de las condiciones de operación de la producción de hidrógeno en este caso es de mucha importancia controlar el pH entre 5.5

-7.5, ya que a medida que las bacterias fermentan produciendo ácidos, el pH disminuye y la enzima hidrogenasa se inhibe (Martinez & Garcia, 2010).

Estudios previos, han demostrado que las variaciones en el pH inicial modifican la velocidad volumétrica de producción de hidrógeno (VVPH) y el perfil de los ácidos carboxílicos, lo que convierte al pH en una variable con selectividad para direccionar la conversión hacia productos que interés (Taotao et al., 2022).

La actividad de las enzimas en la fermentación oscura se ve afectado por el pH, un ejemplo son las hidrogenasa y enzimas implicadas en las rutas de fermentación del acetato y butirato y en la transferencia de los electrones. Es por esto, que utilizar valores de pH <4 inducen la solventogénesis, donde predominan el etanol en lugar de ácidos carboxílicos, valores de pH ácidos moderados (pH 4.5 – 5.9) suelen favorecer la producción de ácidos carboxílicos, mientras que valores cercanos a pH 7 tienden a favorecer procesos que conducen a productos de mayor cadena (elongadores de cadena) y a la estabilización del consorcio microbiano (Martínez-Mendoza et al., 2022; Ramos-Suárez et al., 2024; Taotao et al., 2022).

Para la fermentación oscura de suero ácido, la ruta metabólica impulsada por lactato evidencia la importancia de mantener un pH controlado para reactores continuos debido a que se favorecen las bacterias productoras de hidrógeno y las que llevan a cabo la fermentación oscura. Estudios han demostrado que utilizar un pH de 5.8 favorece la capacidad para producir hidrógeno y butirato mediante la ruta de lactato-acetato (Aranda-Jaramillo et al., 2023).

La selección del pH debe evaluarse en conjunto con otras variables operacionales, sin embargo, su ajuste dependerá del tipo y la proporción de subproductos que se busque obtener, como ácidos carboxílicos (acetato, butirato, propionato, lactato, propionato, caproato) y alcoholes (etanol).

Tiempo de retención hidráulica.

El TRH es un parámetro operacional fundamental que regula la relación entre la velocidad de alimentación de los reactores continuos biológicos y la permanencia de

sustratos, productos y que afecta directamente el crecimiento microbiano (Aboudi et al., 2023).

En sistemas de fermentación oscura en reactores continuos, los TRH entre 6 y 12 horas la VVPH se incrementa (2.2 L H₂/L-d), mientras que con TRH entre 18 y 24 horas la VVPH promedio se reduce (0.85 L H₂/L-d) (Palomo-Briones et al., 2017).

Para la producción de ácidos carboxílicos, TRH entre 15 y 24 horas estabilizan la acidogénesis y favorecen la acumulación de ácidos y una mayor diversificación de cadenas (acético, butírico, propiónico, entre otros). Investigaciones recientes demuestran que el TRH mejora la estabilidad y concentración de ácidos carboxílicos (Martínez-Mendoza et al., 2022; Montoya-Rosales et al., 2022; Regueira-Marcos et al., 2023).

Carga orgánica volumétrica.

La COV es un parámetro determinante en la fermentación oscura ya que regula la cantidad de compuesto orgánico que entra en el sistema por unidad de volumen y tiempo, determinando los rendimientos de hidrógeno y de ácidos carboxílicos. Una COV ~ 3 g DQO/L-d reduce la producción de estos compuestos ya que no existe suficiente sustrato para llevar a cabo los procesos metabólicos, mientras que COV > 12 – 15 g DQO/L-d conducen a una acumulación de metabolitos intermediarios como, por ejemplo, ácidos láctico (Palomo-Briones et al., 2017).

En esta misma línea, experimentos recientes han confirmado que una alta COV (138 g azúcares totales (AT)/L-d) genera VVPH de aproximadamente 30 L/L-d (Montoya-Rosales et al., 2023). Sin embargo, a valores de COV de 160 g AT/L-d se reduce sensiblemente la VVPH, predominando la homoacetogénesis (consumo de hidrógeno y dióxido de carbono para la producción de acetato) y la fermentación ácido-láctica.

El suero de queso por su alta concentración de lactosa y la tendencia a la autofermentación, representa un caso particular, este residuo puede alcanzar valores de 100 g DQO/L, donde el lactato constituye hasta el 80% de la carga orgánica (Ordoñez-Frías et al., 2024). La fracción de lactato, al ser utilizada como fuente de carbono,

favorece rutas metabólicas que conducen a la formación de butirato e hidrógeno (Aranda-Jaramillo et al., 2023).

Se ha reportado que cargas orgánicas moderadas (20 – 25 kg DQO/L-d) permiten alcanzar VVPH de entre 1.5 – 1.9 L H₂/L-d mientras que COV superiores provocan inestabilidad del sistema y deficiencia en la conversión de la DQO (Ordoñez-Frías et al., 2024).

Inóculo.

Los inóculos son la comunidad microbiana que se añade al sustrato para iniciar el proceso de fermentación, por lo cual es fundamental conocer su origen, el estado fisiológico, la concentración y que pretratamiento se le debe aplicar para mantener condiciones óptimas del proceso que se desea llevar a cabo.

La concentración del inóculo en un reactor continuo se determina como la capacidad del consumo del sustrato o la velocidad de crecimiento de la comunidad microbiana activa. Estudios han demostrado que existe una concentración óptima en la que la producción de hidrógeno y de ciertos ácidos alcanza su máximo, por debajo o por encima de este punto de productividad del proceso disminuye por limitaciones en la dinámica de crecimiento o, inhibición por productos generados. Un estudio reciente evaluó diferentes concentraciones de inóculo de 0.5 a 3 g/L, resultando que utilizar 1.5 g/L fue la condición óptima dentro de su proceso para maximizar la producción de hidrógeno a 111.38 mL H₂/g SSV y ácido butírico utilizando una cepa pura de *C. pasteurianum* DSM 525 con suero de queso en polvo (Karakaya & Özmiğçi, 2025).

La utilización de cepas puras (una sola especie microbiana) es muy eficiente para los procesos de fermentación oscura, debido a que permite estudiar de manera controlada las rutas metabólicas implicadas en el proceso. Sin embargo, considerando las limitaciones que pueden tener la utilización de cepas puras en cuanto a condiciones estériles, son altamente sensibles a contaminaciones y no siempre logran adaptarse a sustratos complejos como los residuos agroindustriales (Albuquerque et al., 2024).

Los cultivos mixtos (diferentes especies microbianas) comúnmente se obtienen de plantas de tratamiento de aguas residuales de tipo anaerobia. Se ha demostrado que

utilizar lodos anaerobios presenta mayores ventajas al ser un inóculo práctico y económico. Los lodos anaerobios poseen diversidad metabólica, lo que les otorga una capacidad más eficiente para degradar sustratos heterogéneos como el suero de queso y una mayor resiliencia frente a condiciones ambientales (Aranda-Jaramillo et al., 2023; Leroy-Freitas et al., 2024). Sin embargo, los cultivos mixtos presentan un desafío debido a que al ser una comunidad microbiana hay múltiples rutas metabólicas que se pueden llevar a cabo de manera simultánea. ¿Qué factores determinan la preferencia de los microorganismos por ciertas rutas metabólicas? Esto es precisamente, las condiciones a las que se operan los reactores.

Estudios han demostrado que la aplicación de pretratamientos al inóculo para eliminar microorganismos consumidores de hidrógeno es fundamental para la fermentación oscura y sus productos.

Los principales microorganismos consumidores de hidrógeno en medios anaerobios son los hidrogenotróficos metanógenos, sulfato-reductores y homoacetógenos. Estas comunidades compiten por el hidrógeno para desviar el flujo de electrones hacia el metano o acetato en lugar de hidrógeno libre, es que el principal objetivo de este proceso (Harirchi et al., 2022).

En particular, el choque térmico se ha identificado como uno de los métodos más efectivos para enriquecer bacterias productoras de hidrógeno e inhibir microorganismos competidores como los metanógenos (Al-Haddad et al., 2023).

Cisneros-Pérez et al., (2015), evidenciaron la influencia del pretratamiento del inóculo en la producción de hidrógeno. Se evaluó el choque térmico sobre el lodo metanogénico granular dispersado, sometiéndolo a ebullición durante 45 minutos con el objetivo de eliminar arqueas metanogénicas. El reactor se operó en modo continuo durante 96 días, COV de 36 g AT/L-d y un TRH de 10 horas, alcanzando una VVPH de 4.23 L H₂/L-d.

En conclusión, el pretratamiento previo a la utilización del inóculo en la fermentación oscura favorece la eficiencia del proceso debido a que hay una mayor conversión del sustrato y se inhibe la actividad de las bacterias consumidoras de hidrógeno.

Suero de queso como sustrato para la digestión anaerobia.

El suero de queso es un subproducto líquido que se produce durante la coagulación de la leche en la industria quesera. Su alta carga orgánica, conformada por lactosa, proteínas solubles, grasas y minerales hacen que sea un sustrato eficiente en procesos biotecnológicos (Domínguez-Espinosa et al., 2023).

Sin embargo, su disposición inadecuada puede provocar serios problemas ambientales, tales como contaminación de cuerpos de agua (Prazeres et al., 2012).

En los últimos años, el aprovechamiento del suero de queso mediante digestión anaerobia ha cobrado relevancia como alternativa sostenible, ya que permite reducir el impacto ambiental y al mismo tiempo producir biogás. Su composición fácilmente biodegradable favorece las altas tasas de conversión, lo que ha motivado la investigación de estrategias para reutilizarlo (Domínguez-Espinosa et al., 2023; López-Aguilar et al., 2021). Por ello, resulta fundamental conocer la composición del suero de queso para utilizarlo como sustrato en procesos biotecnológicos.

Composición y características del suero de queso.

El suero de queso es la fracción líquida que permanece tras la coagulación y retirada de la cuajada, llega a retener hasta el 55% de los nutrientes de la leche y representa el 95% del volumen procesado en quesería, por lo que es una fuente abundante y con alto valor de aprovechamiento (Delgado-Macuil et al., 2025).

Existen dos tipos principales: suero dulce (producido por cuajo/renina) y suero ácido (producido por acidificación láctica). Su composición y pH difieren por el método de elaboración. El suero dulce tiene un pH de 6 - 7, mientras que el suero ácido entre 5 – 6 y contiene más ácido láctico y minerales (Deshmukh et al., 2024; Fanello et al., 2024; Figueroa-Pires et al., 2021).

Estudios recientes reportan para el suero de queso rangos típicos de lactosa 46 – 52 g/L, proteínas 6 – 10 g/L, grasas de 5 – 6 g/L y minerales 2.5 – 4 g/L, así como concentraciones de DQO de hasta 100 g/L. Su rápida fermentación, además de promover la acumulación de ácidos, resulta un reto para los procesos biotecnológicos (Figueroa-Pires et al., 2021).

Las altas concentraciones de lactosa, implica que hay disponibilidad del sustrato fermentable debido a que es un azúcar, sin embargo, es una limitante debido a que de manera natural el suero de queso se fermenta por la presencia de microorganismos autóctonos tales como las bacterias ácido-lácticas (BAL) presentes de manera autóctona, que transforma la lactosa en ácido láctico, ver la **Figura 2**.

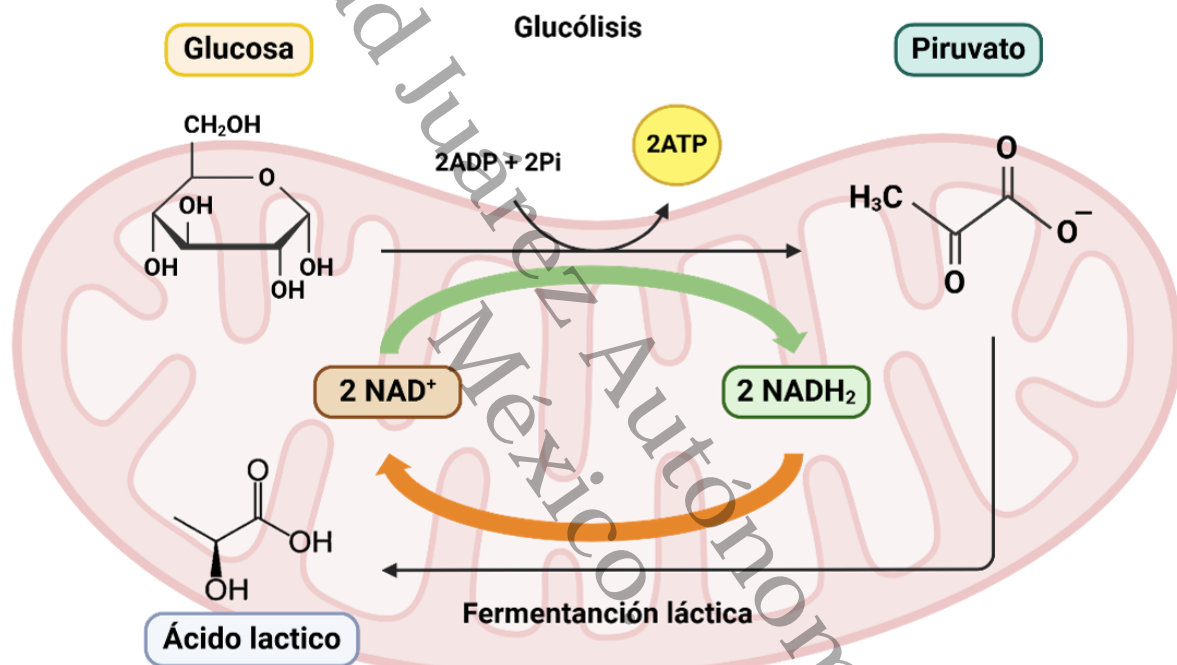


Figura 2. Fermentación natural del suero de queso con BAL presentes en el medio (BioRender, 2024).

La primera etapa consiste en la captación y catálisis de la lactosa por enzimas como la β -galactosidasa que hidroliza la lactosa hacia glucosa y galactosa. La glucosa se metaboliza típicamente por la vía de Embden-Mayerhof-Parnas (EMP), conduciendo a piruvato, el cual se reduce a lactato por la lactato deshidrogenasa (LDH), regenerando NAD^+ necesario para mantener el flujo glucolítico (Wang et al., 2021). La galactosa se incorpora mediante la vía de Leloir para ser finalmente convertida en glucosa-6-fostato y entrar también al ciclo de EMP (Wang et al., 2021).

Las concentraciones de proteínas solubles presentes en el suero de queso aportan nitrógeno y péptidos que son útiles para el crecimiento microbiano, en este caso las proteínas β -lactoglobulina, α -lactoalbúmina y la inmunoglobulina pueden afectar la formación de biomasa y la demanda de carbono/nitrógeno del proceso. En la digestión anaerobia estas proteínas pueden hidrolizarse y liberar aminoácidos que participan en la formación de ácidos carboxílicos (Rejdlová et al., 2025). El alto contenido mineral como calcio, potasio, sodio y fósforo, influye de manera eficiente en el proceso debido a que mejora las condiciones de las rutas metabólicas del proceso además de coadyuvar al crecimiento microbiano.

Para entender su potencial como sustrato, es fundamental conocer la composición del suero de queso, debido a que determina la estabilidad del sistema y la dinámica microbiana.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

ANTECEDENTES

El suero de queso es uno de los productos más abundantes en la industria láctea, debido a la alta producción de quesos, se genera en grandes cantidades. Se considera que este residuo es un problema ambiental debido a su alta carga orgánica y su elevado contenido de lactosa, proteínas y minerales (Lizárraga-Chaidez et al., 2023; Panghal et al., 2018). Sin embargo, estas mismas características lo hacen un sustrato atractivo para la biotecnología, al poder valorizarlo en procesos como fermentación oscura y digestión anaerobia.

Fermentación oscura en la valorización del suero de queso.

En la fermentación oscura, se han realizado diversos estudios con el objetivo de mejorar las condiciones de operación del reactor para obtener una mayor eficiencia en los procesos metabólicos y maximizar los productos de la fermentación.

Antonopoulou et al., (2008) estudiaron el suero de queso feta en la fermentación oscura, sin adiciones de enzimas e inóculos externos, utilizaron un reactor CSTR, con un volumen de trabajo 1 L, el suero de queso tenía una composición de SST 6.77 g/L, SSV 6.27 g/L, DQO 61.0 g/L, AT 38.0 g/L, carbohidratos solubles 36.0 g/L y ácido láctico de 0.62 g/L. El pH se controló a 6.0, temperatura 35°C, COV de 0.041 m³/kg DQO añadido, agitación constante y un TRH de 24 h. Obtuvieron una VVPH de 2.51 L H₂/L-d, y concentraciones de ácido acético 9.39 g/L, ácido butírico 7.19 g/L, ácido láctico 7.54 g/L y etanol 0.30 g/L.

Venetsaneas et al., (2009) publicaron un artículo en donde utilizaron un reactor CSTR con un volumen de trabajo de 0.5 L, suero de queso obtenido de una fábrica local en Grecia con SST 8.69 g/L, SSV 8.09 g/L, DQO 52.1 g/L, AT 43.8 g/L, como inóculo utilizaron la propia comunidad nativa del suero de queso, pH 5.6, 35°C, TRH de 24 h, carga orgánica de 30 g DQO/L-d. Lo que hicieron fue monitorear la productividad de hidrógeno en un reactor con adición de bicarbonato de sodio obtuvieron una VVPH 2.9 L H₂/L-d y otro con control de pH automático entre 5 a 6 una VVPH de 1.9 L H₂/L-d. Para el reactor de mayor productividad con la adición de bicarbonato de sodio, se reportaron concentraciones de ácidos carboxílicos en estado estable, ácido acético 9.20 g/L, ácido butírico 14.50 g/L, ácido láctico 1.20 g/L y etanol 0.25 g/L.

Azbar et al., (2009) reportaron una VVPH a 2.5 L H₂/L-d, utilizando un reactor CSTR con un volumen de trabajo de 2 L, la composición del suero de queso obtenido en Izmir, Turquía tenía una DQO de 86.3 g/L, AT de 42.6 g/L, SST 6.9 g/L y nitrógeno total 0.2 g/L, al suero de queso le realizaron un pretratamiento térmico para eliminar las bacterias lácticas (105°C, 5 min). Las condiciones a las cuales se operaron los reactores fueron a 55°C, agitación a 200 rpm, TRH variado en 1, 2 y 3.5 días, COV variada entre 21 y 47 g DQO/L-d. Lo que buscaban era ver la influencia de la carga orgánica y TRH en el proceso de fermentación, reportaron fue el reactor que obtuvo una mayor eficiencia del proceso fue con un TRH de 3.5 días y una COV de 21 g DQO/L-d. Los metabolitos producidos fueron: ácido acético 51.9 g/L, etanol 26.5 g/L, ácido propiónico 7.9 g/L, ácido butírico 52 g/L, isobutírico 4.8 g/L, isocaproico 0.7 g/L, lactato 165 g/L y formiato 109 g/L.

Ordoñez-Frías et al., (2024) realizó un estudio para conocer el efecto de utilizar suero de queso fermentado naturalmente sobre el proceso de fermentación oscura, utilizó un reactor lodos granulares expandidos (EGSB) con un volumen de trabajo de 2.2 litros, el inóculo utilizado fue lodo metanogénico granular. Las condiciones a las que se operó el reactor fueron pH 5, temperatura 35°C, TRH de 4.5 h, carga orgánica de 91 g DQO/L-d, resultando en una VVPH de 3.2 L H₂/L-d y producción de ácidos carboxílicos: ácido butírico 3.43 g/L y ácido caproico 1.87 g/L.

Aranda-Jaramillo et al., (2025) reportaron una productividad de hidrógeno de 3.2 L H₂/L-d en estado estable, utilizando un reactor EGSB, volumen de trabajo 1 L, el suero de queso que utilizaron fue fermentado naturalmente con una composición final de 9 g AT/L, 17 g lactato/L, 6.7 g acetato/L, 2.1 g butirato/L. El reactor se operó a 35°C, pH 5.9, 150 rpm, TRH 18 h y una carga orgánica de 138.5 g DQO/L-d, utilizando como inóculo un cultivo puro PTA-124,566 procedente de la colección americana de cultivos tipo ATCC, compuesto principalmente por bacterias ácido-lácticas y bacterias productoras de hidrógeno.

Digestión anaerobia en la valorización del suero de queso.

En cuanto a la producción de metano con suero de queso, en la literatura se reportan diversos trabajos. Mainardis et al., (2019) alcanzó una productividad de 437.3 mL CH₄/g SV añadido, mediante una prueba de potencial metanogénico (BMP), lo que se evaluó

fue el pretratamiento ultrasónico aplicado al suero de queso de 251.4-1387.5 Wh/kg SV, las condiciones de operación de 35°C, las pruebas duraron 10 días, la mayor productividad de metano fue con el pretratamiento realizado a 251.4 Wh/kg SV, no se especificó el % de remoción de DQO.

Lembo et al., (2022) llevaron a cabo un sistema en dos etapas, en la primera etapas de analizó la producción de hidrógeno y el efluente se utilizó en la producción de metano, se diluyó en una proporción 1:10, se usó un digestor con un volumen de 51 L, operando a condiciones mesofílicas. La producción de metano fue de 19.8 L biogás/d con un 58.7% de metano a diferencia de la producción en una sola etapa donde todo el sustrato se llevó a producción de metano resultando en 17.1 L biogás/d con un 56.3% de metano, no reportaron los porcentajes de remoción de DQO.

Casallas-Ojeda et al., (2024) reportaron una productividad de metano de 436 mL CH₄/g SV añadido, mediante el proceso de digestión anaerobia, buscaban evaluar el efecto de la temperatura y cargas orgánicas durante la digestión en el suero de queso y encontraron la mayor productividad de metano a temperatura 35°C, índice de Sustrato/inóculo = 4, la duración del proceso fue de 27 días y obtuvieron una remoción de DQO del 90%.

En conjunto, los estudios demuestran que el suero de queso, pese a las limitaciones en cuanto a la autofermentación, disminución de azúcares presentes en el sustrato y la presencia de bacterias ácido-lácticas, puede ser valorizado mediante fermentación oscura y digestión anaerobia para la obtención de hidrógeno y, ácidos carboxílicos o metano, respectivamente. La diversidad de resultados reportados evidencia la necesidad de profundizar en estrategias de control y condiciones operativas para mejorar las productividades en la fermentación oscura y en la digestión anaerobia estableciendo procesos más sostenibles y adaptados al suero de queso fresco.

JUSTIFICACIÓN

En México, la producción de queso fue de 617 mil 726 toneladas de queso (SIAP, 2023), se estima que por cada kilogramo de queso producido se generan entre 9 y 10 litros de suero de queso (Osorio-González et al., 2018). Este subproducto, es altamente contaminante debido a su elevada carga orgánica y representa un problema ambiental. La disposición de suero de queso no tratado contribuye a procesos de contaminación, eutrofización y formación de compuestos tóxicos como nitritos, contaminando el agua, los ecosistemas acuáticos y afectando la salud pública (Cabrera et al., 2025; Salas-Vargas et al., 2021).

En este sentido, es necesario establecer alternativas para valorizar el suero de queso y transformarlo en productos de valor agregado, enfocándose en la sostenibilidad y economía circular del país. La digestión anaerobia y fermentación oscura, forman parte de procesos biotecnológicos que ofrecen ventajas para reducir el impacto ambiental de este subproducto, generando bioenergía y ácidos carboxílicos de interés industrial (Hasan et al., 2024).

La presente investigación se enfoca en la valorización del suero de queso al proponer un esquema experimental con potencial para replicar en estudios posteriores al adaptarse a las condiciones reales del sustrato y ofrecer una solución viable para la gestión de este residuo agroindustrial.

PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

¿Cómo influye la autofermentación del suero de queso ácido en su valorización mediante fermentación oscura y digestión anaerobia?, ¿cuáles son las condiciones operacionales más favorables para maximizar la producción de ácidos carboxílicos, hidrógeno y metano?

HIPÓTESIS

El suero de queso ácido autofermentado puede ser valorizado mediante fermentación oscura y digestión anaerobia, procesos en los cuales la presencia de los sólidos del suero y el tiempo de retención hidráulico influyen de manera significativa en la productividad de ambos procesos, los cuales representan una estrategia viable para reducir el impacto ambiental del suero de queso y transformarlo en productos de valor agregado.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar las interacciones microbianas para la valorización del suero de queso ácido autofermentado, evaluando su potencial en la producción de ácidos carboxílicos, e hidrógeno por fermentación oscura y metano mediante digestión anaerobia.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Caracterizar el suero de queso ácido fresco, autofermentado y autofermentado-filtrado con el fin de determinar sus condiciones iniciales.
2. Evaluar el efecto de los sólidos presentes en el suero de queso ácido autofermentado y del tiempo de retención hidráulico sobre la producción de ácidos carboxílicos e hidrógeno mediante fermentación oscura en reactores CSTR.
3. Analizar la eficiencia de la digestión anaerobia en reactores en lote automatizados para producción de metano, utilizando como sustrato suero autofermentado, suero autofermentado-filtrado y efluentes seleccionados de la fermentación oscura.

METODOLOGÍA

Caracterización del suero de queso ácido: fresco, autofermentado y autofermentado-filtrado.

El suero de queso ácido ($\text{pH} \approx 3$) fresco se colectó de la empresa “Quesería Carol” ubicada en el Marqués, Querétaro, México ($20^{\circ}34'00''$ N, $100^{\circ}14'57''$ W). Se dejó fermentar de manera natural a temperatura ambiente ($\approx 22^{\circ}\text{C}$) y se detuvo cuando el consumo de azúcares totales se mantuvo estable (Mazorra-Manzano et al., 2020). Este proceso se implementó con el fin de reproducir la fermentación natural que ocurre en el suero de queso.

Con el propósito de evaluar la influencia de los sólidos presentes en el suero de queso autofermentado, una fracción del volumen se centrifugó a 6,000 rpm durante 20 minutos y se filtró tres veces con tela de algodón.

La caracterización del suero de queso ácido fresco, autofermentado y autofermentado-filtrado se llevó a cabo mediante la determinación de AT, DQO, sólidos suspendidos totales (SST), SSV, pH y perfil de ácidos carboxílicos., posteriormente, se refrigeró a 4°C hasta su uso.

Fermentación oscura: efecto de los sólidos y del tiempo de retención hidráulico.

Se utilizó como inóculo lodo anaerobio granular proveniente de un UASB a escala industrial que trata vinazas de tequila en “Casa Herradura”, ubicada en Tequila, Jalisco, México ($20^{\circ}53'04''$ N, $103^{\circ}50'22''$ W), se caracterizó con el fin de conocer los parámetros fisicoquímicos, ver **Anexo 1**.

En los experimentos de fermentación oscura, se sometió el inóculo a un pretratamiento térmico, con el fin de eliminar las arqueas metanogénicas, el pretratamiento consistió en secado a 105°C durante 24 horas, siguiendo el protocolo descrito por Montoya-Rosales et al., (2022). El lodo se trituró en un molino de bolas durante 20 minutos a una frecuencia de 30 Hz (ciclos por segundo) reduciendo su tamaño a una textura similar a polvo

equivalente a malla #20, 850 µm. Finalmente se almacenó a temperatura ambiente hasta su utilización.

Se operaron cuatro reactores (F1 – F4) CSTR, marca Applikon Biotechnology (EE. UU.), con sello hidráulico, volumen total de 1.3 L y un volumen de trabajo de 1 L, en la **Figura 3**, se presenta la estrategia experimental de los reactores de fermentación oscura y digestión anaerobia.

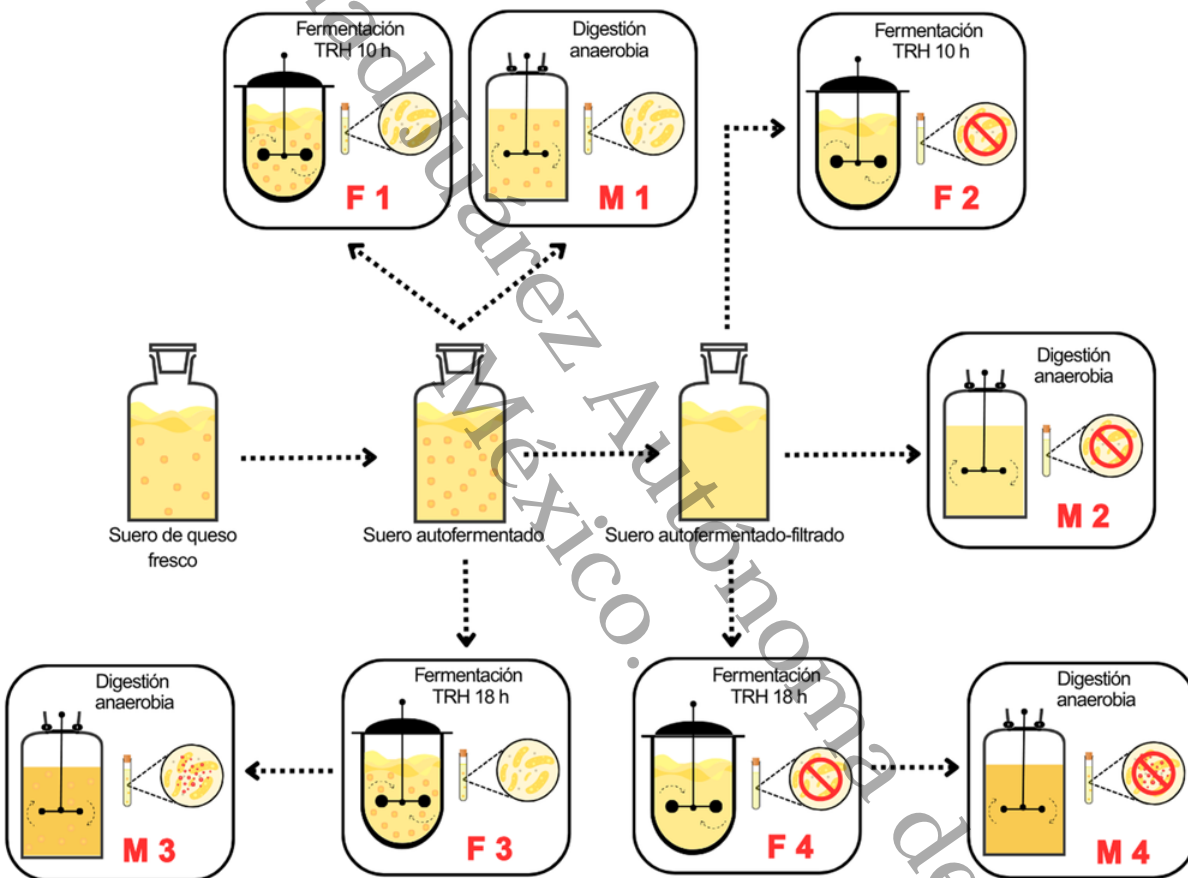


Figura 3. Esquema de tratamientos para la valorización del suero de queso autofermentado; F1: suero de queso autofermentado, TRH 10 h; F2: suero autofermentado-filtrado, TRH 10 h; F3: suero autofermentado, TRH 18 h; F4: suero autofermentado-filtrado, TRH 18 h.

Para favorecer la fermentación oscura y satisfacer los requerimientos nutricionales de las bacterias, se utilizó medio mineral compuesto por (g/L): $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 12.5;

$\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 10; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.25; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.25; KI, 0.25; $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.05; ZnCl_2 , 0.05; NH_4Cl , 210 (Fuentes-Santiago et al., 2023).

La puesta en marcha de cada reactor se realizó operándolo en modo discontinuo durante 24 horas con 4.5 g SSV/L de lodo anaerobio pretratado, una concentración de suero de queso de 10 g DQO_{soluble}/L y pH ajustado a 6.0 (Montoya-Rosales et al., 2022; Palomo-Briones et al., 2017). Posteriormente, los reactores fueron purgados con nitrógeno durante 5 minutos para establecer una atmosfera anaerobia.

Después de las 24 horas, se operaron en modo continuo a una temperatura controlada de 37°C, agitación constante de 300 rpm y pH controlado a 6.0 mediante la adición automatizada de NaOH 5 M a través del controlador Applikon Biotechnology My-Control Bioreactor Controller (EE. UU). En la **Figura 4**, se presenta el esquema de los cuatro reactores operados para producción de hidrógeno y ácidos carboxílicos.

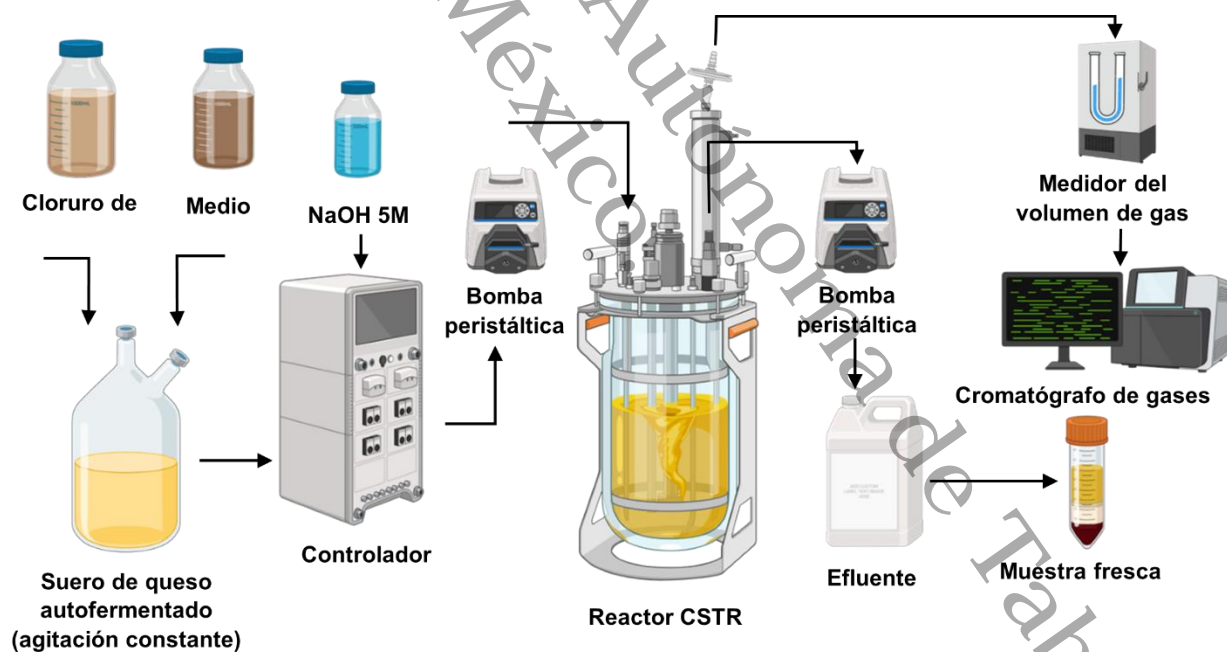


Figura 4. Esquema de reactores CSTR F1 – F4, empleados para la fermentación oscura (BioRender, 2024).

Los reactores F1 y F2 se operaron con un TRH de 10 horas y una COV de 16.6 g DQO/L-d, mientras que los reactores F3 y F4 se mantuvieron con un TRH de 18 horas y una

COV de 9.25 g DQO/L-d. Se determinó que 20 ciclos de TRH eran suficientes para alcanzar el estado estable en los cuatro reactores, el caudal de entrada y de salida se ajustó a 1.67 mL/min para F1 – F2 y 0.92 mL/min para F3 – F4.

Durante la operación de los reactores de fermentación oscura, se realizó un seguimiento de los parámetros de control del proceso para evaluar su evolución y eficiencia. Se recolectaron muestras de efluente de cada reactor a intervalos de 24 horas, estas muestras se utilizaron para determinar SST, SSV, AT, DQO y perfil de ácidos carboxílicos. La producción de hidrógeno y dióxido de carbono se cuantificó mediante un medidor de volumen de gas por desplazamiento de agua y la composición del gas se analizó mediante cromatografía de gases.

Para el análisis de la productividad de la fermentación en función de la VVPH y producción de los ácidos carboxílicos se recolectaron tres muestras de efluentes de cada reactor a intervalos de 24 horas, una vez alcanzado el estado estable.

Digestión anaerobia en reactores en lote automatizados para producción de metano.

Con el fin de evaluar el potencial de producción de metano a partir del suero de queso, los experimentos se realizaron siguiendo el protocolo descrito por Angelidaki & Sanders, (2004).

La configuración de los reactores incluyó los tratamientos M1 – M4, ver **Figura 3**. Los reactores se alimentaron con los siguientes sustratos: M1 con suero de queso autofermentado; M2 suero de queso autofermentado-filtrado; M3 con el efluente del reactor de fermentación F3 y M4 con el efluente del reactor F4. Los efluentes de los reactores F3 y F4 se recolectaron en estado estable, en tres muestras frescas de 800 mL a intervalos de 24 horas, las cuales fueron homogenizadas y centrifugadas a 3,000 rpm durante 10 minutos antes de su uso en los reactores de digestión, con el objetivo de evaluar las diferencias entre los sueros de quesos filtrado y sin filtrar y los sustratos doblemente fermentados.

Los experimentos se realizaron en un equipo automático de potencial de metano (AMPTS II, Automatic Methane Potential Test System, Bioprocess Control, Lund, Suecia), en la **Figura 5** se presenta un esquema de los reactores del AMPTS II. El volumen de cada reactor de vidrio fue de 600 mL, con un volumen de trabajo de 360 mL y espacio cabeza de 240 mL.

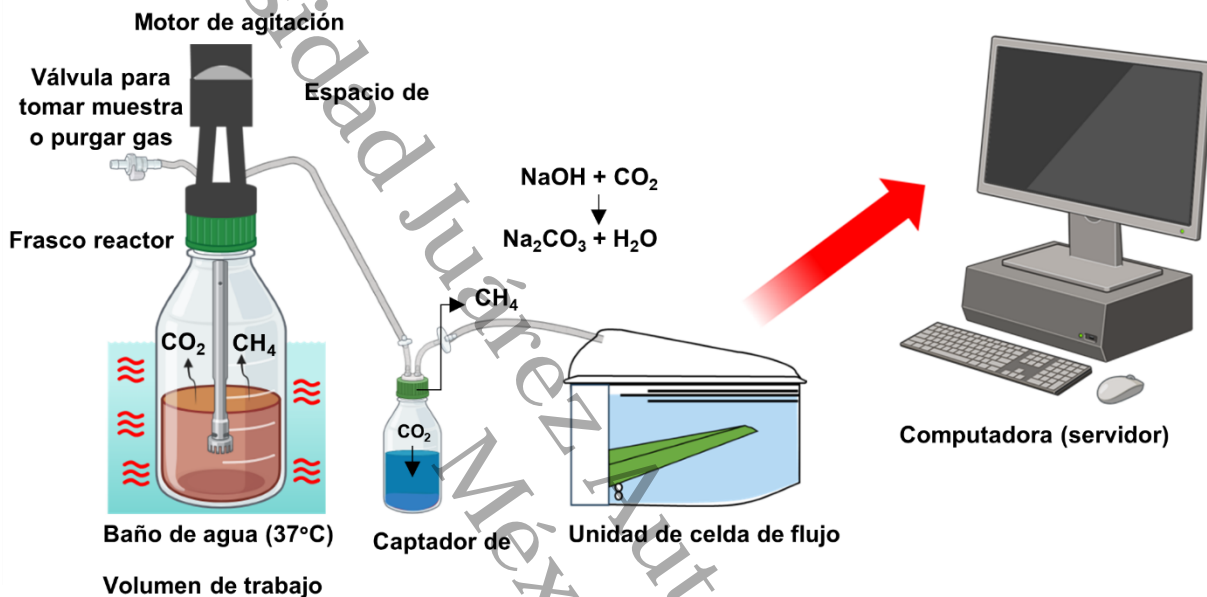


Figura 5. Esquema de reactores del AMPTS II del M1 – M4 empleados para la producción de metano (BioRender, 2024).

Se adicionó a todos los frascos como inóculo lodo anaerobio granular sin pretratamiento térmico a una concentración de 1 g SSV/100 mL de medio, alcanzando una relación sustrato/inoculo (S/I) de 2 g SSV/g DQO, considerando una concentración inicial de sustrato de 5 g DQO/L (Holliger et al., 2016). Se ajustó la alcalinidad de la mezcla a 3 g CaCO_3 /L mediante adición de bicarbonato de sodio y el pH inicial se estableció entre 6.8 y 7.5 (sin controlar el pH durante la digestión anaerobia) mediante soluciones de HCl 5 N o NaOH 5 N. Antes de la operación en lote, los reactores fueron purgados con nitrógeno durante 5 minutos para establecer una atmosfera anaerobia.

El medio mineral utilizado estuvo compuesto por: NH_4Cl , 41.6 g/L; MES (2-(N-morfolino) etanosulfónico), 19.52 g/L; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2 g/L; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.6 g/L; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 40 mg/L; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 40 mg/L; KI, 40 mg/L; $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 8 mg/L; ZnCl_2 , 8 mg/L (Angelidaki

& Sanders, 2004; Carrillo-Reyes et al., 2020). Se adicionaron 2 mL de una solución de fosfato monopotásico al 500x para completar los nutrientes del medio y favorecer la actividad microbiana.

El sistema automatizado constó de un baño térmico controlado a 37°C, en donde se contenían los reactores en lote, una unidad fijadora de dióxido de carbono de una solución de NaOH 3M y timolftaleína al 0.4% y finalmente la unidad medidora de flujo. El tiempo de agitación fue intermitente, 1 minuto a 120 rpm seguido de 3 minutos de pausa.

De cada tratamiento de la producción de metano se incluyeron triplicados, se integró un control endógeno (sin sustrato) y un control positivo de glucosa. Para el control positivo, la glucosa se secó a 105°C durante 2 horas y posteriormente se utilizó para preparar una solución con una concentración de 5 g DQO/L.

La producción de metano se cuantificó mediante las celdas de flujo del AMPTS II, registrando los datos en tiempo real a través del software del equipo. Una vez alcanzada la estabilidad en la producción de metano, se recolectaron muestras de 40 mL de cada reactor para determinar el perfil de ácidos carboxílicos y DQO.

Los datos de producción acumulada de metano se analizó mediante el modelo cinético de Gompertz modificado, donde H_{max} representa la producción acumulativa de metano (NmL), R_{max} la tasa de producción de metano, λ la duración de la fase de retardo y t el tiempo de incubación en días (Regueira-Marcos et al., 2023).

$$H = H_{max} * \exp \left(- \exp \left(\frac{R_{max} * e}{H_{max}} * (\lambda - t) + 1 \right) \right) \quad (\text{Ec. 3})$$

Métodos analíticos.

Para controlar el proceso de fermentación oscura en la producción de hidrógeno, se tomaron muestras frescas del efluente de cada reactor en intervalos de 24 horas. Para los reactores de producción de metano, solo se determinaron los puntos iniciales y finales, debido a que la operación fue en modo discontinuo.

Las determinaciones de los SST y SSV se realizaron de acuerdo con el método estándar APHA 2540 (American Public Health Association 2540 G., 1997). La DQO se determinó siguiendo el método estándar APHA 5220 (American Public Health Association 5220, 1998) y la norma NMX-AA-03/1-SCFI-2012 (Secretaría de Economía, 2012). La determinación de AT se llevó a cabo mediante el método ácido sulfúrico-fenol (Dubois et al., 1956). Para la medición de DQO y AT, se utilizó un espectrofotómetro UV-Vis Orion Aquamate 8000 (Thermo Scientific). Las condiciones de análisis para la cuantificación de las concentraciones de DQO y AT fueron absorbancia de 600 nm y 490 nm, respectivamente.

El volumen de gas hidrógeno y dióxido de carbono producido, se determinó con un medidor de gas por desplazamiento de agua (Prendo, México, modelo MVG-10, Volts 127, 30 W). El análisis de la composición del gas (H_2 y CO_2) para los reactores de fermentación oscura, se midió con una jeringa cromatográfica de muestras gaseosas marca VICI (Valco Instruments, Houston, Texas, EE. UU.) de 1 mL, comparando una muestra de 500 μ L del espacio de cabeza de los reactores de fermentación con estándares de alta pureza (Alltech, Deerfield, Illinois, EE. UU.) utilizando un cromatógrafo de gases Agilent Technologies modelo 6890N Network GC System (Waldbronn, Alemania), equipado con un detector de conductividad térmica (TCD) con temperatura de horno 60°C, temperatura del puerto de inyección (entrada frontal) de 250°C, temperatura del detector (detonador delantero) de 250°C, presión de entrada trasera de 12.96 psi, temperatura de entrada trasera de 34°C, temperatura de detonación posterior de 49°C. La columna utilizada fue una Hayesep D (Alltech, Deerfield, IL, EE. UU.) con las siguientes dimensiones: 10' de longitud de la columna x 1/8" de diámetro exterior de la columna x 0.085" de diámetro interno de la columna, la fase estacionaria fue de polímero estireno-divinilbenceno con un tamaño de partícula del empacado 60/80 mallas con una temperatura máxima de operación de 290°C. Se utilizó nitrógeno como gas portador con un caudal de 12 mL/min (Carrillo-Reyes et al., 2012; Davila-Vazquez et al., 2009).

Los ácidos carboxílicos (acetato, propionato, lactato y butirato) se cuantificaron por comparación con estándares de alta pureza mediante electroforesis capilar (Agilent

1600A, Waldbronn, Alemania) usando un buffer básico de aniones (Agilent, pH = 12.1) y una columna capilar de sílice fundida (Agilent, diámetro interno de 50 μm , longitud de 80.50 cm, largo efectivo de 72 cm), la temperatura y voltaje aplicado fue de 20°C y -30 kV, respectivamente (Davila-Vazquez et al., 2008; Paz Mireles et al., 2016).

Dado que durante los análisis de cuantificación de los ácidos carboxílicos se observaron picos no identificados dentro de los estándares utilizados, se decidió aplicar métodos analíticos complementarios con el fin de obtener un panorama más amplio de la producción de estos compuestos. No obstante, los análisis adicionales se realizaron únicamente en los puntos iniciales y finales de cada reactor de fermentación oscura.

Los compuestos orgánicos (etanol, acetato, propionato, lactato, butirato y caproato), se determinaron mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) equipada con un detector de índice de refracción (RID) y una columna polar Aminex HPX-87H (modelo 1260 Infinity, Agilent Technologies, CA, EE. UU.) con fase estacionaria de resina sulfonada de poliestireno-divinilbenceno. La fase móvil era una solución de ácido sulfúrico 5 mM a un caudal de 0.6 mL/min, la temperatura de la columna y del detector fue de 55°C (Montoya-Rosales et al., 2022; Ordoñez-Frías et al., 2024).

Las concentraciones de los ácidos carboxílicos y alcoholes se transformaron a gramos de DQO por medio de los siguientes factores de conversión: acetato (1.07 g DQO/g), propionato (1.51 g DQO/g), butirato (1.82 g DQO/g), lactato (1.07 g DQO/g), etanol (2.04 g DQO/g) y caproato (2.04 g DQO/g) (Rittman & McCarty, 2020).

Métodos estadísticos.

Utilizando el programa IBM SPSS Statistics 21, se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) de una vía con un nivel de significancia del 5% y una comparación múltiple utilizando el método Tukey (p -valor < 0.05). Se analizaron las diferencias significativas: en la VVPH entre los reactores de fermentación oscura F1 – F4; en las concentraciones de ácidos carboxílicos producidos de los 3 puntos finales de los reactores F1 – F4 determinados por HPLC en la fermentación oscura en estado estable y en la producción de metano entre los reactores M1 – M4.

Antes de aplicar la prueba ANOVA, se comprobó la normalidad de los datos y la homogeneidad de las varianzas para los tres procesos, asegurando que se cumplieran los requisitos estadísticos para llevar a cabo las pruebas.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

RESULTADOS

Composición del suero de queso ácido en suero fresco, autofermentado y autofermentado-filtrado.

El suero de queso se caracterizó fresco, después de la fermentación natural o autofermentación y después de la eliminación de sólidos (autofermentado-filtrado). En la **Tabla 1**, se muestra la caracterización.

Tabla 1. Caracterización del suero de queso fresco, autofermentado y autofermentado-filtrado.

Parámetros	Fresco	Autofermentado	Autofermentado-filtrado
pH	5.8	3.6	3.8
DQO (g/L)	51.10 ± 0.14	51.60 ± 0.07	50.23 ± 0.05
AT (g/L)	28.6 ± 0.19	6.35 ± 0.10	6.46 ± 0.30
SST (g/L)	1.42 ± 0.01	1.58 ± 0.36	1.16 ± 0.49
SSV (g/L)	0.94 ± 0.01	1.15 ± 0.40	0.79 ± 0.34
Acetato (g/L)	1.1 ± 0.01	ND	ND
Lactato (g/L)	5.1 ± 0.01	16.47 ± 0.02	17.50 ± 0.01

DQO: demanda química de oxígeno; AT: azúcares totales; SST: sólidos suspendidos totales; SSV: sólidos suspendidos volátiles y ND: no detectado.

Como se esperaba, la concentración de DQO del suero de queso fresco resulto de 51.10 g/L, lo que confirma que se trata de un efluente altamente contaminante. En general, los únicos parámetros que mostraron cambios importantes, después de la autofermentación y filtración del suero de queso fresco, fueron el pH, las concentraciones de AT, acetato y lactato. En el suero de queso fresco la concentración de acetato fue cercana a 1 g/L y la de lactato de 5 g/L. En cambio, no se detectó acetato después de la autofermentación y la concentración de lactato incrementó a 17 g/L en el suero de queso autofermentado y

autofermentado-filtrado. Esta diferencia se atribuye a la actividad homoláctica durante la autofermentación, como resultado, se observó una disminución en la concentración de AT, debido a su consumo durante la autofermentación.

Producción de ácidos carboxílicos e hidrógeno: Influencia de los sólidos y tiempo de retención hidráulico.

Los cuatro reactores de fermentación oscura (F1 – F4) operaron 20 ciclos de TRH hasta alcanzar el estado estable, se siguió la productividad del hidrógeno en los cuatro reactores y la producción de ácidos carboxílicos, ver **Anexo 2**.

La **Figura 6** muestra las concentraciones de ácidos carboxílicos y alcoholes cuantificadas al final del periodo de operación.

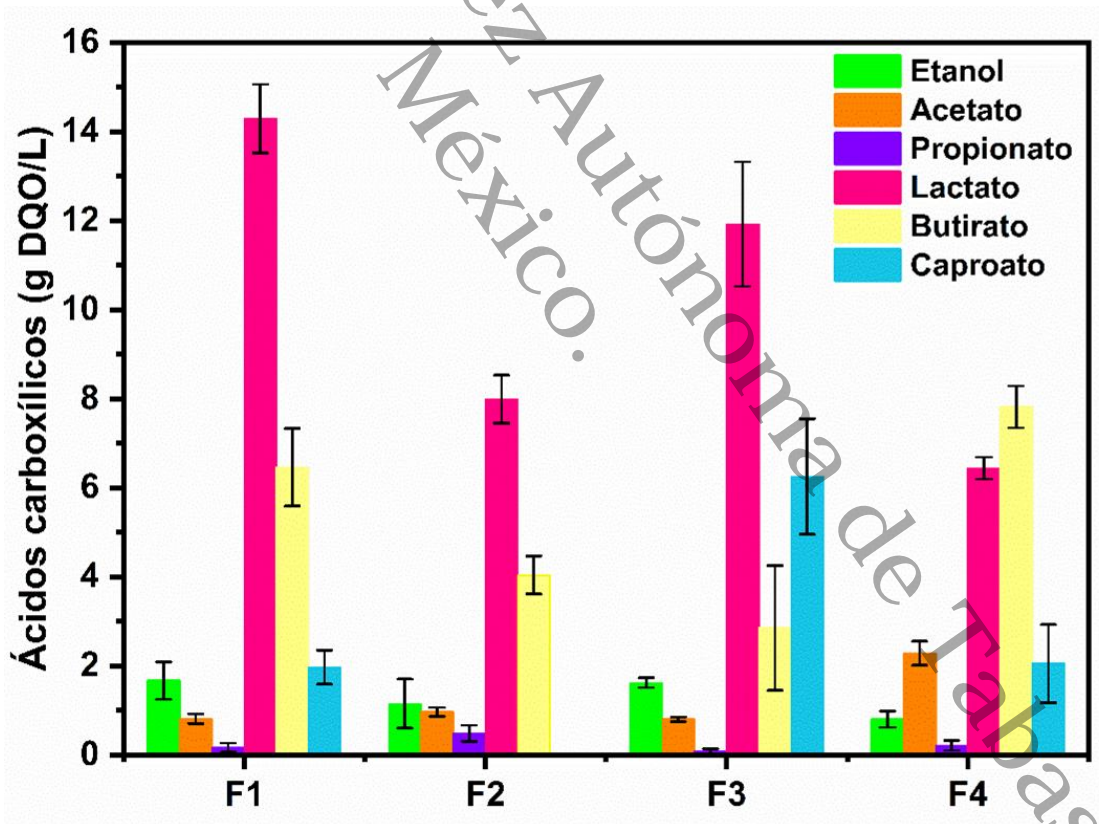


Figura 6. Concentraciones de los ácidos carboxílicos y alcoholes producidos en los reactores F1 – F4 de fermentación oscura en estado estable.

Las concentraciones más altas de metabolitos se obtuvieron en el reactor F1, operado con suero de queso autofermentado y un TRH de 10 horas, alcanzando 14.29 g DQO/L de lactato y 6.46 g DQO/L de butirato, además de caproato, etanol, acetato y propionato, en menores concentraciones (< 2 g DQO/L). En contraste, el reactor F2 operado con suero de queso autofermentado-filtrado bajo el mismo TRH, produjo 7.99 g DQO/L de lactato y 4.04 g DQO/L de butirato, además de concentraciones menores de etanol, acetato y propionato (< 1.2 g DQO/L), sin caproato. Esta diferencia en la distribución de los metabolitos indica una selección de la comunidad microbiana en cada reactor a partir de las condiciones operacionales, lo que demuestra que las BAL autóctonas del suero de queso y otros sólidos presentes de forma natural influyen en los productos de la fermentación.

El reactor F3, operado con suero de queso autofermentado y un TRH de 18 h, alcanzó concentraciones de 11.92 g DQO/L de lactato, 6.25 g DQO/L de caproato, 2.85 g DQO/L butirato y en menores concentraciones (< 2 g DQO/L) acetato, etanol y propionato. En comparación, en el reactor F4, se obtuvieron concentraciones de 7.81 g DQO/L de butirato, 6.42 g DQO/L de lactato, 2.28 g DQO/L de acetato, 2.05 g DQO/L de caproato y en menores concentraciones (< 1 g DQO/L) propionato y etanol.

En general, los resultados evidencian que los sólidos presentes en el suero de queso autofermentado influyen en la fermentación oscura, en la selección de la comunidad microbiana y en las rutas metabólicas, al igual que el TRH de operación de los reactores. Los resultados indicaron que la variación en el TRH afecta directamente las concentraciones de los ácidos carboxílicos, ya que los reactores operados con TRH de 18 horas (F3 y F4) produjeron mayores concentraciones de caproato, que los reactores (F1 y F2) operados un TRH menor (10 h). Lo anterior sugiere que TRH más prolongados favorecen la elongación de cadena de los ácidos carboxílicos, promoviendo la generación de metabolitos de mayor valor agregado como el caproato.

En la **Tabla 2**, se muestra las concentraciones de los metabolitos determinados en los reactores de fermentación oscura, así como las velocidades de producción de hidrógeno. Se observa que la mayor VVPH se obtuvo en el reactor F1, mientras que al modificar el tipo de sustrato y/o el TRH se observó una disminución en la VVPH.

Tabla 2. Producción de hidrógeno y ácidos carboxílicos mediante la fermentación oscura en los reactores F1 – F4.

Reactor	TRH (h)	COV (g DQO/L-d)	VVPH (L H ₂ /L-d)	Metabolitos (g/L)					
				Ace	Prop	Lac	But	Cap	EtOH
F1	10	16.6	2.42 ± 0.12	0.76 ± 0.10 ^a	0.10 ± 0.07 ^a	13.36 ± 0.72 ^a	3.55 ± 0.48 ^a	0.74 ± 0.14 ^a	0.80 ± 0.20 ^a
F2	10	16.6	1.94 ± 0.43	0.89 ± 0.10 ^a	0.31 ± 0.12 ^b	7.47 ± 0.51 ^c	2.22 ± 0.24 ^b	0.0 ^a	0.55 ± 0.27 ^a
F3	18	9.25	1.72 ± 0.44	0.75 ± 0.04 ^a	0.05 ± 0.03 ^a	11.14 ± 0.24 ^b	1.42 ± 0.51 ^b	2.35 ± 0.49 ^b	0.78 ± 0.05 ^a
F4	18	9.25	0.30 ± 0.06	2.13 ± 0.26 ^b	0.14 ± 0.07 ^b	6.02 ± 0.24 ^c	4.29 ± 0.26 ^a	0.77 ± 0.33 ^a	0.38 ± 0.09 ^a

Los superíndices en las concentraciones finales de cada compuesto corresponden a los grupos determinados por la prueba de Tukey. La comparación de letras se realiza únicamente entre los reactores evaluados para el mismo compuesto: valores que comparten la misma letra no presentan diferencias significativas entre sí ($p > 0.05$), mientras que aquellos con letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$). Las letras no deben compararse entre compuestos diferentes.

TRH: tiempo de retención hidráulico; COV: carga orgánica volumétrica; VVPH: velocidad volumétrica de producción de hidrógeno; DQO: demanda química de oxígeno; Ace: acetato; Prop: propionato; Lac: lactato; But: butirato; Cap: caproato; EtOH: etanol.

Este comportamiento se atribuye tanto al efecto de la COV como del TRH, debido a que los reactores F3 y F4 se operaron con menor COV (9.25 g DQO/L-d) y un mayor TRH

(18 h). Aunque el reactor F2 operó con un TRH de 10 horas y una COV de 16.6 g DQO/L-d al igual que el reactor F1, la VVPH fue inferior, lo que se atribuye al uso del suero de queso autofermentado-filtrado, evidenciando que los sólidos (BAL autóctonas del suero de queso) también contribuyen a la producción de hidrógeno mediante el metabolismo lactato-acetato.

Se realizó un ANOVA para evaluar las diferencias en la producción de hidrógeno entre los cuatro reactores (F1 – F4), ver **Anexo 3**. Los resultados indicaron que existen diferencias significativas entre los tratamientos con un p-valor de 0.00260, lo cual sugiere que al menos uno de los reactores presentó un comportamiento distinto a los demás. La prueba de Tukey reveló que los reactores F1, F2 y F3 no son significativamente diferentes entre sí, agrupándose todos en el mismo grupo estadístico (a). En contraste, el reactor F4, se ubicó en un grupo diferente (b), mostrando diferencias significativas respecto a los otros reactores. Estos resultados sugieren que el tratamiento aplicado en el reactor F4 fue menos eficiente para la producción de hidrógeno, en comparación con el resto de los reactores.

Producción de metano a partir de suero autofermentado, filtrado y efluentes de reactores de fermentación oscura.

El suero de queso autofermentado y autofermentado-filtrado, así como los efluentes de los procesos de fermentación oscura a un TRH de 18 horas, con y sin sólidos, se sujetaron a un proceso de digestión anaerobia en el sistema automatizado AMPTS II, con sus respectivos controles endógeno y positivo usando glucosa. Los resultados se muestran en la **Figura 7**, donde se presenta la producción acumulativa de metano para los reactores M1 a M4, en conjunto con los controles.

Se utilizó suero de queso autofermentado en el reactor M1 y mostró una mayor producción de metano en comparación con el reactor M2, en el cual se utilizó suero de queso autofermentado-filtrado, por lo tanto, la diferencia puede atribuirse a la ausencia de los sólidos en el reactor M2. Por otro lado, en los reactores M3 y M4 que utilizaron el efluente de los reactores de fermentación oscura a un TRH de 18 horas, se evidenció un comportamiento diauxico en la producción de metano, lo que indica la degradación secuencial de sustratos presentes en el reactor.

Previsiblemente, en la primera fase los microorganismos degradaron el acetato presente en el efluente, y en una segunda fase, utilizaron compuestos asociados a procesos de hidrólisis y acetogénesis. No obstante, las dinámicas observadas en la producción de metano, en los reactores M3 y M4 se alcanzaron producciones acumuladas de metano ligeramente mayores a las obtenidas en los reactores M1 y M2.

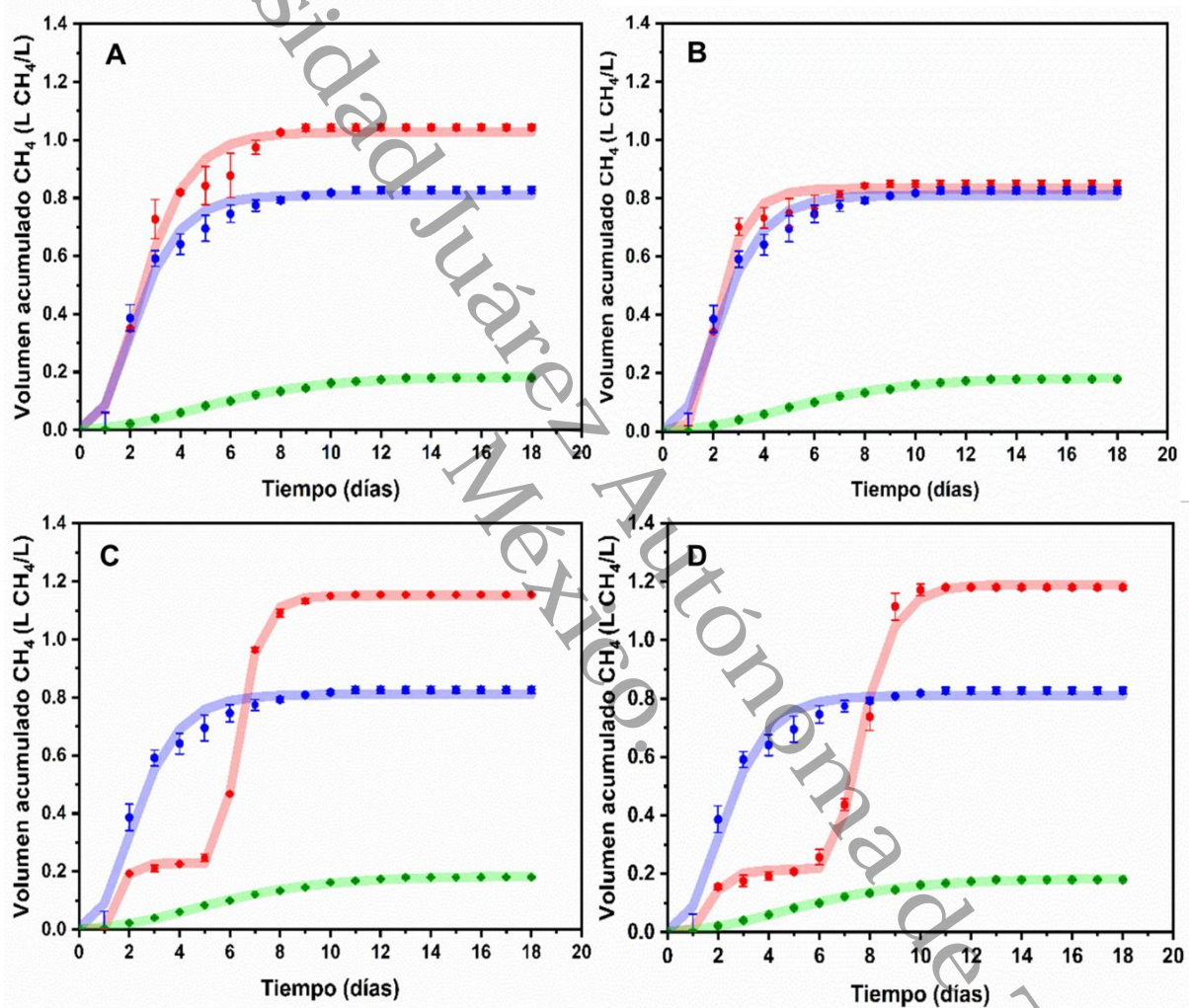


Figura 7. Producción acumulada de metano bajo diferentes tratamientos normalizados al control endógeno. A) M1, B) M2, C) M3 y D) M4. Los datos corresponden a los reactores M1 – M4 (rojo), control positivo (azul) y control endógeno (verde). La línea continua representa el ajuste del modelo de Gompertz modificado para cada caso.

La **Tabla 3**, presenta los parámetros cinéticos obtenidos de los datos experimentales para la producción de metano de los reactores M1 – M4 utilizando el modelo de Gompertz

modificado. Los reactores M3 y M4 presentan las mayores velocidades volumétricas de producción de metano (VVPM), mientras que disminuyen en los reactores M1 y M2. No obstante, la producción máxima de metano (H_{max}) fue similar en los reactores M1, M3 y M4, siendo el reactor M2, el único que mostró una producción menor.

Tabla 3. Parámetros cinéticos a partir de los datos experimentales del modelo de Gompertz modificado en la producción de metano.

Reactor	Consumo DQO (%)	H_{max} (L CH ₄ /L)	λ (d)	R_{max} (L CH ₄ /d)	R^2	VVPM (L CH ₄ /L-d)
M 1	99.27	1.03 ± 0.03	0.90	0.31 ± 0.01	0.98	0.11 ± 0.02
M 2	99.38	0.83 ± 0.02	1.18	0.42 ± 0.01	0.99	0.15 ± 0.01
M 3	99.24	1.15 ± 0.04	6.74	0.86 ± 0.02	1.00	0.21 ± 0.08
M 4	99.02	1.19 ± 0.54	7.59	0.58 ± 0.19	1.00	0.21 ± 0.01

H_{max} : producción acumulativa de metano, λ : fase de retardo, R_{max} : tasa máxima de producción de metano, VVPM: velocidad volumétrica de producción de metano.

En cuanto al tipo de sustrato utilizado, ya sea suero de queso autofermentado (M1) o el efluente proveniente de la fermentación oscura (M3), no se observaron diferencias apreciables en la producción de metano. Esto indica que utilizar el suero de queso autofermentado o doble fermentado (autofermentación seguida de fermentación oscura) genera resultados comparables. Además, la remoción de DQO fue mayor a 99 % en todos los reactores, evidenciando una alta eficiencia del proceso de metanogénesis. En todos los casos, la correlación (R^2) de los datos experimentales con el modelo de Gompertz fue entre 0.98 y 1, tal como se aprecia en la **Figura 7**.

El análisis estadístico de los resultados de los reactores para la producción de metano (M1 – M4), mostraron diferencias entre los tratamientos ($p < 0.05$), ver **Anexo 3**. Los valores de H_{max} de los reactores oscilaron entre 0.83 y 1.19 L CH₄/L (**Tabla 3**) La prueba de Tukey demostró que los cuatro reactores se ubicaron en grupos completamente distintos (a, b, c y d, respectivamente), lo que indica que cada uno presentó un comportamiento significativamente diferente.

DISCUSIÓN

La industria de derivados lácteos en México es muy importante y para hacerla más sustentable se deben tratar de manera adecuada los residuos líquidos y sólidos que genera. En este estudio, se encontró que el suero de queso fresco de la Quesería Carol (El Marqués, Querétaro, México) tiene una concentración de DQO de 51 g/L. Considerando que por cada kilo de queso producido se generan hasta 10 L de suero (Osorio-González et al., 2018), se puede tener una idea de lo contaminante que resulta este efluente sin un tratamiento adecuado. Entre las opciones disponibles para su tratamiento, destaca la digestión anaerobia ya que, usando reactores de alta tasa se puede reducir de manera eficiente las altas cargas orgánicas típicas de la industria de lácteos produciendo metano. Tal como se demostró en este estudio, en los reactores en lote de digestión anaerobia, alimentados con suero de queso autofermentado, se alcanzó 99 % remoción de la DQO. No obstante, el contenido de azúcares, principalmente, del suero de queso se podría explotar aún más mediante la producción de compuestos de alto valor agregado. Una forma de aprovechar al máximo este tipo de efluentes es mediante la fermentación oscura, en la cual, la materia orgánica es transformada a productos de valor agregado tales como ácidos carboxílicos, alcoholes e hidrógeno. Estos compuestos presentan un mayor valor comercial en comparación con el metano. Por ejemplo, el ácido láctico industrial alcanza un precio aproximado de 4 USD/kg (Garrido et al., 2023); el ácido caproico sin refinar se cotiza alrededor de 1.18 USD/kg, lo que representa un valor cinco veces mayor que del metano (0.24 USD/kg) y casi el doble del etanol, estimado en 0.61 USD/kg (Villegas-Rodríguez et al, 2024).

Valorización del suero de queso mediante la producción de ácidos carboxílicos e hidrógeno.

La fermentación oscura del suero de queso autofermentado y autofermentado-filtrado, a las condiciones evaluadas fue adecuada ya que, en todos los casos, se produjo una amplia variedad de ácidos carboxílicos y etanol, en diferentes proporciones, dependiendo de las condiciones. Adicionalmente se produjo hidrógeno. La producción de ácidos

carboxílicos presentó variaciones en cuanto a las concentraciones. Estos resultados reflejan el efecto de la COV, TRH y la presencia de sólidos en el suero de queso autofermentado sobre la selectividad de las comunidades microbianas durante la fermentación.

Dependiendo de las condiciones operacionales aplicadas, en cada reactor se enriquecieron distintas comunidades microbianas, lo que definió la vía para la producción de hidrógeno y ácidos carboxílicos. En el caso del reactor F1, que presentó la mayor concentración de ácido láctico se debe precisamente al TRH corto y a la presencia de sólidos (BAL autóctonas del suero de queso) en el suero de queso autofermentado. Utilizar TRH más prolongados, como en el caso de los reactores F3 y F4, facilitó la elongación de cadena para la producción de butirato y caproato. Estos resultados son consistentes con los reportados por Regueira-Marcos et al., (2024), quienes obtuvieron una producción de lactato de 11.4 g/L, representando el 95 % del total de ácidos carboxílicos generados. Aunque en el estudio previo y el nuestro, la vía metabólica predominante fue la del lactato-acetato (consumo de acetato y lactato para la producción de butirato e hidrógeno), es importante destacar que los autores mencionados emplearon residuos orgánicos sintéticos como sustrato. Los resultados de ambos estudios refuerzan la idea de que tanto la composición del sustrato, como las condiciones de operación influyen de manera directa en la distribución y concentración de los productos fermentativos.

La máxima VVPH (2.42 L H₂/L-d) observada en el presente estudio en el reactor F1, resultó 3 veces más baja que la reportada en estudios previos utilizando suero de leche en polvo, a una COV de 60 g AT/L-d y un TRH de 6 h (Montoya-Rosales et al., 2022). Esto puede explicarse principalmente por la limitada disponibilidad de carbohidratos en el suero de queso autofermentado, así como por la alta concentración de lactato, producto de la autofermentación. Diversos estudios han reportado que, aunque el suero de queso puede ser utilizado para la producción de hidrógeno mediante fermentación oscura, los rendimientos suelen ser bajos debido a la competencia entre las bacterias productoras de hidrógeno y las BAL, presentes de manera natural en el sustrato. Palomo-Briones et al., (2017), utilizaron suero de queso en polvo para evaluar el efecto del TRH

sobre la producción de hidrógeno a una concentración fija de lactosa en la alimentación de 20 g/L. Sus resultados demostraron que con TRH entre 6 y 12 horas la VVPH promedio incrementa (2.2 L H₂/L-d), mientras que con TRH entre 18 y 24 horas la VVPH promedio se reduce (0.85 L H₂/L-d). En el presente estudio se alcanzó una VVPH de 2.42 L H₂/L-d, la cual puede considerarse adecuada para las condiciones operacionales aplicadas y a las características intrínsecas del suero de queso autofermentado, tales como baja concentración de carbohidratos y presencia de lactato. En la **Tabla 4**, se presenta una comparación de algunos procesos usando suero de queso autofermentado en reactores continuos.

Tabla 4. Comparación de la producción de hidrógeno y ácidos carboxílicos a partir del suero de queso fermentado.

	(Ordoñez-Frías et al., 2024)	(Aranda-Jaramillo et al., 2025)	Este estudio
Sustrato	Suero de queso ácido fermentado	Suero de queso fermentado	Suero de queso ácido fermentado
Composición	16 g AT/L, 12.9 g lactato/L y 1.32 g acetato/L	9 g AT/L, 17 g lactato/L, 6.7 g acetato/L y 21 g butirato/L.	6.35 g AT/L, 16.47 g lactato/L
Tipo de reactor	EGSB	EGSB	CSTR
Condiciones de operación	Volumen de trabajo 2.2 L, 35°C, pH 5, TRH 4.5 h, COV 91 g DQO/L-d	Volumen de trabajo 1 L, 35°C, pH 5.8, TRH 18 h, COV 138.5 g DQO/L-d	Volumen de trabajo 1 L, 37°C, pH 6.0, TRH 10 h, COV 16.6 g DQO/L-d
Inóculo	Lodo anaerobio granular	Inóculo especializado denominado PTA-124,566	Lodo anaerobio granular
Producción H₂ (L H₂/L-d) en estado estable	3.2	3.2	2.42

**Ácidos
carboxílicos (g/L)**

Butirato 3.43 y
caproato 1.87

Acetato 16.7, butirato
5.6, lactato 37.5.

Acetato 0.76,
propionato 0.10,
lactato 13.36, butirato
3.55, caproato 0.74 y
etanol 0.80.

COV: carga orgánica volumétrica; CSTR: reactor de tanque agitado continuo; DQO: demanda química de oxígeno; EGSB: reactor de lecho de lodo granular expandido; TRH: tiempo de retención hidráulico; VVPH: velocidad volumétrica de producción de hidrógeno.

Metanización del suero de queso autofermentado y doblemente fermentado.

La digestión anaerobia del suero de queso autofermentado, autofermentado-filtrado o doble fermentado (autofermentación seguida de fermentación oscura) fue exitosa en todos los casos, ya que la eficiencia de remoción de DQO fue superior a 99 % con producciones máximas de metano (H_{max}) similares ($\sim 1 \text{ L CH}_4/\text{L}$).

Considerando lo anterior, y debido a que la fase de retardo (λ) más corta se obtuvo en el reactor M1, la estrategia más factible para la metanogénesis del suero de queso es el uso directo del suero de queso autofermentado sin filtrar. No obstante, la completa acidificación del suero de queso autofermentado puede tener ventajas operacionales si se considera un proceso de dos etapas (doble fermentado seguida de metanogénesis), principalmente relacionado con aspectos de estabilidad operacional en la segunda etapa (metanogénesis) ya que el pH idóneo para que ocurra eficientemente es entre 6.5 y 7.5 (Toledo-Cervantes et al, 2018). En resumen, si la industria productora de queso opta por la digestión anaerobia como estrategia de tratamiento de sus efluentes líquidos, aún después de pasar por un proceso de autofermentación, con certeza tendrá un proceso metanogénico estable, y producirá un vector energético como el metano.

En la **Tabla 5**, se muestra una comparación entre los resultados reportados por Lombardi et al., (2024) y los obtenidos en el presente estudio, destacando tanto el tipo de tratamiento como las condiciones operacionales en relación con la producción específica de metano.

Tabla 5. Comparación de la producción específica de metano y condiciones operativas en digestión anaerobia.

	(Lombardi et. al., 2024)		Este estudio	
Etapas	Fermentación oscura + digestión anaerobia	Digestión anaerobia	Fermentación oscura + digestión	Digestión anaerobia
Sustrato	Suero de queso	Suero de queso	Suero de queso ácido fermentado	Suero de queso ácido fermentado
Tipo de reactor	Fermentación CSTR Digestión anaerobia AMPTS II	AMPTS II	Fermentación CSTR Digestión anaerobia AMPTS II	AMPTS II
Condiciones de operación	Fermentación: Volumen de trabajo 0.5 L, 500 rpm, 38°C, pH 6.9 Digestión anaerobia: relación S/I 3, volumen de trabajo 400 mL, 37°C,	relación I/S 3, volumen de trabajo 400 mL, 37°C,	Fermentación: Volumen de trabajo 1 L, 300 rpm, 37°C, pH 6.0 Digestión anaerobia: relación S/I 3, volumen de trabajo 360 mL, 37°C	relación S/I 3, volumen de trabajo 360 mL, 37°C
Inóculo	Microbiota nativa del suero de queso		Lodo anaerobio granular + microbiota nativa	Lodo anaerobio granular + microbiota nativa
Producción específica CH₄ (NmL/g SV)	725	492	896	521

AMPTS II: Sistema automático de prueba de potencial de metano; CSTR: Reactor continuo de tanque agitado. Los procesos señalados de fermentación oscura más digestión anaerobia, no se trataron de un proceso secuencial, sino los efluentes obtenidos de la fermentación oscura se utilizaron como sustrato en la digestión anaerobia.

Lo reportado por Lombardi et al., (2024) respecto a la fermentación oscura previa a la digestión anaerobia, demuestra que la fermentación oscura puede enriquecer el sustrato en compuestos fácilmente degradables para la digestión anaerobia, concordando con el presente estudio en donde se llevó un comportamiento similar, mejorando la producción de metano en los sustratos doblemente fermentados.

Adicionalmente se aprecia que el inóculo influye considerablemente en la producción de metano, ya que la presencia de la microbiota nativa combinada con el lodo anaerobio granular, favorece la producción específica de metano.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

CONCLUSIONES

Usar suero de queso como sustrato para procesos biotecnológicos es una alternativa eficiente para valorizarlo y obtener productos de valor agregado. En este sentido, la fermentación oscura del suero de queso autofermentado es un proceso viable y factible para su aprovechamiento ya que se encontraron resultados satisfactorios en cuanto a la producción de ácidos carboxílicos y etanol, alcanzando concentraciones totales de hasta 20 g/L. Dependiendo de los objetivos del proceso, se puede dirigir la fermentación hacia la elongación de cadena para la producción de caproato o bien hacia altas concentraciones de lactato, bajo condiciones operacionales seleccionadas como COV y TRH.

Por otro lado, la digestión anaerobia del suero de queso ya sea directamente después de la autofermentación o después de haber pasado por un proceso de fermentación oscura previo, resultó en remociones de DQO superiores a 99 % y una producción estable de metano ($\sim 1 \text{ L CH}_4/\text{L}$). Lo cual indica que es una alternativa sostenible para aprovechar y valorizar al máximo este residuo de la industria quesera al obtener productos de valor agregado y biogás.

RECOMENDACIONES

A partir de los resultados del presente estudio, se proponen las siguientes recomendaciones para fortalecer y ampliar la investigación en torno a la valorización del suero de queso mediante la fermentación oscura y digestión anaerobia:

Se recomienda realizar un estudio metagenómico basado en la secuenciación del gen 16s rRNA con el fin de identificar la composición taxonómica de las comunidades de microorganismos presentes en los reactores de fermentación oscura. Este análisis permitirá conocer las especies microbianas involucradas en la producción de hidrógeno y ácidos carboxílicos, así como su dinámica en sistemas continuos, conocer las comunidades microbianas es esencial para optimizar las condiciones de operación y proponer estrategias de control que favorezcan rutas metabólicas enfocadas a los objetivos.

Es recomendable efectuar un balance de electrones a partir de los metabolitos identificados en los reactores de este proyecto. Este análisis permitiría cuantificar la distribución de electrones entre los diferentes productos de la fermentación, proporcionando una visión del flujo de electrones dentro del sistema. Con esto, sería posible comprender mejor la eficiencia de la conversión de sustrato a productos de interés.

Finalmente, se sugiere llevar a cabo una evaluación tecnoeconómica que permita determinar la viabilidad de escalar la producción de metano a nivel industrial. Este análisis abarcaría aspectos como costos de operación, requerimientos energéticos e infraestructura necesaria. De esta manera, se podría establecer el potencial de la valorización del suero de queso, contribuyendo a la sostenibilidad energética como a la reducción de impactos ambientales.

REFERENCIAS CITADAS

- Aboudi, K., Greses, S., & González-Fernández, C. (2023). Hydraulic Retention Time as an Operational Tool for the Production of Short-Chain Carboxylates via Anaerobic Fermentation of Carbohydrate-Rich Waste. *Molecules*, 28(18). <https://doi.org/10.3390/molecules28186635>
- Al-Haddad, S., Okoro-Shekwa, C., Fletcher, L., Ross, A., & Camargo-Valero, M. (2023). Assessing Different Inoculum Treatments for Improved Production of Hydrogen through Dark Fermentation. *Energies*, 16(3). <https://doi.org/10.3390/en16031233>
- Albuquerque, M. M., Sartor, G. de B., Martínez-Burgos, W. J., Scapini, T., Edwiges, T., Soccol, C. R., & Medeiros, A. B. P. (2024). Biohydrogen Produced via Dark Fermentation: A Review. *Methane*, 3(3), 500–532. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/methane3030029>
- American Public Health Association 2540 G. (1997). *Total, fixed and volatile solids in solid and semisolid samples. Standard methods for the examination of water and wastewater.* (pp. 2–59).
- American Public Health Association 5220. (1998). *Chemical oxygen demand closed reflux colorimetric method. Standard methods for the examination of water and wastewater.* (pp. 5–12; 5-16.).
- Angelidaki, I., & Sanders, W. (2004). Assessment of the anaerobic biodegradability of macropollutants. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 3(2), 117–129. <https://doi.org/10.1007/s11157-004-2502-3>
- Antonopoulou, G., Stamatelatos, K., Venetsaneas, N., Kornaros, M., & Lyberatos, G. (2008). Biohydrogen and methane production from cheese whey in a two-stage anaerobic process. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 47(15), 5227–5233. <https://doi.org/10.1021/ie071622x>
- Aranda-Jaramillo, B., García-Depraect, O., Aguilar-Juárez, O., Archundia-Amador, M., & León-Becerril, E. (2025). Continuous hydrogen production from cheese whey in a single-stage lactate-driven dark fermentation reactor. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2025.106307>
- Aranda-Jaramillo, B., León-Becerril, E., Aguilar-Juárez, O., Castro-Muñoz, R., & García-Depraect, O. (2023). Feasibility Study of Biohydrogen Production from Acid Cheese Whey via Lactate-Driven Dark Fermentation. *Fermentation*, 9(7). <https://doi.org/10.3390/fermentation9070644>
- Azbar, N., Çetinkaya, T., Keskin, T., Korkmaz, K., & Syed, H. (2009). Continuous fermentative hydrogen production from cheese whey wastewater under thermophilic anaerobic conditions. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(17), 7441–7447. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.04.032>
- BioRender. (2024). *BioRender (Versión web 2024) [Software en línea]*. BioRender. <https://biorender.com>
- Bueno de Mesquita, C. P., Wu, D., & Tringe, S. G. (2023). Methyl-Based Methanogenesis: an Ecological and Genomic Review. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 87(1), 1–29. <https://doi.org/10.1128/membr.00024-22>
- Cabrera, A., Norelvys, A., Diaz, M., Guerra, L., Pais, J. M., & Pereda, I. (2025). Methane production from whey in single-stage and two-stage anaerobic systems. *Ingeniería Mecánica*, 28(1815–5944).
- Carrillo-Reyes, J., Buitrón, G., Moreno-Andrade, I., Tapia-Rodríguez, A. C., Palomo-Briones, R., Razo-Flores, E., Aguilar-Juárez, O., Arreola-Vargas, J., Bernet, N., Braga, A. F. M., Braga, L., Castelló, E., Chatellard, L., Etchebehere, C., Fuentes, L., León-Becerril, E., Méndez-Acosta, H. O., Ruiz-Filippi, G., Tapia-Venegas, E., ... Zaiat, M. (2020). Standardized protocol for determination of biohydrogen potential. *MethodsX*, 7. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2019.11.027>
- Carrillo-Reyes, J., Celis, L. B., Alatríste-Mondragón, F., & Razo-Flores, E. (2012). Different start-up strategies to enhance biohydrogen production from cheese whey in UASB reactors. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(7), 5591–5601. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.01.004>
- Casallas-Ojeda, M., Perez-Esteban, N., Cabeza, I., Cobo, M., Olaya-Rincon, M., Caicedo-Concha, D., &

- Astals, S. (2024). Understanding the acidification risk of cheese whey anaerobic digestion under psychrophilic and mesophilic conditions. *Heliyon*, 10(5). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e26476>
- Cisneros-Pérez, C., Carrillo-Reyes, J., Celis, L. B., Alatríste-Mondragón, F., Etchebehere, C., & Razo-Flores, E. (2015). Inoculum pretreatment promotes differences in hydrogen production performance in EGSB reactors. *International Journal of Hydrogen Energy*, 40(19), 6329–6339. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.03.048>
- Davila-Vazquez, G., Alatríste-Mondragón, F., de León-Rodríguez, A., & Razo-Flores, E. (2008). Fermentative hydrogen production in batch experiments using lactose, cheese whey and glucose: Influence of initial substrate concentration and pH. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(19), 4989–4997. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.06.065>
- Davila-Vazquez, G., Cota-Navarro, C. B., Rosales-Colunga, L. M., de León-Rodríguez, A., & Razo-Flores, E. (2009). Continuous biohydrogen production using cheese whey: Improving the hydrogen production rate. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(10), 4296–4304. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.02.063>
- Delgado-Macuil, R. J., Perez-Armendariz, B., Cardoso-Ugarte, G. A., Tolibia, S. E. M., & Benítez-Rojas, A. C. (2025). Recent Biotechnological Applications of Whey: Review and Perspectives. *Fermentation*, 11(4), 1–24. <https://doi.org/10.3390/fermentation11040217>
- Deshmukh, N., Rao, P. S., Sharma, H., M. H., S. K., N., L. N., & C. T., M. K. (2024). Waste to nutrition: The evolution of whey, a byproduct to galactooligosaccharides production. *Food Chemistry Advances*, 4(January), 100642. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2024.100642>
- Domínguez-Espinosa, M. E., Cruz-Salomón, A., Ramírez de León, J. A., Hernández-Méndez, J. M. E., & Santiago-Martínez, M. G. (2023). Syntrophy between bacteria and archaea enhances methane production in an EGSB bioreactor fed by cheese whey wastewater. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 7(December), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2023.1244691>
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Fancello, F., Zara, G., Hatami, F., Scano, E. A., & Mannazzu, I. (2024). Unlocking the potential of second cheese whey: a comprehensive review on valorisation strategies. In *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* (Vol. 23, Issue 2). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/s11157-024-09687-2>
- Feria, A., De la Cruz, D., Ignacio, C., Perez, H., Torres, J. G., & Pacheco, J. G. (2022). Producción biológica de hidrógeno mediante fermentación oscura. *Journal of Basic Sciences*, 8(23), 45–56. <http://revistas.ujat.mx/index.php/jobs>
- Figueroa-Pires, A., Garcia-Marnotes, N., Díaz-Rubio, O., Cobos-Garcia, A., & Dias-Pereira, C. (2021). Dairy By-Products: A Review on the Valorization of Whey and Second Cheese Whey. *Foods*, 10, 1067. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/foods10051067>
- Finn, D. R., Rohe, L., Krause, S., Guliyev, J., Loewen, A., & Tebbe, C. C. (2023). Methanogenesis in biogas reactors under inhibitory ammonia concentration requires community-wide tolerance. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 107(21), 6717–6730. <https://doi.org/10.1007/s00253-023-12752-5>
- Fuentes-Santiago, V., Valdez-Vazquez, I., Vital-Jácome, M., Zavala-Méndez, M., Razo-Flores, E., & Carrillo-Reyes, J. (2023). Carbohydrates/acid ratios drives microbial communities and metabolic pathways during biohydrogen production from fermented agro-industrial wastewater. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 11(3). <https://doi.org/10.1016/j.jece.2023.110302>
- Garrido, R., Cabeza, L. F., & Falguera, V. (2023). Lactic Acid Production from Cow Manure: Technoeconomic Evaluation and Sensitivity Analysis. *Fermentation*, 9(10).

<https://doi.org/https://doi.org/10.3390/fermentation9100901>

- Harirchi, S., Wainaina, S., Sar, T., Nojoumi, S. A., Parchami, M., Parchami, M., Varjani, S., Khanal, S. K., Wong, J., Awasthi, M. K., & Taherzadeh, M. J. (2022). Microbiological insights into anaerobic digestion for biogas, hydrogen or volatile fatty acids (VFAs): a review. *Bioengineered*, 13(3), 6521–6557. <https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2035986>
- Hasan, M. M., Mofijur, M., Uddin, M. N., Kabir, Z., Badruddin, I. A., & Khan, T. M. Y. (2024). Insights into anaerobic digestion of microalgal biomass for enhanced energy recovery. *Frontiers in Energy Research*, 12(February), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2024.1355686>
- Holliger, C., Alves, M., Andrade, D., Angelidaki, I., Astals, S., Baier, U., Bougrier, C., Buffière, P., Carballa, M., De Wilde, V., Ebertseder, F., Fernández, B., Ficara, E., Fotidis, I., Frigon, J. C., De Lacroix, H. F., Ghasimi, D. S. M., Hack, G., Hartel, M., ... Wierinck, I. (2016). Towards a standardization of biomethane potential tests. *Water Science and Technology*, 74(11), 2515–2522. <https://doi.org/10.2166/wst.2016.336>
- Karakaya, G., & Özmişçi, S. (2025). Influence of Different Substrate and Microorganism Concentrations on Butyric Acid-Derived Biohydrogen Production. *Processes*, 13(4). <https://doi.org/10.3390/pr13041068>
- Lembo, G., Signorini, A., Marone, A., Carbone, C., & Agostini, A. (2022). Hydrogen and Methane Production by Single- and Two-Stage Anaerobic Digestion of Second Cheese Whey: Economic Performances and GHG Emissions Evaluation. *Energies*, 15(21). <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/en15217869>
- Leroy-Freitas, D., Muñoz, R., Martínez-Mendoza, L. J., Martínez-Fraile, C., & García-Depraect, O. (2024). Enhancing Biohydrogen Production: The Role of Iron-Based Nanoparticles in Continuous Lactate-Driven Dark Fermentation of Powdered Cheese Whey. *Fermentation*, 10(6). <https://doi.org/10.3390/fermentation10060296>
- Lizárraga-Chaidez, M., Mendoza-Sánchez, M., Abadía-García, L., & García-Pérez, J. (2023). El inocente impacto ambiental del suero de la leche. *Epistemos*, 18(35), 88–97. <https://doi.org/10.36790/epistemos.v18i35.316>
- Lombardi, L., Sahota, S., Poletini, A., Pomi, R., Rossi, A., Zonfa, T., Cema, G., Czerwińska, K., Magdziarz, A., Mikusińska, J., Śliz, M., & Wilk, M. (2024). Valorization of cheese-making residues in biorefineries using different combinations of dark fermentation, hydrothermal carbonization and anaerobic digestion. *Energy*, 305(January). <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.energy.2024.132327>
- López-Aguilar, H., Barrón, A., Franco, M., Paz, A., & Pérez-Hernández, A. (2021). Modelación de la generación de metano a partir de suero lácteo y excreta de ganado en codigestión anaerobia. *Nova Scientia*, 13(27), 1–17. <https://doi.org/10.21640/ns.v13i27.2791>
- Mainardis, M., Flaibani, S., Trigatti, M., & Goi, D. (2019). Techno-economic feasibility of anaerobic digestion of cheese whey in small Italian dairies and effect of ultrasound pre-treatment on methane yield. *Journal of Environmental Management*, 246(June), 557–563. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.06.014>
- Martínez-Mendoza, L. J., Lebrero, R., Muñoz, R., & García-Depraect, O. (2022). Influence of key operational parameters on biohydrogen production from fruit and vegetable waste via lactate-driven dark fermentation. *Bioresource Technology*, 364(October). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.128070>
- Martinez, V., & Garcia, R. (2010). Fermentación oscura, fotofermentación y biofotólisis: análisis de su aplicación en secuencia para la producción de hidrógeno biológico. *DGID Biohidrógeno*, 23(10). <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/catal12111366>
- Mazorra-Manzano, M. A., Robles-Porchas, G. R., González-Velázquez, D. A., Torres-Llanez, M. J., Martínez-Porchas, M., García-Sifuentes, C. O., González-Córdova, A. F., & Vallejo-Córdova, B. (2020). Cheese whey fermentation by its native microbiota: Proteolysis and bioactive peptides release with ACE-inhibitory activity. *Fermentation*, 6(1), 1–12. <https://doi.org/10.3390/fermentation6010019>

- Montoya-Rosales, J. de J., Ontiveros-Valencia, A., Esquivel-Hernández, D. A., Etchebehere, C., Celis, L. B., & Razo-Flores, E. (2023). Metatranscriptomic Analysis Reveals the Coexpression of Hydrogen-Producing and Homoacetogenesis Genes in Dark Fermentative Reactors Operated at High Substrate Loads. *Environmental Science and Technology*, 57(31), 11552–11560. <https://doi.org/10.1021/acs.est.3c02066>
- Montoya-Rosales, J. de J., Palomo-Briones, R., Celis, L. B., Etchebehere, C., Cházaro-Ruiz, L. F., Escobar-Barrios, V., & Razo-Flores, E. (2022). Coping with mass transfer constrains in dark fermentation using a two-phase partitioning bioreactor. *Chemical Engineering Journal*, 445(September 2021), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.136749>
- Ordoñez-Frías, E. J., Muñoz-Páez, K. M., & Buitrón, G. (2024). Biohydrogen production from fermented acidic cheese whey using lactate: Reactor performance and microbial ecology analysis. *International Journal of Hydrogen Energy*, 52, 389–403. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2023.06.307>
- Osorio-González, C. S., Sandoval-Salas, F., Hernández-Rosas, F., Hidalgo-Contreras, J. V., Gómez-Merino, F., & Ávalos de la Cruz, D. A. (2018). Potencial de aprovechamiento del suero de queso en México potential for the use of cheese whey in Mexico. *Agro Productividad*, 11, 101–106.
- Ostos, I., Flórez-Pardo, L. M., & Camargo, C. (2024). A metagenomic approach to demystify the anaerobic digestion black box and achieve higher biogas yield: a review. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 15, Issue October). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1437098>
- Palomo-Briones, R., Razo-Flores, E., Bernet, N., & Trably, E. (2017). Dark-fermentative biohydrogen pathways and microbial networks in continuous stirred tank reactors: Novel insights on their control. *Applied Energy*, 198, 77–87. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2017.04.051>
- Panghal, A., Patidar, R., Jaglan, S., Chhikara, N., Khatkar, S. K., Gat, Y., & Sindhu, N. (2018). Whey valorization: current options and future scenario – a critical review. *Nutrition and Food Science*, 48(3), 520–535. <https://doi.org/10.1108/NFS-01-2018-0017>
- Paz Mireles, C. L., Razo Flores, E., & Cercado Quezada, B. (2016). Efecto de la composición de mezclas de metabolitos procedentes de la fermentación oscura para su uso en la producción de biohidrógeno en celdas de electrólisis microbiana. *Repositorio IPICYT*.
- Prazeres, A., Carvalho, F., & Rivas, J. (2012). Cheese whey management: A review. *Journal of Environmental Management*, 110, 48–68. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.05.018>
- Ramos-Suárez, J. L., Álvarez-Méndez, S. J., Padrón Tejera, E., Ritter, A., & Mata González, J. (2024). Temperature Control Effect on Cheese Whey Anaerobic Digestion with Low-Cost Tubular Digesters. *Processes*, 12(7). <https://doi.org/10.3390/pr12071452>
- Regueira-Marcos, L., García-Depraect, O., & Muñoz, R. (2023). Elucidating the role of pH and total solids content in the co-production of biohydrogen and carboxylic acids from food waste via lactate-driven dark fermentation. *Fuel*, 338(December 2022). <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2022.127238>
- Regueira-Marcos, L., García-Depraect, O., & Muñoz, R. (2024). Continuous two-stage lactate-driven dark fermentation process for enhanced biohydrogen production from food waste. *Journal of Water Process Engineering*, 67(September). <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2024.106116>
- Rejdlová, A., Lorencová, E., Míšková, Z., & Salek, R. N. (2025). Techno-Functional Properties and Recent Advances in the Manufacturing of Whey Beverages: A Review. *Applied Sciences (Switzerland)*, 15(4). <https://doi.org/10.3390/app15041846>
- Rittman, B. E., & McCarty, P. L. (2020). *Environmental Biotechnology. Principles and Applications* (McGraw-Hill Education (ed.); Second Ed.).
- Salas-Vargas, C., Brunett-Pérez, L., Espinosa-Ortiz, V. E., & Martínez-García, C. G. (2021). Environmental impact of Oaxaca cheese production and wastewater from artisanal dairies under two scenarios in

- Aculco, State of Mexico. *Journal of Cleaner Production*, 311(April). <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.127586>
- Sebastián-Nicolás, J. L., González-Olivares, L. G., Vázquez-Rodríguez, G. A., Lucho-Constatino, C. A., Castañeda-Ovando, A., & Cruz-Guerrero, A. E. (2020). Valorization of whey using a biorefinery. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 14(5), 1010–1027. <https://doi.org/10.1002/bbb.2100>
- Secretaria de Economía. (2012). NMX-AA-030/1-SCFI-2012, Análisis De Agua - Medición De La Demanda Química De Oxígeno En Aguas Naturales, Residuales Y Residuales Tratadas. In *Diario Oficial de la Federación* (Vol. 1, pp. 1–18). <http://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/166774/NMX-AA-030-1-SCFI-2012.pdf>
- SIAP. (2023a). Boletín de Leche 2023. *Agricultura*. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/940825/Bolet_n_de_Leche_2023.pdf
- SIAP. (2023b). Panorama de la lechería en México. *Agricultura*. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/940824/Panorama_de_la_lecher_a_en_M_xico_2023.pdf
- Sun, Y., Zhang, T., Lu, B., Li, X., & Jiang, L. (2023). Application of cofactors in the regulation of microbial metabolism: A state of the art review. *Frontiers in Microbiology*, 14(April), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1145784>
- Taotao, T., Ying, C., Min, L., Ye, D., & Yichuan, T. (2022). Effect of pH on the performance of hydrogen production by dark fermentation coupled denitrification. *Environmental Research*, 208. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.112663>
- Toledo-Cervantes, A., Guevara-Santos, N., Arreola-Vargas, J., Snell-Castro, R., & Mendez-Acosta, H. O. (2018). Performance and microbial dynamics in packed-bed reactors during the long-term two-stage anaerobic treatment of tequila vinasses. *Biochemical Engineering Journal*, 138, 12–20. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.06.020>
- Venetsaneas, N., Antonopoulou, G., Stamatelatou, K., Kornaros, M., & Lyberatos, G. (2009). Using cheese whey for hydrogen and methane generation in a two-stage continuous process with alternative pH controlling approaches. *Bioresource Technology*, 100(15), 3713–3717. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.01.025>
- Wang, Y., Chen, X., Spengler, K., Terberger, K., Boehm, M., Appel, J., Barske, T., Timm, S., Battchikova, N., Hagemann, M., & Gutekunst, K. (2022). Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase and low abundant ferredoxins support aerobic photomixotrophic growth in cyanobacteria. *ELife*, 11, 1–18. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.71339>
- Wang, Y., Wu, J., Lv, M., Shao, Z., Hungwe, M., Wang, J., Bai, X., Xie, J., Wang, Y., & Geng, W. (2021). Metabolism Characteristics of Lactic Acid Bacteria and the Expanding Applications in Food Industry. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9(May), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.612285>
- Yuan, W., Du, Y., Yu, K., Xu, S., Liu, M., Wang, S., Yang, Y., Zhang, Y., & Sun, J. (2022). The Production of Pyruvate in Biological Technology: A Critical Review. *Microorganisms*, 10(12). <https://doi.org/10.3390/microorganisms10122454>
- Zhang, L., Kuroki, A., & Tong, Y. W. (2020). A Mini-Review on In situ Biogas Upgrading Technologies via Enhanced Hydrogenotrophic Methanogenesis to Improve the Quality of Biogas From Anaerobic Digesters. *Frontiers in Energy Research*, 8(April), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2020.00069>

ANEXOS

ANEXO 1: Caracterización del lodo anaerobio granular fresco y pretratado.

Se presenta la caracterización realizada al lodo anaerobio granular con y sin pretratamiento (105°C, 24 h).

Parámetros fisicoquímicos	Lodo anaerobio fresco	Lodo anaerobio pretratado
SST (g/g lodo)	0.06 ± 0.01	0.98 ± 0.01
SSV (g/g lodo)	0.05 ± 0.01	0.87 ± 0.01

Se muestra una fotografía del lodo anaerobio granular fresco y pretratado, utilizado como inóculo en los reactores de digestión anaerobia y fermentación oscura.

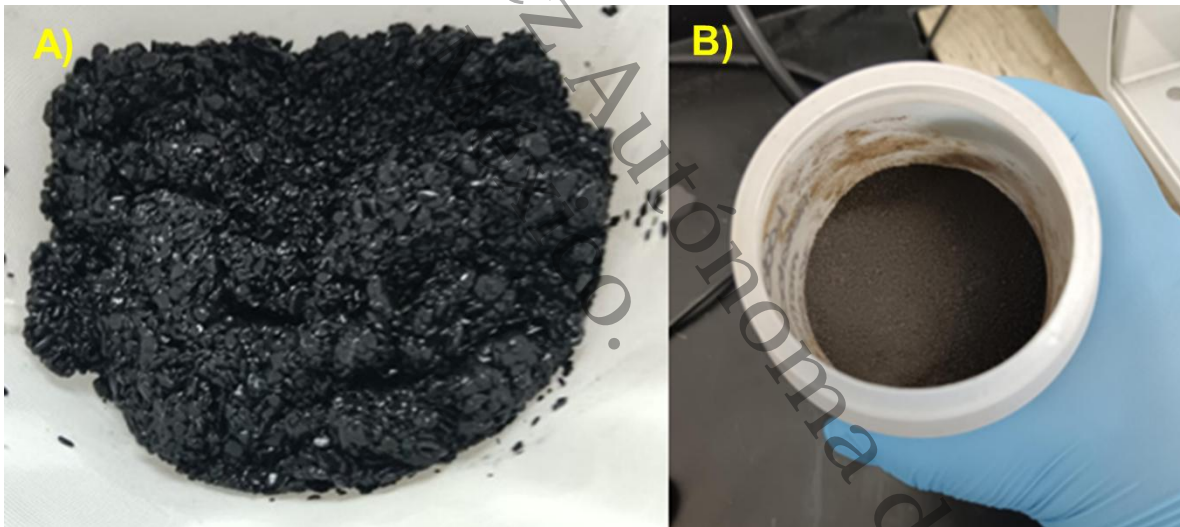


Figura A1.1. Fotografía del lodo anaerobio granular fresco A), pretratado térmicamente y molido B).

ANEXO 2: Perfiles de producción de hidrógeno y ácidos carboxílicos en los reactores de fermentación oscura.

El anexo 2 muestra los perfiles de producción de hidrógeno y ácidos carboxílicos que se evaluaron durante la operación continua de los reactores de fermentación oscura.

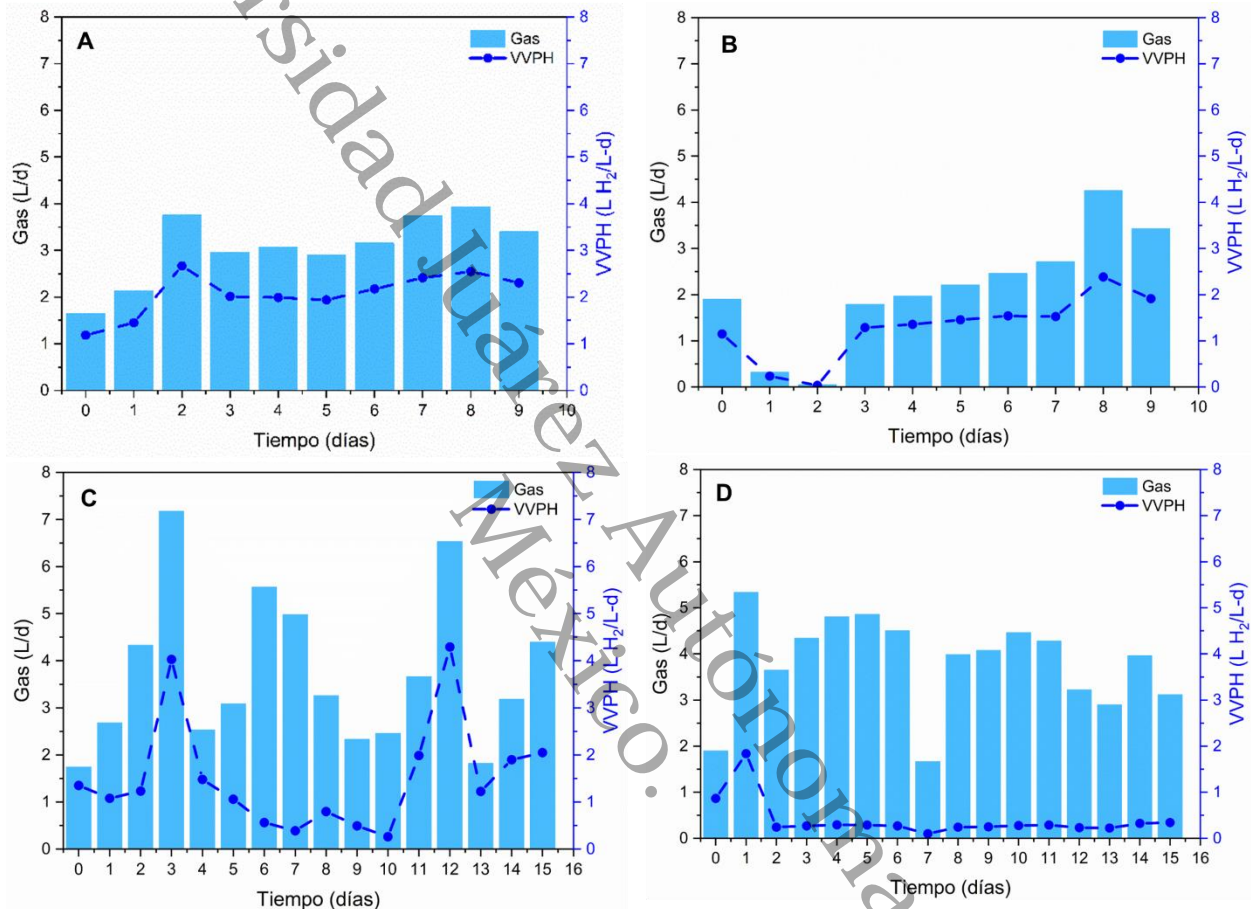


Figura A2.1. Producción de hidrógeno biológico de los cuatro reactores de fermentación oscura (F1 – F4) a partir de las velocidades volumétricas de producción de hidrógeno y los litros obtenidos por día, A) F1, B) F2, C) F3 y D) F4.

Se presenta las cinéticas de la producción de los ácidos carboxílicos intermediarios del proceso de fermentación oscura del suero de queso ácido autofermentado.

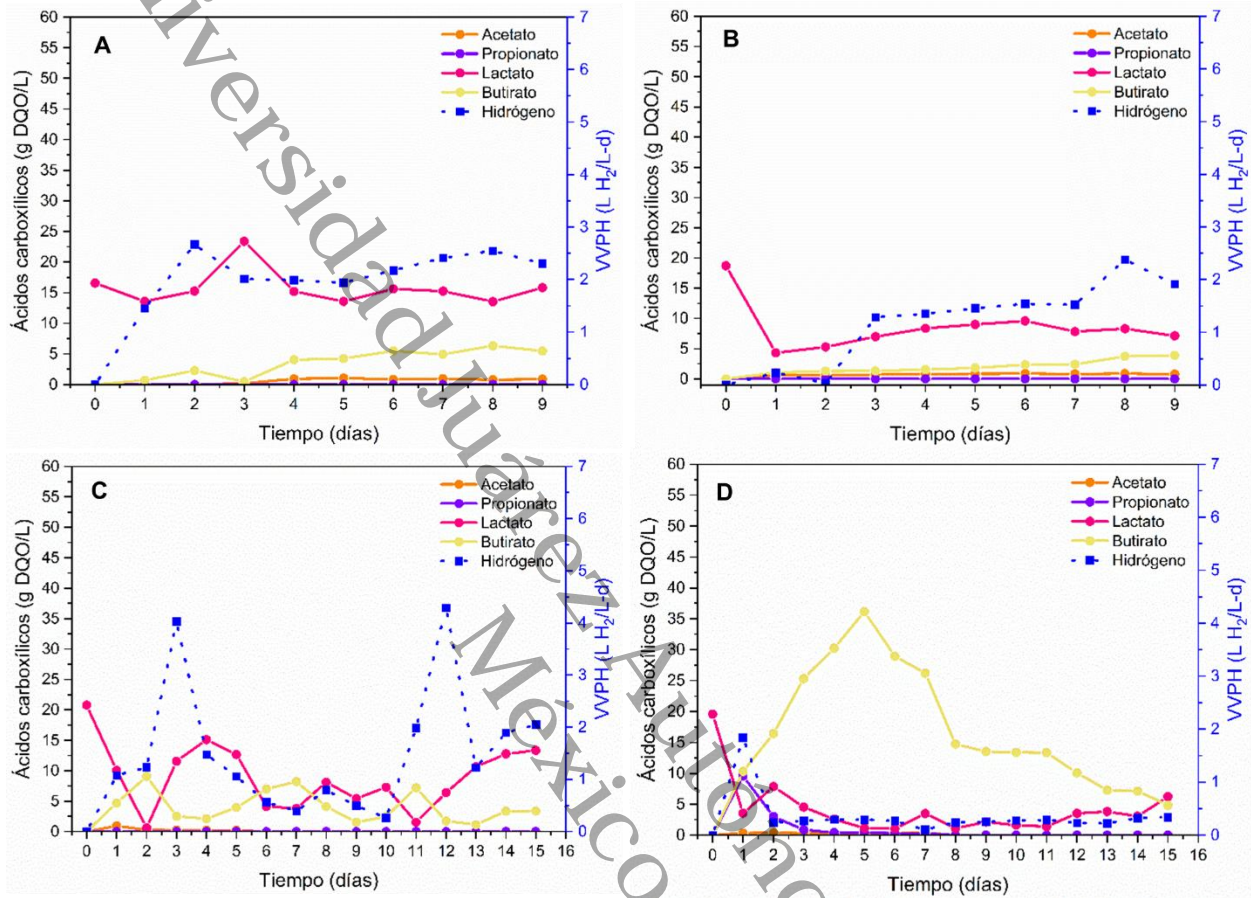


Figura A2.2. Cinética de la producción de los ácidos carboxílicos de los cuatro reactores de fermentación oscura en comparación con las velocidades de producción de hidrógeno. A) F1, B) F2, C) F3 y D) F4.

Se muestra el balance de masas de los reactores de fermentación oscura operados. En el balance de masas de los reactores de fermentación se observó la distribución de la demanda química de oxígeno (DQO) a lo largo del proceso.

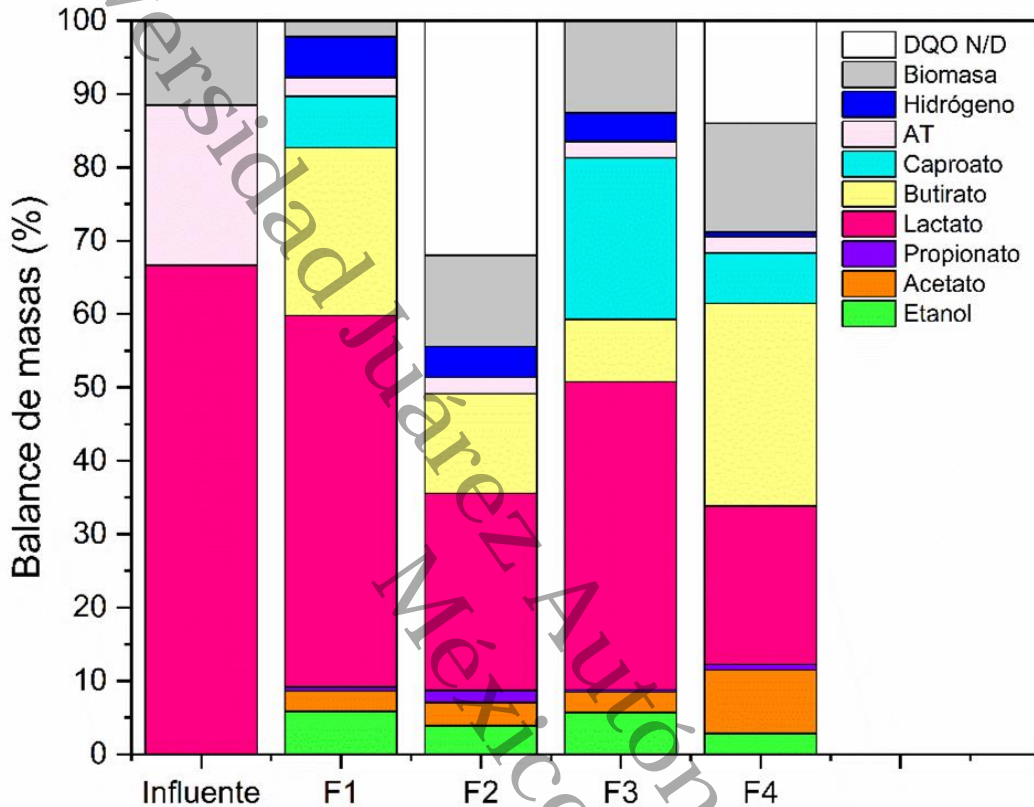


Figura A2.3. Balance de masas de los estados estables de cada reactor de fermentación oscura. DQO N/D: demanda química de oxígeno no identificada; AT: azúcares totales.

ANEXO 3: Resultados del ANOVA y Tukey para VVPH, ácidos carboxílicos y VVPM.

Para llevar a cabo el análisis ANOVA de 1) las velocidades volumétricas de producción de hidrógeno, 2) la producción de ácidos carboxílicos y 3) las velocidades volumétricas de producción de metano, se llevó a cabo un análisis estadístico y posteriormente, con la finalidad de cumplir con los supuestos del ANOVA, se aplicó la prueba de normalidad de los datos seguido de una prueba de homogeneidad de varianzas.

Análisis estadístico de las velocidades volumétricas de producción de hidrógeno

Seguido se realizó una prueba de normalidad de datos a partir de la prueba de Shapiro-Wilk debido a que el tamaño muestral de cada uno de los reactores era de 3.

	Reactor	Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Significancia
VVPH (L H2/L-d)	F 1	.995	3	.868
	F 2	.997	3	.901
	F 3	.883	3	.332
	F 4	.866	3	.285

Se presenta la tabla de la prueba de Levene con respecto a la homogeneidad de varianzas.

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
2.927	3	8	.100

Se demuestra a partir del p-valor de 0.100 que los datos para todos los reactores de fermentación oscura en comparación con la VVPH son homogéneos, por lo que se puede continuar al análisis de varianzas múltiples ANOVA.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	7.527	3	2.509	25.316	.000195

Intra-grupos	.793	8	.099
Total	8.320	11	

La prueba ANOVA confirma que los reactores F1 – F4 no son iguales, sin embargo, se necesita de una prueba post hoc de Tukey para identificar que reactores si son iguales y cuales son diferentes.

Reactor	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		a	b
F 4	3	.29500	
F 3	3		1.72433
F 2	3		1.93967
F 1	3		2.42167
Sig.		1.000	.100

Análisis estadístico de las producciones de ácidos carboxílicos y alcohol en estado estable

Se presenta la prueba de normalidad de los datos de producción de los ácidos carboxílicos a partir de Shapiro-Wilk.

	Reactor	Shapiro-Wilk
		Sig.
Etanol Concentración (g/L)	Reactor 1	.896
	Reactor 2	.274
	Reactor 3	.111
	Reactor 4	.987

Acetato Concentración (g/L)	Reactor 1	.609
	Reactor 2	.419
	Reactor 3	.670
	Reactor 4	.957
Propionato Concentración (g/L)	Reactor 1	1.000
	Reactor 2	.477
	Reactor 3	.446
	Reactor 4	.606
Lactato Concentración (g/L)	Reactor 1	.876
	Reactor 2	.775
	Reactor 3	.911
	Reactor 4	.801
Butirato Concentración (g/L)	Reactor 1	.915
	Reactor 2	.049
	Reactor 3	.251
	Reactor 4	.341
Caproato Concentración (g/L)	Reactor 1	.200
	Reactor 3	.251
	Reactor 4	.846

La prueba de homogeneidad de varianzas de Levene en las concentraciones de los ácidos carboxílicos y alcohol.

	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Etanol Concentración (g/L)	2.862	3	8	.104

Acetato Concentración (g/L)	1.755	3	8	.233
Propionato Concentración (g/L)	1.754	3	8	.233
Lactato Concentración (g/L)	1.538	3	8	.278
Butirato Concentración (g/L)	2.666	3	8	.119
Caproato Concentración (g/L)	4.940	3	8	.032

El análisis ANOVA de los ácidos carboxílicos y alcohol en los reactores F1 – F4, se presenta en la siguiente tabla.

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Etanol Concentración (g/L)	Inter- grupos	.355	3	.118	3.894	.055
	Intra- grupos	.243	8	.030		
	Total	.598	11			
Acetato Concentración (g/L)	Inter- grupos	4.001	3	1.334	61.171	.000
	Intra- grupos	.174	8	.022		
	Total	4.175	11			
	Inter- grupos	.114	3	.038	6.251	.017

Propionato Concentración (g/L)	Intra- grupos	.049	8	.006		
	Total	.162	11			
Lactato Concentración (g/L)	Inter- grupos	101.421	3	33.807	53.366	.000
	Intra- grupos	5.068	8	.633		
	Total	106.489	11			
	Inter- grupos	15.040	3	5.013	21.191	.000
Butirato Concentración (g/L)	Intra- grupos	1.893	8	.237		
	Total	16.932	11			
Caproato Concentración (g/L)	Inter- grupos	8.797	3	2.932	31.861	.000
	Intra- grupos	.736	8	.092		
	Total	9.533	11			

Y por último la prueba post hoc de Tukey para todos los ácidos carboxílicos y alcohol.

Etanol Concentración (g/L)

	Reactor	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
			a	b
HSD de Tukey	Reactor 4	3	.38467	
	Reactor 2	3	.55200	
	Reactor 3	3	.77667	
	Reactor 1	3	.80467	
	Sig.		.071	

Acetato Concentración (g/L)				
	Reactor	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
			a	b
HSD de Tukey	Reactor 3	3	.74533	
	Reactor 1	3	.76000	
	Reactor 2	3	.89467	
	Reactor 4	3		2.12667
	Sig.		.622	1.000

Propionato Concentración (g/L)				
	Reactor	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
			a	b
HSD de Tukey	Reactor 3	3	.05400	
	Reactor 1	3	.10400	
	Reactor 4	3		.13667
	Reactor 2	3		.31267
	Sig.		.588	.093

Lactato Concentración (g/L)					
	Reactor	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
			a	b	c
HSD de Tukey	Reactor 4	3	6.01933		
	Reactor 2	3	7.47067		
	Reactor 3	3		11.14000	

Reactor 1	3		13.35800
Sig.		.194	1.000 1.000

Butirato Concentración (g/L)

	Reactor	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
			a	b
HSD de Tukey	Reactor 3	3	1.41800	
	Reactor 2	3	2.21800	
	Reactor 1	3		3.54933
	Reactor 4	3		4.29067
	Sig.		.259	.313

Caproato Concentración (g/L)

	Reactor	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
			a	b	c
HSD de Tukey	Reactor 2	3	.00000		
	Reactor 1	3	.73933		
	Reactor 4	3	.77133		
	Reactor 3	3		2.34800	
	Sig.		.057	1.000	

Análisis estadístico de las velocidades volumétricas de producción de metano

La prueba de normalidad de los datos de VVPM a partir de Shapiro-Wilk

	Reactor	Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig,
VVPM	M 1	.992	3	.825
(L CH4/L-d)	M 2	.980	3	.726

M 3	.964	3	.637
M 4	1.000	3	1.000

La prueba de homogeneidad de varianzas de Levene en las VVPM.

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
2.099	3	8	.179

El análisis ANOVA de las velocidades volumétricas de producción de metano en los reactores M1 – M4.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	.001	3	.000	2.885	.103
Intra-grupos	.001	8	.000		
Total	.002	11			

La prueba post hoc de Tukey para las VVPM.

Reactor	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		a	b	c	d
M 3	3	.00000			
M 2	3		.73933		
M 4	3			.77133	
M 1	3				2.34800
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

ANEXO 4: Alojamiento de la Tesis en el Repositorio Institucional

Título de Tesis:	INTERACCIONES MICROBIANAS EN LA FERMENTACIÓN OSCURA DEL SUERO DE QUESO ÁCIDO EN SISTEMAS CONTINUOS: EFECTO DE LA MICROBIOTA NATIVA Y DEL LODO ANAEROBIO GRANULAR
Autores de la Tesis:	Andrea Lizbeth Feria Lara, Durvel de la Cruz Romero & Elías Razo Flores
ORCID:	Andrea Feria: https://orcid.org/0009-0002-4256-9572 Durvel de la Cruz: https://orcid.org/0000-0001-5430-9888 Elías Razo: https://orcid.org/0000-0002-8262-695X
Resumen de la Tesis:	<p>El suero de queso es un subproducto agroindustrial que representa un riesgo ambiental considerable debido a su elevada demanda química de oxígeno (DQO). En México, el suero de queso no es tratado directamente y su manejo implica un proceso de autofermentación que afecta su posterior tratamiento. En este trabajo se usaron estrategias para valorizar el suero de queso fresco autofermentado, autofermentado filtrado y doblemente fermentado mediante la fermentación oscura y la digestión anaerobia. En la fermentación oscura se operaron cuatro reactores continuos de tanque agitado para analizar el efecto del tiempo de retención hidráulico (TRH), la carga orgánica volumétrica (COV) y la presencia de sólidos sobre la producción de metabolitos e hidrógeno. Se alcanzaron concentraciones totales de ácidos carboxílicos y etanol hasta de 20 g/L, con una velocidad volumétrica de producción de hidrógeno de 2.42 L H₂/L-d (litros de hidrógeno por cada litro de suero de queso agregado al día). Se determinó que los sólidos presentes en el suero de queso autofermentado influyen en la fermentación oscura y sus rutas metabólicas. Dependiendo de los objetivos del proceso de valorización, es posible promover la</p>

	<p>producción de lactato o caproato, ajustando los valores de TRH y COV. La digestión anaerobia del suero de queso en sus distintas formas fue muy eficiente, alcanzando remociones de DQO superiores a 99 % y una velocidad volumétrica de producción de metano de 0.21 L/L-d. Estos resultados demuestran el potencial de valorización del suero de queso para la producción de ácidos carboxílicos o metano, las cuales son alternativas sostenibles para la industria quesera en un esquema de economía circular.</p>
<p>Palabras claves de la Tesis:</p>	<p>Digestión anaerobia; ácidos carboxílicos; reactor continuo de tanque agitado; fermentación oscura; metanogénesis</p>
<p>Referencias citadas:</p>	<p>Aboudi, K., Gréses, S., & González-Fernández, C. (2023). Hydraulic Retention Time as an Operational Tool for the Production of Short-Chain Carboxylates via Anaerobic Fermentation of Carbohydrate-Rich Waste. <i>Molecules</i>, 28(18). https://doi.org/10.3390/molecules28186635</p> <p>Al-Haddad, S., Okoro-Shekwa, C., Fletcher, L., Ross, A., & Camargo-Valero, M. (2023). Assessing Different Inoculum Treatments for Improved Production of Hydrogen through Dark Fermentation. <i>Energies</i>, 16(3). https://doi.org/10.3390/en16031233</p> <p>Albuquerque, M. M., Sartor, G. de B., Martinez-Burgos, W. J., Scapini, T., Edwiges, T., Soccol, C. R., & Medeiros, A. B. P. (2024). Biohydrogen Produced via Dark Fermentation: A Review. <i>Methane</i>, 3(3), 500–532. https://doi.org/https://doi.org/10.3390/methane3030029</p> <p>American Public Health Association 2540 G. (1997). <i>Total, fixed and volatile solids in solid and semisolid samples. Standard methods for the examination of water and wastewater</i>. (pp. 2–59).</p> <p>American Public Health Association 5220. (1998). <i>Chemical oxygen demand closed reflux colorimetric method. Standard methods</i></p>

	<p><i>for the examination of water and wastewater.</i> (pp. 5–12; 5-16.).</p> <p>Angelidaki, I., & Sanders, W. (2004). Assessment of the anaerobic biodegradability of macropollutants. <i>Reviews in Environmental Science and Biotechnology</i>, 3(2), 117–129. https://doi.org/10.1007/s11157-004-2502-3</p> <p>Antonopoulou, G., Stamatelatou, K., Venetsaneas, N., Kornaros, M., & Lyberatos, G. (2008). Biohydrogen and methane production from cheese whey in a two-stage anaerobic process. <i>Industrial and Engineering Chemistry Research</i>, 47(15), 5227–5233. https://doi.org/10.1021/ie071622x</p> <p>Aranda-Jaramillo, B., García-Depraect, O., Aguilar-Juárez, O., Archundia-Amador, M., & León-Becerril, E. (2025). Continuous hydrogen production from cheese whey in a single-stage lactate-driven dark fermentation reactor. <i>Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers</i>. https://doi.org/10.1016/j.jtice.2025.106307</p> <p>Aranda-Jaramillo, B., León-Becerril, E., Aguilar-Juárez, O., Castro-Muñoz, R., & García-Depraect, O. (2023). Feasibility Study of Biohydrogen Production from Acid Cheese Whey via Lactate-Driven Dark Fermentation. <i>Fermentation</i>, 9(7). https://doi.org/10.3390/fermentation9070644</p> <p>Azbar, N., Çetinkaya, T., Keskin, T., Korkmaz, K., & Syed, H. (2009). Continuous fermentative hydrogen production from cheese whey wastewater under thermophilic anaerobic conditions. <i>International Journal of Hydrogen Energy</i>, 34(17), 7441–7447. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.04.032</p> <p>BioRender. (2024). <i>BioRender (Versión web 2024) [Software en línea]</i>. BioRender. https://biorender.com</p> <p>Bueno de Mesquita, C. P., Wu, D., & Tringe, S. G. (2023). Methyl-Based Methanogenesis: an Ecological and Genomic Review. <i>Microbiology and Molecular Biology Reviews</i>, 87(1), 1–29.</p>
--	---

	<p>https://doi.org/10.1128/membr.00024-22</p> <p>Cabrera, A., Norelvys, A., Diaz, M., Guerra, L., Pais, J. M., & Pereda, I. (2025). Methane production from whey in single-stage and two-stage anaerobic systems. <i>Ingeniería Mecánica</i>, 28(1815–5944).</p> <p>Carrillo-Reyes, J., Buitrón, G., Moreno-Andrade, I., Tapia-Rodríguez, A. C., Palomo-Briones, R., Razo-Flores, E., Aguilar-Juárez, O., Arreola-Vargas, J., Bernet, N., Braga, A. F. M., Braga, L., Castelló, E., Chatellard, L., Etchebehere, C., Fuentes, L., León-Becerril, E., Méndez-Acosta, H. O., Ruiz-Filippi, G., Tapia-Venegas, E., ... Zaiat, M. (2020). Standardized protocol for determination of biohydrogen potential. <i>MethodsX</i>, 7. https://doi.org/10.1016/j.mex.2019.11.027</p> <p>Carrillo-Reyes, J., Celis, L. B., Alatraste-Mondragón, F., & Razo-Flores, E. (2012). Different start-up strategies to enhance biohydrogen production from cheese whey in UASB reactors. <i>International Journal of Hydrogen Energy</i>, 37(7), 5591–5601. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.01.004</p> <p>Casallas-Ojeda, M., Pérez-Esteban, N., Cabeza, I., Cobo, M., Olaya-Rincon, M., Caicedo-Concha, D., & Astals, S. (2024). Understanding the acidification risk of cheese whey anaerobic digestion under psychrophilic and mesophilic conditions. <i>Heliyon</i>, 10(5). https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e26476</p> <p>Cisneros-Pérez, C., Carrillo-Reyes, J., Celis, L. B., Alatraste-Mondragón, F., Etchebehere, C., & Razo-Flores, E. (2015). Inoculum pretreatment promotes differences in hydrogen production performance in EGSB reactors. <i>International Journal of Hydrogen Energy</i>, 40(19), 6329–6339. https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.03.048</p> <p>Davila-Vazquez, G., Alatraste-Mondragón, F., de León-Rodríguez,</p>
--	---

	<p>A., & Razo-Flores, E. (2008). Fermentative hydrogen production in batch experiments using lactose, cheese whey and glucose: Influence of initial substrate concentration and pH. <i>International Journal of Hydrogen Energy</i>, 33(19), 4989–4997. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.06.065</p> <p>Davila-Vazquez, G., Cota-Navarro, C. B., Rosales-Colunga, L. M., de León-Rodríguez, A., & Razo-Flores, E. (2009). Continuous biohydrogen production using cheese whey: Improving the hydrogen production rate. <i>International Journal of Hydrogen Energy</i>, 34(10), 4296–4304. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.02.063</p> <p>Delgado-Macuil, R. J., Perez-Armendariz, B., Cardoso-Ugarte, G. A., Tolibia, S. E. M., & Benítez-Rojas, A. C. (2025). Recent Biotechnological Applications of Whey: Review and Perspectives. <i>Fermentation</i>, 11(4), 1–24. https://doi.org/10.3390/fermentation11040217</p> <p>Deshmukh, N., Rao, P. S., Sharma, H., M. H. , S. K., N. , L. N., & C . T. , M. K. (2024). Waste to nutrition: The evolution of whey, a byproduct to galactooligosaccharides production. <i>Food Chemistry Advances</i>, 4(January), 100642. https://doi.org/10.1016/j.focha.2024.100642</p> <p>Domínguez-Espinosa, M. E., Cruz-Salomón, A., Ramírez de León, J. A., Hernández-Méndez, J. M. E., & Santiago-Martínez, M. G. (2023). Syntrophy between bacteria and archaea enhances methane production in an EGSB bioreactor fed by cheese whey wastewater. <i>Frontiers in Sustainable Food Systems</i>, 7(December), 1–14. https://doi.org/10.3389/fsufs.2023.1244691</p> <p>Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. <i>Analytical Chemistry</i>, 28(3), 350–356.</p>
--	---

	<p>https://doi.org/10.1021/ac60111a017</p> <p>Fancello, F., Zara, G., Hatami, F., Scano, E. A., & Mannazzu, I. (2024). Unlocking the potential of second cheese whey: a comprehensive review on valorisation strategies. In <i>Reviews in Environmental Science and Biotechnology</i> (Vol. 23, Issue 2). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/s11157-024-09687-2</p> <p>Feria, A., De la Cruz, D., Ignacio, C., Perez, H., Torres, J. G., & Pacheco, J. G. (2022). Producción biológica de hidrógeno mediante fermentación oscura. <i>Journal of Basic Sciences</i>, 8(23), 45–56. http://revistas.ujat.mx/index.php/jobs</p> <p>Figueroa-Pires, A., Garcia-Marnotes, N., Díaz-Rubio, O., Cobos-Garcia, A., & Dias-Pereira, C. (2021). Dairy By-Products: A Review on the Valorization of Whey and Second Cheese Whey. <i>Foods</i>, 10, 1067. https://doi.org/10.3390/foods10051067</p> <p>Finn, D. R., Rohe, L., Krause, S., Guliyev, J., Loewen, A., & Tebbe, C. C. (2023). Methanogenesis in biogas reactors under inhibitory ammonia concentration requires community-wide tolerance. <i>Applied Microbiology and Biotechnology</i>, 107(21), 6717–6730. https://doi.org/10.1007/s00253-023-12752-5</p> <p>Fuentes-Santiago, V., Valdez-Vazquez, I., Vital-Jácome, M., Zavala-Méndez, M., Razo-Flores, E., & Carrillo-Reyes, J. (2023). Carbohydrates/acid ratios drives microbial communities and metabolic pathways during biohydrogen production from fermented agro-industrial wastewater. <i>Journal of Environmental Chemical Engineering</i>, 11(3). https://doi.org/10.1016/j.jece.2023.110302</p> <p>Garrido, R., Cabeza, L. F., & Falguera, V. (2023). Lactic Acid Production from Cow Manure: Technoeconomic Evaluation and Sensitivity Analysis. <i>Fermentation</i>, 9(10).</p>
--	---

	<p>https://doi.org/https://doi.org/10.3390/fermentation9100901</p> <p>Harirchi, S., Wainaina, S., Sar, T., Nojourni, S. A., Parchami, M., Parchami, M., Varjani, S., Khanal, S. K., Wong, J., Awasthi, M. K., & Taherzadeh, M. J. (2022). Microbiological insights into anaerobic digestion for biogas, hydrogen or volatile fatty acids (VFAs): a review. <i>Bioengineered</i>, 13(3), 6521–6557. https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2035986</p> <p>Hasan, M. M., Mofijur, M., Uddin, M. N., Kabir, Z., Badruddin, I. A., & Khan, T. M. Y. (2024). Insights into anaerobic digestion of microalgal biomass for enhanced energy recovery. <i>Frontiers in Energy Research</i>, 12(February), 1–16. https://doi.org/10.3389/fenrg.2024.1355686</p> <p>Holliger, C., Alves, M., Andrade, D., Angelidaki, I., Astals, S., Baier, U., Bougrier, C., Buffière, P., Carballa, M., De Wilde, V., Ebertseder, F., Fernández, B., Ficara, E., Fotidis, I., Frigon, J. C., De Lacroix, H. F., Ghasimi, D. S. M., Hack, G., Hartel, M., ... Wierinck, I. (2016). Towards a standardization of biomethane potential tests. <i>Water Science and Technology</i>, 74(11), 2515–2522. https://doi.org/10.2166/wst.2016.336</p> <p>Karakaya, G., & Özmihçi, S. (2025). Influence of Different Substrate and Microorganism Concentrations on Butyric Acid-Derived Biohydrogen Production. <i>Processes</i>, 13(4). https://doi.org/10.3390/pr13041068</p> <p>Lembo, G., Signorini, A., Marone, A., Carbone, C., & Agostini, A. (2022). Hydrogen and Methane Production by Single- and Two-Stage Anaerobic Digestion of Second Cheese Whey: Economic Performances and GHG Emissions Evaluation. <i>Energies</i>, 15(21). https://doi.org/https://doi.org/10.3390/en15217869</p> <p>Leroy-Freitas, D., Muñoz, R., Martínez-Mendoza, L. J., Martínez-Fraile, C., & García-Depraect, O. (2024). Enhancing Biohydrogen Production: The Role of Iron-Based Nanoparticles</p>
--	--

	<p>in Continuous Lactate-Driven Dark Fermentation of Powdered Cheese Whey. <i>Fermentation</i>, 10(6). https://doi.org/10.3390/fermentation10060296</p> <p>Lizárraga-Chaidez, M., Mendoza-Sánchez, M., Abadía- García, L., & García-Pérez, J. (2023). El inocente impacto ambiental del suero de la leche. <i>Epistemus</i>, 18(35), 88–97. https://doi.org/10.36790/epistemus.v18i35.316</p> <p>Lombardi, L., Sahota, S., Poletti, A., Pomi, R., Rossi, A., Zonfa, T., Cema, G., Czerwińska, K., Magdziarz, A., Mikusińska, J., Śliz, M., & Wilk, M. (2024). Valorization of cheese-making residues in biorefineries using different combinations of dark fermentation, hydrothermal carbonization and anaerobic digestion. <i>Energy</i>, 305(January). https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.energy.2024.132327</p> <p>López-Aguilar, H., Barrón, A., Franco, M., Paz, A., & Pérez-Hernández, A. (2021). Modelación de la generación de metano a partir de suero lácteo y excreta de ganado en codigestión anaerobia. <i>Nova Scientia</i>, 13(27), 1–17. https://doi.org/10.21640/ns.v13i27.2791</p> <p>Mainardis, M., Flaibani, S., Trigatti, M., & Goi, D. (2019). Techno-economic feasibility of anaerobic digestion of cheese whey in small Italian dairies and effect of ultrasound pre-treatment on methane yield. <i>Journal of Environmental Management</i>, 246(June), 557–563. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.06.014</p> <p>Martínez-Mendoza, L. J., Lebrero, R., Muñoz, R., & García-Depraect, O. (2022). Influence of key operational parameters on biohydrogen production from fruit and vegetable waste via lactate-driven dark fermentation. <i>Bioresource Technology</i>, 364(October). https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.128070</p> <p>Martinez, V., & Garcia, R. (2010). Fermentación oscura,</p>
--	---

	<p>fotofermentación y biofotólisis: análisis de su aplicación en secuencia para la producción de hidrógeno biológico. <i>DGID Biohidrógeno</i>, 23(10). https://doi.org/https://doi.org/10.3390/catal12111366</p> <p>Mazorra-Manzano, M. A., Robles-Porchas, G. R., González-Velázquez, D. A., Torres-Llanez, M. J., Martínez-Porchas, M., García-Sifuentes, C. O., González-Córdova, A. F., & Vallejo-Córdoba, B. (2020). Cheese whey fermentation by its native microbiota: Proteolysis and bioactive peptides release with ACE-inhibitory activity. <i>Fermentation</i>, 6(1), 1–12. https://doi.org/10.3390/fermentation6010019</p> <p>Montoya-Rosales, J. de J., Ontiveros-Valencia, A., Esquivel-Hernández, D. A., Etchebere, C., Celis, L. B., & Razo-Flores, E. (2023). Metatranscriptomic Analysis Reveals the Coexpression of Hydrogen-Producing and Homoacetogenesis Genes in Dark Fermentative Reactors Operated at High Substrate Loads. <i>Environmental Science and Technology</i>, 57(31), 11552–11560. https://doi.org/10.1021/acs.est.3c02066</p> <p>Montoya-Rosales, J. de J., Palomo-Briones, R., Celis, L. B., Etchebere, C., Cházaro-Ruiz, L. F., Escobar-Barrios, V., & Razo-Flores, E. (2022). Coping with mass transfer constrains in dark fermentation using a two-phase partitioning bioreactor. <i>Chemical Engineering Journal</i>, 445(September 2021), 1–9. https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.136749</p> <p>Ordoñez-Frías, E. J., Muñoz-Páez, K. M., & Buitrón, G. (2024). Biohydrogen production from fermented acidic cheese whey using lactate: Reactor performance and microbial ecology analysis. <i>International Journal of Hydrogen Energy</i>, 52, 389–403. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2023.06.307</p> <p>Osorio-González, C. S., Sandoval-Salas, F., Hernández-Rosas, F., Hidalgo-Contreras, J. V., Gómez-Merino, F. ., & Ávalos de la</p>
--	--

	<p>Cruz, D. A. (2018). Potencial de aprovechamiento del suero de queso en México potential for the use of cheese whey in Mexico. <i>Agro Productividad</i>, 11, 101–106.</p> <p>Ostos, I., Flórez-Pardo, L. M., & Camargo, C. (2024). A metagenomic approach to demystify the anaerobic digestion black box and achieve higher biogas yield: a review. In <i>Frontiers in Microbiology</i> (Vol. 15, Issue October). https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1437098</p> <p>Palomo-Briones, R., Razo-Flores, E., Bernet, N., & Trably, E. (2017). Dark-fermentative biohydrogen pathways and microbial networks in continuous stirred tank reactors: Novel insights on their control. <i>Applied Energy</i>, 198, 77–87. https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2017.04.051</p> <p>Panghal, A., Patidar, R., Jaglan, S., Chhikara, N., Khatkar, S. K., Gat, Y., & Sindhu, N. (2018). Whey valorization: current options and future scenario – a critical review. <i>Nutrition and Food Science</i>, 48(3), 520–535. https://doi.org/10.1108/NFS-01-2018-0017</p> <p>Paz Mireles, C. L., Razo Flores, E., & Cercado Quezada, B. (2016). Efecto de la composición de mezclas de metabolitos procedentes de la fermentación oscura para su uso en la producción de biohidrógeno en celdas de electrólisis microbiana. <i>Repositorio IPICYT</i>.</p> <p>Prazeres, A., Carvalho, F., & Rivas, J. (2012). Cheese whey management: A review. <i>Journal of Environmental Management</i>, 110, 48–68. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.05.018</p> <p>Ramos-Suárez, J. L., Álvarez-Méndez, S. J., Padrón Tejera, E., Ritter, A., & Mata González, J. (2024). Temperature Control Effect on Cheese Whey Anaerobic Digestion with Low-Cost Tubular Digesters. <i>Processes</i>, 12(7).</p>
--	--

	<p>https://doi.org/https://doi.org/10.3390/pr12071452</p> <p>Regueira-Marcos, L., García-Depraect, O., & Muñoz, R. (2023). Elucidating the role of pH and total solids content in the co-production of biohydrogen and carboxylic acids from food waste via lactate-driven dark fermentation. <i>Fuel</i>, 338(December 2022). https://doi.org/10.1016/j.fuel.2022.127238</p> <p>Regueira-Marcos, L., García-Depraect, O., & Muñoz, R. (2024). Continuous two-stage lactate-driven dark fermentation process for enhanced biohydrogen production from food waste. <i>Journal of Water Process Engineering</i>, 67(September). https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2024.106116</p> <p>Rejdlová, A., Lorencová, E., Míšková, Z., & Salek, R. N. (2025). Techno-Functional Properties and Recent Advances in the Manufacturing of Whey Beverages: A Review. <i>Applied Sciences (Switzerland)</i>, 15(4). https://doi.org/10.3390/app15041846</p> <p>Rittman, B. E., & McCarty, P. L. (2020). <i>Environmental Biotechnology. Principles and Applications</i> (McGraw-Hill Education (ed.); Second Edi).</p> <p>Salas-Vargas, C., Brunett-Pérez, L., Espinosa-Ortiz, V. E., & Martínez-García, C. G. (2021). Environmental impact of Oaxaca cheese production and wastewater from artisanal dairies under two scenarios in Aculco, State of Mexico. <i>Journal of Cleaner Production</i>, 311(April). https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.127586</p> <p>Sebastián-Nicolás, J. L., González-Olivares, L. G., Vázquez-Rodríguez, G. A., Lucho-Constantino, C. A., Castañeda-Ovando, A., & Cruz-Guerrero, A. E. (2020). Valorization of whey using a biorefinery. <i>Biofuels, Bioproducts and Biorefining</i>, 14(5), 1010–1027. https://doi.org/10.1002/bbb.2100</p> <p>Secretaría de Economía. (2012). NMX-AA-030/1-SCFI-2012,</p>
--	---

	<p>Análisis De Agua - Medición De La Demanda Química De Oxígeno En Aguas Naturales, Residuales Y Residuales Tratadas. In <i>Diario Oficial de la Federación</i> (Vol. 1, pp. 1–18). http://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/166774/NMX-AA-030-1-SCFI-2012.pdf</p> <p>SIAP. (2023a). Boletín de Leche 2023. <i>Agricultura</i>. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/940825/Bolet_n_de_Leche_2023.pdf</p> <p>SIAP. (2023b). Panorama de la lechería en México. <i>Agricultura</i>. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/940824/Panorama_de_la_lecher_a_en_M_xico_2023.pdf</p> <p>Sun, Y., Zhang, T., Lu, B., Li, X., & Jiang, L. (2023). Application of cofactors in the regulation of microbial metabolism: A state of the art review. <i>Frontiers in Microbiology</i>, 14(April), 1–12. https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1145784</p> <p>Taotao, T., Ying, C., Min, L., Ye, D., & Yichuan, T. (2022). Effect of pH on the performance of hydrogen production by dark fermentation coupled denitrification. <i>Environmental Research</i>, 208. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.112663</p> <p>Toledo-Cervantes, A., Guevara-Santos, N., Arreola-Vargas, J., Snell-Castro, R., & Mendez-Acosta, H. O. (2018). Performance and microbial dynamics in packed-bed reactors during the long-term two-stage anaerobic treatment of tequila vinasses. <i>Biochemical Engineering Journal</i>, 138, 12–20. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.06.020</p> <p>Venetsaneas, N., Antonopoulou, G., Stamatelatou, K., Kornaros, M., & Lyberatos, G. (2009). Using cheese whey for hydrogen and methane generation in a two-stage continuous process with alternative pH controlling approaches. <i>Bioresource Technology</i>, 100(15), 3713–3717.</p>
--	--

	<p>https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.01.025</p> <p>Wang, Y., Chen, X., Spengler, K., Terberger, K., Boehm, M., Appel, J., Barske, T., Timm, S., Battchikova, N., Hagemann, M., & Gutekunst, K. (2022). Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase and low abundant ferredoxins support aerobic photomixotrophic growth in cyanobacteria. <i>ELife</i>, 11, 1–18. https://doi.org/10.7554/ELIFE.71339</p> <p>Wang, Y., Wu, J., Lv, M., Shao, Z., Hungwe, M., Wang, J., Bai, X., Xie, J., Wang, Y., & Geng, W. (2021). Metabolism Characteristics of Lactic Acid Bacteria and the Expanding Applications in Food Industry. <i>Frontiers in Bioengineering and Biotechnology</i>, 9(May), 1–19. https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.612285</p> <p>Yuan, W., Du, Y., Yu, K., Xu, S., Liu, M., Wang, S., Yang, Y., Zhang, Y., & Sun, J. (2022). The Production of Pyruvate in Biological Technology: A Critical Review. <i>Microorganisms</i>, 10(12). https://doi.org/10.3390/microorganisms10122454</p>
--	---

Universidad Juarez Autónoma de Tabasco.



“Donde hacer ciencia, es Básico”