

**DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS CINÉTICOS DE DOS INÓCULOS LÁCTICOS:
Lactobacillus plantarum A6 Y BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS DE YOGURT**

**DETERMINATION OF KINETIC PARAMETERS OF TWO LACTIC INOCULUMS:
Lactobacillus plantarum A6 AND LACTIC ACID BACTERIAS OF YOGURT**

**DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS CINÉTICOS DE DOIS INÓCULOS LÁCTICOS:
Lactobacillus plantarum A6 E BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS DE IOGURTE**

CLAUDIA AGUDELO¹, RODRIGO ORTEGA², JOSÉ LUÍS HOYOS³

PALABRAS CLAVE:

Ácido láctico, Cinética, *Lactobacillus plantarum* A6, *Lactobacillus delbrueckii*, *Streptococcus thermophilus*.

KEY WORDS:

Acid, Kinetic, *Lactobacillus plantarum* A6, *Lactobacillus delbrueckii*, *Streptococcus thermophilus*.

PALAVRAS-CHAVE:

Ácido Láctico, Cinética, *Lactobacillus plantarum* A6 e *Lactobacillus delbrueckii*, *Streptococcus thermophilus*.

RESUMEN

Se realizó la comparación del comportamiento cinético de dos inóculos de Bacterias Ácido Lácticas (BAL) desarrollados a partir de *Lactobacillus plantarum* A6 y de yogurt comercial. Se incubaron a 35°C durante 48 horas y se repicaron tras 24 horas de fermentación en medio líquido para su posible aplicación en la fermentación de residuos pesqueros. Para cada cepa se midió la biomasa mediante conteo en placa según la NTC 5034 de 2002, el consumo de azúcares totales por el método de antrona y la producción de ácido láctico por titulación bajo la NTC 4978 de 2001, durante el tiempo de incubación. Los resultados mostraron un mejor desarrollo para *Lactobacillus plantarum* A6 con diferencias significativas ($\alpha = 0,05$) en los rendimientos Yx/s y Yp/s de 0,401 y 0,34 respectivamente para la primera etapa, y de $Yx/s = 0,39$ y $Yp/s = 0,36$ en la segunda etapa, a diferencia de las BAL del yogurt las cuales presentaron rendimientos menores. Otros parámetros cinéticos como la velocidad máxima de crecimiento y tiempo de duplicación para ambas cepas no presentan diferencias significativas ($\alpha = 0,05$).

ABSTRACT

A comparison was made of the kinetic behavior of two inoculums of lactic acid bacteria (LAB) developed from *Lactobacillus plantarum* A6 and commercial yogurt. They were incubated at 35 °C during 48 hours and were

Recibido para evaluación: 15/10/2010. Aprobado para publicación: 13/11/2010

1 Ingeniera Agroindustrial. Universidad del Cauca.

2 Ingeniero Agroindustrial. Universidad del Cauca.

3 Ingeniero Agroindustrial. Candidato Mg. Ingeniería de Alimentos. Universidad del Cauca.

replicated after 24 hours of fermentation in liquid medium for its possible application in the fermentation of fishing residues. For each strain was measured the biomass through plate count according to the NTC 5034 of 2002, the total sugars consumption by the antrona method and the lactic acid by titulation under the NTC 4978 of 2001 during the incubation time. The results showed a better development for *Lactobacillus plantarum* A6 with meaningful differences ($\alpha = 0,05$) in the performances Yx/s y Yp/s of 0,401 and 0,34 respectively to the first stage, and of $Yx/s = 0,39$ and $Yp/s = 0,36$ in the second stage unlike those of LAB of the yogurt which displayed lower performances. Other kinetic parameters like maximum speed growth and duplication time for both strains do not show meaningful differences ($\alpha = 0,05$).

RESUMO

Foram comparados o comportamento cinético de dois inóculos de Bactérias de Ácido Lático (BAL) desenvolvido a partir de *Lactobacillus plantarum* A6 e de iogurte comercial. Incubados a 35 ° C por 48 horas e se repicaram após de 24 horas de fermentação em meio líquido, para possível aplicação na fermentação de resíduos de peixe. Para cada amostra se mediu a biomassa mediante contagem em placa acordo com a NTC 5034 de 2002, o consumo de açúcares totais pelo método de antrona e na produção de ácido láctico por titulação sob o NTC 4978 de 2001, durante o tempo de incubação. Os resultados mostraram um melhor desenvolvimento de *Lactobacillus plantarum* A6 com diferenças significativas ($\alpha = 0,05$) nos rendimentos Yx / s , Yp / s de 0,401 e 0,34 respectivamente para a primeira fase, e $Yx / s = 0,39$ e $Yp / s = 0,36$ na segunda etapa, em contraste com as BAL do iogurte, que tiveram rendimentos inferiores. Outros parâmetros cinéticos como a velocidade máxima de crescimento e tempo de duplicação para as duas cepas não apresentaram diferenças significativas ($\alpha = 0,05$).

INTRODUCCIÓN

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son un importante grupo de microorganismos gram positivos los cuales producen ácido láctico como el principal producto metabólico a partir de carbohidratos a través del proceso de fermentación [1].

En las fermentaciones lácticas, los cultivos de BAL son comúnmente usados en las industrias como iniciadores para la producción de gran variedad de alimentos fermentados [2]. Un ejemplo de ello es el sector de la pesca, en donde las BAL son utilizadas para la producción de ensilado de pescado mediante la bioconversión de los residuos pesqueros, siendo esta una ruta que ofrece numerosas ventajas como método de preservación, permitiendo la recuperación del valor agregado de subproductos tales como, quitina, proteínas y pigmentos los cuales tienen un extenso mercado [3].

Dentro de los estudios alrededor del tema, se encuentran desarrollos de ensilajes de pescado que utilizan bacterias lácticas propias de la materia prima. Así mismo se ha utilizado el *Lactobacillus plantarum*, una bacteria ácido láctica, amilolítica, facultativa y heterofermentativa, [4] para llevar a cabo este tipo de

procesos fermentativos. De igual forma ha sido evaluada la inoculación de ensilajes con las bacterias lácticas del yogurt [*Lactobacillus delbrueckii*, y *Streptococcus thermophilus* [5], las cuales constituyen una buena alternativa como fermento o inóculo debido a la simbiosis que ambos microorganismos presentan.

No obstante la eficiencia del proceso de producción y la posible aplicación en estas fermentaciones están sujetas al conocimiento de la cinética de crecimiento de las cepas utilizadas. Por tanto el objetivo de esta investigación fue evaluar los parámetros cinéticos de crecimiento tanto de *Lactobacillus plantarum* A6 como de las BAL del yogurt, adicionadas a un medio líquido de cultivo, determinando la capacidad de ambas cepas para llevar a cabo el proceso fermentativo.

MATERIALES Y MÉTODO

Cepas de bacterias ácido lácticas

Los microorganismos de trabajo usados fueron *L. plantarum* A6 (proporcionado por Cristina Ramírez Ph.D. Grupo de investigación GIPAB de la escuela de Ingeniería de Alimentos de la Universidad del Valle

Grupo de investigación en Microbiología y Biotecnología Aplicada – MIBIA –, del Dpto. de Biología, Sección Biología Marina) y las BAL del yogurt fueron aisladas de un yogurt comercial.

Activación de cepas

Ambas cepas fueron activadas previamente en agar MRS, realizando verificación con azul de anilina y luego repicadas en un medio de cultivo líquido alternativo [6], e incubadas a 35°C durante 48 horas (primera siembra) de fermentación en una incubadora E&Q serie IDEN-6V. Tras este tiempo se realizó una segunda siembra por 24 horas de fermentación bajo las mismas condiciones de incubación. La realización del segundo repique a partir del primer inóculo para las dos cepas tuvo por objetivo evaluar el escalamiento del proceso, además de obtener un inóculo joven en fase exponencial para ser adicionado posteriormente a los ensilajes de pescado y obtener de esta forma una fermentación más rápida en un tiempo menor.

Métodos analíticos

Durante el tiempo de fermentación fueron medidas las variables de crecimiento de biomasa mediante conteo en placa según la NTC 5034 de 2002, el consumo de sustrato se evaluó mediante la determinación de azúcares totales por el método de Antrona a 625nm, en un espectrofotómetro SHIMADZU UV-1800, y la producción de ácido láctico mediante la determinación de acidez titulable bajo la NTC 4978 de 2001.

Análisis estadístico

Se empleó un diseño completamente al azar, con dos tratamientos y dos réplicas.

RESULTADOS

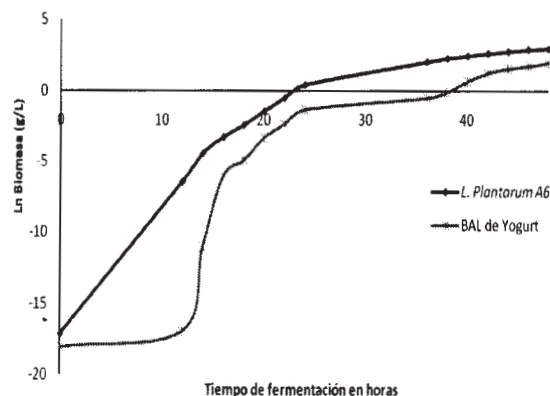
Primera siembra *L. plantarum A6*

Los resultados mostraron diferencias significativas ($\alpha=0,05$) entre los tratamientos de la primera siembra, siendo más influyente la cepa de *L. plantarum A6*, la cual tuvo un mejor desarrollo en el medio en cuanto a parámetros de crecimiento (19,6 g/L de biomasa), consumo de sustrato (97,6%) y generación de ácido láctico (18 g/L) en comparación con las bacterias lácticas del

yogurt. Aunque *L. plantarum A6* es una bacteria heterofermentativa, a diferencia de las bacterias del yogurt que presentan un comportamiento homofermentativo, esta bacteria tiene una gran capacidad biosintética y una perfecta adaptación en medios abundantes en nutrientes y fuentes energéticas [7], gracias al tamaño de su genoma, el cual es 50% más grande que la mayoría de bacterias ácido lácticas presentando una gran capacidad metabólica [8] razón por la cual puede tener rendimientos mayores.

En la figura 1, se puede observar que el crecimiento de *L. plantarum A6* describe dos fases. Una primera fase que va desde las 0 horas hasta las 24 horas de fermentación correspondiente a la fase exponencial en donde las células se reproducen sin limitación de sustancias nutritivas a velocidad máxima [9], seguida de una fase estacionaria hasta las 48 horas en donde no se diferencia un aumento significativo en la densidad celular. En la gráfica no es posible observar una fase clara de adaptación del microorganismo al medio, sin embargo es probable que sea una fase corta producida en las primeras horas de fermentación debido a la capacidad de *L. plantarum A6* de establecerse y crecer rápidamente. Algunos autores reportan que a concentraciones bajas de lactosa en el medio (20g/L), las células presentan una fase corta de adaptación, mientras que a concentraciones altas de lactosa (60g/L), la fase de adaptación incrementa en 5 horas. A una concentración de 50g/L de sustrato, valor que concuerda con la cantidad inicial obtenida en esta investigación, se muestra como resultado una fase de adaptación entre las segunda y tercer hora de fermentación [10]. De igual forma la cantidad de inóculo del 10% utilizada en esta investigación reduce el tiempo de latencia [11].

Figura 1. Curva de crecimiento de las bacterias lácticas para la primera siembra



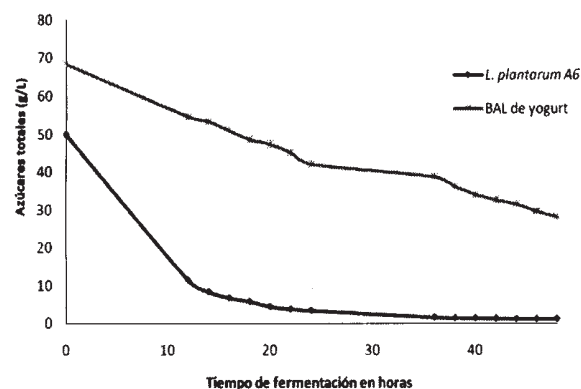
La velocidad específica de crecimiento (μ) para la fase exponencial fue de $0,53 \text{ h}^{-1}$. Esta velocidad depende de la concentración de nutrientes, así a altas concentraciones la velocidad específica alcanza valores máximos fijados por la cinética intrínseca de las reacciones intracelulares, las cuales están relacionadas en la transcripción y traducción del DNA [12]. Por su parte *L. plantarum* es un microorganismo que bajo óptimas condiciones de crecimiento puede llegar a tener una velocidad máxima específica de crecimiento mayor a $0,5 \text{ h}^{-1}$ [10], dependiendo de variables como la temperatura, pH, y de la concentración del sustrato y del producto.

Con la curva de crecimiento también se logró determinar el tiempo de duplicación para *L. plantarum A6* el cual fue de 1,28 h lo cual indica que es el tiempo necesario para que la población doble su tamaño. Para esta misma cepa se ha encontrado un tiempo de generación de 1,1 h en un medio con almidón [13], mientras que otros autores han encontrado un tiempo de duplicación de 1,98 horas [14].

En cuanto al consumo del sustrato, en la figura 2, se esquematiza el agotamiento sucesivo de la fuente de carbono durante el transcurso de la fermentación para las dos cepas. Cabe destacar que *L. plantarum* permite el empleo de una gran cantidad de fuentes de carbono, propiedad que resulta de un buen número de genes involucrados en el transporte y utilización del azúcar, y un versátil metabolismo del piruvato, el cual tiene el potencial de producir D y L-lactato, formato, acetato, etanol, acetoina, y 2,3-Butanodiol [15].

Se puede observar que en las primeras 12 horas, las bacterias de *L. plantarum A6* consumieron alrededor

Figura 2. Consumo de azúcares totales (g/L) de las bacterias lácticas para la primera siembra



del 77% de los azúcares totales disponibles, y a las 36 horas donde se finaliza la fase exponencial queda solo el 3,2% de azúcar total. Sin embargo cabe destacar que *L. plantarum A6*, una vez agotada la fuente energética, es capaz de aprovechar otros nutrientes como proteínas y grasas presentes en el medio [16], por lo que se recomienda que la fermentación no sea prolongada más allá de las 48 horas en donde se ha agotado prácticamente todo el sustrato.

El rendimiento de biomasa versus sustrato $Y_{x/s}$ para *L. plantarum A6* en la primera siembra, fue de 0,401, lo cual indica una buena eficiencia del nutriente para soportar biosíntesis al ser comparada con rendimientos obtenidos por otros investigadores quienes reportan un rendimiento de biomasa respecto a glucosa de 0,143 para *L. plantarum* en medio MRS tras 48 horas de fermentación [7].

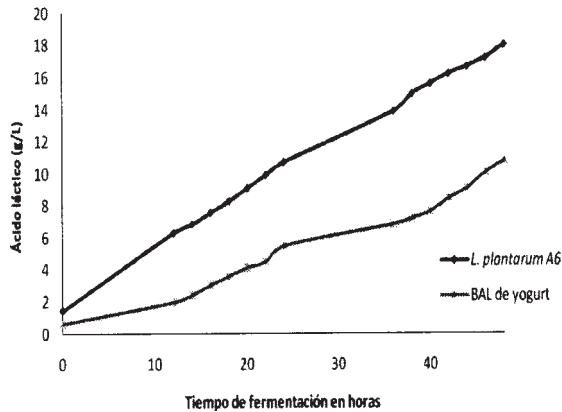
Sin embargo cabe destacar que no todas las cepas de *L. plantarum* presentan la misma capacidad, en especial *L. plantarum A6*, se caracteriza por una mayor habilidad dentro de su categoría para convertir más rápidamente la fuente de carbono en lactato [17]. Se encuentran reportes de rendimientos de biomasa versus glucosa de 0,21 para *L. plantarum A6* en caldo MRS [14]. Sin embargo otros estudios reportan un rendimiento de 0,49 para *L. plantarum* en un medio con almidón de yuca [18]. Este rendimiento depende de igual forma del tipo de sustrato utilizado como se reportó anteriormente. Con relación a la lactosa, los rendimientos de $Y_{x/s}$ varían desde 0,27 hasta 0,45 dependiendo del pH [10].

En La Figura 3, se muestra la producción de ácido láctico durante el proceso fermentativo para ambas cepas.

Según los datos experimentales obtenidos, durante las primeras doce horas se produce el 35% de la cantidad total de ácido láctico, después de este tiempo la producción se ve afectada por el crecimiento del microorganismo y el bajo consumo del sustrato, logrando estabilizarse a las 48 horas de fermentación con una producción total de (18 g/L).

Bajo estos resultados se obtiene un rendimiento de producto versus sustrato $Y_{p/s}$ para *L. plantarum A6* en la primera siembra de 0,34. Este rendimiento es menor al reportado por algunos autores [7, 10, 14], quienes obtuvieron valores entre 0,7 y 0,9. Sin embargo cabe destacar que este parámetro está sujeto a factores

Figura 3. Producción de ácido láctico (g/L) de las bacterias lácticas para la primera siembra



importantes como la temperatura y pH óptimos, los cuales influyen en las características de crecimiento del microorganismo e inciden notablemente en la velocidad y rendimientos asociados [19]. En este caso, la temperatura de trabajo fue de 35°C, mientras que el pH fue cambiando a lo largo del tiempo de fermentación comenzando con un valor de 6,25 en la hora 0 y finalizando en 4,05 a las 48 horas. Estas condiciones de trabajo probablemente afectaron el desarrollo del microorganismo, ya que los valores se encuentran por debajo de los óptimos reportados en algunas investigaciones las cuales establecen una temperatura óptima de 37°C y un pH óptimo entre 6 y 7 para *L. plantarum* [20]. Por tanto bajo las condiciones del ensayo el metabolismo celular tiende a volverse más lento.

Otras variables secundarias que pueden afectar los rendimientos son la inhibición del microorganismo por producto o por la limitación de nutrientes. No obstante cabe destacar que *L. plantarum A6* es bacteria láctica capaz de mantener el gradiente de pH entre el interior y el exterior de la célula en presencia de grandes cantidades de lactato, por lo que puede soportar medios acidificados y terminar completamente su proceso de fermentación [13, 16].

Un factor importante a tener en cuenta dentro del Yp/s es que cuando las bacterias crecen sobre, lactato, piruvato, acetato u otro compuesto, se desarrollan rutas adicionales o rutas anapleróticas para mantener funcionando el ciclo de los ácidos tricarbónicos y proveer moléculas intermediarias para la síntesis de los azúcares [21], por lo cual es probable que *L. plantarum A6* haya utilizado el ácido láctico para convertirlo en

piruvato y consecuentemente como fuente energética para su desarrollo, reduciendo de esta forma la cantidad de producto generado.

Este rendimiento también pudo verse afectado ya que la especie *L. plantarum*, no solo utiliza el carbono disponible para producir ácido láctico, sino también en la generación de otros productos importantes tales como metabolitos, exopolisacáridos, enzimas y bacteriocinas [8], las cuales inhiben la presencia de bacterias, entre ellas las gran negativas y microorganismos patógenos.

Primera siembra BAL del yogurt

Los resultados del proceso fermentativo para las BAL del yogurt, registraron un crecimiento de bacterias lácticas de 7,22 g/L, un consumo de azúcares totales al final de las 48 horas de fermentación del 58,5% y una generación de ácido láctico de 10,08g/L.

En la figura 1, se observa que el crecimiento de BAL, describe tres fases. Una primera fase de adaptación en las primeras doce horas de fermentación, en la cual estos microorganismos, adaptan su metabolismo a las nuevas condiciones ambientales (abundancia de nutrientes y condiciones de cultivo), para iniciar la fase exponencial que va desde las 12 horas hasta las 36 horas de fermentación, en la cual las BAL, consumen a velocidad máxima los nutrientes del medio, y una fase final estacionaria de las 36 a 48 horas, en donde no se ve un aumento significativo de bacterias ni de consumo de nutrientes.

De la curva de crecimiento se encontró la velocidad específica de crecimiento obteniendo un resultado 0,579 h⁻¹. Esta velocidad muestra un valor menor a las reportadas en otras investigaciones en donde se alcanza una velocidad específica de crecimiento de 1 h⁻¹, bajo procesos de fermentación en batch en continuo y con bacterias inmovilizadas [22]. Otros estudios reportan para *L. delbrueckii*, una velocidad específica de crecimiento de 1,14 h⁻¹ [23], mientras que para *S. thermophilus*, se ha encontrado una velocidad de 0.83h⁻¹ [24].

En cuanto al consumo de sustrato en la figura 2, se observa una disminución de los azúcares totales durante el tiempo de fermentación. En las primeras doce horas de fermentación los microorganismos consumieron el 20% de la fuente energética disponible. Ya en la fase exponencial las BAL del yogurt, aprovecharon alrededor

del 43% de los azúcares totales y al finalizar el proceso fermentativo hubo un consumo total de 58,53%. Cabe destacar que la mayor parte del consumo del sustrato está dirigido al crecimiento celular consecuentemente con la producción de ácido láctico, sin embargo tanto *S. thermophilus* como *L. delbrueckii*, utilizan la fuente de carbono para sintetizar otro tipo de productos como exopolisacáridos durante la fase estacionaria y de crecimiento, los cuales contribuyen a la viscosidad, textura y propiedades reológicas deseables de la leche fermentada [25,26]. Otro producto asociado al crecimiento celular es la generación de enzimas, específicamente las BAL del yogurt producen altas cantidades B-galactosidasas las cuales hidrolizan la lactosa [27]. También está asociado a *S. thermophilus*, la producción de ciertas bacteriocinas las cuales inactivan microorganismos patógenos tales como *Clostridium sporogenes*, *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus* y *Listeria monocytogenes* [28].

El rendimiento de biomasa respecto a sustrato Yx/s para este caso fue de 0,179 este rendimiento obtenido es muy cercano a los reportados por algunos autores quienes obtuvieron en siete experimentos rendimientos desde 0,061 hasta 0,164 bajo temperaturas y caudales de alimentación, diferentes [22]. Aunque cabe destacar, que estos rendimientos dependen de las condiciones del proceso las cuales pueden variar a lo largo de la fermentación. Dentro de estos valores se engloba el uso de sustrato que no está directamente asociado a la producción de biomasa, por tanto la variación total de la concentración del sustrato será debida a la asimilación de la fuente como material celular, la provisión de energía para la síntesis celular y la provisión de energía para el mantenimiento del cultivo [29].

En cuanto a la generación de producto, el ácido láctico al final del proceso fermentativo fue del 1%, valor que se encuentra dentro de los requisitos para productos fermentados establecidos por la Norma Técnica Andina PNA 16 007:2007 la cual estipula un porcentaje de acidez mínimo para bebidas lácteas de 0,6% y máximo de 1,5 %. Sin embargo bajo las condiciones de consumo de fuente de carbono obtenidas en esta investigación se esperaba obtener un mayor porcentaje de ácido láctico, debido a que ambas cepas *S. thermophilus* y *L. delbrueckii*, son bacterias del tipo homofermentativas. No obstante los 40g/L de carbono consumido generaron únicamente 10g/L de ácido láctico. Lo cual se puede explicar debido a la generación de otro tipo de productos

por parte de *S. thermophilus*, tales como ácido fórmico y dióxido de carbono, los cuales estimulan posteriormente a *L. delbrueckii*, al que se le asocia de igual forma la producción de acetaldehído [30].

Bajo estos resultados se obtuvo un rendimiento de producto versus sustrato Yp/s de 0,25. Este valor resultó significativamente menor al obtenido por otro autor quien a diferencia del presente estudio, mantuvo el pH del medio constante a lo largo del experimento en un valor próximo al óptimo para el desarrollo de las cepas [31], probablemente la inhibición causada por la disminución del pH, que ocurre durante el proceso fermentativo explique en parte las diferencias encontradas. Aunque cabe destacar que otro factor que posiblemente pudo haber influenciado fue la temperatura de 35°C a la cual se llevó a cabo el proceso, debido a que es un valor menor al óptimo. *Lactobacillus bulgáricus* se desarrolla óptimamente entre 45 y 50°C acidificando fuertemente el medio, y puede llegar a formar hasta un 2,7% de ácido láctico, mientras que *S. thermophilus* se multiplica bien entre 37 y 40°C y es una especie menos acidificante que la anterior [8]. Es claro que estos valores dependen también de factores tales como, las condiciones del medio de cultivo, y el método llevado a cabo para realizar el proceso fermentativo pudiendo obtener de esta forma rendimientos mayores.

Segunda siembra para *L. plantarum* A6 y BAL del yogurt

Los resultados mostraron en general para *L. plantarum* A6 y para las BAL de yogurt en la segunda siembra, que las células ya se han adaptado a las nuevas condiciones de crecimiento, alterando el medio constantemente, tomando los sustratos y excretando los productos metabolizados.

Al comparar los resultados obtenidos con la primera siembra, se observan diferencias significativas ($\alpha=0,05$) en ambos casos logrando un mayor crecimiento celular, un mayor consumo de sustrato, y una mayor producción de ácido láctico en menor tiempo de fermentación (24 horas) en comparación con la primera siembra. Los parámetros obtenidos para la cepa de *L. plantarum* fueron de Yx/s de 0,39; Yp/s de 0,36, y una velocidad específica de crecimiento de 0,39. Mientras que para las BAL de yogurt se obtuvo un Yx/s de 0,172, un Yp/s de 0,28 y una velocidad específica de crecimiento de 0,48 h⁻¹.

En Las figuras 4, 5 y 6 se puede observar que *L. plantarum* A6 presenta un mayor desarrollo cinético en el medio en comparación con las BAL del yogurt, sin

Figura 4. Curva de crecimiento de las bacterias lácticas para la segunda siembra

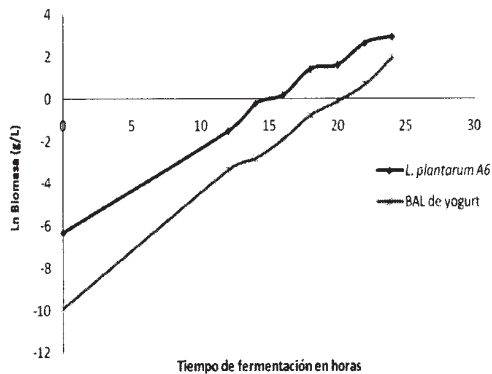


Figura 5. Consumo de azúcares totales (g/L) de las bacterias lácticas para la segunda siembra.

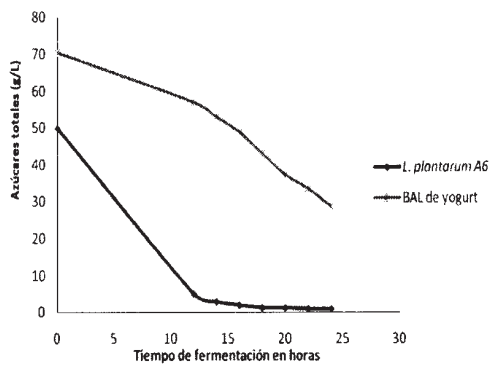
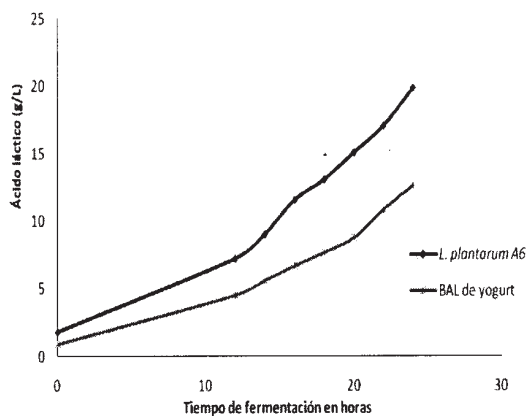


Figura 6. Producción de ácido láctico (g/L) de las bacterias lácticas para la segunda siembra



embargo ambas cepas pueden ser consideradas viables para el proceso de fermentación de vísceras y residuos.

CONCLUSIONES

Ambas cepas mostraron un buen desarrollo en el medio en cuanto a parámetros de crecimiento celular, consumo de azúcares y producción de ácido láctico. Sin embargo *Lactobacillus plantarum* A6 presentó mayor capacidad metabólica y de adaptación al medio, lo cual le permite obtener rendimientos mayores. Las BAL del yogurt por su parte son una buena alternativa en el proceso de fermentación, si se requiere de un inóculo de fácil acceso para el piscicultor.

REFERENCIAS

- [1] REDDY, Gopal, et al. Amylolytic bacterial lactic acid fermentation. A review. Science Direct. Biotechnol Adv. 2007; 26: 22–34.
- [2] YANG, S.Y, et al. Lactic acid fermentation of food waste for swine feed. Science Direct. Bioresource technol. 2005; 97: 1858–1864.
- [3] CIRA, Luis A, et al. Pilot scale lactic acid fermentation of shrimp wastes for chitin recovery. Science Direct. Process Biochem. 2001; 37: 1359-1366.
- [4] PINTADO, José. RAIMBAULT, Maurice y GUYOT, Jean-Pierre. Influence of polysaccharides on oxygen dependent lactate utilization by an amylolytic lactobacillus plantarum strain. Science direct. Int J Food Microbiol. 2004; 98: 81– 88.
- [5] FARNWORTH, E.R, et al. Growth of probiotic bacteria and bifidobacteria in a soy yogurt formulation. Science Direct. Int J Food Microbiol. 2006; 116: 174-181
- [6] RAMÍREZ T, Cristina. Manual de metodología para el seguimiento de los procesos de fermentación. Cali, Colombia. 2008. 21 p.
- [7] GEORGIEVA et al. Growth parameters of probiotic strain Lactobacillus plantarum, isolated from traditional white cheese. Biotechnol. & Biotechnol. Special edition/on-line. EQ. 23/2009/SE.
- [8] VÁZQUEZ AGUILAR, María Miriam. Viabilidad y propiedades fisicoquímicas de leche fermentada probiótica. [Tesis de grado para optar por el título Maestra en Ciencia de Alimentos]. [Puebla, México]. Escuela de Ingeniería y Ciencias. De-

- partamento de Ingeniería Química y Alimentos. Universidad de las Américas de Puebla. 2008.
- [9] FLORES NOCEDAL, Mónica. Elaboración de cultivos microbianos a partir de pasta de coco y su utilización para borregos en engorda. [Tesis de grado para optar por el título Maestra en Ciencias pecuarias]. [Tecomán, Col. México]. Universidad de Colima. Postgrado interinstitucional de ciencias pecuarias. 2000.
- [10] FU, Wenge y MATHEWS, A.P. Lactic acid production from lactose by *Lactobacillus plantarum*: Kinetic model and effects of pH, substrate, and oxygen. *Science Direct. Biochem Eng J.* 1999; 3: 163- 170.
- [11] SOTO, P. Jahn, E. y ARREDONDO, S. Población y fertilización nitrogenada en un híbrido de maíz para ensilaje en el valle central regado. En: Universidad EAFIT. Biblioteca digital. Microorganismos Rumiales. [Internet]. 2006 [Consultado: 15 de Enero de 2010]. Disponible en: <http://bdigital.eafit.edu.co/bdigital/PROYECTO/P660.6CDD949/marcoTeorico.pdf>
- [12] OROZCO MURILLO, Maria Patricia y SOLARTE, Juan Andrés. Búsqueda del mejor medio de cultivo y modelamiento cinético para la obtención del ácido láctico a partir de glucosa por vía fermentativa. [Trabajo de grado para optar al título de Ingeniero químico]. [Manizales, Colombia]. Universidad Nacional de Colombia. Sede Manizales. Facultad de Ingeniería y Arquitectura. Ingeniería Química. 2003.
- [13] GIRAUD, Eric. CHAMPALIER, Alan, y RAIMBAULT, Maurice. Degradation the raw starch by a wild amylolytic strain of *Lactobacillus plantarum*. *Appl Environ Microb.* 1994; 60 [12]: 4319-4323.
- [14] RAO et al. Kinetic growth parameters of different amylolytic and non-amylolytic *Lactobacillus* strains under various salt and pH conditions. *Science Direct. Bioresource Technol.* 2004; 94: 331–337.
- [15] DELLAGLIO et al. Characterization of Starter Cultures. Tamime, A. Y. 2005. Probiotic Dairy Products. En: Vázquez Aguilar, María Miriam. Viabilidad y propiedades fisicoquímicas de leche fermentada probiótica. [Tesis de grado para optar por el título Maestra en Ciencia de Alimentos]. [Puebla, México]. Escuela de Ingeniería y Ciencias. Departamento de Ingeniería Química y Alimentos. Universidad de las Américas de Puebla. 2008.
- [16] SAMANIEGO FERNÁNDEZ, Luz María y Sosa del Castillo, Maryla. *Lactobacillus* spp.: Importantes promotores de actividad probiótica, antimicrobiana y bioconservadora. Editorial Universitaria del Ministerio de Educación Superior de la República de Cuba. Universidad de Matanzas Camilo Cienfuegos. Centro de Estudios Biotecnológicos, Facultad de Agronomía. Ciudad de Matanzas, Cuba. 2000.
- [17] GIRAUD, Eric y CUNY, Gerard. Molecular characterization of the α -amylase genes of *Lactobacillus plantarum* A6 and *Lactobacillus amylovorus* reveals an unusual 3^{3/4} end structure with direct tandem repeats and suggests a common evolutionary origin. *Science Direct. Gene.* 1997; 198 : 149–157.
- [18] ETOA, Francois. DJOULDE, Roger y ESSIA, Jean. Growth and α -amylase production by strains of *Lactobacillus plantarum* and *Rhizopus oryzae* cultures in cassava starch medium. *Cafobios. J Exp Biol.* 2005; 01 [02]: xx-xx.
- [19] ADAMBERG et al. The effect of temperature and pH on the growth of lactic acid bacteria: a pH-auxostat study. *Science Direct. Int J Food Microbiol.* 2003; 85: 171– 183.
- [20] HERNÁNDEZ, S. Caracterización y evaluación físico-biológica de soportes inertes para fermentación sólida. En: Flores Nocedal, Mónica. Elaboración de cultivos microbianos a partir de pasta de coco y su utilización para borregos en engorda. [Tesis de grado para optar por el título Maestra en Ciencias pecuarias]. [Tecomán, Col, México]. Universidad de Colima. Postgrado interinstitucional de ciencias pecuarias. 2000.
- [21] CARILLO, Leonor. Microbiología Agrícola. Capítulo 3. Actividad microbiana. [Internet]. 2003 [Consultado : 25 de Noviembre de 2009]. Disponible en: [http:// www.librospdf.net/Microbiologia-agricola-Leonor-Carrillo-2003/1/](http://www.librospdf.net/Microbiologia-agricola-Leonor-Carrillo-2003/1/)
- [22] PAULETTI et al. Fabricación de yogurt con bacterias inmovilizadas. *Revista Ciencia y Tecnología de los Alimentos.* 2004; 4 [3]: 190-196.
- [23] BURGOS et al. Kinetics study of the conversion of different substrates to lactic acid using *Lactobacillus bulgaricus*. En: Pauletti et al. Fabricación de yogurt con bacterias inmovilizadas. *Revista Ciencia y Tecnología de los Alimentos.* 2004; 4 [3]: 190-196.
- [24] MONTEAGUDO et al. Kinetics of lactic acid fermentation by *Lactobacillus delbreckii* grown on beet molasses. *J Chem Technol Biot.* 1997; 68: 71- 276.

- [25] FERNÁNDEZ DELGADILLO, Sergio Salvador. Acumulación "in vitro" de exopolisacáridos por una cepa nativa de *Enterobacter cloacae*. Efectos de factores ambientales y nutricionales. [Tesis de grado para optar al título de Doctor en Ciencias Biológicas]. [Monterrey, México]. Universidad Autónoma de Nuevo León, Pedro de Alba S/N.2004.
- [26] DELORME, Christine. Safety assessment of dairy microorganisms: *Streptococcus thermophilus*. Science Direct. Int J Food Microbiol. 2008; 126: 274–277.
- [27] TARIK, Canan. USTOK, Fatma y HARSA, Sebnem. Optimization of the associative growth of novel yoghurt cultures in the production of biomass, b-galactosidase and lactic acid using response surface methodology. Science Direct. Int Dairy J. 2009; 19: 236–243.
- [28] GILBRETH and SOMKUTI. Thermophilin 110: a bacteriocin of *Streptococcus thermophilus* En: Delorme, Christine. Safety assessment of dairy microorganisms: *Streptococcus thermophilus*. Science Direct. Int J Food Microbiol. 2008; 126: 274–277.
- [29] TRONCONI, Gilmar. Microorganismos en la producción de alimentos. Revista industria y alimentos Internacional. 2009; 12 [45].
- [30] MANTELLO, Sergio. Materias Primas: Yogurt: Siembra del fermento. [Internet]. 2000 [Consultado: 12 de Diciembre de 2009] Disponible en: <http://www.mundohelado.com/materiasprimas/yogurt/yogurt05.htm>
- [31] BIBAL et al. Influence of pH lactose and lactic acid on the growth of *Streptococcus memons*: a kinetic study. Appl Microbiol Biotechnol. 1988; 18: 340-344.