

CRECIMIENTO DE *Lactobacillus casei ssp casei* ATCC 393 EN SUERO CLARIFICADO

GROWTH OF *Lactobacillus casei ssp casei* ATCC 393 IN CLAFIIED WHEY

CRESCIMENTO *Lactobacillus casei ssp casei* ATCC 393 EM SORO CLARIFICADO

JOHN ALEXANDER VELASQUEZ-TELLEZ^{1*}, GERMAN GIRALDO-GIRALDO²,
LEONARDO PADILLA-SANABRIA³, YULA MERCEDES GIRALDO-CASTAÑO⁴.

RESUMEN

En este trabajo se evaluó el efecto del pH y la temperatura sobre el crecimiento de Lactobacillus casei ssp casei ATCC 393, cultivado en suero de leche clarificado en fermentación por lotes. Se observó el efecto de los factores sobre la velocidad específica de crecimiento y la producción de biomasa, utilizando para cada parámetro evaluado la metodología de superficie de respuesta, empleando un diseño central compuesto rotable 2². Los resultados obtenidos del modelo para maximizar la velocidad de crecimiento específica a 0,061h⁻¹ el proceso debe ser realizado a pH cercano de 7,1 y temperatura de 36,9°C, y para maximizar la producción de biomasa a 11,58 g/L debe realizarse a pH de 7,0 y temperatura de 35,7°C, estos resultados ratifican el efecto del pH y la temperatura sobre el crecimiento de Lactobacillus casei.

Recibido para evaluación: 24 de Agosto de 2012. **Aprobado para publicación:** 17 de Abril de 2015.

- 1 Universidad del Quindío, Grupo de Investigación Agroindustria de Frutas Tropicales. Profesional Químico. Armenia, Colombia.
- 2 Universidad del Quindío, Facultad de Ciencias Agroindustriales, Licenciatura en Educación, Área Mayor Química. Ph.D. Ciencia y Tecnología de Alimentos. Armenia, Colombia.
- 3 Universidad del Quindío, Grupo de Investigación Agroindustria de Frutas Tropicales. Bacteriólogo, MSc. Ciencias Biomédicas. Armenia, Colombia.
- 4 Universidad del Quindío, Grupo de Investigación Agroindustria de Frutas Tropicales. Profesional Químico. Armenia, Colombia.

Correspondencia: johnalexvelasquez@gmail.com

ABSTRACT

This study evaluated the effect of pH and temperature on the growth of Lactobacillus casei ssp casei ATCC 393, grown in clarified whey in fermentation batch. It was observe factors effect on specific growth rate and biomass production, for each parameter evaluated using the response surface methodology, using also a central composite rotatable design 2². The results of the model for the specific growth rate to maximize to 0,061 h⁻¹ specifies the process to be performer at pH near 7,1 and a temperature of 36,9°C and maximize biomass production 11,58 g/L must be at pH 7,0 and temperature of 35,7°C, these results confirm the effect of pH and temperature on the growth of Lactobacillus casei

RESUMO

Neste trabalho avaliou-se o efeito do pH e a temperatura no crescimento de Lactobacillus casei ssp casei ATCC 393, numa cultura em soro de leite clarificado em fermentação por lotes. Observaram-se o efeito dos fatores sobre a velocidade específica de crescimento e a produção de biomassa, usando para cada parâmetro avaliado a metodologia de superfície de resposta num modelo rotativo central composto 2². Os resultados obtidos para maximizar a velocidade de crescimento específica a 0,061h⁻¹ sugerem que deve ser realizado um pH perto de 7,1 e uma temperatura de 36,9°C e para maximizar a produção de biomassa a 11,58 g/L deve realizar-se a um pH de 7,0 e uma temperatura de 35,7°C. Estes resultados ratificam o efeito do pH e a temperatura sobre o crescimento de Lactobacillus casei.

INTRODUCCIÓN

Entre los *Lactobacillus*, las especies de *L. acidophilus* y *L. casei* son usados frecuentemente como probióticos, estos son considerados microorganismos autóctonos y asociados con el anfitrión humano [1]. Los *Lactobacillus casei* son un tipo de bacteria probiótica muy eficaz para equilibrar la microflora intestinal, prevenir los trastornos intestinales, regular el sistema inmune específicamente de la respuesta inmune celular y además posee una potente acción antidiarreica [2]. Industrialmente, *L. casei* tiene aplicaciones como probióticos en humanos, como cultivo iniciador ácido-productor para fermentaciones de leche y especialmente como cultivos para la intensificación y aceleración de desarrollo de sabores en ciertas variedades de quesos madurados con bacterias [3].

La manufactura industrial de queso produce grandes cantidades de suero de leche, que contiene principalmente lactosa (4,5%), proteínas (0,6%) y sales (0,7%) [4], el suero representa el mayor problema de contaminación en los países que dependen de la economía lechera y es normalmente usado como alimento para animales [5], posee una alta demanda química de oxígeno (valores entre 40000 and 60000 mg O₂/L), y debido a esta razón, no puede ser desechado sin antes realizársele un tratamiento previo [6]. Actualmente, para disminuir su efecto contaminante se realizan dife-

PALABRAS CLAVE:

Fermentación en lotes, Velocidad específica de crecimiento, Biomasa, Metodología de superficie de respuesta.

KEY WORDS:

Fermentation for batch, Specific speed of growth, Biomass, Response surface methodology.

PALAVRAS-CHAVE:

Fermentação em lotes, Velocidade específica de crescimento, Biomassa, Metodologia de superfície de resposta.

rentes procesos de transformación, entre los que se encuentran la producción de suero en polvo dulce y ácido, suero condensado, suero delactosado y desmineralizado, obtención de proteína, lactosa, siropes, quesos, además de obtener alcohol etílico, vinagre y ácido láctico [7], este último ampliamente utilizado por la industria de alimentos, farmacéutica y química [8].

Los procesos de bioconversión surgen como una alternativa para el aprovechamiento de este desecho como sustrato para el crecimiento de microorganismos capaces de metabolizar la lactosa, en este trabajo se evalúa el efecto del pH inicial y temperatura sobre el crecimiento de *Lactobacillus casei ssp casei* ATCC 393 en suero de leche, en cultivo batch.

MÉTODO

En el cultivo se empleó la cepa de *Lactobacillus casei ssp casei* ATCC 393 (Remel-Apogent). El lactosuero utilizado, se obtuvo del proceso de manufactura de queso, empleando leche comercial. Para la desproteínización del lactosuero se empleó la técnica del punto isoelectrónico, ajustando el pH a 5,5 con adición de HCl 3N y aplicando tratamiento térmico en autoclave a 105°C por 15 minutos, luego se enfrió a -4°C por 24 horas y se decantó para remover las proteínas precipitadas. Para la preparación del inóculo la paja de la cepa de *Lactobacillus casei ssp casei* ATCC 393, se activó en 10 mL de agar APT, se incubó a 37°C durante 48 horas, con esta solución bacteriana se impregnaron perlas porosas que fueron sembradas e incubadas bajo las mismas condiciones anteriores, posteriormente se guardó la solución a -5°C con glicerol al 50%, esta solución se empleó para la producción del inóculo, tomando 200 microlitros e inoculando 10 mL de suero clarificado, se incubó a 37°C por 48 horas.

Para los procesos de fermentación en batch, se empleó un fermentador tipo tanque agitado con capacidad para 5,0 L, utilizando un volumen de trabajo de 4 L, se realizaron las corridas experimentales sin control de pH, a 180 rpm por 120 horas y 10% de inóculo inicial. El pH inicial del sustrato se ajustó al valor deseado con adición de HCl 3N ó NaOH 6N. Las muestras se tomaron cada 0, 2, 4, 6, 24, 48, 72, 96 y 120 horas para realizar los respectivos análisis.

En este trabajo se determinaron grados brix, empleando un refractómetro de mesa Thermo Electron Corporation ABBE-3L. El pH se midió con un potenciómetro

Hanna pH 212. La densidad se determinó utilizando un termo lactodensímetro (Brixco). El contenido de nitrógeno se midió por el método Kjeldahl [9]. La cantidad de proteína se determinó como el porcentaje de nitrógeno multiplicado por el factor 6,38 [9]. El contenido de calcio se cuantificó en un espectrofotómetro de llama Thermo Electron Corporation S4 AA Spectrometer, empleando la técnica de análisis en jugos de fruta [10]. El contenido de lactosa se determinó por el método espectrofotométrico de Teles [11]. La biomasa se cuantificó por medio de densidad óptica a 600 nm, la cual fue relacionada con la concentración utilizando un espectrofotómetro U.V. visible Hewlett Packard Chemstation 8453 G1115AA.

Para evaluar el efecto del pH y temperatura sobre el crecimiento de *Lactobacillus casei ssp casei* ATCC 393 en suero clarificado, se empleó la metodología de superficie de respuesta, analizando de manera independiente los parámetros de velocidad específica de crecimiento (μ) y producción de biomasa, utilizando un diseño central compuesto rotatable 22. Los factores en el diseño se codificaron de acuerdo a la ecuación 1.

$$x_i = \frac{(X_i - X_{cp})}{\Delta X_i} \quad (\text{Ec.1})$$

Donde x_i = valor codificado de la variable independiente, X_i = valor real de la variable independiente, X_{cp} = valor real de la variable independiente en el punto central y ΔX_i = valor del paso de cambio.

El comportamiento del sistema (fermentación) se explica con la ecuación 2.

$$Y = b_0 + \sum b_i x_i + \sum b_{ii} x_i^2 + \sum b_{ij} x_i x_{ij} \quad (\text{Ec.2})$$

Donde Y = valor de la respuesta predicha, b_0 = constante, b_i = efecto lineal, b_{ii} = efecto cuadrático, b_{ij} = efecto de interacción y x_i = variable independiente.

En el cuadro 1, se muestra el rango y los niveles de las variables investigadas en este trabajo.

Cuadro 1. Valores reales de las variables usadas en el diseño central compuesto.

Variables		Rango y niveles		
		-1	0	1
pH				
	X_1	6	7	8
Temperatura (°C)				
	X_2	32	37	42

Se empleó el paquete estadístico Statgraphics centu- rión para diseñar, modelar la respuesta y analizar los resultados obtenidos del proceso fermentativo.

RESULTADOS

En cuanto a la composición del suero de leche, en el cuadro 2, se muestra la caracterización de suero entero y clarificado, en ella se observa una disminución aproximada del 10% en la cantidad de sólidos, cerca del 45% en el contenido de nitrógeno y proteínas, además de la disminución de una tercera parte del contenido de calcio, mientras que la lactosa no presentó cambios aparentes en la concentración después de la desproteínización. Los valores obtenidos en este trabajo se encuentran dentro de los rangos reportados para el suero entero de leche de vaca [12] y además, los valores del suero clarificado son similares a los obtenidos por otros autores [13, 14 y 15], quienes utilizaron el mismo tratamiento de clarificación.

El diseño central compuesto codificado, los resultados de velocidad específica de crecimiento experimental y los obtenidos por el modelo, se muestran en el cuadro 3.

Los valores de velocidad específica de crecimiento se determinaron a partir de la pendiente de la curva loga- rítmica de la biomasa contra el tiempo en la región de crecimiento exponencial.

El modelo de regresión para la velocidad específica de crecimiento, se muestra en la ecuación 3.

$$Y = -0,889355 + 0,179608X_1 + 0,0169177X_2 - 0,0140626X_1^2 + 0,00055X_1X_2 - 0,000282497X_2^2 \quad (Ec.3)$$

Cuadro 2. Caracterización de suero entero y suero clarificado.

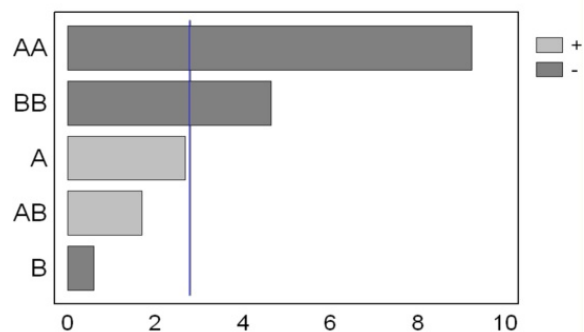
Parámetros	Suero Entero	Suero Clarificado
° Brix	7,2	6,5
pH	6,57	5,71
Densidad	1,029	1,029
% N	0,20	0,11
% Proteínas	1,28	0,70
Lactosa (g/L)	43,5	43,7
Calcio (g/L)	0,313	0,223

Donde Y es la respuesta predicha para la velocidad es- pecífica de crecimiento, X1 y X2 son las variables co- dificadas de pH y temperatura respectivamente. Esta ecuación tiene dos términos lineales, dos términos cuadráticos y un término de interacción y es empleada para predecir la respuesta de velocidad específica de crecimiento con los parámetros utilizados de los facto- res (pH y temperatura) y compararlos con los valores obtenidos experimentalmente (cuadro 3). En el cuadro 4, se muestra el análisis de varianza (ANOVA), para la velocidad específica de crecimiento, donde se eviden- cia dos efectos significativos (valor-P menor a 0,05); el efecto cuadrático del pH y la temperatura, este re- sultado se puede ver además en el diagrama de Pareto (figura 1).

Al comparar los resultados experimentales de veloci- dad específica de crecimiento con los obtenidos a trav- és del modelo matemático (cuadro 3), se evidencia el efecto del pH y la temperatura en un 96,01%, además del valor de R² ajustado de 91,03%, lo cual valida la significancia estadística del modelo, evidenciando una buena correlación entre los valores experimentales y las respuestas predichas; en concordancia con estos resultados se encuentran los representados en la figu- ra 2, donde los puntos de valores predichos vs experi- mentales están alrededor de la línea diagonal, además en la figura 3, se muestran los valores predichos vs re- siduos, en ella no se observa un patrón en los residuos que pueda afectar el modelo, al mismo tiempo un valor de 0,00325 del error estándar de estimación, confirma la poca desviación de los residuos e indica buena pre- cisión y confiabilidad de las corridas experimentales.

En la figura 4, se muestra la superficie y el contorno de respuesta de velocidad específica de crecimiento; esta figura es la representación grafica de la ecuación cua-

Figura 1. Diagrama de Pareto para la velocidad específica de crecimiento.



Cuadro 3. Diseño central compuesto codificado, resultados experimentales y del modelo.

Ensayo	X_1	X_2	μ (1/h) *	μ (1/h) **	Producción de	Producción de
					Biomasa g/L *	Biomasa g/L **
1	-1	-1	0,036	0,040	8,51	8,75
2	1	-1	0,040	0,040	8,11	8,69
3	-1	1	0,032	0,033	5,69	5,52
4	1	1	0,047	0,045	5,50	5,68
5	-1,41421	0	0,031	0,028	8,84	8,88
6	1,41421	0	0,035	0,037	9,40	8,95
7	0	-1,41421	0,050	0,047	8,11	7,61
8	0	1,41421	0,044	0,045	3,12	3,20
9	0	0	0,060	0,061	11,31	11,38
10	0	0	0,061	0,061	11,44	11,38

* Resultados experimentales

** Resultados del modelo

Cuadro 4. Análisis de varianza para velocidad específica decrecimiento.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:pH	0,0000759952	1	0,0000759952	7,17	0,0553
B:Temperatura	0,00000376107	1	0,00000376107	0,36	0,5833
AA	0,000904018	1	0,000904018	85,35	0,0008
AB	0,00003025	1	0,00003025	2,86	0,1663
BB	0,000228017	1	0,000228017	21,53	0,0097
Error total	0,0000423687	4	0,0000105922		
Total (corr.)	0,0010624	9			

$R^2 = 96,012\%$, R^2 ajustada = $91,027\%$, Error estándar de estimación = $0,00325456$

Figura 2. Valores Predichos vs Experimentales.

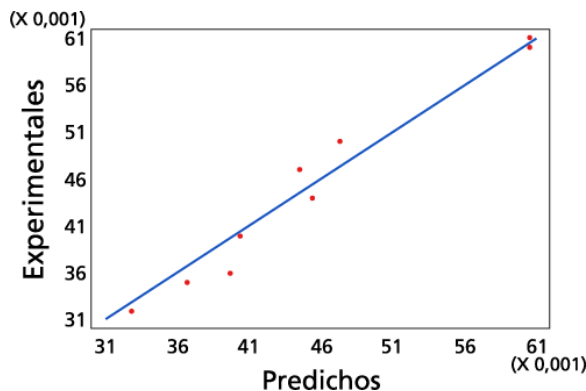


Figura 3. Valores Predichos vs Residuos

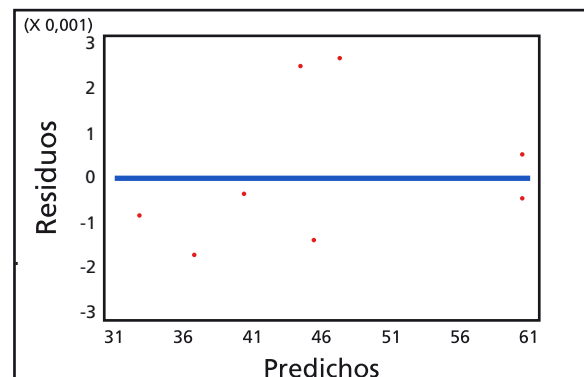
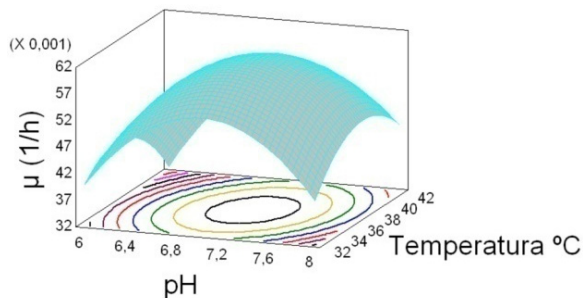


Figura 4. Superficie y contorno de respuesta para velocidad específica de crecimiento de *Lactobacillus casei ssp casei* ATCC 393, mostrando el efecto del pH y la temperatura.



drática del modelo y es práctica para entender el efecto del pH y temperatura sobre la variable respuesta, en ella se evidencia una superficie convexa, lo que indica que hay variables bien definidas para la optimización de la velocidad específica de crecimiento, debido a que la superficie en la cima es simétrica y plana [16].

El máximo valor experimental de velocidad específica de crecimiento obtenido en este trabajo fue de $0,061 \text{ h}^{-1}$, este valor es cercano al logrado por Feoli *et al.*, (1995) [17], quienes alcanzaron $0,068 \text{ h}^{-1}$ con *Lactobacillus delbruekii bulgaricus* cultivado en un medio compuesto por sacarosa y suero de sangre de res. El resultado de $0,061 \text{ h}^{-1}$ es bajo comparado con lo obtenido por Tango y Ghaly (1999) [18], quienes lograron una velocidad específica de crecimiento de $0,24 \text{ h}^{-1}$ con *Lactobacillus helveticus* empleando suero de leche como medio de crecimiento y al reportado por Sharma y Mishra (2014) [19] quienes reportan $0,45 \text{ h}^{-1}$ en *Lactobacillus plantarum* NCDC 414 crecido en jugo de verduras.

El resultado bajo de velocidad específica de crecimiento logrado en este trabajo, ratifica el extenso tiempo requerido en el proceso fermentativo (120 horas).

El resultado obtenido por el modelo para maximizar la velocidad específica de crecimiento a $0,061 \text{ h}^{-1}$, indica que el proceso debe ser realizado a pH cercano de 7,1 y temperatura de $36,9^\circ\text{C}$.

El diseño central compuesto codificado, los resultados de producción de biomasa experimentales y los obtenidos por el modelo se muestran en el cuadro 3. Para hallar la producción de biomasa (g/L), se realizó

la diferencia entre la biomasa final e inicial, tomando para todas las fermentaciones la biomasa final como la cantidad presente en 120 horas y como biomasa inicial la cantidad en 0 horas.

El modelo de regresión para la producción de biomasa, se muestra en la ecuación 4.

$$Y = -198,253 + 16,8744X_1 + 8,44616X_2 - 1,23126X_1^2 + 0,0105X_1X_2 - 0,119349X_2^2 \quad (\text{Ec.4})$$

Donde Y es la respuesta predicha para la producción de biomasa (g/L), X_1 y X_2 son las variables codificadas de pH y temperatura respectivamente, esta ecuación igualmente es empleada para predecir la respuesta y comparar los resultados con los valores obtenidos experimentalmente (cuadro 3). En el cuadro 5, se muestra el análisis de varianza (ANOVA) para la producción de biomasa, donde se manifiesta el efecto significativo de tres factores (valor-P menor de 0,05); el efecto cuadrático del pH y la temperatura, además del efecto lineal de la temperatura, estos efectos también se aprecian en el diagrama de Pareto (figura 5), donde claramente se evidencia que las variables evaluadas de pH y temperatura tienen efecto significativo sobre la producción de biomasa.

El resultado en el cuadro 5, de 0,9849 para el coeficiente de determinación, indica que el 98,49% de la variación de producción de biomasa es atribuido a las variables independientes de pH y temperatura y solo un 1,51% de la variación total no puede ser explicado por el modelo, esta alta correlación entre los valores experimentales y las respuestas predichas, se reafirma con el valor del R^2 ajustado de 96,60%, además de la ubicación de los puntos sobre la línea diagonal en la gráfica de valores predichos vs experimentales (figura 6), lo que indica que el modelo es adecuado para describir la producción de biomasa bajo los rangos evaluados de pH y temperatura. En la figura 7, se muestran los valores predichos vs residuos, estos son inferiores al 5,0% y junto al valor del error estándar de estimación de 0,48%, confirma la alta significancia estadística del modelo.

En la figura 8, se muestra la superficie y el contorno de respuesta para la producción de biomasa, en la superficie se evidencia el efecto del pH y la temperatura, mientras el contorno no muestra efecto de interacción entre las variables (contornos circulares), confirmando los resultados obtenidos en el ANOVA (cuadro 5).

Cuadro 5. Análisis de varianza para la producción de Biomasa.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:pH	0,00509837	1	0,00509837	0,02	0,8890
B:Temperatura	19,4904	1	19,4904	84,51	0,0008
AA	6,93024	1	6,93024	30,05	0,0054
AB	0,011025	1	0,011025	0,05	0,8376
BB	40,6983	1	40,6983	176,47	0,0002
Error total	0,922511	4	0,230628		
Total (corr.)	61,14	9			

R2 = 98,4912 %, R2 ajustada = 96,6051 %, Error estándar de estimación = 0,480237

Figura 5. Diagrama de Pareto para producción de biomasa.

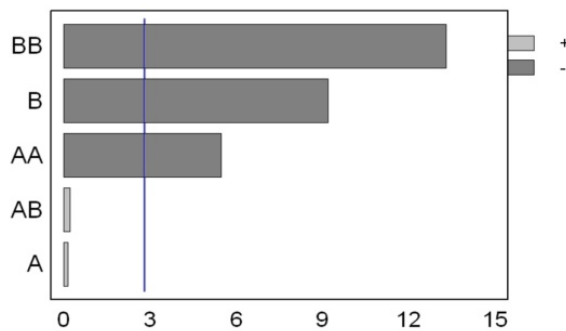


Figura 6. Valores Predichos vs Experimentales.

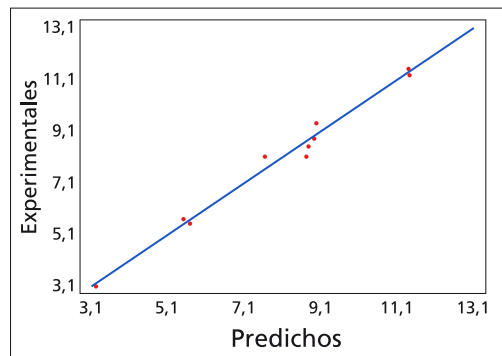


Figura 7. Valores Predichos vs Residuos.

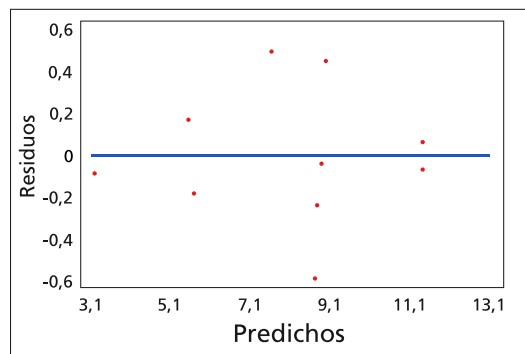
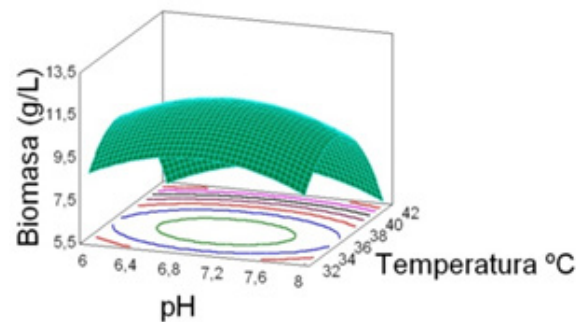


Figura 8. Superficie y contorno de respuesta para la producción de biomasa de *Lactobacillus casei ssp. casei* ATCC 393, mostrando el efecto del pH y la temperatura.



La máxima producción de biomasa obtenida en este trabajo fue 11,31 g/L, este valor es más alto que el reportado por Fajardo *et al.*, (2014) [20] de 0,33 g/L de biomasa para *Lactobacillus casei subsp. casei* CECT 4043 crecido en suero de leche, al conseguido por Tosungnoen *et al.*, (2014) [21] de 3,183 g/L en *Lactobacillus Plantarum* MSUL 702 cultivado en medio líquido de almidón de yuca, el logrado por Aguirre *et al.*, (2010) [22] de 3,25 g/L para *Lactobacillus casei* crecido en suero de leche en cultivo batch, al obtenido por Yáñez *et al.*, (2008) [23] quienes alcanzaron una biomasa de 3,6 g/L cuando evaluaron el efecto del ácido hexanoico sobre la cinética de crecimiento de *Lactobacillus rhamnosus* en un medio de glucosa, al obtenido por Sachin *et al.*, (2006) [24], los cuales consiguieron una biomasa de 5,7 g/L con *Lactobacillus delbrueckii* NCIM 2365 mutado cultivado en medio hidrolizado de azúcar de caña el cual era suplementado con extracto de levadura y además el logrado por Plessas *et al.*, (2008) [25] de 7,8 g/L de biomasa en una mezcla de *Kluyveromyces marxianus* y *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* utilizando como medio suero de leche diluido. Sin embargo el resultado de

biomasa en este trabajo es más bajo que el logrado por Yoo *et al.*, (1997) [26], quienes obtuvieron una concentración de biomasa de 14,4 g/L con *Lactobacillus casei* cultivado en un medio a base de glucosa suplementado con 30 g/L de extracto de levadura.

El resultado del modelo para maximizar la producción de biomasa en 11,38 g/L, el proceso debe realizarse a pH cercano de 7,0 y temperatura de 35,7°C.

CONCLUSIONES

Comparando los resultados experimentales con los obtenidos a través de los modelos matemáticos, se concluye que estos son adecuados para explicar el comportamiento de las variables respuesta (R^2 ajustada de 91,027% y 96,605% para velocidad específica de crecimiento y la producción de biomasa respectivamente).

Para maximizar conjuntamente la velocidad específica de crecimiento y producción de biomasa, debido que no se presenta efecto de interacción en ambos modelos, el proceso fermentativo debe realizarse a pH cercano de 7,05 y temperatura de 36,3°C.

Conforme al resultado obtenido en este trabajo sobre producción de biomasa, el *Lactobacillus casei ssp casei* ATCC 393 presenta un alto potencial probiótico, sin embargo se hace necesario evaluar diferentes condiciones de cultivo que permitan optimizar el crecimiento del microorganismo.

AGRADECIMIENTOS

A la red de universidades públicas del eje cafetero (Alma Mater) y al grupo de investigación Agroindustria de Frutas Tropicales, perteneciente a los programas de Química y Ciencias Agroindustriales de la Universidad del Quindío.

REFERENCIAS

[1] AVONTS, L., VAN UYTVEN, E. and VUYST, L. Cell growth and bacteriocin production of probiotic *Lactobacillus* strains in different media. *International Dairy Journal*, 14, 2004, p. 947-955.

- [2] TODD, R.K. and MARTIN, J.K. Selection and design of probiotics. Raleigh (USA): North Carolina State University, Department of Food Science, 1999.
- [3] RAYMON, E.K. Enciclopedia de Tecnología Química. Tomo XI. I Edición. México (México): Ediciones Hispanoamericana, 1962, p. 654- 655.
- [4] SCHEPERS, A.W., THIBAUT, J. and LACROIX, C. Continuous lactic acid production in whey permeate/yeast extract medium with immobilized *Lactobacillus helveticus* in a two-stage process: model and experiments. *Enzyme Microbiology Technology*, 38, 2006, p. 324-337.
- [5] RODRÍGUEZ, L.R., TEIXEIRA, J.A. and OLIVEIRA, R. Low-cost fermentative medium for biosurfactant production by probiotic bacteria. *Biochemical Engineering Journal*, 32, 2006, p. 135-142.
- [6] GONZÁLEZ, M.I., ÁLVAREZ, S., RIERA, F. and ÁLVAREZ, R. Economic evaluation of an integrated process for lactic acid production from ultrafiltered whey. *Journal of Food Engineering*, 80, 2007, p. 553-561.
- [7] KONONOVICH, N. Whey utilization and whey products. *Journal of Dairy Science*, 62(7), 1979, p. 1149-1160.
- [8] OHKOUCHI, Y. and INOUE, Y. Direct production of L(+)-lactic acid from starch and food wastes using *Lactobacillus manihotivorans* LMG18011. *Bioresource Technology*, 97, 2006, p. 1554-1562.
- [9] ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). Official Methods of analysis. Maryland (USA): 16th Ed. 3rd Revision. 1997.
- [10] ROSS, J.T. and PRICE, W.J. Analysis of fruit juices. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 21, 1970, p. 51.
- [11] FEITOSA, F.F., YOUNG, C.K. and STULL, J.M. A method for rapid determination of lactose. *Journal of Dairy Science*, 61(4), 1978, p. 506-508.
- [12] JELEN, P. Industrial whey processing technology: an overview. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27(4), 1979, p. 658-661.
- [13] JAKYMEC, M., MORAN, H., PÁEZ, G., FERRER, J., MÁRMOL, Z. y RAMONES, E. Cinética de la producción de ácido láctico por fermentación sumergida con lactosuero como sustrato. *Revista Científica*, 11(1), 2001, p. 53-59.
- [14] QUINTERO, H., RODRÍGUEZ, M., PÁEZ, G., FERRER, J., MÁRMOL, Z. y RINCÓN, M. Producción continua de proteína unicelular (*K. fragilis*) a partir de suero de leche. *Revista Científica*, 11(2), 2001, p. 87-94.

- [15] URRIBARRÍ, L., VIELMA, A., PAÉZ, G., FERRER, J., MÁRMOL, Z. y RAMONES, E. Producción de ácido láctico a partir de suero de leche, utilizando *Lactobacillus helveticus* en cultivo continuo. Revista Científica, 14(4), 2004, p. 297-302.
- [16] YU, L., LEI, T., REN, X., PEI, X. and FENG, Y. Response surface optimization of L(+) lactic acid production using corn steep liquor as an alternative nitrogen source by *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1466. Biochemical Engineering Journal, 39, 2008, p. 496-502.
- [17] FEOLI, M., ESCOBAR, C. y MARÍN, R. Obtención de ácido láctico por fermentación con *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus*. Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas, 23, 1995, p. 18-24.
- [18] TANGO, M.S. and GHALY, A.E. Effect of temperature on lactic acid production from cheese whey using *Lactobacillus helveticus* under batch conditions. Biomass Bioenergy, 16, 1999, p. 61-78.
- [19] SHARMA, V. and MISHRA, H. Unstructured kinetic modeling of growth and lactic acid production by *Lactobacillus plantarum* NCDC 414 during fermentation of vegetable juices. Food Science and Technology, 59, 2014, p. 1123-1128.
- [20] FAJARDO, P., RODRÍGUEZ, I., PASTRANA, L. and PÉREZ, N. Production of a potentially probiotic culture of *Lactobacillus casei subsp. casei* CECT 4043 in whey. International Dairy Journal, 18, 2008, p. 1057-1065.
- [21] TOSUNGNOEN, S., CHOOKIETWATTANA, K. and DARARAT, S. Lactic Acid Production from Repeated-Batch and Simultaneous Saccharification and Fermentation of Cassava Starch Wastewater by Amylolytic *Lactobacillus Plantarum* MSUL 702. APCBEE Procedia, 8, 2014, p. 204-209.
- [22] AGUIRRE, E.J., AGUILAR, J.M., RAMÍREZ, A. and ALVAREZ, M.M. Production of probiotic biomass (*Lactobacillus casei*) in goat milk whey: Comparison of batch, continuous and fed-batch cultures. Bioresource Technology, 101, 2010, p. 2837-2844.
- [23] YÁNEZ, R., MARQUES, S., GÍRIO, F.M. and ROSEIRO, J.C. The effect of acid stress on lactate production and growth kinetics in *Lactobacillus rhamnosus* cultures. Process Biochemistry, 43, 2008, p. 356-361.
- [24] SACHIN, R., KADAM, S.S., PATIL, K.B., BASTAWDE, J.M. and KHIRE, D.V. G. Strain improvement of *Lactobacillus delbrueckii* NCIM 2365 for lactic acid production. Process Biochemistry, 41, 2006, p. 120-126.
- [25] PLESSAS, S., BOSNEA, L., PSARIANOS, C., KOUTINAS, A.A., MARCHANT, R. and BANAT, I.M. Lactic acid production by mixed cultures of *Kluyveromyces marxianus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus* and *Lactobacillus helveticus*. Bioresource Technology, 99, 2008, p. 5951-5955.
- [26] YOO, I.K., CHANG, H.N., LEE, E.G., CHANG, Y.K. and MOON, S.H. Effect of B Vitamin Supplementation on Lactic Acid Production by *Lactobacillus casei*. Journal of fermentation and bioengineering, 84(2), 1997, p. 172-175.