

PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LACTICO DE LACTOSUERO SUPLEMENTADO UTILIZANDO *Lactobacillus casei*

PRODUCTION OF LACTIC ACID WITH SUPPLEMENTED WHEY USING *Lactobacillus casei*

PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁCTICO COM SORO DE LEITE SUPLEMENTAÇÃO DE *Lactobacillus casei*

CARLOS GARCÍA M.¹, GUILLERMO ARRÁZOLA P.², MARCELA VILLALBA C.³

RESUMEN

El lactosuero se aprovechó como materia prima para la obtención de ácido láctico, previa pasteurización a 92°C durante 15min y desproteinización por filtración, mediante la fermentación batch a 37 °C y pH 6,5 con Lactobacillus casei durante 21 h. Se estudió el efecto de las variables concentración inicial de lactosa y sulfato de amonio como suplementos del lactosuero en la producción del ácido láctico. Se obtuvo una productividad máxima de 1,1 g.L⁻¹ h⁻¹ en ácido láctico. El coeficiente de rendimiento Yp/s varió de 0,5306 - 0,2488 g. g⁻¹ para 47,9 g.L⁻¹ y 87,72g.L⁻¹ de lactosa inicial. La producción se asoció con el crecimiento del L. casei durante sus fases, donde utilizó entre el 84,0 al 77,4% de lactosa después de 21h de fermentación.

Recibido para evaluación: 01/06/2012. **Aprobado para publicación:** 06/03/2013.

- 1 Ingeniero, especialista. Programa Ingeniería de Alimentos. Grupo Investigación Procesos y Agro Industria de Vegetales. Universidad de Córdoba.
- 2 Ingeniero, Ph.D.. Programa Ingeniería de Alimentos. Grupo Investigación Procesos y Agro Industria de Vegetales. Universidad de Córdoba.
- 3 Ingeniera, MSc. Programa Ingeniería de Alimentos. Grupo Investigación Procesos y Agro Industria de Vegetales. Universidad de Córdoba.

Correspondencia: guillermo.arrazola@ua.es

ABSTRACT

The whey was used as raw material for production of lactic acid, after pasteurization at 92 ° C for 15 min and desproteinization by filtration, through fermentation batch to 37 ° C and pH 6.5 with Lactobacillus casei for 21 hours. The effect of initial concentration of lactose and sulfate of ammonium as supplements of whey in the production of lactic acid was studied. We collected a maximum production of 1,1 g. L⁻¹ h⁻¹ of lactic acid. The coefficient of performance Yp/s ranged from 0,5306 - 0,2488 g. g⁻¹ for 47,9 g. L⁻¹ and 87,7 g. L⁻¹ initial lactose. Production was associated with the growth of L. casei during their stages, where used between the 84,0 to 77,4% lactose after 21 hours of fermentation.

RESUMO

O soro foi utilizada como matéria-prima para a produção de ácido láctico, depois da pasteurização a 92 ° C durante 15 min e desproteinização por filtração, através de fermentação em lotes, a 37 ° C e pH 6,5, com Lactobacillus casei durante 21 h. O efeito da variação da concentração inicial de lactose e sulfato de amônio como suplementos de soro de leite na produção de ácido láctico. Máxima produtividade foi obtido 1,1 g. L⁻¹ h⁻¹, em ácido láctico. O rácio de desempenho Yp/s variou 0,5306-0,2488 g. g⁻¹ a 47,9 g. L⁻¹ e 87,72 g. L⁻¹ de lactose inicial. A produção foi associada com o crescimento de L. casei durante as suas fases, em que utilizado entre 84,0-77,4% de lactose após 21h de fermentação.

INTRODUCCION

El lactosuero es un líquido claro de color amarillo verdoso subproducto del procesamiento de leche en la elaboración de quesos, con una producción mundial de 82 millones de Tm[1]. Se ha constituido en el principal residuo de la industria láctea, donde una parte de éste es usado para alimentación animal, y el resto tratado como un desecho vertido directamente en los cursos de agua naturales. El vertimiento directo del lactosuero a fuentes de agua, sin un tratamiento previo, genera un problema de contaminación ambiental; debido a la materia orgánica constituida por 4,8% de lactosa, 0,75% de proteínas y 6,2% de materia seca[1], nutrientes valiosos al momento de aprovecharlos como alimento y medio de cultivo para fermentaciones industriales. La aplicación de procesos biotecnológicos permite obtener sustancias con interesantes aplicaciones en la industria de alimentos, química y farmacéutica; como es el caso del ácido L(+) láctico cuyo mercado mundial ascendió en el 2006 a 68.000 ton/año y se espera un crecimiento del 10 al 15% anual.

En Colombia todo el producto se importa y equivale a mil millones de pesos anuales [2]. La producción de leche en Colombia, para el año 2008 fue de 13,3 millones de litros [3], de los cuales un 18% se destinó a la producción de quesos y un 9% a leches fermentadas [3], lo que quiere decir que la producción nacional de suero de queso, correspondió a 2,08 millones de litros [4]. En el departamento de Córdoba la producción industrial de la

PALABRAS CLAVE:

Coefficiente de rendimiento Yp/s, Lactosa, Fermentación, Subproducto.

PALAVRAS-CHAVE:

Eficiência Yp/s, fermentação de lactose, Subproduto.

KEYWORDS:

Efficiency Yp/s, Lactose, Fermentation, By-products.

leche y los derivados generó cerca de 300 empleos y una producción bruta industrial de \$ 109.000 millones, equivalente al 25% de la producción láctea de la región Caribe y al 5,58% del total nacional.

El objetivo de este estudio fue la producción de ácido láctico a partir de lactosuero utilizando *Lactobacillus casei* en cultivo batch, suplementando el medio con lactosa y sulfato de amonio como fuente de carbono y nitrógeno respectivamente

MÉTODO

Se utilizó lactosuero fresco, de empresas de Ciéna-ga de Oro, Córdoba, Colombia. El Lactosuero fue pasteurizado a 90°C por 15min y desproteínizado por filtración. Se suplementó con Lactosa y Sulfato de amonio (Lo:So) 1,28:2,62; 9,38:5; 21,25:8,5; 33,13:11,99 y 41,22:14,37 g L⁻¹, ajustando el pH a 6,5 utilizando carbonato de sodio 2,5 N y adicionando 5 g L⁻¹ de hexametáfosfato para 500 mL de lactosuero.

Activación del *Lactobacillus casei* ATCC 393

Se activó el *Lactobacillus casei* ATCC 393 en 10 mL de caldo MRS incubando a 37°C durante 24 h, periodo después del cual se tomó 1 mL y se agregó a 9 mL de caldo MRS e incubó a 37°C durante 6 h. Del caldo se tomó 1 mL y se realizaron siembras en profundidad en Agar MRS y se incubaron a 37°C durante 48 h. Se realizaron 3 repeticiones en cada etapa.

Adaptación del microorganismo

Se adaptó inoculando con 10 mL de *Lactobacillus casei* activado en 500 mL de lactosuero e incubando a 37°C durante 12 h.

Fermentación ácido láctica

Se llevó a cabo en un Fermentador Tecferm 1 L con un volumen de trabajo de 500 mL. Se inoculó un 10% del cultivo con el microorganismo adaptado, garantizando una población mínima de 10⁶ UFC mL⁻¹. Las condiciones de trabajo fueron a presión atmosférica, 37 °C y 150 rpm de agitación magnética. Se monitoreó la fermentación durante 21h a 37°C ajustando el pH a 6,5, determinando concentración de lactosa (g. L⁻¹) y *Lactobacillus casei* (Log UFC mL⁻¹).

Métodos de análisis

La determinación de lactosa se realizó por el método espectrofotométrico (160.51), el contenido de nitrógeno se determinó por el método de Kjeldahl (976,06), ácido láctico por titulometría (947,05) y pH por potenciometría (973.41) descritos en [5]. La densidad óptica (DO) de la biomasa fue medida en un Spectronic +20 a 610 nm tomando 10 mL de muestra y centrifugando a 6.000 rpm por 15 min. Para relacionar la DO con la concentración de biomasa se elaboró una curva de calibración DO vs logUFC.mL⁻¹ acorde a [6].

Análisis estadístico

Se realizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial completo 22 con 2 niveles 5 g. L-1 y 11,99 g. L-1 de lactosa inicial y 9,38 g. L-1 y 33,13 g. L-1 de sulfato de amonio para un total de 4 tratamientos y 3 repeticiones, a los cuales se aplicó un análisis de varianza para evaluar el efecto combinado de los factores seguido de una prueba de comparación de medias de Tukey ($p > 0,05$)

RESULTADOS

Composición del lactosuero

La caracterización del lactosuero pasteurizado tiene una composición en lactosa de 46,5%±0,02 y la desproteínización redujo el nitrógeno a 0,154±0,005% N. El pH del suero (6,2) lo define como un suero dulce y se ajustó a 6,5 correspondiente al pH en la fermentación. Los valores obtenidos están dentro de los rangos aceptables para suero de leche [7] y es similar al usado en otros estudios [8, 9, 10, 11, 12].

Los resultados obtenidos a través de un diseño central compuesto (Cuadro1) muestran un α (1,28 – 41,22) para el factor concentración de lactosa.

Fermentación del lactosuero

El cuadro 2 muestra los tratamientos evaluados para producir ácido láctico a partir de lactosuero suplementado y los valores medios de producción de ácido láctico (P), concentración de *L. casei* (N) y consumo de lactosa (%) a las 21 horas de fermentación. En el análisis de varianza, los resultados muestran que la suplementación con sulfato de amonio es estadísticamente significativos ($p < 0,05$), mientras la variable

Cuadro 1. Variables de estudio y sus niveles

Variable de estudio	Niveles experimentales				
	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
Lactosa (L)	1,28	9,38	21,25	33,13	41,22
Sulfato de Amonio (SA)	2,62	5	8,5	11,99	14,37

lactosa no es significativo su efecto sobre la producción de ácido láctico. Estos resultados muestran que *L. casei* fue capaz de producir ácido láctico al suplementar con lactosa y sulfato de amonio. El tratamiento 2 presentó la mayor producción de ácido láctico, con una suplementación de 5 g. L⁻¹ de sulfato de amonio y 9,38 g. L⁻¹ de lactosa para una producción de 21,46 g. L⁻¹ de ácido láctico.

La producción más baja de ácido láctico en el tratamiento 4 (13,76 g. L⁻¹) fue obtenida con una concentración de 11,99 g. L⁻¹ de sulfato de amonio y 79,63 g. L⁻¹ de lactosainicial.

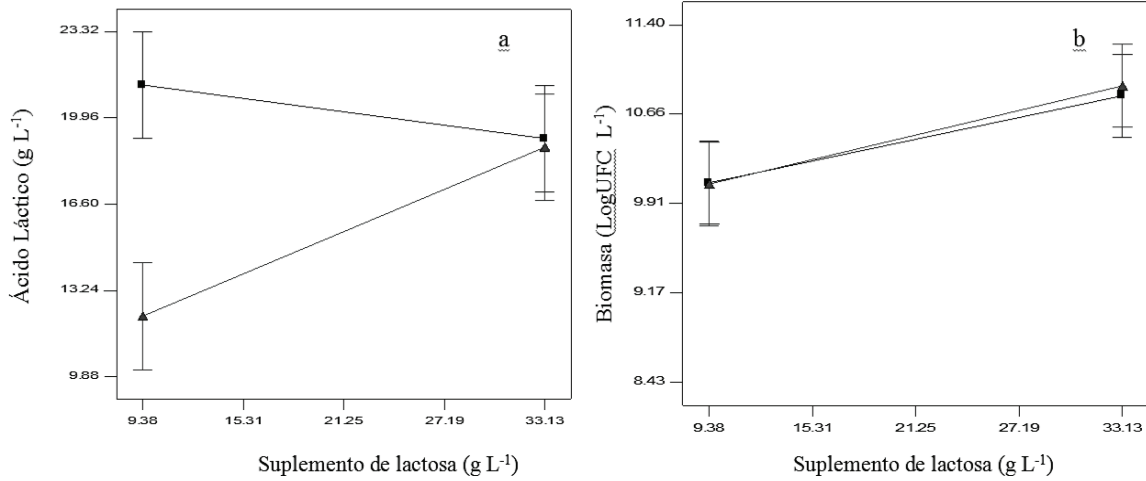
El crecimiento del *L. casei* en el cultivo estuvo directamente relacionado con la concentración de lactosa; es decir, el mayor crecimiento de 8,39 log UFC.mL⁻¹ se obtuvo a 87,72 g. L⁻¹ de lactosa (Lo), aunque fue la menor conversión de ésta, lo cual sugiere una mayor predisposición del medio para el crecimiento del *L. casei* que para la formación de ácido láctico. En consecuencia, los resultados obtenidos confirman el efecto de la suplementación con sulfato de amonio y su balance con la lactosa sobre la bioconversión a ácido láctico; tal como lo muestran los estudios cuando al suplementar con una fuente de nitrógeno se mejoró la velocidad de bioconversión y se duplicó el ácido láctico producido [13, 14, 15]. Entre los trata-

mientos 1 y 5 se encuentra la variación máxima y mínimo de rendimiento (Yp/s) mostrando una reducción del 53,1%, asociado a la máxima (8,39 logUFC. mL⁻¹) y mínima (5,42 log UFC. mL⁻¹) concentración de biomasa. Esto confirma la influencia que tiene el balance de nutrientes del medio en la tendencia a producir biomasa o convertirlos preferentemente en ácido láctico. El rendimiento de ácido láctico (Yp/s) decrece con el aumento de la concentración de lactosa. [16] reportaron rendimientos de 0,47 a 0,33 (g ácido láctico / g lactosa) cuando suplementaron con glucosa, [17] encontraron valores de rendimiento de 0,15 y 0,23 en lactosuero diluido (36 g. L⁻¹) y no diluido (52 g. L⁻¹) respectivamente, usando *L. helveticus*. Por otro lado, [18] alcanzaron rendimientos Y_{x/s} de 0,36 LogUFC. g⁻¹ de *L. casei* y Y_{p/s} de 0,52 g. g⁻¹ en suero de leche de cabra en un cultivo batch con un consumo de lactosa de 28,36 g. L⁻¹ después de 40 h de fermentación. Los resultados muestran la asociación existente entre la producción de biomasa y de ácido láctico; además, de que altas concentraciones de lactosa no favorecen directamente el crecimiento microbiano o la formación de producto. El nivel de significancia (p<0,05) de la interacción entre la concentración de lactosa y sulfato de amonio se explica por el balance que favorece la producción de ácido láctico (Figura 1a). El efecto mixto señala que las mejores producciones se obtienen a niveles bajos de sulfato de amonio y a niveles altos se requiere mayor suplementación con lactosa inicial; sin embargo, altas concentraciones de nitrógeno en el medio no favorecen la producción de ácido láctico. De esto se deduce que se requieren condiciones de un medio de crecimiento balanceado tal como lo sugiere [19]; como una regla general de nutrientes de carbono: nitrógeno: fósforo de 100:10:1 (10 g. L⁻¹ carbono y 1 g. L⁻¹ nitrógeno), relación que en el estudio se da a concentraciones altas de sulfato de amonio y lactosa.

Cuadro 2. Producción de ácido láctico a partir del lactosuero suplementado

Tratamientos	Suplemento							
	So (g.L ⁻¹)	L (g.L ⁻¹)	Lo (g.L ⁻¹)	P (g.L ⁻¹)	N (logUFC.mL ⁻¹)	Consumo Lactosa (%)	Yx/s (logUFC.g ⁻¹)	Yp/s
1	2,62	1,27	47,9	17,89 ab	5,42 a	87,5	0,255 a	0,530 a
2	5	9,38	55,88	21,46 b	7,32 b	87,4	0,218 b	0,451 b
3	8,5	21,25	67,75	17,87 ab	7,61 c	84,0	0,173 c	0,328 c
4	11,99	33,13	79,63	13,76 a	7,62 c	79,1	0,168 d	0,278 d
5	14,37	41,22	87,72	20,86 b	8,39 d	77,4	0,156 e	0,248 e

Figura 1. Producción de ácido láctico



(a) y biomasa de *L. casei* (b) debido al efecto combinado de la suplementación con lactosa y sulfato de amonio (■:5g. L⁻¹; ▲:11,99g. L⁻¹)

En cuanto a la producción de biomasa hay un efecto significativo ($p < 0,05$) de la lactosa y no del sulfato de amonio o la interacción de estas (Figura 1b). No se observa diferencias altas en el rango de concentraciones evaluadas, pero sí un incremento de la concentración de biomasa con el aumento de la concentración inicial de lactosa.

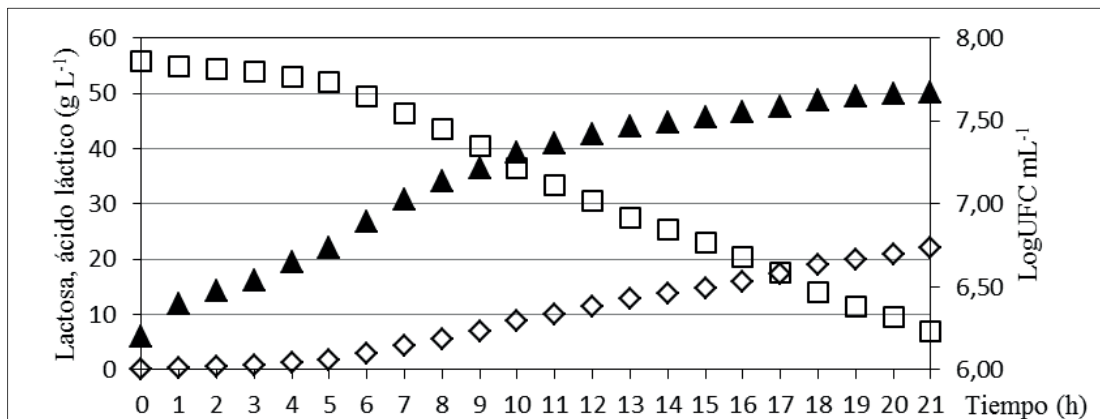
En términos generales, se deduce que las relaciones superiores a 10:1 permitieron lograr producciones altas de ácido láctico y que a concentraciones bajas de nitrógeno se obtienen buenos resultados a las concentraciones de lactosa suplementada en el estudio.

Teniendo en cuenta que el incremento de lactosa favoreció la producción de biomasa y de ácido láctico debido a la asociación del metabolito con el microorganismo más que al balance de nutrientes en el medio.

La producción de ácido láctico empezó a partir de las 4 h (Figura 2) y se mantuvo en aumento hasta alcanzar 22,05 g. L⁻¹ de ácido láctico, 7,68 log UFC. mL⁻¹ de *L. casei* y un consumo de 87,4% de lactosa a las 21 h de fermentación.

El estudio realizado por [17], encontraron que a concentraciones iniciales de lactosa de 36 g. L⁻¹ y 52 g. L⁻¹ se

Figura 2. Fermentación en concentración de lactosa



(□), ácido láctico (◇) recuento de *L. casei* (▲) a 55,88 g. L⁻¹ inicial de lactosa.

alcanzó un azúcar residual de 8,5 g. L⁻¹ y 7,5 g. L⁻¹ utilizando *L. helveticus* y cuando usaron *L. bulgaricus* un residual de 11,5 g. L⁻¹ y 19,4 g. L⁻¹ respectivamente. [20] obtuvieron producciones de ácido láctico de 13,1, 17,2 y 19,1 g. L⁻¹ a temperaturas de 32, 37 y 43°C respectivamente, utilizando 50 g. L⁻¹ de lactosa en un medio suplementado con minerales y 5 g de extracto de levadura.

Este incremento está asociado al consumo de lactosa y se observa que a medida que aumenta la concentración celular el ácido láctico va alcanzando mayores concentraciones, mostrando un comportamiento típico de este tipo de metabolito primario asociado al crecimiento microbiano.

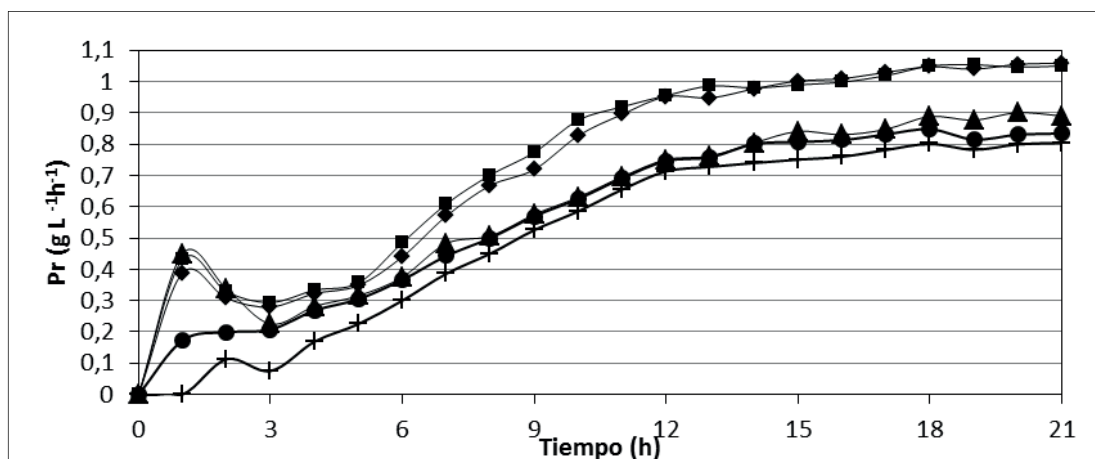
Un patrón similar se observó para la producción de ácido láctico a partir de lactosuero [6]; glucosa [21]; melaza [22]; mucilago de café [23]; suero de leche de cabra [18]. Las concentraciones de biomasa y ácido láctico se estabilizaron a las 21 horas de fermentación batch, tiempo en el cual se alcanzaron las productividades máximas (Qp) de ácido láctico en cada tratamiento. La productividad es incremental durante las primeras 12 h de la fermentación, a partir de la cual se presenta una meseta hasta las 21 h (Figura 3). La máxima productividad fue de 1,058 g. L⁻¹h⁻¹ y se obtuvo en el lactosuero suplementado con lactosa: sulfato de amonio inicial de 47,9: 2,62 g. L⁻¹ y 55,88: 5,0 g. L⁻¹, en los tratamientos 3, 4 y 5 la productividad fue de 0,89 g. L⁻¹h⁻¹, 0,83 g. L⁻¹h⁻¹, 0,804 g. L⁻¹h⁻¹ respectivamente.

Las mejores productividades se obtienen a niveles bajos de sulfato de amonio y lactosa, siendo el tra-

tamiento 2 el que presenta la máxima producción de ácido láctico y productividad, con una reducción de la productividad a medida que aumenta la concentración de los suplementos; de tal forma, que altas concentraciones de nitrógeno en el medio no favorecen la velocidad de producción de ácido láctico, confirmando que el balance de nutrimentos en el lactosuero suplementado favorece la velocidad de formación del ácido láctico. La suplementación con una fuente de nitrógeno (extracto de levadura, peptona o licor de maíz (CSL) mejora la productividad con respecto al lactosuero no suplementado (Cuadro 3). En este estudio al suplementar con sulfato de amonio de 2,62 a 14,37 g. L⁻¹ se alcanzaron productividades de 0,8 a 1,1 g. L⁻¹h⁻¹ resultando buenas considerando el costo que representa el extracto de levadura en la producción industrial.

En el cuadro 3 se reportan las concentraciones y productividades de ácido láctico (Qp) en cultivo por carga para las condiciones que se consideraron adecuadas para el crecimiento del microorganismo en este y otros estudios. Puede observarse que la productividad de ácido láctico es comparable con los medios que usan lactosuero diluido o suplementado con la fuente de carbono [16, 17], siendo superior de tal forma que la suplementación con una fuente de nitrógeno es importante para aumentar la producción. Medios suplementados con extracto de levadura y minerales favorece una mayor productividad dado su importancia como fuente de nutrimentos completa a diferencia del sulfato de amonio que aporta nitrógeno.

Figura 3. Ácido láctico a las 21h fermentación para tratamientos ♦: 1; ■: 2; ▲: 3; ●: 4; +: 5



Cuadro 3. Productividad de ácido láctico en diferentes condiciones de fermentación, en sistema batch

Medio	Microorganismo	Suplemento (g.L ⁻¹)	Condición	Ácido Láctico (g.L ⁻¹)	Qp (g. L ⁻¹ . h ⁻¹)	Fuente
Lactosuero	Lb. helveticus R211	E.L	N.R	66	1,4	[8]
Lactosuero	Lb. casei NRRL B-441	E.L.: 5,0 MnSO ₄ .H ₂ O	pH 5,5 37°C		1,87	[24]
Desproteínizado	Lb. helveticus ATCC 8018	E.L.: 20; peptona tripsica de caseína: 10	pH 5,9 40°C 100rpm, 7h	13,02	2,17	[7]
50 g.L ⁻¹ Lactosuero	Lb. casei subsp. casei ATCC 39392	CSL: 20, Glucosa: 80	pH 4,8-5,0 42°C 180rpm		0,375FC 0,625 y 0,425 IC	[16]
Diluido 36 g.L ⁻¹	Lb. helveticus y Lb. bulgaricus	Ninguno	37°C 150rpm	4,1 y 3,9	0,17 y 0,16	[17]
52 g.L ⁻¹ Lactosa	Lb. helveticus y Lb. bulgaricus	Ninguno	37°C 150rpm	10,1 y 9,6	0,21 y 0,2	[17]
g.L ⁻¹ Lactosa 47,9 55,88 67,75 79,63	Lb. casei ATCC 393	Sulfato de Amonio 2,62 5 8,5	37°C 150rpm pH inicial 6,5		1,058 1,058 0,89 0,83	Este estudio

E.L. Extracto de Levadura; CSL: CornSteepLicuor; B: Batch; F-B: FedBatch; C: Continuo; FC: células libres; IC: células inmovilizadas.

CONCLUSIONES

El lactosuero es una materia prima favorable para producir ácido láctico mediante el proceso de fermentación por *Lactobacillus casei* a las condiciones de 37°C y pH 6,5.

Las mejores producciones se obtienen a niveles bajos de sulfato de amonio, y a niveles altos se requiere mayor suplementación con lactosa inicial; sin embargo, altas concentraciones de nitrógeno en el medio no favorecen la producción de ácido láctico. El *L. casei* creció con un alto rendimiento en ácido láctico, que se redujo al incrementarse la concentración inicial de lactosa (fuente de carbono) y de sulfato de amonio (fuente de nitrógeno) en el medio; de tal forma, que el lactosuero requiere una mayor suplementación con fuentes de nitrógeno que de carbono.

REFERENCIAS

- [1] OREPOULOU, V. and RUSS, W. Utilization of by-products and treatment of waste in the food industry. 1 ed. New York (USA): Springer, 2007, 316 p.
- [2] SERRATO, B.J. y CAICEDO, M.L. Efecto de la concentración de material inerte en un biocatalizador de alginato de calcio con células inmovilizadas sobre la fermentación láctica. Ingeniería e Investigación, 25 (2), 2005, p. 78-82.
- [3] COLOMBIA. MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL. Corporación Colombia Internacional. Oferta Agropecuaria –ENA Cifras Primer Semestre 2009. Bogotá (Colombia): 2009, 21 p.
- [4] LONDOÑO, M., SEPÚLVEDA, J., HERNÁNDEZ, A. y PARRA, J. Bebida fermentada de suero de queso fresco inoculada con *Lactobacillus casei*. Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín, 61(1), 2008, p. 4409-4421.
- [5] UNITES STATES OF AMERICA. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). Official Methods of Analysis of A.O.A.C. International. 16 ed. Washington D.C. (USA): 1997.
- [6] ALTIOK, D. Kinetic Modelling of Lactic Acid Production from Whey [M.Sc. Thesis Food Engineering]. Izmir (Turkey): Izmir Institute of Technology, Faculty of Engineering, 2004, 89 p.
- [7] URRÍBARRÍ, L., VIELMA, A., PAÉZ, G., FERRER, J. y MÁRMOL, Z. Producción de ácido láctico a

- partir de suero de leche utilizando *Lactobacillus helveticus* en cultivo continuo. Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia, 14 (1), 2004, p. 297–302.
- [8] SCHEPERS, A., THIBAUT, J. and LACROIX, C. *Lactobacillus helveticus* growth and lactic acid production during pH-controlled batch cultures in whey permeate/yeast extract medium. Part I: Multiple factor kinetic analysis. Enzyme and Microbial Technology, 30, 2002, p. 176-186.
- [9] NABI, B. and ARDALAN, B. Batch and continuous production of lactic acid from whey by immobilized *Lactobacillus*. Journal of Environmental Studies, 30 (34), 2004, p. 47–53.
- [10] PANESAR, P., KENNEDY, J., GANDH, D. and BUNKO, K. Bioutilisation of whey for lactic acid production. Journal of Food Chemistry, 105 (1), 2007, p. 1–14.
- [11] USTÁRIZ, F., LACA, A., GARCÍA, L. and DÍAZ, M. Fermentation conditions increasing protease production by *Serratia marcescens* in fresh whey. Rev. Téc. Ing. Univ. Zulia, 31 (1), 2008, p. 79 – 89.
- [12] PANESAR, P., KENNEDY, J., KNILL, C. and KOSSEVA, M. Production of L(+) Lactic Acid using *Lactobacillus casei* from Whey. Braz. Arch. Biol. Technol., 53 (1), 2010, p. 219-226.
- [13] ARASARATNAM, V., SENTHURAN, A. and BALASUBRAMANIAM, K. Supplementation of whey with glucose and different nitrogen sources for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii*. Enzyme and Microbial Technology, 19 (7), 1996, p. 482-486.
- [14] OHKOUCHI, Y. and INOUE Y. Direct production of L(+)-lactic acid from starch and food wastes using *Lactobacillus manihotivorans* LMG18011. Bioresource Technology, 97 (1), 2006, p. 1554–1562.
- [15] DE LIMA, C., FONTES, L., BLANCO, K. and CONTIERO, J. Response surface optimization of D(-)-lactic acid production from *Lactobacillus* SMI8 using corn steep liquor and yeast autolysate as nitrogen sources. African Journal of Food Science, 3 (9), 2009, p. 257-261.
- [16] MIRDAMADI, S., ATASHGAHI, S., RAJABI, A., AZIZ-MOHSENI, F., ROAYAEI, M. and HAMED, J. Cell entrapment of *Lactobacillus casei subsp. casei* ATCC 39392 for lactic acid production. Iranian Journal of Biotechnology, 6 (1), 2008, p. 16-21.
- [17] PLESSAS, S., BOSNEA, L., PSARIANOS, C., KOUTINAS, A., MARCHANT, R. and BANAT, I. Lactic acid production by mixed cultures of *Kluyveromyces marxianus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *Lactobacillus helveticus*. Bioresource Technology, 99 (13), 2008, p. 5951–5955.
- [18] AGUIRRE, E., RAMIREZ, A., AGUILAR, J. y ÁLVAREZ, M. Producción de proteína y biomasa probiótica de *Lactobacillus casei* liofilizadas a partir de suero de leche de cabra. Revista Mexicana de Ingeniería Química, 8 (1), 2009, p. 67-76.
- [19] McNEIL, B. and HARVEY, L. Practical Fermentation Technology. 1 ed. West Sussex (England): Jhon Wiley and Sons, 2008, 377 p.
- [20] CHRONOPOULOS, G., BEKATOROU, A., BEZIRTZOGLU, E., KALIAFAS, A., KOUTINAS, A., MARCHANT, R. and BANAT, I. Lactic acid fermentation by *Lactobacillus casei* in free cell form and immobilised on gluten pellets. Biotechnology Letters, 24, 2002, p. 1233–1236.
- [21] YU, M., WANG, R., WANG, C., DUAN, K. and SHEU, D. Enhanced production of L(+)-lactic acid by floc-form culture of *Rhizopus oryzae*. J. Chinese Inst. Chem. Eng., 38, 2007, p. 223-228.
- [22] DUMBREPATIL, A., ADSUL, M., CHAUDHARI, S., KHIRE, J. and GOKHALE, D. Utilization of Molasses Sugar for Lactic Acid Production by *Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii* Mutant Uc-3 in Batch Fermentation. Appl. Environ. Microbiol., 74 (1), 2008, p. 333–335.
- [23] ARIAS, M., HENAO, L. y CASTRILLÓN, Y. Producción de ácido láctico por fermentación de mucílago de café con *Lactobacillus bulgaricus* NRRL-B548. Dyna, 76 (158), 2009, p. 147-153.
- [24] BUYUKKILECI, A.O. and HARSA, S. Batch production of L(+) lactic acid from whey by *Lactobacillus casei* (NRRL B-441). Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 79 (9), 2004, p. 1036-1040.