



PRODUCTION OF PROBIOTIC BIOMASS AND LACTIC ACID FROM SWEET WHEY

PRODUCCIÓN DE BIOMASA PROBIÓTICA Y ÁCIDO LÁCTICO A PARTIR DE LACTOSUERO DULCE

BOTELLO-SUÁREZ W. A¹; FUENTES, D. ROMINA², MEDINA, S. ALEXIS³

¹PhD. Wilmar Alirio Botello Suárez.

Profesor asociado. Programa de Ingeniería ambiental, Facultad de Ingeniería, Universidad El Bosque.

wbotello@unbosque.edu.co

²MSc. Romina Esmeralda Fuentes Díaz.

Profesor asociado. Programa de Ingeniería biotecnológica, Facultad de Ciencias Agrarias y del Ambiente, Universidad Francisco de Paula Santander.

rominaesmeraldafd@ufps.edu.co

³Ing. Alexis Antonio Medina Sánchez.

Programa de Ingeniería biotecnológica, Facultad de Ciencias Agrarias y del Ambiente, Universidad Francisco de Paula Santander.

almedina1981@hotmail.com

Entidad

Av. Cra. 9 No. 131 A – 02, Bogotá D.C, Colombia

PBX: (571) 648 9000

E-mail: wbotello@unbosque.edu.co

Resumen

El lactosuero dulce (LD) constituye uno de los principales subproductos de la industria láctea. Dada su alta concentración de materia orgánica y nutrientes, el inadecuado manejo de este efluente puede generar serios problemas ambientales. El presente estudio tuvo como objetivo evaluar el potencial uso del LD para la obtención de biomasa probiótica y ácido láctico, a través de la optimización de variables de producción. Para ello, fue analizada la cinética de crecimiento de dos cepas probióticas de *Lactobacillus* sp., evaluando condiciones operacionales correspondientes al tipo de cultivo (monocultivo y co-cultivo), sustrato (fresco y desproteínizado), tasa de dilución y agitación. Posteriormente, fue verificada la cinética de crecimiento y producción de biomasa y de ácido láctico a una escala de 20L, en un sistema operado en régimen discontinuo. Las mejores condiciones de crecimiento fueron obtenidas empleando LD fresco diluido, co-cultivo y agitación intermitente a 60 r.p.m. El escalado del bioproceso permitió recuperar una concentración de biomasa de hasta 10⁸ UFC/mL y obtener un rendimiento de ácido láctico de 54,1% en relación al contenido de lactosa. En base a los resultados obtenidos, se concluye que el LD puede ser aprovechado como sustrato para la obtención de productos de interés biotecnológico, representando una materia prima económica y de fácil procesamiento.

Palabras clave: Ácido láctico, aprovechamiento de subproductos, biomasa.





Abstract

Sweet whey (SW) represents one of the main by-products of the dairy industry. Given its high concentration of organic matter and nutrients, the inadequate disposal of this effluent can generate serious environmental problems. The aim of this work was to establish the potential use of SW as a growth medium for probiotic biomass and lactic acid, through optimization of production variables. The growth kinetics of two probiotic strains of *Lactobacillus sp.* was analyzed, evaluating operational conditions corresponding to the culture conditions (monoculture and co-culture), substrate (fresh and deproteinized), dilution rate and shaking. Subsequently, the growth kinetics and biomass and lactic acid production were verified at a scale of 20L, in batch system. The best growth conditions were obtained using fresh diluted SW, co-cultivation and intermittent shaking at 60 r.p.m. The scaling-up of the bioprocess allowed to recover a biomass concentration of up to 10^8 CFU / mL and a lactic acid yield of 54.1% in relation to the lactose content. Based on the results obtained, it is concluded that SW can be used as a substrate to obtain products of biotechnological interest, representing an inexpensive and easy-to-process raw material.

Keywords: Biomass, exploitation of by-products, lactic acid.

1. INTRODUCCIÓN

El lactosuero dulce (LD) es un líquido resultante de la coagulación enzimática de la leche durante la elaboración del queso (Huertas, 2009). Constituye uno de los principales subproductos de la industria láctea, representando cerca del 85% del volumen total de leche procesada (Rincon Garcia et al., 2020).

La composición del LD está representada principalmente por la presencia de compuestos hidrosolubles tales como lactosa (4,5-5%), proteínas solubles (0,6-0,8%), lípidos (0,4-0,5%) y sales minerales (8-10% de extracto seco), alcanzando una demanda bioquímica de oxígeno (DBO₅) de hasta 50000 mg/L (Huertas, 2010, 2009). En consecuencia, la gestión inadecuada de este efluente puede generar graves problemas ambientales.

Considerando su alta concentración de materia orgánica y nutrientes, el LD puede ser potencialmente aprovechado como sustrato para la

obtención de productos de interés biotecnológico, tales como biomasa probiótica y ácido láctico (Božanić et al., 2014; Recio et al., 2019). Por tanto, la optimización de variables asociadas a la generación de estos productos representa un aspecto de creciente interés.

Las bacterias ácido lácticas (BAL), particularmente pertenecientes al género *Lactobacillus*, presentan un alto interés industrial y alimenticio. Estos microorganismos presentan un reconocido potencial probiótico (Neethu et al., 2015; Rama et al., 2019; Rodríguez-Palacios et al., 2009). Adicionalmente pueden ser cultivados en LD, siendo uno de sus productos metabólicos el ácido láctico (Rama et al., 2019). No obstante, su obtención está condicionada a la adecuada selección de variables operacionales asociadas a su producción, las cuales permitan estimar la cantidad de biomasa y metabolitos generados en un tiempo y concentración de sustrato específicos. Adicionalmente, es necesario evaluar las condiciones





propias de cultivo y parámetros cinéticos críticos para un eventual escalado.

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar el potencial uso del LD como sustrato para el crecimiento de dos cepas probióticas de *Lactobacillus sp.* y obtención de ácido láctico, considerando las siguientes condiciones operacionales: i) relación C/N y concentración del sustrato, mediante dilución y desproteínización; ii) agitación del sistema y iii) tipo de cultivo (monocultivo y co-cultivo). Las variables con mejor desempeño fueron empleadas para el escalado del bioproceso a un volumen operacional de 20L, a partir del cual fueron estimadas las constantes cinéticas y el rendimiento de biomasa probiótica y ácido láctico obtenido a partir del sustrato suministrado. Los datos obtenidos constituyen un aporte para el desarrollo de sistemas de aprovechamiento de LD.

2. METODOLOGIA

2.1 Inóculo

Las cepas probióticas de *Lactobacillus sp.* empleadas para la realización de las pruebas cinéticas (denominadas Lac7 y Lac12), fueron obtenidas a partir del banco de aislados ambientales del laboratorio de biotecnología industrial de la Universidad Francisco de Paula Santander (Cúcuta, Colombia). Para la preparación de los inóculos, una colonia procedente de un cultivo axénico de cada una de las cepas seleccionadas fue inoculada en 15 mL de caldo para bacterias ácido lácticas MRS (*Man Rogosa Sharpe, Merck*). El periodo de incubación fue de 12-14h a

37°C. Posteriormente, por medio de diluciones sucesivas, el cultivo obtenido fue ajustado a una densidad óptica (OD₆₀₀) de 0,2.

2.2 Sustrato

El LD empleado como sustrato en el presente estudio fue colectado en una empresa láctea de la ciudad de Cúcuta (Colombia), en contenedores plásticos estériles de 3 L. Este efluente fue almacenado a -5°C. La composición (en términos de porcentaje de lactosa y proteína) del lactosuero empleado se indica en la Tabla 1.

Tabla 1. Determinación del contenido de lactosa y proteína en el lactosuero fresco (L.F) y lactosuero desproteínizado (L.D) empleados como medio de cultivo.

| Componente | L.F | L.D |
|--------------|------|------|
| Lactosa (%) | 5,1 | 4,2 |
| Proteína (%) | 0,84 | 0,38 |

L.F: Lactosuero fresco; L.D: Lactosuero desproteínizado.

Para definir el tipo de tratamiento a realizar sobre el LD, inicialmente, fueron evaluados un total de ocho ensayos conducentes a variar la relación C/N del sustrato. Para ello, el LD fue dividido en dos categorías: sin pretratamiento, denominado lactosuero fresco (L.F) y con pretratamiento, denominado lactosuero desproteínizado (L.D) (Cury Regino et al., 2011). Cada categoría fue diluida con agua destilada estéril en proporciones 1:0, 1:1, 1:5 y 1:10.

Después de su preparación, los medios fueron sometidos a pasteurización (90°C por 10 min). Estos análisis fueron realizados empleando un volumen de 1L, a 37°C,





pH $6,0 \pm 0,1$ e inóculo del 2%. El periodo de incubación fue de 24h. Como control fue establecido el caldo MRS. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado. Se tomaron muestras en intervalos de tiempo definidos para determinar la concentración de biomasa (UFC/mL), pH y concentración de ácido láctico.

2.3 Evaluación de las condiciones operacionales

Una vez seleccionado el tratamiento más eficiente a aplicar sobre el sustrato, fueron evaluadas las condiciones operacionales correspondientes al periodo de agitación y el sistema de cultivo: monocultivo y co-cultivo. En el primer caso, fueron evaluados dos tratamientos correspondientes a agitación intermitente (cada hora durante 20 min a 60 r.p.m), y agitación constante a 60 r.p.m. En la evaluación del sistema de cultivo fue realizada cinética de crecimiento para cada uno de las cepas por separado (monocultivo) y una mezcla de la misma proporción de cada una de ellas (co-cultivo). Estas pruebas fueron realizadas considerando las condiciones operacionales anteriormente descritas. Así mismo, se tomaron muestras en intervalos de tiempo definidos para determinar la concentración de biomasa (UFC/mL), pH y concentración de ácido láctico.

2.4 Escalado y balance del bioproceso

La configuración del sistema empleado para el escalado del bioproceso se describe en la Figura 1. Fue dispuesto un tanque de

fermentación con volumen operacional de 20 L operado en régimen discontinuo. La temperatura del proceso fue de 37°C para un periodo de 36 h de operación. Se calcularon los parámetros cinéticos de rendimiento de biomasa y ácido láctico ($Y_{x/s}$ y $Y_{p/s}$, respectivamente), y la velocidad específica de crecimiento microbiano (μ) a través de la estimativa de la concentración de biomasa y ácido láctico generado en función del tiempo de establecido para el crecimiento exponencial (18 h). La estimación de los parámetros estequiométricos fue realizada a partir de la composición típica de la biomasa ($\text{CH}_{1.79}\text{O}_{0.5}\text{N}_{0.2}$), considerando un contenido de sales del 5% (Ertola et al., 1994).

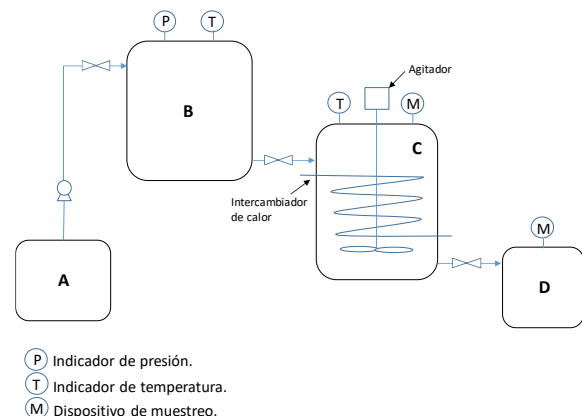


Figura 1. Configuración del sistema de producción de *Lactobacillus sp.* A: Tanque de alimentación; B: Esterilizador; C: Biorreactor; D: Tanque de recolección.

2.5 Procedimientos analíticos y análisis estadístico

La concentración celular durante la fermentación fue determinada por el método estándar de recuento en placa de células viables. Para ello fueron establecidas diluciones seriadas y siembra en superficie sobre placas



Petri conteniendo medio MRS. Las placas fueron incubadas a 37°C por 5 días, tiempo después del cual fue realizado el recuento (expresado en unidades formadoras de colonia sobre mililitro, UFC/mL). La concentración de ácido láctico fue estimada por titulometría (método AOAC 947.05) (Atherton et al., 1977) y el pH del medio fue determinado por el método electrométrico. Todas las pruebas fueron realizadas por triplicado. Para el análisis estadístico los datos se compararon utilizando el análisis de varianza unidireccional (ANOVA) seguido de la prueba de Tukey con un nivel de significancia del 5% ($p < 0,05$). Todos los análisis fueron realizados usando el software R (Versión 3.5.1).

3. ANALISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.1 Selección del medio de cultivo

Para la implementación del sistema de producción se procedió a seleccionar en primera instancia el

medio de cultivo a emplear. El lactosuero fue evaluado a través del establecimiento de varios tratamientos teniendo en cuenta su dilución y desproteización. Los análisis realizados para la selección del medio de cultivo se describen en la Tabla 2, donde también se detalla la concentración de biomasa obtenida para cada una de las cepas probióticas en estudio luego de 24 horas de proceso a escala de 1L.

Los mayores valores obtenidos para los parámetros de concentración celular y velocidad específica de crecimiento (con excepción del medio control) se presentaron en los tratamientos T₁ con $4,5 \times 10^8$ UFC/mL y $\mu = 0,5418 \text{ h}^{-1}$, T₅ con $4,1 \times 10^8$ UFC/mL y $\mu = 0,5534 \text{ h}^{-1}$, y T₂ con $3,9 \times 10^8$ UFC/mL y $\mu = 0,5418 \text{ h}^{-1}$; tratamientos correspondientes a los medios S.F. 1:0, S.D. 1:0 y S.F. 1:1 respectivamente. Entre estos tratamientos no se presenta una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

Tabla 2. Velocidad específica de crecimiento (μ) de las cepas de *Lactobacillus sp.* seleccionados (Lac7 y Lac12) y concentración máxima de biomasa obtenida (UFC/mL) luego de 24 h de incubación para cada uno de los tratamientos (T1 a T8).

| Tratamiento | Sustrato | Lac7 | | Tratamiento | Sustrato | Lac12 | |
|----------------|----------|-------------------------------|-------------------|----------------|----------|-------------------------------|-------------------|
| | | $\mu \text{ (h}^{-1}\text{)}$ | UFC/mL | | | $\mu \text{ (h}^{-1}\text{)}$ | UFC/mL |
| T ₀ | MRS | 0,297 A | $4,3 \times 10^7$ | T ₀ | MRS | 0,6951 A | $7,8 \times 10^8$ |
| T ₁ | L.F 1:0 | 0,190 AB | $3,9 \times 10^7$ | T ₁ | L.F 1:0 | 0,5418 B | $4,5 \times 10^8$ |
| T ₅ | L.F 1:1 | 0,137 AB | $3,6 \times 10^7$ | T ₅ | L.D 1:0 | 0,5606 B | $3,9 \times 10^8$ |
| T ₂ | L.F 1:5 | 0,408 AB | $3,4 \times 10^7$ | T ₂ | L.F 1:1 | 0,3616 B | $7,4 \times 10^7$ |
| T ₃ | L.F 1:10 | 0,344 BC | $3,3 \times 10^7$ | T ₆ | L.D 1:1 | 0,4643 C | $1,6 \times 10^8$ |
| T ₄ | L.D 1:0 | 0,291 BC | $3,8 \times 10^7$ | T ₇ | L.D 1:5 | 0,5534 D | $4,1 \times 10^8$ |
| T ₆ | L.D 1:1 | 0,345 C | $3,0 \times 10^7$ | T ₄ | L.F 1:10 | 0,4943 D | $2,4 \times 10^8$ |
| T ₇ | L.D 1:5 | 0,248 C | $2,9 \times 10^7$ | T ₃ | L.D 1:5 | 0,4925 E | $1,6 \times 10^8$ |
| T ₈ | L.D 1:10 | 0,106 D | $1,8 \times 10^7$ | T ₈ | L.D 1:10 | 0,4251 E | $6,6 \times 10^7$ |





L.F: lactosuero fresco, L.D: lactosuero desproteinizado. Valores de μ seguidos por la misma letra no presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$).

Los tratamientos restantes no mostraron un buen desempeño, posiblemente debido a una elevada dilución de sus componentes durante la constitución del sustrato, en particular factores de crecimiento específicos.

El tratamiento T₂ representó una de las alternativas más rentables desde el punto de vista de producción de biomasa respecto a los medios S.F. 1:0 y S.D. 1:0, evaluados en los tratamientos T₁ y T₅ respectivamente, reduciendo costos asociados a la preparación de 1 L de sustrato respecto al suero empleado en el tratamiento T₁, y respecto al empleado en el tratamiento T₅. Esto reduce la necesidad de invertir en reactivos químicos y energía para llevar a cabo un proceso de desproteinización del sustrato. Por tanto, con base en los resultados anteriormente mencionados se procedió a seleccionar al medio evaluado en el tratamiento T₂, S.F. 1:1, como medio de cultivo a emplear en el escalado del bioproceso.

3.2 Optimización de variables

Una vez seleccionado el medio de cultivo se procedió a evaluar el periodo de agitación y el crecimiento de las cepas probióticas en sistemas de monocultivo y co-cultivo. Tanto la velocidad como el tiempo de agitación del sistema fueron estimadas en base a la homogenización del medio en el menor tiempo posible, procurando no aumentar la tensión de oxígeno disuelto en este, debido a las características microaerófilas de los microorganismos en estudio (Klein et al., 1998).

En pruebas realizadas de forma experimental se logró establecer que la velocidad más apropiada es de 60 r.p.m.

por un intervalo de tiempo de 20 min cada hora, alcanzando el fin propuesto.

La concentración celular a las 18 horas de trabajo fue del orden de 10^8 UFC/mL en los diferentes tratamientos (Figura 2A), alcanzando velocidades específicas de crecimiento entre 0,14 y 0,15 h⁻¹. Considerando estos datos, se estableció que la agitación no constituye una variable crítica para la escala empleada (1L). Sin embargo, a volúmenes mayores y con el objeto de obtener una mayor homogenización en el medio de cultivo, y por lo tanto una mejor área de contacto entre los microorganismos y el medio, se estableció la agitación intermitente como la alternativa más adecuada para ser implementada en posteriores análisis.

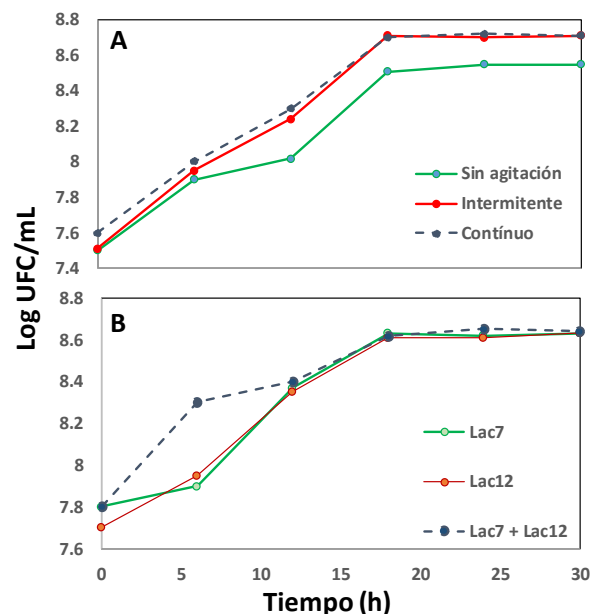


Figura 2. Perfil cinético del crecimiento de *Lactobacillus sp.* (Lac7, Lac12). **A.** Evaluación de la frecuencia de agitación a 60 r.p.m (intermitente y continua). **B.** Crecimiento en sistemas de monocultivo y co-cultivo.

En cuanto a la comparación de los sistemas de cultivo, el crecimiento en





cultivo mixto presentó valores similares a cualquiera de los monocultivos evaluados, obteniendo incluso la mayor producción de biomasa (4.5×10^8 UFC/mL) a las 24 horas de proceso (Figura 2B) (Maldonado y Caballero, 2016; Pérez et al., 2017). No obstante, dadas las similitudes de las características morfológicas de las colonias de las dos cepas en estudio, no fue posible establecer la proporción exacta de cada microorganismo durante la cinética de crecimiento establecida.

En relación con el análisis de la productividad de cada uno de los sistemas de cultivo, se logra evidenciar la ventaja que proporciona el cultivo mixto, al presentar un menor tiempo de operación del sistema. Adicionalmente, considerando que los resultados obtenidos en el sistema de cultivo mixto resultaron satisfactorios en comparación con los ensayos de los montajes individuales, y que el mismo permite la producción simultánea de ambos microorganismos sin que se vea afectada de forma considerable la concentración celular, el desarrollo de los posteriores diseños experimentales se realizó con base a este tipo de sistema.

3.3 Escalado y balance del bioproceso

El crecimiento microbiano en un proceso fermentativo diseñado para la producción de biomasa está basado principalmente en la utilización de uno de los componentes del medio de cultivo por parte de los microorganismos, en el que la concentración del sustrato es considerada un factor crítico para obtener una mayor producción de células, siendo necesaria la optimización de ciertas condiciones

fundamentales de cultivo como temperatura, pH, agitación, entre, otros (Madigan et al., 2017). En este estudio fueron consideradas las condiciones operacionales óptimas estimadas previamente, particularmente para sistema de cultivo, agitación y pretratamiento del sustrato.

Los análisis realizados con el sistema a escala de 20L permitieron obtener un valor máximo para la producción de ácido láctico de valores máximos de generación de ácido láctico 13,8 g/L, con una generación de biomasa de hasta $2,1 \times 10^8$ UFC/mL (Figura 3).

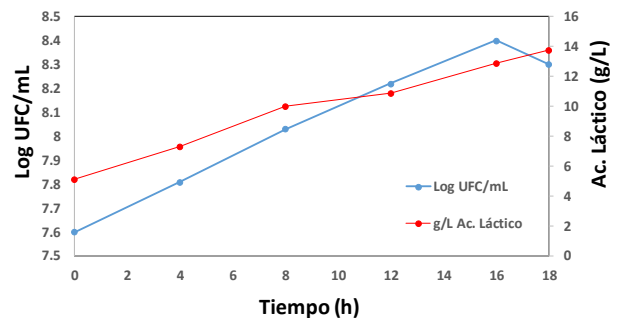


Figura 3. Comparación de la producción de biomasa con la generación de ácido láctico en el proceso escalado ($V=20L$).

La producción de ácido láctico está estrechamente relacionada con el crecimiento y mantenimiento celular de *Lactobacillus sp.* Estos microorganismos utilizan las hexosas del medio a través de la vía de Emden-Meyerhof, ruta en la cual el principal producto del metabolismo energético es ácido láctico (Madigan et al., 2017).

El aumento en la biomasa genera un aumento en la concentración de ácido láctico en el medio, hasta un punto en el que la concentración de lactato sigue aumentando así la biomasa se mantenga estable o disminuya un poco (Figura 3). Esto es debido posiblemente a que la energía





proveniente de las hexosas metabolizadas ya no es utilizada para la producción de nuevas células sino en el mantenimiento celular (Rose, 2014).

El balance del bioproceso a partir de

la composición teórica de la biomasa y los datos experimentales determinados luego de 18 h se relacionan en la Tabla 3.

Tabla 3. Parámetros cinéticos, porcentaje de ácido láctico, concentración de biomasa y pH obtenidos en el sistema de producción evaluado luego de 18 h de proceso. μ : Velocidad específica de crecimiento; Y: Rendimiento, X: Biomasa; S: Sustrato; P: Ácido láctico.

| Condiciones iniciales: | |
|---|---|
| Volumen de operación (L) | 20 |
| Fuente de Carbono (g/L de C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁) | 25,5 |
| Fuente de N (g/L de NH ₃) | 4,2 |
| pH | 7,0 |
| Inóculo | Lac7; Lac12 (2% V/V) |
| Composición Típica de la biomasa (Ertola et al 1994) | C H _{1.79} O _{0.5} N _{0.2} |
| Condiciones finales: | |
| μ (h ⁻¹) | 0.14 |
| Biomasa (UFC/mL) | 2,1 x 10 ⁸ |
| pH | 4.8 |
| Ácido láctico (g/L) | 13,8 |
| Y _{X/S} (g Biomasa/g sustrato) | 0.52 g Biomasa / g Lactosa |
| Y _{P/S} (g Ácido láctico/g Lactosa) | 0.54 g ácido Láctico/ g Lactosa |
| Estequiometría del proceso: | |
| C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ + 1.37 NH ₃ -----> 6.87 CH _{1.79} O _{0.5} N _{0.2} + 1.71C ₃ H ₆ O ₃ + 1.78H ₂ O | |

El balance del bioproceso según datos experimentales obtenidos (Tabla 3), indica que el sistema de producción de lactobacilos a base de LD presentó alcanzó una productividad total de 0.52 g de biomasa por gramo de lactosa disponible. Diversos autores han reportado desempeños similares o más eficientes, a través de la alteración de la composición del medio de cultivo, o la operación de procesos continuos o semi-continuos (Aguirre-Ezkauriatza et al., 2010; Lavari et al., 2014; Ziadi et al., 2020). Adicionalmente, el crecimiento de biomasa está estrechamente relacionado a las características de las cepas en analizadas. Los resultados obtenidos en el presente estudio

permiten inferir que el ajuste de variables operacionales constituye una estrategia crítica para mejorar el desempeño de un proceso de producción de biomasa probiótica a base de LD, el cual es susceptible de optimización al considerar otros pretratamientos del sustrato y otro régimen de operación. La relación estequiométrica calculada a partir de los datos obtenidos facilitaría el desarrollo de estos estudios.

La producción de ácido láctico presentó un rendimiento del 54,1%. Considerando la dilución realizada, estos valores son similares a los obtenidos por otros autores empleando LD (Bouchard et al., 2015; Soriano-





Perez et al., 2012). Consecuentemente, el sistema implementado bajo las consideraciones operacionales establecidas posibilitó la co-generación de biomasa y metabolitos de interés biotecnológico.

4. CONCLUSIÓN

En este estudio se determinaron las variables operacionales críticas para el aprovechamiento del LD como sustrato de crecimiento de biomasa probiótica y producción de ácido láctico. El sistema implementado permitió alcanzar una productividad total de 0.52 g de biomasa por gramo de lactosa, en un tiempo de operación de 18 h. Paralelamente, el bioproceso posibilitó la cogeneración de ácido láctico, con un rendimiento de 0.54 g / g Lactosa. Considerando las condiciones establecidas, el LD puede ser potencialmente aprovechado en sistemas de obtención de productos de interés biotecnológico, representando una materia prima económica y de fácil procesamiento.

5. REFERENCIAS

- Aguirre-Ezkauriatza, E.J., Aguilar-Yáñez, J.M., Ramírez-Medrano, A., Alvarez, M.M., 2010. Production of probiotic biomass (*Lactobacillus casei*) in goat milk whey: Comparison of batch, continuous and fed-batch cultures. *Bioresour. Technol.* 101, 2837–2844. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.10.047>
- Atherton, H. V, Newlander, J.A., 1977. *Chemistry and testing of dairy products*. AVI Publishing Co. Inc.
- Bouchard, D.S., Seridan, B., Saraoui, T., Rault, L., Nicoli, J., Loir, Y. Le, Even, S., 2015. *Lactic Acid Bacteria Isolated from Bovine Mammary Microbiota: Potential Allies against Bovine Mastitis* 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144831>
- Božanić, R., Barukčić, I., Kl, J., Tratnik, L., 2014. Possibilities of Whey Utilisation, *Austin J Nutri Food Sci.*
- Cury Regino, K., Arteaga Márquez, M., Martínez Flórez, G., Luján Rhenals, D., Durango Villadiego, A., 2011. Evaluación de la fermentación del lactosuero ácido Evaluación de la fermentación del lactosuero ácido (entero y desproteínizado) utilizando *Lactobacillus casei* Evaluation of acid whey fermentation (whole and deproteinized) using *Lactobacillus casei* ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN, *Rev. Colomb. Biotecnol.*
- Ertola, R.J., Giulietti, A.M., Castillo, F.J., 1994. Design, formulation and optimization of media. *Bioreact. Syst. Des.* Asenjo J. J Merchuk (eds.). Marcel Dekker. New York. USA. pp 89–137.
- Huertas, R.A.P., 2010. Digestión anaerobia de lactosuero: efecto de altas cargas puntuales. *Rev. Fac. Nac. Agron.* 63, 5385–5394.
- Huertas, R.A.P., 2009. Lactosuero: importancia en la industria de alimentos. *Rev. Fac. Nac. Agron.* 62, 4967–4982.
- Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C., Reuter, G., 1998. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 41, 103–125. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(98\)00049-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00049-X)
- Lavari, L., Páez, R., Cuatrin, A., Reinheimer, J., Vinderola, G., 2014. Use of cheese whey for biomass





- production and spray drying of probiotic lactobacilli. *J. Dairy Res.* 81, 267–274. <https://doi.org/10.1017/S0022029914000156>
- Madigan, M.T., Bender, K.S., Buckley, D.H., Sattley, W.M., Stahl, D.A., 2017. *Brock Biology of Microorganisms* 15 edn.
- Maldonado, L. y Caballero, L. (2016). Bebida fermentada a base de arroz con adición de probióticos. *Revista @limentech.* 14(1), 58-73. DOI: <https://doi.org/10.24054/16927125.v1.n1.2016.2126>
- Neethu, M., Bunt, C., Hussain, M., 2015. Comparison of Microbiological and Probiotic Characteristics of Lactobacilli Isolates from Dairy Food Products and Animal Rumen Contents. *Microorganisms* 3, 198–212. <https://doi.org/10.3390/microorganisms3020198>
- Pérez, A. Villarreal, J. Pérez, Y. Ramírez, A. y Rangel, M. (2017). Actividad antimicrobiana de aceites esenciales de naranja dulce (*Citrus sinensis*) y limón criollo (*Citrus Aurantifolia*) como control en el añublo bacteriano de la panícula del arroz. *Revista @limentech.* 15(2), 28-44. DOI: <https://doi.org/10.24054/16927125.v2.n2.2017.2966>
- Rama, G.R., Kuhn, D., Beux, S., Maciel, M.J., Volken de Souza, C.F., 2019. Potential applications of dairy whey for the production of lactic acid bacteria cultures. *Int. Dairy J.* <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2019.06.012>
- Recio, R. Recio, C. y Pilatowsky, I. (2019). Estudio experimental de la deshidratación de tomate verde (*pysalis ixocarpa* brot) utilizando un secador solar de tipo directo. *Revista Bistua.* 17(1), 76-86. DOI: <https://doi.org/10.24054/01204211.v1.n1.2019.3136>
- Rincon Garcia, D.J., Sepúlveda-Valencia, J.U., Ciro-Velásquez, H.J., 2020. Evaluación del proceso de Diafiltración para la concentración de la proteína en el suero dulce de quesería. *DYNA* 87, 239–247. <https://doi.org/10.15446/dyna.v87n214.82795>
- Rodriguez-Palacios, a., Staempfli, H.R., Duffield, T., Weese, J.S., 2009. Isolation of bovine intestinal *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus acidilactici* with inhibitory activity against *Escherichia coli* O157 and F5. *J. Appl. Microbiol.* 106, 393–401. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03959.x>
- Rose, A.H., 2014. *Chemical microbiology: an introduction to microbial physiology.* Elsevier.
- Soriano-Perez, S., Flores-Velez, L., Alonso-Davila, P., Cervantes-Cruz, G., Arriaga, S., 2012. Production of lactic acid from cheese whey by batch cultures of *Lactobacillus helveticus*. *Ann. Microbiol.* 62, 313–317.
- Ziadi, M., M'Hir, S., Aydi, A., Hamdi, M., Al Loman, A., 2020. Bioreactor Scale-Up and Kinetic Modeling of Lactic Acid and Biomass Production by *Enterococcus faecalis* SLT13 during Batch Culture on Hydrolyzed Cheese Whey. *J. Chem.* 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/1236784>

