

# PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO A PARTIR DE SUERO DE LECHE, UTILIZANDO *Lactobacillus helveticus* EN CULTIVO CONTINUO

## Production of Lactic Acid from Milk Whey Using *Lactobacillus helveticus* in Continuous Culture

Lauris Urribarrí<sup>1</sup>, Alex Vielma<sup>2</sup>, Gisela Paéz<sup>2</sup>, José Ferrer<sup>2</sup>, Zulay Mármol<sup>2</sup> y Eduardo Ramones<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Química, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia. Apartado 526. Maracaibo 4001-A, Edo. Zulia, Venezuela. E-mail: lkurribarrí@hotmail.com. <sup>2</sup>Departamento de Ingeniería Bioquímica, Escuela de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, Universidad del Zulia, Apartado 526. Maracaibo 4001-A, Edo. Zulia, Venezuela.

### RESUMEN

Se estudió el cultivo continuo de la bacteria *Lactobacillus helveticus* ATCC 8018 en suero de leche desproteínizado y suplementado con 20 g/L de extracto de levadura y 10 g/L de peptona tripsica de caseína, como una función de la tasa de dilución, (D) a pH 5,9 y temperatura de 40°C, condiciones adecuadas de crecimiento del microorganismo previamente determinadas en cultivo por carga. Se utilizó un biorreactor BioFlo 4000 con un volumen de trabajo de 4 L y controles automáticos de los flujos de alimentación, extracción, temperatura, pH y velocidad de agitación. La tasa de dilución se varió entre 0,05 y 0,4 h<sup>-1</sup>. Se caracterizó el suero de leche, determinando su contenido de lactosa, nitrógeno, proteínas, fósforo y pH. A partir del cultivo continuo se determinó el valor de la tasa específica de crecimiento máximo, ( $\mu_{max} = 0,469 \pm 0,012 \text{ h}^{-1}$ ), la constante específica de consumo de sustrato, ( $K_s = 0,064 \pm 0,004 \text{ Kg/m}^3$ ), y el rendimiento real ( $Y_c = 0,759 \pm 0,061 \text{ kg de biomasa producido/ kg de lactosa consumido para crecimiento}$ ). La máxima concentración de biomasa y ácido láctico fue de 55 y 10,97 kg/m<sup>3</sup> respectivamente y se alcanzaron a  $D = 0,1 \text{ h}^{-1}$ . La máxima productividad de biomasa y ácido láctico fue 6,2 y 1,83 kg/m<sup>3</sup>.h respectivamente a  $D = 0,2 \text{ h}^{-1}$ . Estos resultados revelan y sugieren el potencial uso del lactosuero como sustrato para bacterias homolácticas.

**Palabras clave:** Suero de leche, *Lactobacillus helveticus*, cultivo continuo, ácido láctico.

### ABSTRACT

The continuous culture of the bacterium *Lactobacillus helveticus* ATCC 8018 was studied on deproteinized whey supplemented with 20 g/L yeast extract and 10 g/L tryptose peptone as a function of the dilution rate, (D) at pH 5.9 and temperature of 40°C, suitable conditions previously determined from batch culture. A biorreactor BioFlo 4000 was used with a work volume of 4 L and automatic controls of the feeding and extraction flows, temperature, pH and speed of agitation. The dilution rate was varied between 0.05 and 0.4 h<sup>-1</sup>. The whey was characterized, and its contents of lactose, nitrogen, proteins, phosphorus and pH, evaluated. The maximum specific growth rate ( $\mu_{max} = 0.469 \pm 0.012 \text{ h}^{-1}$ ), the saturation constant ( $K_s = 0.064 \pm 0.004 \text{ Kg/m}^3$ ) and the true yield ( $Y_c = 0.759 \pm 0.061 \text{ Kg of biomass produced/Kg of lactose consumed for growth}$ ) were determined from the continuous culture experiments. The maximum concentrations of biomass and lactic acid were 55 and 10.97 kg/m<sup>3</sup> at  $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$ , respectively. The maximum productivities of biomass and lactic acid were 6.2 and 1.83 kg/m<sup>3</sup>.h, respectively at  $D = 0.2 \text{ h}^{-1}$ . These results reveal and suggest the potential use of whey as a substrate for homolactic bacteria.

**Key words:** Whey, *Lactobacillus helveticus*, continuous culture, lactic acid.

### INTRODUCCIÓN

La preocupación pública por el control de la polución ambiental ha incitado la búsqueda de la más conveniente, económica y eficiente forma de aprovechamiento de los subproductos de la industria láctea, antes de ser desechados [5, 13].

El suero de leche es el subproducto más abundante de la industria láctea, es el residual obtenido de la manufactura del queso. Este subproducto es de difícil aceptación en el mercado, ya que sus características no lo hacen apto para su comercialización directa como suero líquido [12]. Debido a esto, el lactosuero se trata mediante técnicas que permiten la extracción de sus componentes, tales como: la lactosa (3,3 - 6,0%) y proteínas (0,32 - 0,7%), que constituyen fuentes potenciales para la alimentación humana; sin embargo, sólo una parte del suero se utiliza para estos fines, ya que la mayor parte del lactosuero se convierte en un efluente altamente contaminante cuando se vierte a los cuerpos de agua, debido a su gran demanda biológica y química de oxígeno [10, 12].

Los procesos de bioconversión surgen como una alternativa para el aprovechamiento de este desecho como sustrato para el crecimiento de microorganismos capaces de producir sustancias, como el ácido láctico, ampliamente usado en la industria alimenticia, textil, farmacéutica y cosmética [10, 11, 15].

Entre los microorganismos empleados para la producción de ácido láctico [1, 8, 16], el *Lactobacillus helveticus* ATCC 8018, consume los nutrientes presentes en el suero, principalmente la lactosa, produciendo además del ácido láctico pequeñas trazas de productos volátiles como ácido acético y dióxido de carbono, siendo capaz de convertir el 85 % de la fuente de carbono suministrada en ácido láctico [3].

La producción de ácido láctico y la determinación de los parámetros de crecimiento de *Lactobacillus helveticus* en cultivo continuo utilizando la lactosa del suero de leche como sustrato son los principales objetivos de esta investigación.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Microorganismo

El microorganismo utilizado en la presente investigación fue la bacteria *Lactobacillus helveticus* ATCC 8018. Esta se obtuvo de la American Type Culture Collection (ATCC), activada y mantenida en tubos de cultivo de 25x150 mm (200 g/L de leche descremada, 5 g/L de extracto de levadura, 200 mL/L de jugo de tomate a pH 7 y completado con agua destilada [4]). Una vez sembrados, los tubos se incubaron aeróbicamente durante un lapso de 2 a 3 días a 37°C y posteriormente se almacenaron a 4°C hasta su utilización.

### Suero de leche

El suero de leche utilizado fue suministrado por la empresa VENELÁCTEOS ubicada en Santa Rosa de Agua en Maracaibo, Edo. Zulia, Venezuela. Se utilizó suero de leche ácido, proveniente de la última etapa de producción de queso ricota. Se caracterizó midiendo nitrógeno, proteínas, fósforo, lactosa y pH [2, 6].

### Desproteización y suplementación del suero de leche

Para desproteizar el suero de leche se le aplicó un tratamiento térmico, en un autoclave (Felisa, México D.F) a 115°C durante 20 minutos. Luego se enfrió durante 24 horas a 4°C, se decantó para remover las proteínas precipitadas y se filtró con tierra diatomeas en papel filtro Whatman N° 40 [9]. Posteriormente se suplementó con 20 g/L de extracto de levadura y 10 g/L de peptona tripsica de caseína [1, 9]. Todos los químicos utilizados como suplemento fueron de grado analítico. El pH se ajustó al valor deseado (5,9 o 6,8 según la fermentación a realizar) con HCl 10N y se esterilizó en un autoclave a 115°C durante 20 minutos.

### Métodos de análisis

**Nitrógeno:** El contenido de nitrógeno se determinó por el método de Kjeldahl [2].

**Proteínas:** El contenido de proteínas se determinó como el porcentaje de nitrógeno multiplicado por el factor 6,38 [2].

**Lactosa:** El contenido de lactosa se determinó utilizando el método espectrocolorimétrico de Dubois y colaboradores [6].

**Fósforo:** El contenido de fósforo se determinó mediante el método espectrocolorimétrico del molibdo-vanadato de amonio [2].

**Biomasa:** La concentración de biomasa en el medio se determinó turbidimétricamente, midiendo la absorbancia de la muestra en un Spectronic 20 a una longitud de onda de 490 nm [14].

**Ácido láctico:** La concentración de ácido láctico fue determinada por cromatografía en fase gaseosa, empleando un cromatógrafo Perkin Elmer, equipado con una columna capilar Carbowax, para ácidos grasos, de 30 m de longitud y 0,25 mm de diámetro. La temperatura en el puerto de inyección fue de 230°C, la del horno fue 137°C y la del detector fue 250°C [9]. Se empleó helio como gas portador a una presión de 5 psi. El volumen inyectado por análisis fue de 1 µL.

### Preparación del inóculo

Se preparó añadiendo a cada 100 mL de medio, 10 mL de medio con el microorganismo activo. Posteriormente, se incubó en una incubadora modelo INNOVA 4300 durante 12 horas, para garantizar el máximo crecimiento exponencial [9, 15].

### Cultivo por carga

Se realizaron cuatro cultivos por carga, por duplicado, a temperaturas de 40°C y 42°C y pH de 5,9 y 6,8 a 100 r.p.m, utilizando Tween 80 como antiespumante en una concentra-

ción de 1 g/L [9] en un fermentador New Brunswick Scientific, modelo BioFlo 4000. Para iniciar las fermentaciones se inoculó el medio de cultivo con un volumen igual al 10% del volumen de trabajo de 4 L. Se midió la concentración de biomasa, la concentración de lactosa y de ácido láctico, cada hora hasta alcanzar el máximo crecimiento logarítmico de biomasa, y así determinar las condiciones adecuadas de crecimiento del microorganismo para emplearlas en el cultivo continuo.

### Cultivo continuo

Establecidas las condiciones de operación a partir del cultivo por carga, se realizaron cinco (5) cultivos continuos por duplicado a tasas de dilución entre 0,05 y 0,40 h<sup>-1</sup>, en un fermentador New Brunswick Scientific, modelo BioFlo 4000. El pH 5,9 se controló automáticamente a través de la consola de control del fermentador, con soluciones de HCl y NaOH 10 N, suministradas por dos bombas peristálticas del equipo. La temperatura se mantuvo constante a 40°C y la agitación en 100 r.p.m. Se utilizó un volumen de trabajo de 4 L con un inóculo del 10%.

Inicialmente se operó como un cultivo por carga; alcanzada la fase de crecimiento exponencial (8 horas después de la inoculación) se comenzó a bombear medio fresco al fermentador y a extraer el producto obtenido.

Una vez alcanzado el estado estacionario, donde la concentración de biomasa es constante (aproximadamente al transcurrir 3 veces el tiempo de retención), se midió la concentración de biomasa, lactosa y ácido láctico finales.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Composición del suero de leche

La caracterización del suero de leche fresco y desproteínizado se presenta en la TABLA I.

Se observa un ligero incremento en la concentración de lactosa y fósforo una vez efectuada la desproteínización, mientras que el porcentaje de nitrógeno y proteínas disminuyeron en un 42,86% y 43,28%, respectivamente. Los valores obteni-

dos están dentro de los rangos aceptables para suero de leche [10] y además resultaron similares a los reportados por Jakymec y col. [9] y Quintero y col. [15] en los que se utilizó tratamiento termo-ácido.

### Cultivo por carga

En los cultivos por carga se observó fase de adaptación rápida, como consecuencia de la adecuación previa del inóculo al medio. A pH 5,9 y temperaturas de 40 y 42°C, el cultivo creció exponencialmente de 6 a 7 horas, mientras que a pH 6,8 y temperaturas de 40 y 42°C la duración de esta fase fue de 5 horas (FIGS. 1 a 4).

En la TABLA II, se reportan los valores de la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), determinados a partir de la pendiente de la curva logarítmica de la biomasa contra el tiempo en la región de crecimiento exponencial, a cada una de las condiciones estudiadas. El mayor valor de velocidad específica de crecimiento fue 0,376 h<sup>-1</sup> a las condiciones de pH 5,9 y temperatura 40°C; los valores de velocidad específica de crecimiento obtenidos indican que el pH es el factor determinante para el crecimiento del microorganismo.

En el cultivo por carga a pH 5,9 y temperatura 40°C se detectó ácido láctico, siendo la mayor concentración obtenida de 13,02 kg/m<sup>3</sup>. La máxima velocidad específica de crecimiento y la concentración de ácido láctico obtenidas definen a estas condiciones como las adecuadas para utilizarlas en el cultivo continuo.

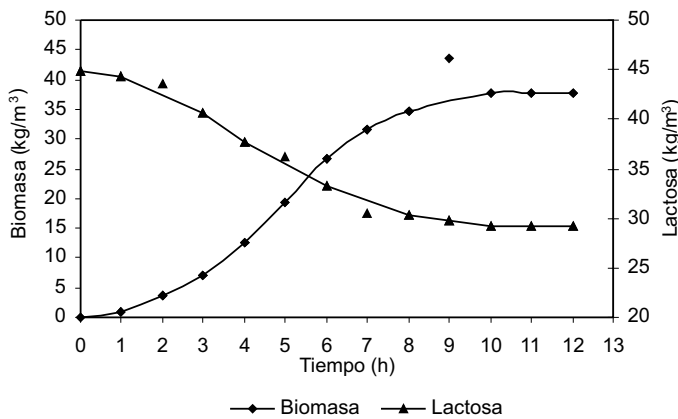
En la TABLA III, se reportan las concentraciones y productividades de ácido láctico en cultivo por carga para las condiciones que se consideraron adecuadas para el crecimiento del microorganismo en este y otros estudios.

Puede observarse que la concentración de ácido láctico producida en este estudio, 13,02 kg/m<sup>3</sup>, usando *Lactobacillus helveticus*, fue superior a la obtenida por Jakymec y col. [9], 1,65 kg/m<sup>3</sup>, utilizando *Lactobacillus bulgaricus*, considerado como el mayor productor de ácido láctico [3, 7], tal diferencia es explicable por la falta de control del pH en este último trabajo, ya que es sabido que los productos de las fermentaciones promueven condiciones adversas que inhiben las funcio-

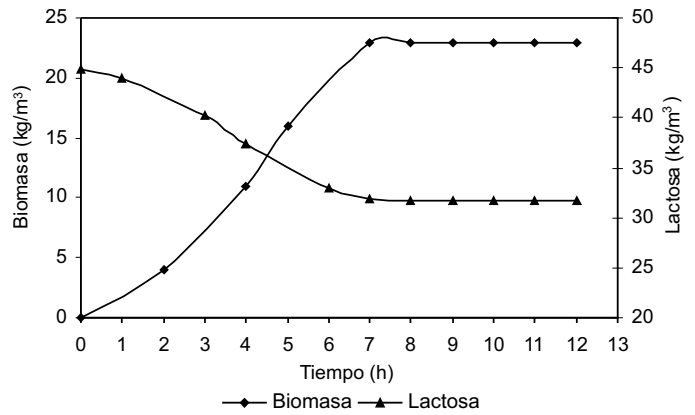
TABLA I  
CARACTERIZACIÓN DEL SUERO DE LECHE

Parámetros	Suero de leche fresco		Suero de leche desproteínizado*	
	X±S		X±S	
Lactosa (kg/m <sup>3</sup> )	44,20	0,1290	44,93	0,1290
Nitrógeno (%)	0,21	0,0050	0,12	0,0104
Proteínas (%)	1,34	0,0032	0,76	0,0048
Fósforo (%)	0,34	0,0221	0,35	0,0010
pH	5,45	0,0023	5,97	0,0098

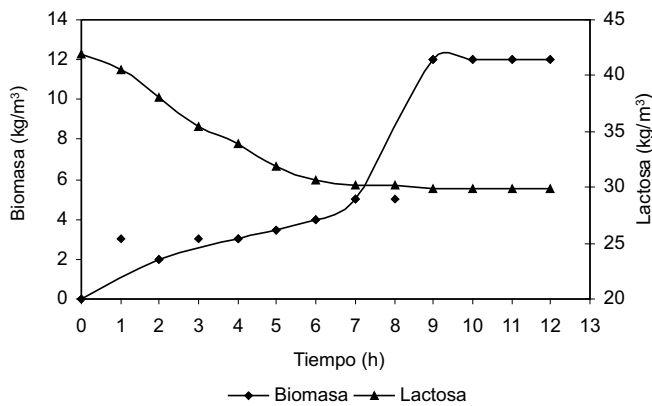
X: valor promedio. \*Suplementado y ajustado su pH a 5,9.



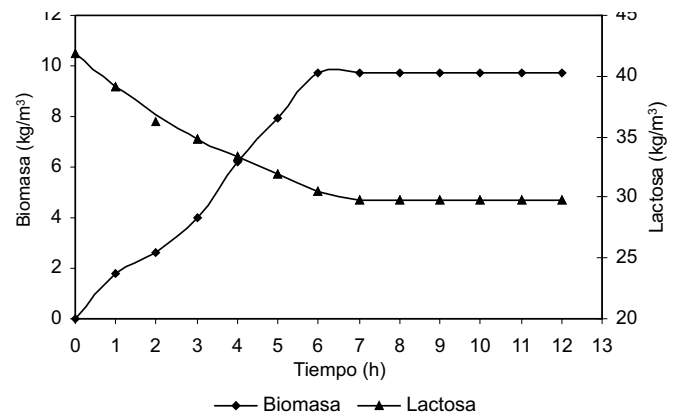
**FIGURA 1. CRECIMIENTO EN CULTIVO POR CARGA DE *Lactobacillus helveticus* EN SUERO DE LECHE A pH 5,9 Y T 40°C.**



**FIGURA 2. CRECIMIENTO EN CULTIVO POR CARGA DE *Lactobacillus helveticus* EN SUERO DE LECHE A pH 5,9 Y T 42°C.**



**FIGURA 3. CRECIMIENTO EN CULTIVO POR CARGA DE *Lactobacillus helveticus* EN SUERO DE LECHE A pH 6,8 Y T 40°C.**



**FIGURA 4. CRECIMIENTO EN CULTIVO POR CARGA DE *Lactobacillus helveticus* EN SUERO DE LECHE A pH 6,8 Y T 42°C.**

nes de los microorganismos. Por otro lado, la productividad de ácido láctico en este estudio resultó comparable con la reportada por Roy y col. [16], quienes trabajaron a igual pH y temperatura de 42°C.

### Cultivo continuo

Se realizaron los cultivos continuos, variando la tasa de dilución (D) y manteniendo constante la concentración inicial de lactosa. En las FIGS. 5 y 6 se observan la concentración y productividad de biomasa, y la concentración y la productividad del ácido láctico, respectivamente, para cada una de las tasas de dilución empleadas (entre 0,05 y 0,4 h<sup>-1</sup>). La concentración de la biomasa en el estado estacionario aumenta progresivamente a medida que aumenta la tasa de dilución hasta D= 0,1 h<sup>-1</sup>, alcanzándose la máxima concentración de biomasa de 55 kg/m<sup>3</sup> y ácido láctico 10,97 kg/m<sup>3</sup> para luego caer rápidamente hasta alcanzar la tasa de lavado (0,47 h<sup>-1</sup>). La máxima productividad de biomasa y ácido láctico fue 6,2 y 1,83 kg/m<sup>3</sup>.h, respectivamente a las 0,2 h<sup>-1</sup>, por lo cual se consideró la tasa de dilución óptima.

El rendimiento celular (Y<sub>c</sub>) se obtuvo a partir de la ecuación que describe el balance de sustrato en el estado estacionario [14]. El rendimiento Y<sub>c</sub> (FIG. 7), representa la cantidad de sustrato que el microorganismo empleó para crecimiento y no para funciones de mantenimiento, siendo éste 0,759 ± 0,01 kg biomasa/kg sustrato.

Los parámetros de crecimiento del *Lactobacillus helveticus* se muestran en la TABLA IV y se calcularon aplicando el modelo del quimiostato con requerimiento de energía de mantenimiento, y la linearización de Lineweaver - Burke [14] (FIG. 8). El valor obtenido de K<sub>s</sub> supera en un orden de magnitud al reportado por Jakymec y col. [9] (0,00127m<sup>3</sup>/kg-h), lo que indica que el *Lactobacillus helveticus* tiene mayor afinidad por el sustrato utilizado (lactosa) que el *Lactobacillus bulgaricus*.

### CONCLUSIONES

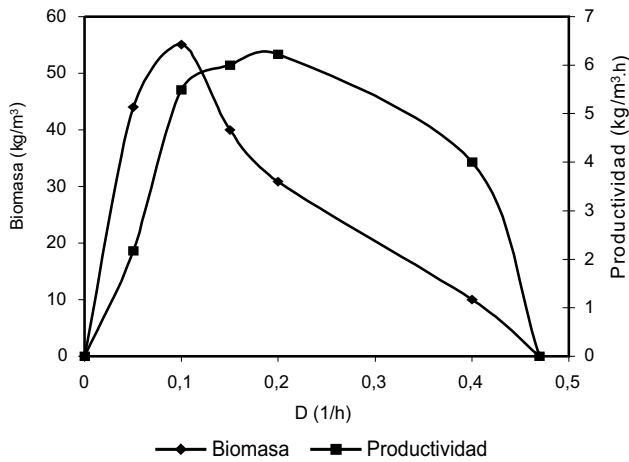
El suero de leche es un sustrato adecuado para la producción de ácido láctico utilizando *Lactobacillus helveticus*, obteniéndose altos valores de rendimiento real (Y<sub>c</sub>= 0,759± 0,061 kg biomasa producidos/kg de lactosa consumidos para crecimiento).

**TABLA II**  
**VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO ( $\mu$ ) EN CULTIVO POR CARGA DE *Lactobacillus helveticus* EN SUERO DE LECHE A DIFERENTES CONDICIONES DE pH Y TEMPERATURA**

pH	T (°C)	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )		r
		X±S		
5,9	40	0,376	0,002	0,959
	42	0,371	0,001	0,921
6,8	40	0,319	0,015	0,949
	42	0,336	0,003	0,973

**TABLA III**  
**CONCENTRACIÓN Y PRODUCTIVIDAD DE ÁCIDO LÁCTICO EN CULTIVO POR CARGA**

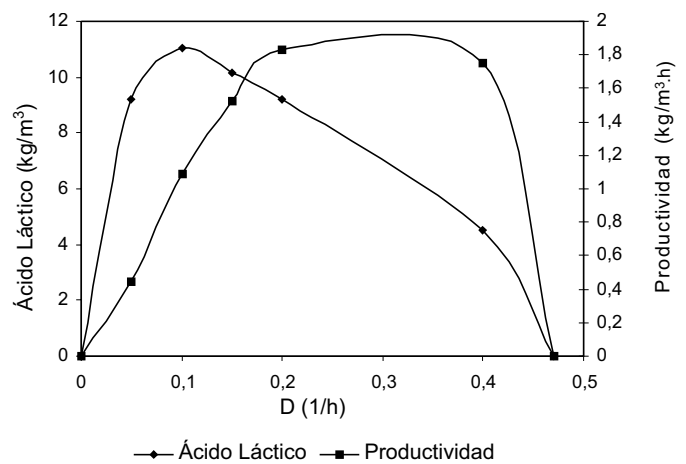
Concentración (kg/m <sup>3</sup> )	Productividad (kg/m <sup>3</sup> .h)	Microorganismo	Fuente
13,02 <sup>(a)</sup>	2,17 <sup>(b)</sup>	<i>Lactobacillus helveticus</i>	Este estudio
—	2,70 <sup>(c)</sup>	<i>Lactobacillus helveticus</i>	Roy y col. [16]
1,65 <sup>(d)</sup>	—	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Jakymec y col. [9]



**FIGURA 5. EFECTO DE LA TASA DE DILUCIÓN EN LA CONCENTRACIÓN Y PRODUCTIVIDAD DE BIOMASA EN EL ESTADO ESTACIONARIO DURANTE EL CULTIVO CONTINUO UTILIZANDO *Lactobacillus helveticus* EN SUERO DE LECHE A pH 5,9 Y T 40°C.**

Las condiciones óptimas para el crecimiento del *Lactobacillus helveticus* son a 40°C y a pH 5,9. A estas condiciones se obtuvo una concentración y una productividad de ácido láctico de 13,02 kg/m<sup>3</sup> y 2,17 kg/m<sup>3</sup>.h, respectivamente.

El comportamiento del cultivo continuo con respecto a la tasa de dilución evidencia el efecto de la energía de mantenimiento a bajas tasas de dilución. El máximo valor de productividad de biomasa y de ácido láctico fue 6,2 kg /m<sup>3</sup>.h y 1,83 kg/m<sup>3</sup>.h respectivamente, se obtuvieron a una tasa de dilución óptima de 0,2 h<sup>-1</sup>. La máxima concentración de biomasa y ácido láctico en el estado estacionario fue 55 kg /m<sup>3</sup> y 10,97 kg/m<sup>3</sup> a



**FIGURA 6. EFECTO DE LA TASA DE DILUCIÓN EN LA CONCENTRACIÓN Y PRODUCTIVIDAD DE ÁCIDO LÁCTICO EN EL ESTADO ESTACIONARIO DURANTE EL CULTIVO CONTINUO UTILIZANDO *Lactobacillus helveticus* EN SUERO DE LECHE A pH 5,9 Y T 40°C.**

una tasa de dilución de 0,1 h<sup>-1</sup>. La máxima velocidad específica de crecimiento en cultivo continuo fue  $\mu_{\text{máx}} = 0,469 \text{ h}^{-1}$ .

La bacteria *Lactobacillus helveticus* presenta una gran afinidad por el suero de leche dado el valor de  $K_s = 0,064 \pm 0,004 \text{ kg/m}^3$  obtenido del cultivo continuo.

#### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CONDES) por el financiamiento de dicha investigación.

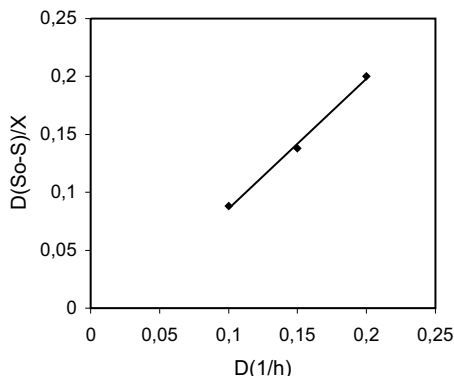


FIGURA 7. CÁLCULO DEL COEFICIENTE DE RENDIMIENTO REAL (Yc).

TABLA IV  
PARÁMETROS DE CRECIMIENTO DE *Lactobacillus helveticus* EN CULTIVO CONTINUO A pH 5,9 Y TEMPERATURA 40°C

Ks (m <sup>3</sup> /kg-h)	μ <sub>máx</sub> (h <sup>-1</sup> )	r
0,064 0,004	0,469 ± 0,012	0,997

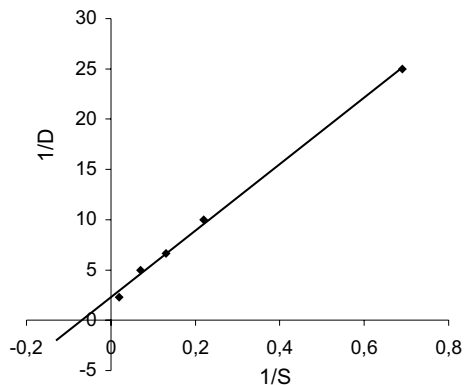


FIGURA 8. CÁLCULO DE LA VELOCIDAD ESPECÍFICA MÁXIMA Y DE LA CONSTANTE Ks EN CULTIVO CONTINUO EN SUERO DE LECHE A pH 5,9 Y T 40°C.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] AMRANE, A.; PRIGENT Y. "Influence of an initial addition of lactic acid on growth, acid production and their coupling for batch culture of *L. helveticus*". **Bioprocess Eng.** 19 (4): 307-312. 1997.

[2] ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (A.O.A.C). "Official Methods of Analysis". 13th Ed. 125 pp. 1990.

[3] BROCK, T.D.; MADIGAN, M.T. **Biology of microorganisms**. Prentice- Hall. 6th Ed. Englewood Cliffs, N.J. 322 pp. 1991.

[4] GHERNA, R.; PIENTA, P.; COTE, R. Eds. **American Type Culture Collection (ATCC)**. "Catalogue of Bacteria & Bacteriophages". Staff. 18th Ed. Maryland. 694 pp. 1992.

[5] CUDDY, M.E.; ZALL, R.R. "Performance of lipid-dried acid whey in extruded and baked product". **Food Technol.** (1): 54-59. 1982.

[6] DUBOIS, M.; GILLES, K.; HAMILTON, J.; REBERS, P.; SMITH, F. "Colorimetric method for determination of sugars and related substances". **Anal. Chem.** 28(3): 350-356. 1956.

[7] FRAZIER, W.C. **Microbiología de los alimentos**. 2a Ed. Editorial Acribia. España. 512 pp. 1976.

[8] GÄTJE, G.; GOTTSCHALK, G. "Limitation of growth and lactic acid production in batch and continuous culture of *Lactobacillus helveticus*". **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 34: 446-449. 1991.

[9] JAKYMEC, M.; MORAN, H.; PÁEZ, G.; FERRER, J.; MÁRMOL, Z.; RAMONES, E. "Cinética de la producción de ácido láctico por fermentación sumergida con lactosuero como sustrato". **Rev. Cient., FCV-LUZ**. XI(1): 53-59. 2001.

[10] JELEN, P. "Industrial whey processing technology: an overview". **J. Agric. Food Chem.** 27(4): 658-661. 1979.

[11] KONONOVICH, N. "Whey utilization and whey products". **J. Dairy Sci.** 62(7): 1149-1160. 1979.

[12] MARWAHA, S.S.; KENNEDY J.F. Review: "Whey pollution problem and potential utilization". **Int. J. Food Sci. Technol.** 23: 323-336. 1988.

[13] PETERSON, A.E.; WALKER, W.G.; WATSON, K.S. "Effect of whey applications on chemical properties of soils and crops". **J. Agric. Food Chem.** 27(4): 654-658. 1979.

[14] PIRT, S.J. **Principles of Microbe and Cell Cultivation**". Blackwell Scientific Publications. Oxford, U.K. 284 pp. 1985.

[15] QUINTERO, H.; RODRIGUEZ, M.; PÁEZ, G.; FERRER, J.; MÁRMOL, Z.; RINCÓN, M. "Producción continua de proteína unicelular (*K. fragilis*) a partir de suero de leche". **Rev. Cient., FCV-LUZ**. XI(2): 87-94. 2001.

[16] ROY, D.; GOULET, J.; LEDUY, A. "Batch fermentation of whey ultrafiltrate by *L. helveticus* for lactic acid production". **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 24 (3): 206-213. 1990.