



Producción biotecnológica de ácido láctico mediante homofermentación probiótica a partir de subproductos de la agroindustria

Biotechnical production of lactic acid by probiotic
homofermentation from agrobusiness byproducts

Over Ángelo Lemus Quintana

Médico Veterinario y Zootecnista
Instructor SENA
oalemus@misena.edu.co

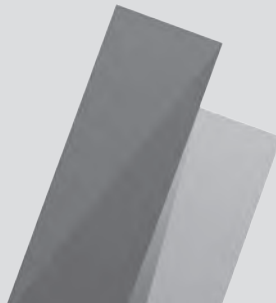
Colaboradores

Sergio Andrés Cabrera Navarro

Gestor Tecnoparque
scabreran@sena.edu.co

Semilleros de investigación del programa Tecnólogo en Acuicultura

Servicio Nacional de Aprendizaje
SENA Regional Tolima
Centro Agropecuario
La Granja, Espinal



Resumen

El ácido láctico es un ácido orgánico que se obtiene mediante un proceso biotecnológico de homofermentación probiótica, considerado de gran importancia en la industria farmacéutica, alimentaria, en la producción de polímeros biodegradables y en la acuicultura.

El proceso biotecnológico homofermentativo se convierte en una alternativa para la solución a las dificultades que se presentan en la producción acuícola, como son la alta conversión alimenticia de organismos hidrobiológicos, la alta presencia de lodos en los estanques, la variabilidad en la calidad del agua y el manejo sanitario que dan como resultado la baja rentabilidad del sector.

Se han realizado trabajos para obtener y cuantificar el ácido láctico de fermentos elaborado con subproductos de la agroindustria de alimentos (Rajarshi Biswas. 2005); basados en estos estudios se realizó la investigación de la producción biotecnológica de ácido láctico mediante homofermentación probiótica de sustratos ricos en carbohidratos, proteínas y subproductos de la agroindustria, activado por medio de bacterias ácido lácticas y levaduras, en el Centro Agropecuario La Granja, de la Regional Tolima del SENA.

En la preparación del homofermento se empleó melaza de caña comercial, harina de soya, y lactosuero obtenido de la agroindustria de quesos, los cuales fueron inoculados. El proceso biotecnológico se llevó a cabo en birreactores con agitación cada 12 horas a temperatura ambiente, durante un período de 20 días.

Para determinar las concentraciones de ácido láctico existen varios métodos, como el de destilación reactiva (Perdomo Hurtado, F. P. 2007); y por titulación (Rajarshi Biswas. 2005), este último, utilizado en la presente investigación.

Los resultados obtenidos en laboratorio demostraron altas concentraciones de ácido láctico en el homofermento elaborado a partir del lixiviado de soya, igual a 19.26 gramos de ácido láctico por litro de fermento. Finalmente, el análisis estadístico de varianza reveló que a un nivel de significancia $p < 0,005$ existen diferencias entre las medias analizadas. Se realizó además, el análisis del proceso biotecnológico en el homofermento de campo y se encontró una concentración de 20,43 gramos de ácido láctico por litro de fermento.

Palabras clave:

Biotecnología, ácido láctico, homofermentación, probióticos, prebióticos y fermentación láctica.

Abstract

Lactic acid is an organic acid which is obtained by a biotechnological process of probiotic homofermentation, considered of great importance in the pharmaceutical, food industry, in the production of biodegradable polymers and in aquaculture.

The homofermentative bioprocess becomes an alternative for the solution to the difficulties encountered in aquaculture production such as high feed conversion of aquatic organisms,

the high presence of sludge in ponds, variability in water quality and health management resulting in low profitability of the sector.

Work has been done to obtain and quantify lactic acid ferments, made with products of agribusiness food (Rajarshi Biswas. 2005); Based on these studies investigating the biotechnological production of lactic acid was performed using probiotic homofermentation of substrates rich in carbohydrates, proteins and by-products of agribusiness, activated by lactic acid bacteria and yeasts in the La Granja Agricultural Center, SENA, Tolima.

In preparing the homofermento, commercial cane molasses, soy flour, whey obtained was used and agribusiness cheese, which were inoculated. The bioprocess was carried out in bioreactors with stirring every 12 hours at room temperature, for a period of 20 days. To determine the concentrations of lactic acid, there are several methods, such as reactive distillation (Perdomo Hurtado, F. P. 2007); and by titration (Rajarshi Biswas. 2005), the latter used in this investigation.

The laboratory results showed high concentrations of lactic acid in the homofermento leachate produced from soy, equal to 19.26 grams of lactic acid per liter of ferment. Finally the statistical analysis of variance revealed that at a significance level of $p < 0.005$ differences between means tested. They are also conducted, analysis bioprocess in homofermento field and a concentration of 20.43 grams of lactic acid per liter of ferment was found.

Keywords:

Biotechnology, lactic acid, homofermentation, probiotics, prebiotics and lactic fermentation.

Introducción

La biotecnología se define como “la aplicación de procedimientos científicos para la transformación de materias primas por agentes biológicos para producir bienes y servicios” (Statistical Definition of Biotechnology – OECD, 2005); basados en este concepto, la producción biotecnológica de ácido láctico es importante para la producción no contaminante por las industrias farmacéutica, alimenticia, textil y de plásticos (Iniguez Arichavala, A.R, Castillo Molina, A. 2011). Mediante procesos biotecnológicos homofermentativos con bacterias lácticas más eficientes, no contaminantes y amigables con el medio ambiente, se promueve la producción y rentabilidad en el sector piscícola y la industria a nivel mundial.

La biotecnología con la utilización de microorganismos permite realizar homofermentos que hacen más eficiente y rentable

la producción de sustancias o ácidos orgánicos de interés económico y ambiental. Los probióticos desarrollados en un medio con nutrientes obtenidos de subproductos de la agroindustria de bajo costo, y susceptibles de ser cultivados a gran escala permite un proceso biotecnológico eficiente.

La investigación adelantada en el Centro Agropecuario La Granja se basa en un proceso biotecnológico mediante la homofermentación, utilizando probióticos como levaduras, hongos unicelulares, anaerobios facultativos y bacterias ácido lácticas, unicelulares procariontes y anaerobias facultativas de cultivos comerciales que fabrican un solo producto orgánico como es el ácido láctico.

La finalidad de muchas investigaciones ha sido recuperar el ácido láctico a partir de caldos de fermentación (Von Frieling, P. A,

Schu" Gerl, K. 2013); en este caso se implementó un proceso biotecnológico mediante un homofermento probiótico con subproductos de la agroindustria para la producción piscícola y

mediante este fermento a base de lactosuero y/o agua, producir, obtener, y cuantificar, el ácido láctico para su aplicación en la industria y en la acuicultura.

Biorreactor homofermentativo

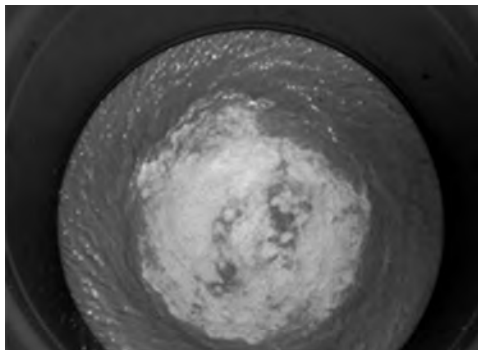


Figura: El autor

Agitación del homofermento

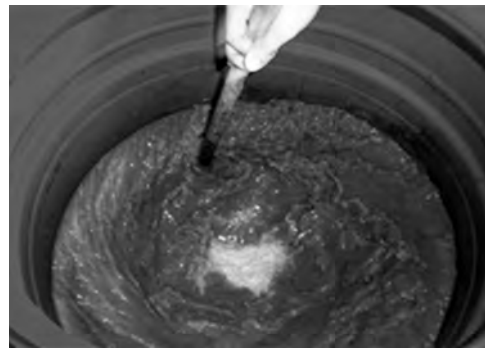


Figura: El autor

Titulación del ácido láctico



Figura: El autor

Investigador y colaborador



Figura: El autor

En la producción biotecnológica de ácido láctico mediante homofermentación probiótica, el ácido orgánico producido se denomina ácido 2 - hidroxipropanoico y está formado por los grupos funcionales alcohol y carboxilo, conformando un carbono asimétrico que le confiere su actividad óptica. Esta producción biotecnológica está basada en la homofermentación probiótica de sustratos ricos en carbohidratos, como la melaza de caña y el lactosuero, subproductos de la agroindustria, que por medio de bacterias ácido lácticas y levaduras, producen un ácido orgánico de calidad, amigable con el medio ambiente y permitiendo una oferta de productos piscícolas de alta calidad nutricional y sanitaria, que llegan al consumidor final, cumpliendo con las buenas prácticas de producción y la inocuidad del producto final; además, permite disminuir el uso de medicamentos e insumos para

su manejo, obteniendo mayor productividad y haciéndola más competitiva en el mercado. Los microorganismos utilizados en la producción de ácido láctico, son los lactobacilos (también *Lactobacillus* o bacterias del ácido lácticas), género de bacterias Gram positivas anaerobias aerotolerantes, denominadas así debido a que la mayoría de sus miembros convierten la lactosa que se encuentra en el lactosuero y los azúcares que están en la melaza, en un ácido orgánico como el láctico.

Habitualmente son benignas e incluso necesarias, habitan en el cuerpo humano y en el de otros animales; por ejemplo, están presentes en el tracto gastrointestinal y en la vagina. Muchas especies son importantes en la descomposición de la materia vegetal. La producción de este ácido orgánico, hace que su ambiente sea ácido, lo cual inhibe el crecimiento de bacterias

dañinas de la salud. Algunas especies de *Lactobacillus* se usan industrialmente para la producción de yogurt y de otros alimentos fermentados; algunas bebidas contienen *Lactobacillus* como suplemento dietético. Muchos lactobacilos son los únicos seres vivos que no requieren hierro para vivir y tienen una tolerancia extremadamente alta al peróxido de hidrógeno; estos microorganismos presentan la característica inusual de operar usando un metabolismo homofermentativo (es decir, sólo producen ácido láctico a partir de azúcares) y son aerotolerantes a pesar de la ausencia de cadena respiratoria.

Las levaduras son hongos microscópicos unicelulares que son importantes por su capacidad para realizar la descomposición mediante fermentación de diversos cuerpos orgánicos, principalmente los azúcares o hidratos de carbono, produciendo distintas sustancias. Aunque

en algunos textos de botánica se considera que las levaduras 'verdaderas' pertenecen sólo a la clase Ascomycota; desde una perspectiva microbiológica se ha denominado levadura a todos los hongos con predominio de una fase unicelular en su ciclo de vida, incluyendo a los hongos basidiomicetes.

A veces suelen estar unidos entre sí formando cadenas, producen en investigación. Esta levadura tiene la facultad de crecer en forma anaerobia realizando fermentación alcohólica; se reproducen asexualmente por gemación o brotación y sexualmente mediante ascosporas o basidioesporas.

Durante la reproducción asexual, una nueva yema surge de la levadura madre cuando se dan las condiciones adecuadas, la yema se separa de la madre al alcanzar un tamaño adulto.

Las materias primas o prebióticos utilizadas en el

proceso biotecnológico para la producción de ácido láctico, son una mezcla de nutrientes que en las concentraciones adecuadas y en las condiciones físicas óptimas, permiten el crecimiento de los microorganismos o probióticos; sin embargo, para que las bacterias ácido lácticas crezcan adecuadamente en un homofermento probiótico deben reunir una serie de condiciones como temperatura, grado de humedad, y además de contener los nutrientes y los factores de crecimiento necesarios, estar exento de todo microorganismo contaminante.

El lactosuero para el proceso biotecnológico se obtuvo de la unidad de agroindustria, que es un líquido obtenido en el proceso de fabricación del queso; sus características corresponden a un líquido fluido de color verdoso amarillento, turbio, de sabor fresco, débilmente dulce, de carácter ácido, con

un contenido de nutrientes o extracto seco del 5,5% al 7% proveniente de la leche.

La melaza o miel de caña utilizada que se adquirió del comercio, es un producto líquido y espeso derivado de la caña de azúcar, y en menor medida de la remolacha azucarera, obtenido del residuo restante en las cubas de extracción de los azúcares. Su aspecto es muy similar al de la miel aunque de color parduzco muy oscuro, prácticamente negro, el sabor es dulce y ligeramente similar al del regaliz, con un pequeño regusto amargo. Nutricionalmente presenta un altísimo contenido en hidratos de carbono, además de vitaminas del grupo B y abundantes minerales, entre los que destacan hierro, cobre y magnesio; su contenido de agua es bajo.

La soja o soya (*Glycinemax*), adquirida en el comercio, es una especie de la familia de las leguminosas (*Fabaceae*)

cultivada por sus semillas, de medio contenido en aceite (planta oleaginosa) y alto de proteína. El grano de soja y sus subproductos, aceite y harina de soja, principalmente; se utilizan en la alimentación humana y del ganado; se comercializa en el mundo por sus múltiples usos. El cultivo de soja, además de ser un factor muy valioso, ayuda al ser humano si se efectúa en el marco de un cultivo por rotación estacional, ya que fija el nitrógeno en los suelos agotados tras haberse practicado otros cultivos intensivos. El nombre de género *Glycine* fue introducido originalmente por Linnaeus (1737) en la primera edición de *Genera Plantarum*. La palabra *glycine* deriva del griego -*glykys* (dulce) y se refiere, probablemente al dulzor de los tubérculos comestibles con forma de pera (apios en griego) producidos por la enredadera leguminosa o herbácea trepadora, *Glycine*

apios, que ahora se conoce como *Apios americana*.

La viabilidad de la producción biotecnológica de ácido láctico mediante homofermentación probiótica está garantizada, ya que las materias primas utilizadas son de bajo costo, presentan bajos niveles de contaminantes, rápidas tasas de producción, alto rendimiento, subproductos de la agroindustria formados, capacidad para ser fermentados con un mínimo pre-tratamiento y disponibilidad durante todo el año (El autor, 2014).

La homofermentación ácido láctica, es de importancia en la industria para la producción de ácido láctico, el cual tiene varios usos; los lactatos de hierro se emplean en el tratamiento de anemias, los de calcio para aumentar el nivel de calcio y los de sodio en la industria del plástico. Los microorganismos que llevan a cabo esta fermentación se

denominan 'fermentos lácticos' o 'bacterias del ácido lácticas', que se produce mediante la reacción: lactosa + 2 H₂O ----> 2 glucosa ----> 4 ácido láctico + ATP.

1. Diseño Metodológico

1. Alistamiento materiales para preparar un litro de cultivo



Figura: El autor

Biorreactores para la producción de ácido láctico.

Homofermento probiótico de campo estandarizado según protocolo establecido.



Figura: El autor

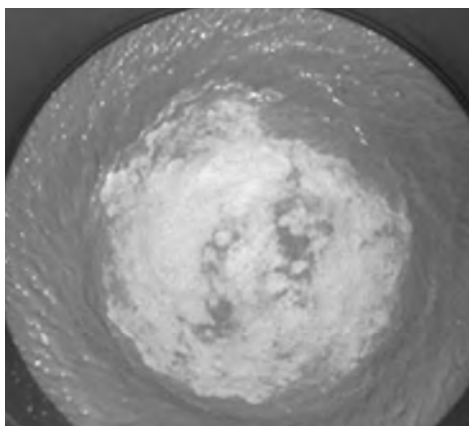


Figura: El autor

.....
Producción biotecnológica de ácido láctico mediante homofermentación probiótica a partir de subproductos de la agroindustria. O. Lemus, S. Cabrera Navarro, Semilleros de investigación del programa Tecnólogo en Acuicultura

Producción biotecnológica de ácido láctico prototipo para homofermento probiótico de 1 litro en el laboratorio

1. Alistamiento materiales para preparar un litro de cultivo



Figura: El autor

a. Melaza 20 gramos, soya 20 gramos, levadura 1 gramo, lactosuero 1 litro, cultivo láctico.

2. Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121 grados Celsius, la mezcla sin los cultivos, se esterilizan los 3 grupos:

Grupo 1: Leche de soya

Grupo 2: Sólido (bagazo) de soya

Grupo 3: Harina de soya

El homofermento de campo Grupo 4 no se esteriliza.



Figura: El autor

3. Observación de microorganismos de los cultivos con tinción de Gram.

Levadura = Agua destilada más levadura 0,1 gramo
Lactobacillus y estreptococos

4. Cantidad de cultivo para inocular los homofermentos de laboratorio.
Cultivo láctico, el contenido de cultivo pesó 1.580 gramos.



Figura: El autor

Determinación de la concentración de ácido láctico - análisis de pH con potenciómetros.

Fermento probiótico de campo: Olor:
etanol fuerte, pH: 3,5

1. Cultivo soya molida (harina)
Olor: leve a etanol, pH: 4,070
2. Cultivo sólido (bagazo de soya)
Olor: etanol leve, pH: 4,047
3. Cultivo líquido (leche soya) Olor:
etanol leve, pH: 4,022



Figura: El autor

5. Homofermento probióticos de laboratorio y de campo.

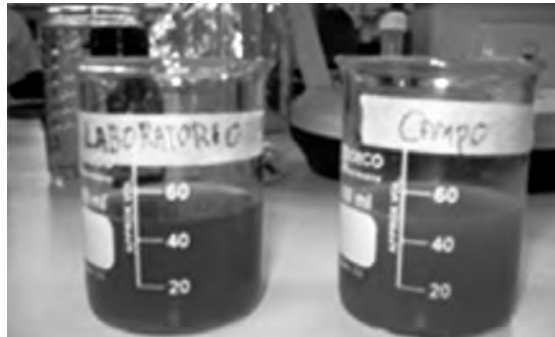


Figura: El autor

Determinación de la concentración de ácido láctico por titulación

1. Centrifugación de 50 mL de homofermento probiótico de campo y 50 mL del homofermento probiótico de laboratorio a 4.400 rpm por 15 minutos.

El homofermento de laboratorio presenta un mayor precipitado al centrifugar, lo que indica mayor biomasa probiótica.



Figura: El autor

2. El sobrenadante se transfiere a un beaker y se calienta a 80 grados centígrados por 5 minutos.



Figura: El autor

- | | |
|--|---|
| a. Fermento laboratorio líquido
(leche de soya), pH =
3,64 a 65 grados Celsius.
pH = 3,82 a 45 grados Celsius. | c. Fermento sólido (bagazo de soya),
pH = 3,97 a 27 grados Celsius. |
| b. Fermento de campo pH =
3,14 a 65 grados Celsius.
pH = 3,21 a 50 grados Celsius. | d. Fermento harina
pH = 3.95 a 27 grados Celsius. |

6. Cambios en los homofermentos probióticos después del calentamiento a 80 grados centígrados.



Figura: El autor

7. Se agregaron gotas $\text{Ca}(\text{OH})_2$ al 5% hasta llegar a pH de 7.

1. Fermento laboratorio líquido,
pH= 8,80
2. Fermento laboratorio sólido,
pH= 7,75
3. Fermento laboratorio harina,
pH= 7,53
4. Fermento de campo,
pH= 7,80



Figura: El autor

8. El sobrenadante se transfiere a un beaker y se calienta a 80 grados centígrados por 5 minutos.

- | | |
|---|--|
| a. Fermento laboratorio líquido
pH= 8,80, filtrado | b. Fermento laboratorio sólido
pH= 7,75, filtrado |
| c. Fermento laboratorio harina
pH= 7,53, filtrado | d. Fermento de campo
pH= 7,80, filtrado |

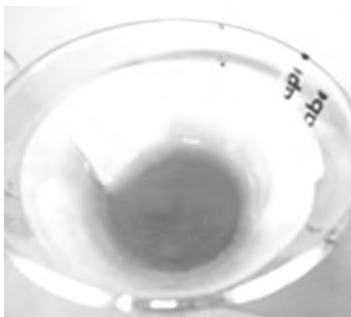


Figura: El autor

9. El precipitado en el papel filtro se disuelve en un frasco cónico, usando ácido clorhídrico al 1% normal.

- a. Precipitado laboratorio líquido pH= 4,98
- b. Precipitado laboratorio sólido = pH= 5,68
- c. Precipitado laboratorio harina pH= 6,06
- d. Precipitado de campo = pH= 5,98

10. Se centrifugó el precipitado disuelto en ácido clorhídrico.

- | | |
|---|---|
| a. Precipitado laboratorio líquido
pH= 4,98 | c. Precipitado laboratorio harina
pH= 6,06 |
| b. Precipitado laboratorio sólido =
pH= 5,68 | d. Precipitado de campo =
pH= 5,98 |



Figura: El autor

11. Titulación para determinar la concentración del ácido láctico del homofermento probiótico por titulación con bureta electrónica.

- a. Precipitado laboratorio líquido pH = 4,60
- b. Precipitado laboratorio sólido pH = 4,80

- c. Precipitado laboratorio harina pH = 5,08
- d. Precipitado de campo pH = 4,35

A. En un beaker se adiciona 5 mL de disolución de ácido láctico, se agrega 5 gotas de fenolftaleína y se coloca el potenciómetro para la determinación de pH hasta llegar a pH= 8.

- a. Precipitado laboratorio líquido ,pH = 5.32
NaOH utilizado 0, 1 normal = 2,14 a un pH = 8,13 (s°x) °1,8 g/l
S = volumen NaOH utilizado, $x = 2,14 \times 1,8 = 3,85$ g/l
- b. Precipitado laboratorio sólido, pH = 5,42
NaOH utilizado 0, 1 normal= 1,84 a un pH = 8,09 (s°x) °1,8 g/l
S = volumen NaOH utilizado, $x = 1,84 \times 1,8 = 3,312$ g/l
- c. Precipitado de laboratorio harina pH = 5,08
NaOH utilizado 0, 1 normal= 1,17 a un pH = 8,03 (s°x) °1,8 g/l
S= volumen NaOH utilizado, $x = 1,17 \times 1,8 = 2,106$ g/l
- d. Precipitado de campo, pH= 6,51
NaOH utilizado 0, 1 normal= 2,27 a un pH = 8.26 (s°x) °1,8 g/l
S = volumen NaOH utilizado, $x = 2,27 \times 1,8 = 4,086$ g/l

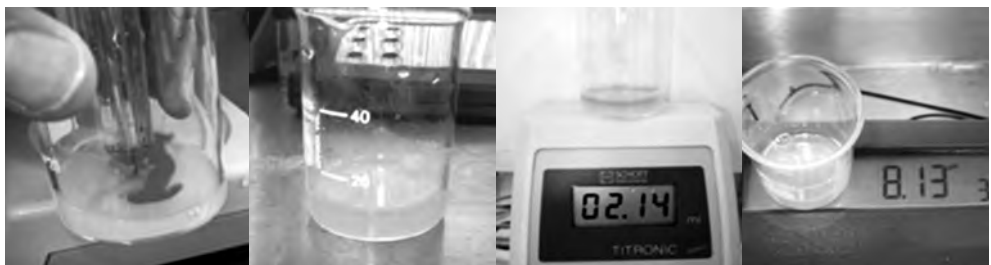


Figura: Titulación con NaOH al 0,1 normal

12. Subproductos de la extracción del ácido láctico.

Biomasa probiótica



Biomasa y filtrado probiótico



Biomasa probiótica



Figura: El autor

2. Resultados

1. Titulación para determinar concentración del ácido láctico del homofermento probiótico con bureta electrónica.

a. Precipitado de laboratorio líquido
pH = 4,60

b. Precipitado de laboratorio sólido
= pH = 4,80

c. Precipitado de laboratorio harina
pH = 5,08

d. Precipitado de campo
pH = 4,35

- En un beaker se adiciona 5 ml de disolución de ácido láctico, luego se agrega 5 gotas de fenolftaleína, se coloca el potenciómetro para la determinación de pH hasta llegar a pH = 8.

a. Precipitado laboratorio líquido,
pH = 5,32

NaOH utilizado 0,1 normal = 2,14
a un pH = 8,13

(S°x) °1,8 g/l

S = volumen NaOH utilizado,
 $x = 2,14 \times 5 \times 1,8 = 19,26 \text{ g/l}$
de ácido láctico

b. Precipitado de laboratorio sólido
(frijol entero), pH = 5,42
NaOH utilizado 0,1 normal = 1,84
a un pH = 8,09
(S°x) °1,8 g/l
S = volumen NaOH utilizado,
 $x = 1,84 \times 5 \times 1,8 = 16,56 \text{ g/l}$
de ácido láctico

c. Precipitado laboratorio harina
a pH = 5,08
NaOH utilizado 0,1 normal = 1,17
a un pH = 8,03
(S°x) °1,8 g/l
S = volumen NaOH utilizado,
 $x = 1,17 \times 5 \times 1,8 = 10,53 \text{ g/l}$
de ácido láctico

d. Precipitado de campo,
pH = 6,51
NaOH utilizado = 0,1 normal =
2,27 a un pH = 8,26
(S°x) °1,8 g/l
S = volumen NaOH utilizado, $x =$
 $2,27 \times 5 \times 1,8 = 20,43 \text{ g/l}$
de ácido láctico

3. Conclusiones

1. El precipitado del
homofermento probiótico de
laboratorio (líquido).

NaOH utilizado a 0,1 normal
= 2,14, a un pH = 8,13, (s°x)
1,8 g/l,

S = volumen NaOH utilizado.
 $x = 2,14 \times 5 \times 1,8 = 19,26 \text{ g/l}$,
es el de mayor contenido de
ácido láctico de las tres muestras
investigadas en laboratorio.

Homofermento de laboratorio

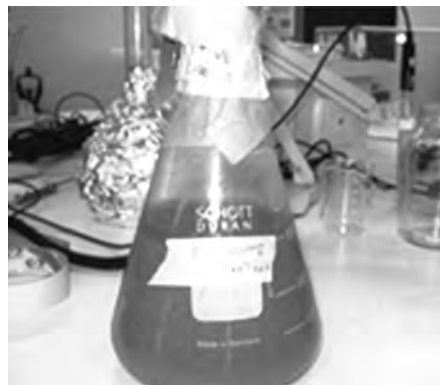


Figura: El autor

2. Precipitado homofermento probiótico de campo.

pH = 6,51, NaOH utilizado al 0,1 normal = 2,27, a un pH = 8.26 ($S^{\circ}x$) $^{\circ}1$, 8 g/l, S = Volumen NaOH utilizado.

$x = 2,27 \times 5 \times 1,8 = 20,43$ g/l, se obtuvo la mayor concentración de ácido láctico en campo comparada con los medios utilizados y estandarizados en laboratorio.

Filtrado homofermento de campo



Figura: El autor

Homofermento de campo



Figura: El autor

4. Recomendaciones

Se recomienda utilizar el protocolo establecido en el proceso biotecnológico del homofermento de campo con 20,43 gramos de ácido láctico por litro de fermento y el establecido en laboratorio (lixiviado de soya) con 19,26 gramos de ácido láctico por litro de fermento,

con iguales características en el proceso biotecnológico de homofermentación.

Homofermento probiótico utilizado y estandarizado durante tres años de trabajo en campo.

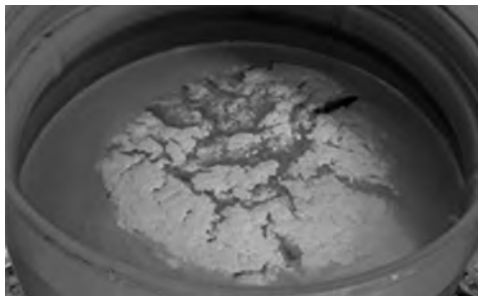


Figura: El autor

Bibliografía

Iniguez Arichavala, A.R Castillo Molina, A. (2011). Obtención de ácido láctico a partir del almidón de papa como materia prima para la fabricación de material descartable biodegradable. "Tesis de ingeniero ambiental, publicada", Universidad Politécnica Salesiana, sede Cuenca, Ecuador.

Rajarshi Biswas. (2005). Lactic acid production from food processing wastes. "Tesis de Masters of Science (Biotechnology), publicada", Department of Biotechnology and Environmental Sciences Thapar Institute of Engineering and Technology Patiala -147004, India.

Cardona Álzate C.A., López Giraldo L. J., Edwin López Suárez F.E. (2004). Separación de ácido láctico por destilación reactiva. Revista Universidad EAFIT, Vol. 40, (no. 135). pp. 40-53.

Perdomo Hurtado, F. P. (2007). Diseño conceptual y simulación de columnas de destilación reactiva implementando termodinámica topológica a condiciones finitas de operación. "Tesis para optar al título de Magíster en Ingeniería Química, publicada". Universidad Nacional de Colombia sede Manizales, Departamento de Ingeniería Química, Manizales, Colombia.

Von Frieling, P. a, Schu" Gerl, K. (2013). Recovery of lactic acid from aqueous model solutions and fermentation broths. Recuperado de <http://www.elsevier.com/locate/procbio>.

Rajarshi biswas. July (2005). Lactic acid production from food processing wastes, a dissertation submitted in partial fulfillment of the requirements for the award of the degree of masters of science (biotechnology) (reg. no. 3030118) department of biotechnology and environmental sciences thapar institute of engineering and technology. Patiala -147004.

Ariana Núñez, Georgina Michelena, Emilia Carrera, Xiomara Álvarez. (2009). Estudios sobre la recuperación y purificación de ácido láctico para la producción de plásticos biodegradables. ICIDCA, AZCUBA (Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar). Vol. XIII,

Núm. 2, mayo-agosto, 2009, pp. 20-29.

Von Frieling, P. a, k. Schu" Gerl B. (1998). Recovery of lactic acid from aqueous model solutions and fermentation brothsp. A haltermann, werk wilhelmsburg, wilmannstrasse 36, 21107 Hamburg, Germany by institute fur technische chemie, callinstr. 3, d-30167, hannover, Germany received 3 august 1998; received in revised form 19 October 1998; november 1998.

Adsul, M., Khire, J., Bastawde, K. y Gokhale, D. (2007). Production of lactic acid from cellobiose and cellotriose by lactobacillus delbrueckii mutant uc-3. applied and environmental microbiology 73 (15): 5055-5057.

Agarwal, I., Dutt, K., Meghwanshi, G. y Saxena, R. (2008). Anaerobic fermentative production of lactic acid using cheese whey and corn steep liquor. Biotechnology letters

30 (4): 631-635.8.

Alonso, J., Garrote, G., Domínguez, H., Santos, V. y Parajo, J. (2009). Lactic acid from apple pomace: a laboratory experiment for teaching valorization of wastes. *Cyta - journal of food* 7 (2): 83 - 88.

Altaf, M., Naveena, B. y Gopal, R. (2007). Use of inexpensive nitrogen sources and starch for lactic acid production in anaerobic submerged fermentation. *Bio resource technology* 98: 498–503.

Altaf M., Naveena, B., Venkateshwar, M., Vijaykumar, E. y Gopal, R. (2006). Single step fermentation of starch to l(+)lactic acid by *Lactobacillus amylophilus* in shake using inexpensive nitrogen sources to replace peptone and yeast extract- optimization by RSM. *Process biochemistry* 41(2): 465-472.

Altaf, M., Naveena, B. y Gopal, R. (2005). Screening of

inexpensive nitrogen sources for production of lactic acid from starch by amylolytic *Lactobacillus amylophilus* GV6 in single step fermentation. *Food technology and biotechnology* 43 (3): 235–239.

Altaf, M., Venkateshwar, M., Srijana, M. y Gopal, R. (2007). Economic approach for lactic acid fermentation by *Lactobacillus amylophilus* GV6 using inexpensive carbon and nitrogen sources.

Altıok, D. (2004). Kinetic modelling of lactic acid production from whey. Master of Science, Izmir Institute of Technology, Food Engineering, Izmir, Turkey.

Amrane, A. y Prigent, Y. (1996). A novel concept of bioreactor: specialized function two-stage continuous reactor, and its application to lactose conversion into lactic acid. *Journal of biotechnology*.

- Arasaratnam, V., Senthuran, a. y Balasubramaniam, K. (1996). Supplementation of whey with glucose and different nitrogen sources for lactic acid production by *lactobacillus delbrueckii*. *Enzyme and microbial technology* 19 (7): 482-486.
- Arias, M., Mario Henao, I., Castrillón, Y. (2009). Producción de ácido láctico por fermentación de mucílago de café con *lactobacillus bulgaricus* nrri-b 548.dyna 76 (158): 147-153.
- Bhatta, S. y Srivastava, S. (2008). Lactic acid production from cane molasses by *lactobacillus delbrueckii* naci 2025 in submerged condition: optimization of medium component by taguchi doe methodology. *Food biotechnology* 22(2): 115 - 139.
- Bu"yu"kkileci, A. y Harsa, S. (2004). Batch production of lactic acid from whey by *lactobacillus casei* (nrri b-441). *Journal of chemical technology and biotechnology* 79: 1036-1040.
- Bustos, G., de la Torre, N., Martínez, M., Casares, A. y Domarco, Y. (2004). Evaluación de azúcares hemicelulósicos de las podas de sarmiento y lías de vinificación como medio nutritivo para la producción de ácido láctico por *lactobacillus pentosus*. *Ciencia y tecnología alimentaria* 4 (004): 283-291.
- Choudhur y, T. y Swaminathan, Ding, S. y Tan, T. (2006). L-lactic acid production by *lactobacillus casei* fermentation using dif ferent fed - batch feeding strategies. *Process biochemistr y* 41 (6): 1451-1454.
- Rui Ban, Feishen, Xin-gang Li, Shi-minxu. (2003). Lactic acid production. Lactic acid by biotechnology 20 by pellet-form *Rhizopusoryzae* R. 1021 in a stirred tank fermentor. *Chemical engineering science* 58 (3-6): 785-791.
- Hofvendahl, K. y Hägerdal, B. (2000). Factors affecting the fermentative lactic acid

production from renewable resources. Enzyme and microbial technology 26 (2-4): 87-107.

Huang, L., Jin, B., Lant, P. y Zhou, J. (2005). Simultaneous saccharification and fermentation of potato starch wastewater to lactic acid by *Rhizopus oryzae* and *Rhizopus arrhizus*. Biochemical. Idris, A. (2006). Effect of sodium alginate concentration, bead diameter, initial pH and temperature on lactic acid production from pineapple waste using immobilized *Lactobacillus delbrueckii*. Process biochemistry 41 (5): 1117-1123.

Joshi, S., Singhvi, M., Khire, J. y Gokhale, D. (2010). Strain improvement of *Lactobacillus lactis* for D-lactic acid production. Biotechnology letters 32 (4): 517-520.

Kenji Okano, S., Sakurako, K., Junya, N., Hideki, F. y Akihiko, K. (2007). Improvement in lactic acid production from

starch using α -amylase-secreting *Galactococcus lactis* cells adapted to maltose or starch. Applied microbiology and biotechnology 75 (5): 1007-1013.

Korbekandi, H., Abedi, D., Jalali, M., Fazeli, M. y Heidari, M. (2007). Optimization of *Lactobacillus casei* growth and lactic acid production in batch culture. Journal of biotechnology 131(1): 133-187.

Lee, K. (2004). Comparison of fermentative capacities of *Lactobacilli* in single and mixed culture in industrial media. Process biochemistry 40 (5): 1559-1564.

Statistical Definition of Biotechnology - OECD. (UPDATED IN 2005) www.oecd.org. Consultado el 2016-12-10