

## Producción de ácido láctico por una mezcla de *Lactococcus lactis* y *Streptococcus salivarius* en fermentaciones en discontinuo

### Lactic acid production from a mixture of cultures of *Lactococcus lactis* and *Streptococcus salivarius* using batch fermentation

Liliana Serna Cock\*,

\*\*

#### RESUMEN

Se estudió la producción de ácido láctico (AL), la conversión de sustrato (CG), y el rendimiento ( $Y_{p/s}$ ) de *Lactococcus lactis*, *Streptococcus salivarius* y una mezcla 1:1 de ambas cepas en sustrato glucosado. *Lactococcus lactis* se seleccionó de 20 cepas homofermentativas aisladas de cultivos de caña de azúcar variedad CC85-92 y *Streptococcus salivarius* se aisló de un fermento láctico comercial. En fermentaciones llevadas a cabo con la mezcla microbiana, a 32 °C con 60 gL<sup>-1</sup> de glucosa y pH 6,0 se obtuvo un máximo de 47,63 gL<sup>-1</sup> de ácido láctico, conversión de glucosa de 95,4% y rendimiento en producto de 0,83 gg<sup>-1</sup>.

**Palabras clave:** caña de azúcar, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus salivarius*, mezcla de cepas.

#### ABSTRACT

Production of lactic acid (LA), yield ( $Y_{p/s}$ ) and substrate conversion (SC) from *Lactococcus lactis*, *Streptococcus salivarius* and their mixtures were tested. *Lactococcus lactis* was selected from 20 homofermentative strains isolated from a sugar cane crop (variety CC85-92) and *Streptococcus salivarius* was isolated from a commercial lactic ferment. Batch fermentation experiments at 32 C with a glucose concentration of 60 gL<sup>-1</sup> and a pH of 6,0 were carried out. A maximum of 47,63 gL<sup>-1</sup> of lactic acid concentration, 95,4% of substrate conversion and 83 gg<sup>-1</sup> were obtained from the mixture of strains after a fermentation of 48 h.

**Key words:** sugar cane, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus salivarius*, mixture of strains.

#### INTRODUCCIÓN

Desde la antigüedad cientos de bacterias ácido lácticas (LAB) han sido aisladas de alimentos fermentados, animales y humanos para ser utilizadas en la producción de ácido láctico y como cultivos iniciadores en la elaboración de vegetales, cárnicos y productos lácteos fermentados (Adamberg *et al.*, 2003); sin embargo, las exigencias crecientes de rentabilidad económica y de calidad sensorial y sanitaria de estos productos han motivado innumerables

investigaciones encaminadas a obtener fermentos de la más alta calidad que posean aptitudes particulares para aplicaciones como acidificación rápida, producción de sustancias aromatizantes, producción de sustancias texturizantes, carácter probiótico, entre otras (Kourkoutas *et al.*, 2005; Schäffer *et al.*, 2004). La mezcla de cepas ha sido propuesta como una buena alternativa para satisfacer estas necesidades y se ha encontrado potencial de uso en la producción de ácido láctico, la producción de alimentos prebióticos, el mejoramiento de la eficiencia de

\* Dra. en Ingeniería de Alimentos. Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira. Correo electrónico: lsemac@palmira.unal.edu.co

\*\* Ing. química. Doctora en Ciencias. Correo electrónico: aidrodri@univalle.edu.co

Departamento de Ingeniería de Alimentos, Facultad de Ingeniería, Universidad del Valle. Cali, Colombia.

**Recibido:** octubre 21 de 2004 **Aceptado:** mayo 11 de 2005

transformación de azúcares en forrajes ensilados (Luis *et al.*, 1991; Merry *et al.*, 1993; Bolsen *et al.*, 1996; Mora *et al.*, 1997), entre otros; sin embargo, el hecho de que las condiciones óptimas de crecimiento de los microorganismos utilizados en las mezclas no coincidan y que las cualidades acidificantes y aromatizantes de los microorganismos utilizados en las mezclas sean diferentes crea la dificultad de establecer las condiciones de cultivo óptimas para la mezcla, como suplementos nutricionales, temperatura, demanda de oxígeno y pH (Schäffer *et al.*, 2004).

En la producción fermentativa de ácido láctico los microorganismos utilizados pertenecen a los géneros *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus*, *Enterococcus*, *Aerococcus* y *Rhizopus* (Salminen, 1993; Domínguez y Vásquez, 1999); no obstante, debido a que una de las problemáticas es el alto costo de producción (Akerberg y Zacchi, 2000; Kwon *et al.*, 2000), se han venido estudiando mezclas de cepas lácticas y no lácticas que permitan degradar sustratos baratos complejos y/o mejorar los rendimientos; Kurosawa *et al.*, (1988), por ejemplo, utilizaron una mezcla de *Aspergillus* y *Streptococcus* empleando como sustrato almidón; Özen *et al.* (1992) emplearon *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* en permeado de lactosuero; Roukas y Kotzekidou (1991 y 1998) usaron *Lactobacillus casei* y *Lactococcus lactis* en lactosuero desproteinizado; Malakar *et al.* (1999) utilizaron *Lactobacillus curvatus* y *Enterobacter cloacae* en caldo MRS; Wang *et al.* (2003) emplearon *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus* y *Bifidobacterias* en leche de soya; Adamberg *et al.* (2003) usaron *Streptococcus salivarius*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus paracasei* en un medio de cultivo comercial basado en lactosa, y Schäffer *et al.* (2004) utilizaron un cultivo mesófilo y otro termófilo en leche.

En este trabajo se estudió la producción de ácido láctico (AL), la conversión de glucosa (CG) y el rendimiento en producto ( $Y_{p/s}$ ) de *Lactococcus lactis* aislado de cultivos de caña de azúcar, *Streptococcus salivarius* aislado de un fermento comercial y de una mezcla 1:1 de ambas cepas en fermentaciones en discontinuo a escala de laboratorio, utilizando como sustrato caldo MRS (De Man y Sharpe, 1960) adicionado de glucosa.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Aislamiento de microorganismos.** Para aislar cepas nativas de interés en la producción de ácido láctico, se tomaron muestras de cultivos de caña de azúcar de 12,3 meses de edad, provenientes de la variedad CC85-92 y muestras de jugo de caña de la misma variedad en la hacienda y el ingenio La Cabaña (Caloto, Cauca). Las muestras en el cultivo fueron tomadas de hojas en el sitio de unión con el tallo (HUT), en la superficie de las hojas (HS), en exudados producidos por el perforador de caña *Diatraea saccharalis* (EX) y del primero, segundo y tercer tercio del tallo de la caña (CPT, CST, CTT). Las muestras tomadas en el ingenio provenían de jugo de caña sin adición de cal y sin sulfitar (JCSSSE), de cachaza sin filtrar (CCHSF), de lodos de filtros (LF) y del primer molino de caña (M1). Las muestras se transportaron bajo refrigeración al laboratorio de bioconversiones de la Universidad del Valle donde fueron procesadas.

A cada muestra se le realizó dilución suficiente hasta obtener colonias aisladas utilizando agua peptona al 0,1% y cada una se sembró por duplicado en agar MRS. El medio se esterilizó a 121,1 °C y su pH se ajustó a 6,0 con ácido sulfúrico. Cuando el medio de cultivo estaba a una temperatura de 50 °C, se adicionó azul de anilina 2ml/L. El medio se inoculó con 0,1ml de cada una de las diluciones (en superficie) y se incubaron a 36 y 45 °C por 48 horas en condiciones aeróbicas. Después de realizar los conteos de colonias productoras presuntivas de ácidos orgánicos (que asimilaron el azul de anilina), se obtuvo cultivo puro de cada una de las morfologías crecidas, mediante repiques en el mismo medio. Una vez se obtuvieron los cultivos puros, se repicaron en un medio de cultivo líquido, caldo MRS y se incubaron a las mismas condiciones anotadas arriba. Muestras de los cultivos líquidos puros de 24 horas se centrifugaron a 5000 × g por 10 minutos y luego fueron filtrados con filtros millipore HVLPO2500; los sobrenadantes de las muestras filtradas se inyectaron en un HPLC.

Las cepas productoras de más de 12 gL<sup>-1</sup> de ácido láctico, en las condiciones anotadas, se almacenaron en caldo MRS con glicerol y fueron sometidas a congelación para conservarlas.

Para llevar a cabo este estudio, se seleccionó la cepa homofermentativa más productora de ácido láctico.

El *Streptococcus salivarius* se aisló de un cultivo láctico comercial en caldo MRS y agar MRS a 45 °C, siguiendo el mismo procedimiento de aislamiento descrito para la cepa aislada de cultivos de caña.

**Fermentación.** Nueve fermentaciones se realizaron en caldo MRS adicionado de glucosa hasta 60 gL<sup>-1</sup> aprox. (ver tabla 2, glucosa inicial), a 32 °C, en erlenmeyer de 500 ml con un volumen de trabajo de 250 ml. El pH se ajustó a 6,0 con NaOH 4 M. Las cepas se adaptaron a las condiciones descritas por tres generaciones, antes de iniciar las fermentaciones.

Para todos los casos se utilizó: 10% de inóculo con respecto al volumen, tiempo de fermentación de 48 horas y velocidad de agitación de 120 rpm. Las muestras del caldo de fermentación se tomaron a las 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 y 48 horas para determinación de azúcares totales, producción de ácido láctico, producción de otros ácidos orgánicos, etanol, viabilidad microbiana y biomasa.

**Método analítico.** Las concentraciones de azúcares y de ácido láctico se midieron por cromatografía líquida de alta resolución HPLC (Hitachi L-6000A, integrador D-2500) equipada con una columna Aminex HPX 87H, 300 mm, utilizando como fase móvil ácido sulfúrico 0,005 M. La biomasa se calculó a partir de datos de densidad óptica a 540 nm utilizando un espectrofotómetro Milton Roy 401. La viabilidad de las cepas se determinó mediante cultivo en placa utilizando agar MRS, pero no se realizó recuento microbiano. El pH se midió con un pHmetro Orion 710<sup>a</sup>.

El porcentaje de conversión de sustrato (CG) y el rendimiento en producto Y<sub>p/s</sub> se calcularon mediante las siguientes expresiones:

$$CG = \frac{100 * (S_0 - S)}{S_0}$$

$$Y_{p/s} = \frac{P}{S_0 - S}$$

**Reactivos.** Se utilizaron productos grado reactivo (Sigma Chemical Co).

## ANÁLISIS EXPERIMENTAL

Para analizar el comportamiento de los microorganismos y su mezcla en cuanto a la concentración de ácido láctico (AL), el porcentaje de conversión de glucosa (CG) y el rendimiento (Y<sub>p/s</sub>) se utilizó una Anova de un solo factor (tipo de microorganismo fermentador) con tres categorías y tres réplicas: *Lactococcus lactis*, *Streptococcus salivarius* y una mezcla 1:1 de ambos microorganismos. Se utilizó la prueba de diferencia significativa honesta de Tukey (DSH) para analizar los valores entre los pares de medias de las variables que mostraron diferencias significativas.

## RESULTADOS

En los cultivos de caña de azúcar y en el ingenio azucarero se aislaron veinte cepas que fueron confirmadas para producción de ácido láctico, de las cuales solamente una cepa homofermentativa produjo cantidades significativas (12,4 gL<sup>-1</sup>) de ácido láctico a 36 °C y 13,7 gL<sup>-1</sup> a 32 °C (sin ajuste de pH y sin agitación); esta cepa, aislada de hojas de plantas de caña de azúcar, se identificó bioquímicamente como *Lactococcus lactis subs lactis*. De las cepas aisladas de los cultivos de caña de azúcar, ninguna produjo cantidades significativas de ácido láctico a 45 °C. La tabla 1 muestra los sitios en los cuales se aislaron microorganismos productores de ácido láctico, la concentración máxima en

**Tabla 1.** Sitios en las plantaciones de caña de azúcar y en los ingenios azucareros en los cuales se aislaron bacterias productoras de ácido láctico

Sitio de muestra	Concentración de AL gL <sup>-1</sup>	Tipo de metabolismo
HUT	12,4	Homofermentativo
	9,4	Homofermentativo
	2,58	Homofermentativo
	2,4	Homofermentativo
	3,05	Heterofermentativo
HS	4,8	Homofermentativo
	2,4	Homofermentativo
	2,2	Homofermentativo
EX	1,9	Homofermentativo
	0,97	Homofermentativo
CPT	8,5	Heterofermentativo
	3,3	Homofermentativo
	2,2	Homofermentativo
CST	10,7	Heterofermentativo
	8,5	Heterofermentativo
	8,6	Heterofermentativo
	2,1	Homofermentativo
CTT	0,1	Homofermentativo
JCSyE	8,7	Heterofermentativo
JCSSSE	12,3	Heterofermentativo

gL<sup>-1</sup> de ácido láctico obtenida en cada sitio y el modo de fermentación de la glucosa a 36 °C.

Las cinéticas de formación de producto, consumo de sustrato y producción de biomasa de *Lactococcus lactis* (aislado de hojas de plantas de caña de azúcar), *Streptococcus salivarius* (aislado de un cultivo láctico comercial) y la mezcla 1:1 de las cepas mencionadas, en MRS adicionado de glucosa, pueden observarse en las figuras 1, 2 y 3, y el promedio de tres réplicas de la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), el rendimiento celular ( $Y_{x/s}$ ) el rendimiento en producto ( $Y_{p/s}$ ), y el porcentaje de conversión de sustrato, en la tabla 2.

En el análisis de la varianza, el consumo de sustrato, la concentración de ácido láctico y el rendimiento presentaron un F calculado de 183,56, 91,20

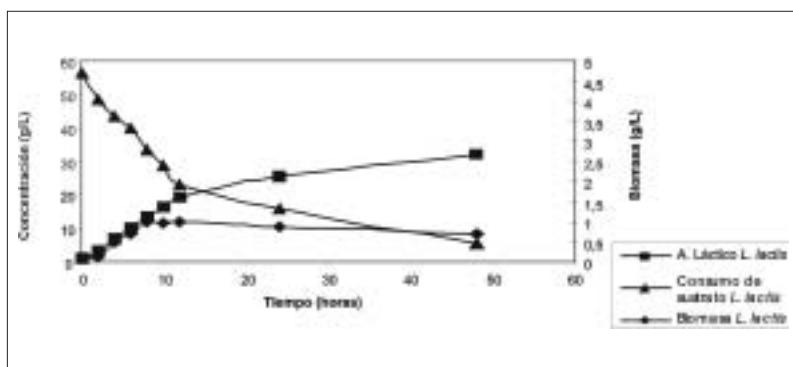


Figura 1. Cinética de formación de producto, consumo de sustrato y producción de biomasa de *Lactococcus lactis* en medio de cultivo glucosado (promedio de tres réplicas).

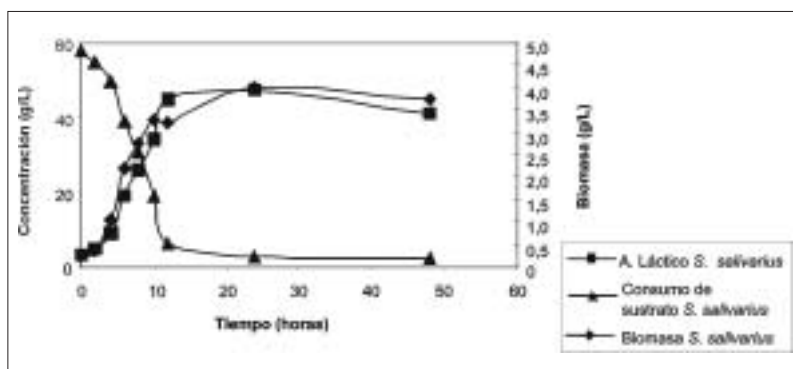


Figura 2. Cinética de formación de producto, consumo de sustrato y producción de biomasa de *Streptococcus salivarius* en medio de cultivo glucosado (promedio de tres réplicas).

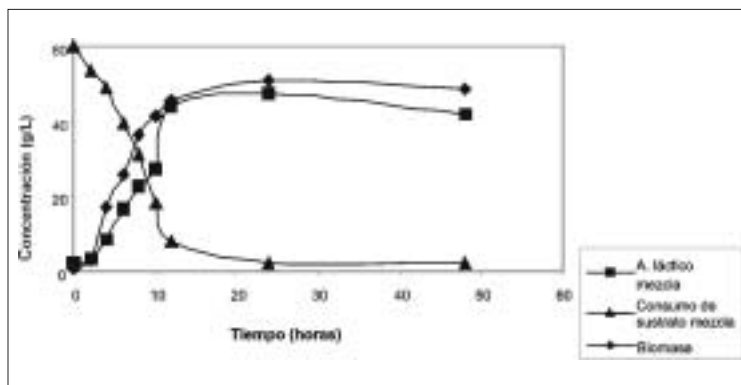


Figura 3. Cinética de formación de producto, consumo de sustrato y producción de biomasa para una mezcla 1:1 de *Lactococcus lactis* y *Streptococcus salivarius* en medio de cultivo glucosado (promedio de tres réplicas).

y 69,80, respectivamente, y los F teóricos para los mismos parámetros cinéticos fueron de 5,14 con un nivel de confianza del 95%. Con estos valores de F y  $P < 0,005$ , podemos decir que hay diferencias significativas entre los tres tratamientos para las tres variables de respuesta.

En la tabla 3 se presenta el Anova para AL. La prueba DSH no mostró diferencias significativas entre los pares de medias de las variables de respuesta de las fermentaciones llevadas a cabo con *Streptococcus salivarius* y las variables de respuesta de la mezcla (a pesar de que AL, CG,  $Y_{p/s}$  fueron superiores en la mezcla). Con el análisis de estos resultados podemos concluir que a pesar de haberse encontrado diferencias significativas en las variables de respuesta de los tres tratamientos, el uso de la mezcla microbiana no difiere en la conversión de glucosa, la producción de ácido láctico y el rendimiento, comparado con el uso de la cepa única de *Streptococcus salivarius*, pero los mismos parámetros evaluados sí difieren entre la mezcla microbiana y *Lactococcus lactis*.

**DISCUSIÓN**

Referente a la cepa de *Lactococcus lactis* aislada de hojas de cultivos de caña de azúcar, la concentración significativa de ácido láctico obtenida en 48 horas de fermentación sin control de pH y sin agitación (13,7 gL<sup>-1</sup>) y con

**Tabla 2.** Parámetros cinéticos de fermentaciones tipo batch con *Lactococcus lactis*, *Streptococcus salivarius* y una mezcla 1:1 de ambas cepas

Parámetros cinéticos	<i>Lactococcus lactis subs lactis</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>	Mezcla de cepas 1:1
Tiempo de fermentación hasta. Pmax (h)	48	48	48
Glucosa inicial. So (g <sup>L</sup> <sup>-1</sup> )	56,50	58,08	59,84
Glucosa final. S (g <sup>L</sup> <sup>-1</sup> ) al tiempo en que P es max	5,50	2,53	2,74
Glucosa consumida. So-S (g <sup>L</sup> <sup>-1</sup> )	50,99	55,55	57,09
Conversión de glucosa. 100*(So-S)/So (%)	90,26	95,64	95,42
Concentración max celular. Xmax (g <sup>L</sup> <sup>-1</sup> )	1	4	4,25
Velocidad específica de crecimiento $\mu$ (h <sup>-1</sup> )	0,42	0,18	0,32
Rendimiento celular. Yx/s ((X-Xo)/(So-S)) gg <sup>-1</sup>	0,06	0,06	0,07
Concentración max de ácido láctico. Pmax AL(g <sup>L</sup> <sup>-1</sup> )	32,36	47,26	47,63
Rendimiento de producto. Yp/s (P/(So-S)) gg <sup>-1</sup>	0,63	0,85	0,83

control de pH y agitación (32.36 g<sup>L</sup><sup>-1</sup>), se puede explicar por la adaptación de la cepa a entornos con altas concentraciones en sacarosa ya que este microorganismo cuenta con el sistema enzimático para hidrolizar el disacárido y metabolizar luego la glucosa por la vía glicolítica (Salminen, 1993).

De otro lado, debido a que no se han publicado resultados de investigaciones donde se hayan trabajado mezclas de *Lactococcus lactis* y *Streptococcus salivarius*, la discusión de los resultados obtenidos en este estudio se realizará a la luz de la información

obtenida de investigaciones en producción de ácido láctico con otras mezclas de cepas láctica y no lácticas.

Dado que no se encontraron diferencias significativas en la variable de respuesta CG, cuando se utilizó la mezcla microbiana y cuando se utilizó *Streptococcus salivarius* como cepa única, los resultados obtenidos de CG en este estudio podrían compararse con los resultados reportados por Wang *et al.* (2003) quienes encontraron valores del mismo orden de magnitud (diferencias no significantes) en el

**Tabla 3.** Análisis de la varianza para la variable de respuesta concentración de ácido láctico (AL)

Grupos	Réplicas	Suma	Promedio	Varianza		
<i>Lactococcus lactis</i>	3	97,08	32,36	2,01		
<i>Streptococcus salivarius</i>	3	141,768	47,25	0,58		
Mezcla 1:1	3	142,80	47,60	1,10		
<b>Análisis de varianza</b>						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	454,28	2	227,14	183,56	4,15E-06	5,14
Dentro de los grupos	7,42	6	1,23			
Total	461,71	8				

contenido de rafinosa; después de 24 horas de fermentación en discontinuo en leche de soya; cuando emplearon una mezcla microbiana (*L. acidophilus* con *B. infantis* y *L. acidophilus* con *B. longun*) comparada con la cepa única (*L. acidophilus*); igual comportamiento encontraron cuando emplearon una mezcla de *S. thermophilus* con *B. infantis* y *S. thermophilus* con *B. longun*, contrastado con una cepa pura de *S. thermophilus*. En cuanto a AL, los mismos autores, con el producto anotado, reportan concentraciones menores de ácido láctico después de 24 horas de fermentación cuando emplearon mezclas microbianas que cuando emplearon la cepa pura; con *L. acidophilus* y *S. thermophilus* solas obtuvieron 22,96 y 41,32 mmolL<sup>-1</sup> de ácido láctico, respectivamente, y cuando mezclaron *L. acidophilus* con *B. infantis* y *B. longun* obtuvieron 13,84 y 12,11 mmolL<sup>-1</sup> correspondientemente y con *S. thermophilus* 18,85 y 12,64 mmolL<sup>-1</sup> de ácido láctico, para las mismas mezclas anotadas. Estos resultados difieren de los encontrados en este estudio ya que la concentración de ácido láctico fue mayor en la mezcla microbiana comparada con la concentración obtenida con *Lactococcus lactis* y fue del mismo orden de magnitud con respecto a *Streptococcus salivarius*.

Los resultados de biomasa obtenidos con la mezcla de *Lactococcus lactis* y *Streptococcus salivarius* y los obtenidos con *Streptococcus salivarius* pueden ser comparables con los de Adamberg *et al.* (2003) quienes, utilizando una técnica innovativa, pH-auxostat para estudiar el efecto de la temperatura y el pH sobre el crecimiento de bacterias ácido lácticas, informan que el crecimiento de una mezcla de *L. bulgaricus* y *S. salivarius* en leche fue similar al observado por cada uno de los microorganismos por separado en el mismo sustrato.

A pesar de que la temperatura óptima para el crecimiento de *Lactococcus lactis* es 37 °C y de *Streptococcus salivarius* es 45 °C, ambas cepas crecieron a 32 °C (figuras 1, 2); a esta temperatura *Lactococcus lactis* presenta su máximo crecimiento a las 4 horas de fermentación mientras que *Streptococcus salivarius* muestra su máximo crecimiento a las 10 horas; la mezcla a la misma temperatura presentó su pico máximo de crecimiento en un tiempo intermedio respecto al obtenido con cepas puras (figura 3); estos resultados son afines a los reportados por Schäffer *et al.* (2004) quienes encontraron que una mezcla de cepas, una mesófila y una prebiótica termotolerante podían crecer bien a 30 °C; la cepa

mesófila presentó su pico máximo a las 6,5 horas, la cepa termotolerante a 4,5 y la mezcla a las 5 horas. Es de anotar que, aunque cada microorganismo presenta una temperatura óptima de crecimiento, pueden crecer en forma no óptima en un amplio rango de temperaturas y esto explica el hecho de que *Streptococcus salivarius* y *Lactococcus lactis* lo puedan hacer a 32 °C.

La más alta concentración de glucosa residual se obtuvo con *Lactococcus lactis* 5,5 gL<sup>-1</sup>, mientras que *Streptococcus salivarius* y la mezcla de microorganismos presentaron residuales del mismo orden de magnitud 2,53 y 2,74 gL<sup>-1</sup>, respectivamente; Roukas y Kotzekidou (1998), en fermentaciones lácticas con *Lactobacillus casei*, *Lactococcus lactis* y su mezcla, encuentran también que *Lactococcus lactis* da la más alta concentración de glucosa residual, mientras que la mezcla de cultivos da la más baja concentración; sin embargo, las concentraciones de ácido láctico obtenidas en este estudio, 47,6 gL<sup>-1</sup>, con mezcla de cultivo *Lactococcus lactis* y *Streptococcus salivarius*, son muy superiores a las obtenidas por Roukas y Kotzekidou (1998) quienes en fermentaciones en discontinuo obtuvieron un máximo de 24 gL<sup>-1</sup> en 24 horas.

Con respecto al aislamiento de la cepa nativa de *Lactococcus lactis* se puede concluir que, dado que los *Lactococcus* aislados de material vegetal han sido poco estudiados (Niel, 1999) y que la concentración de ácido láctico, la conversión de glucosa y el rendimiento en producto obtenidos con esta cepa fueron significativos, es importante evaluar el potencial genético y comercial de este microorganismo aislado de cultivos de caña de azúcar, así como el de otras bacterias ácido lácticas adaptadas a sustratos diferentes a lactosa.

Con relación a la mezcla microbiana, se puede concluir que la mezcla 1:1 de *Lactococcus lactis* y *Streptococcus salivarius* no aumenta la concentración en ácido láctico, la conversión de glucosa, ni los rendimientos en producto y en biomasa comparados con los obtenidos con *Streptococcus salivarius*. Con los resultados de este trabajo y los obtenidos por los autores citados podemos concluir además que, aunque las mezclas microbianas se plantean como una alternativa para mejorar los rendimientos en producción de ácido láctico y de muchos otros metabolitos de interés, lograr un sinergismo microbiano suficiente para optimizar la producción de ácido láctico

demanda abundante investigación, dadas las diferentes condiciones físicas de temperatura, pH, agitación, tipo de sustrato y concentración de sustrato óptimos para cada especie microbiana.

Por último, se puede concluir que el conocimiento profundo del metabolismo y la fisiología de bacterias ácido lácticas aisladas de diferentes fuentes y de sus mezclas en distintos sustratos de fermentación, permitirá en el futuro generar mezclas microbianas cada vez más definidas y reproducibles, lo que constituirá un factor de progreso en la tarea de disminuir los costos de producción de ácido láctico.

## BIBLIOGRAFÍA

- Adamberg, K.; Kask, S.; Laht, T.; Paalme, T. 2003. The effect of temperature and pH on the growth of lactic acid bacteria: a pH-auxostat study. *Internacional Journal of Microbiology*. 85: 171-183.
- Akerberg, C.; Zacchi, G. 2000. An economic evaluation of the fermentative production of lactic acid from wheat flour. *En Bioresource Technology*. 75: 119-126.
- Bolsen, K. K.; Ashbgl, G.; Weinberg, Z. G. 1996. Silage fermentation and silage additive (review). *AJAS*. 9(5): 483-493.
- De Man J. C. R. and M. Sharpe, M. E. 1960. A médium for the cultivation of *Lactobacilli*. *J. Appl Microbiol*. 23: 130-135.
- Dimínguez, J.; Vásquez, M. 1999. Effect of the operational conditions on the L-Lactic acid production by *Rhizopus oryzae*. *Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 2(3): 113-118.
- Kourkoutas, Y.; Xolias, V.; Kallis, M.; Bezirtoglou, E.; Kaneillaki, M. 2005. *Lactobacillus casei* cell immobilization on fruit pieces for probiotic additive, fermented milk and lactic acid production. *Process Biochem*. 40(1): 411-416.
- Kurosawa, H.; Ishikawa, H.; Tanaka, A. 1988. A.L-lactic acid production from starch by coimmobilized mixed culture system of *Aspergillus awamori* and *Streptococcus lactis*. *Biotechnoogy Bioeng*. 31: 183-187.
- Kwon, S.; Lee, C.; Lee, E.; Chang, Y.; Chang, N. 2000. Production of lactic acid by *Lactobacillus rhamnosus* with vitamin-supplemented soybean hydrolysate. *Enzyme and Microbial Technology*. 26: 209-215.
- Luis, L.; Esperance, M.; Ramírez, M. 1991. Utilización de aditivos en la conservación de forrajes en forma de ensilajes. I. Aditivos biológicos. *Pastos y Forrajes*. 14: 185.
- Malakar, P.; Martens, D.; Zwietering, M.; Beal, C.; Riet, K. 1999. Modelling the interactions between *Lactobacillus curvatus* and *Enterobacter cloacae*. II. Mixed cultures and Shelf life predictions. *International Journal of Food Microbiology*. 51: 67-79.
- Merry, R. J.; Cussen-Mac Kenna, R. F.; y Jones, R. 1993. Biological silage additives. *Ciencia e Investigación Agraria*. 20(2): 1-29.
- Mora, F.; Revuelta, D.; Ramírez, J. 1997. Ensilajes de King Grass empleando diferentes variantes del inóculo de bacterias ácido lácticas (*Pennicetum purpureum x Pen-nisetum typhoides*) <http://www.monografias.com/trabajos15/king-grass/king-grass.shtml#ANEX>
- Niel, E. W.; Hahn-Hagerdal, B. 1999. Nutrient requirements of *lactococci* in defined growth media. *Appl Microbiol Biotechnol*. 52: 617-627.
- Özen, S.; Özilgen, M. 1992. Effects of substrate concentration on growth and lactic acid production by mixed cultures of *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. *Journal Chem. Tech Biotechnol*. 54: 57-61.
- Roukas, T.; Kotzekidou, P. 1991. Production of lactic acid from deproteinized whey by coimmobilized *Lactobacillus casei* and *Lactococcus lactis* cell. *Enzyme and Microbial Technol*. 13(1): 33-38.
- Roukas, T.; Kotzekidou, P. 1998. Lactic acid production from deproteinized whey by mixed cultures of free and coimmobilized *Lactobacillus casei* and *Lactococcus lactis* cells using fedbatch culture. *Enzyme and Microbial Techno*. 22(3): 199-204.
- Salminen, S. 1993. *Lactic acid bacteria*. New York: Marcel Dekker, 442 p.
- Schäffer, B.; Szalaly, S; Lórinezy, D. 2004. Examination of the growth of probiotic culture combinations by the isoperibolic batch calorimetry. *Thermochemica Acta*. 415: 123-126.
- Wang, Y.; Chui, R.; Yang, H.; Chou, C. 2003. Sugar and acid contents in soymilk fermented with lactic acid bacteria alone or simultaneously with *bifidobacteria*. *Food Microbiology*. 20: 333-338.