

CINÉTICA DE LA PRODUCCIÓN DE ACIDO LÁCTICO POR FERMENTACIÓN SUMERGIDA CON LACTOSUERO COMO SUSTRATO

Kinetic of the Lactic Acid Production by Submerged Fermentation with Whey as Substrate

Miguel Jakymec, Héctor Morán, Gisela Páez, José R. Ferrer, Zulay Mármol y Eduardo Ramones

Laboratorio de Tecnología de Alimentos, Escuela de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, Universidad del Zulia.
Apartado 4011-A 526. Maracaibo, estado Zulia, Venezuela. E-mail: gpaez@luz.ve

RESUMEN

Se estudió la cinética de producción del ácido láctico, a partir del suero de leche, utilizando *Lactobacillus bulgaricus*, mediante fermentación por carga. El suero de leche fue desproteinizado (bajando el pH a 4,5, calentando durante 20 min) y suplementado con 20 g/L de extracto de levadura, 10 g/L de peptona tripsica de caseína y 1 g/L de Tween 80 como antiespumante. La fermentación se llevó a cabo a 42°C y a 100 rpm de agitación en un fermentador New Brunswick modelo Bioflo 4000, a tres concentraciones iniciales de lactosa diferentes: 27,98 g/L, 49,89 g/L y 90,64 g/L. El máximo rendimiento de ácido láctico fue 10%, para una concentración inicial de lactosa de 49,89 g/L. La cinética de la producción de biomasa fue ajustada por el modelo logístico, obteniéndose en la mejor simulación un valor de $\mu_{max} = 0,884h^{-1}$, la de producción de ácido láctico por la ecuación de Luedekin y Piret, obteniéndose en la mejor simulación los siguientes coeficientes $a = -1,348 \cdot 10^{-2}$ y $\beta = 1,29 \cdot 10^{-2}$, y la de consumo de sustrato por la ecuación de Hanson y Tsao, obteniéndose en la mejor simulación un coeficiente $K_s = 1,27 \cdot 10^{-3}$.

Palabras clave: Fermentación láctica, lactosuero, producción de ácido láctico, cinética.

ABSTRACT

Kinetic of the lactic acid production in batch fermentation was studied from whey, using *Lactobacillus bulgaricus*. Whey was deproteinized (by adjusting the pH to 4,5, heating for 20 min) and supplemented with 20 g/L yeast extract, 10 g/L triptic casein peptone and 1 g/L Tween 80 as antifoam. The fermentation was performed at 42°C and agitation speed 100 rpm in a

New Brunswick Fermentor model Bioflo 4000, at three different initial lactose concentrations: 27.98 g/L, 49.89 g/L and 90.64 g/L. Maximum lactic acid yield was 10%, at an initial lactose concentration of 49,89 g/L. Biomass production kinetics was adjusted by a logistic model ($\mu_{max} = 0.884h^{-1}$ for the best modelling), lactic acid production by the Luedekin and Piret equation ($a = -1.348 \cdot 10^{-2}$ and $\beta = 1.429 \cdot 10^{-2}$ for the best modelling) and substrate consumption was adjusted by the Hanson and Tsao equation ($K_s = 1.27 \cdot 10^{-3}$ for the best modelling).

Key words: Lactic acid fermentation, whey, lactic acid production, kinetic.

INTRODUCCIÓN

El suero es el líquido residual de la transformación de la leche en queso. Es el subproducto más abundante en las industrias lácteas. El suero es un producto muy utilizado en el campo de la alimentación animal (hasta un 20% en peso del alimento), en la fabricación de algunos tipos de bebidas y de alimentos enriquecidos para el hombre. Desde el punto de vista nutricional la proteína presente en el suero es el componente más valioso, contiene también las vitaminas y minerales no retenidos en el proceso de coagulación de la leche y lactosa, de gran uso en la industria farmacéutica y alimenticia. Sin embargo la cantidad de suero que se aprovecha es muy poca comparada con su producción. La producción de suero en la región Zulia fue para 1997, 162.387 toneladas [6].

A través de procesos de bioconversión pueden obtenerse del suero productos con un alto valor comercial, uno de estos productos es el ácido láctico, utilizado en las industrias alimenticia, farmacéutica, textil, como materia prima en la producción de polímeros biodegradables, en el procesamiento del papel y en la síntesis de barnices y pinturas. El ácido

láctico puede ser obtenido por fermentación del suero con bacterias del género *Lactobacillus*, entre estas el *Lactobacillus bulgaricus*. La medición del crecimiento del microorganismo, el consumo del sustrato y la producción del ácido fundamenta la determinación de los parámetros que describen el bioproceso.

Existen varios modelos que permiten una descripción adecuada de procesos de fermentación con lactosa como sustrato, como una vía sencilla de conversión en ácido láctico asumiendo que la producción de este ácido está parcialmente asociada con el crecimiento microbiano. La simulación de los datos experimentales de un cultivo de *Lactobacillus bulgaricus* en suero de leche correlaciona el bioproceso con estos modelos.

El objetivo de esta investigación fue estudiar la producción del ácido láctico empleando suero de leche como sustrato, estableciendo el modelo cinético de la fermentación.

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Microorganismo

Se trabajó con *Lactobacillus bulgaricus*, obtenido liofilizado del Chr. Hansen's Laboratorium A/S de Dinamarca.

El microorganismo liofilizado se reactivó en leche, durante 2 días a 40°C. De los tubos de reactivación, se tomó 1 mL, transfiriéndose a tubos con 9 mL de agar de leche descremada. Se dejó crecer durante 24 h; refrigerándose a 4°C para su conservación.

Medio de cultivo

El suero de leche, de la última etapa de producción de queso ricota, fue suministrado por la empresa Venelacteos ubicada en Maracaibo, estado Zulia. Se caracterizó midiendo los sólidos totales, cenizas, nitrógeno, proteínas, fósforo y lactosa y desproteinizó bajando el pH a 4,5 con ácido fosfórico y calentando a 90°C durante 20 minutos. Se enfrió y filtró en papel Whatman número 42.

El medio empleado en las fermentaciones fue el siguiente: suero desproteinizado, diluido con agua destilada para obtener una concentración de 27,98 g/L; suero desproteinizado con adición de lactosa hasta una concentración de 90,64 g/L y suero desproteinizado con 49,89 g/L de lactosa (concentración de lactosa en el suero fresco). En todos los casos el medio se suplementó con 20 g/L de extracto de levadura y 10 g/L de peptona tripsica de caseína 1; el pH inicial se ajustó a 5,9, con una solución de NaOH al 10%.

Fermentación

Se realizaron fermentaciones por carga y por duplicado en el fermentador New Brunswick modelo Bioflo 4000 (New Brunswick, New Jersey, USA), con 3 L de medio de cultivo,

previamente esterilizados a 115°C durante 20 minutos, sin aireación, sin control de pH, manteniendo la temperatura a 42°C y la agitación a 100 rpm, con Tween 80 (1 g/L) como antiespumante. La inoculación se realizó bajo condiciones asépticas.

Inóculo

El inóculo fue un 10% del volumen total de medio, a partir de cultivo bacteriano refrigerado. Se dejó adaptar y reproducir durante 12 horas en estufa a 42°C sin agitación, para cada fermentación.

A cada inóculo preparado se le realizó un conteo en placas para garantizar entre 10^6 y 10^8 unidades formadoras de colonias por mL de inóculo.

Métodos de análisis

Lactosa: Se determinó utilizando el método espectrocolorimétrico de Dubois [4].

Sólidos totales y cenizas: Se determinaron empleando los métodos de la A.O.A.C. [3].

Nitrógeno: Se determinó por el método de Kjeldahl [3].

Proteínas: Se determinaron como porcentaje de nitrógeno multiplicado por 6,38 [3].

Fósforo: Se determinó por el método espectrocolorimétrico del molibdo-vanadato de amonio [3].

Biomasa: Se determinó turbidimétricamente midiendo la absorbancia del medio a una longitud de onda de 490 nm en un Spectronic 20, Bausch & Lomb (Rochester, New York USA) [8].

Ácido láctico: La concentración de ácido láctico fue determinada por cromatografía en fase gaseosa, empleando un cromatógrafo Perkin Elmer (Norwalk, Connecticut USA), equipado con una columna capilar Carbowax, para ácidos grasos, de 15 m de longitud y 0,25 mm de diámetro. La temperatura en el puerto de inyección fue de 200°C, la del horno fue 190°C y la del detector fue 250°C [11]. Se empleó nitrógeno como gas de arrastre a una presión de 14 psig. El volumen inyectado por análisis fue de 1 µL.

Para calibrar el equipo se utilizó un estándar de 1% p/v, el cual tuvo un tiempo de retención de 1,267 min.

Como tratamiento previo a la inyección en el cromatógrafo, las muestras fueron centrifugadas a 5000 rpm durante 30 minutos y filtradas usando papel millipore de 0,2 µm, para prevenir la obstrucción de la columna.

Cinética

Se ajustaron los datos experimentales a las ecuaciones cinéticas propuestas para la producción de biomasa, ácido láctico y el consumo de sustrato.

Biomasa

Entre las ecuaciones descritas para la producción de Biomasa [2, 7, 11] se tienen:

$$\frac{dX}{dt} = X\mu_{\max} \frac{S}{K_s + S} \quad \text{(Ecuación de Monod)} \quad (1)$$

$$\frac{dX}{dt} = X(\mu_{\max} - hP) \quad \text{(Ecuación de Luedekin y Piret)} \quad (2)$$

$$\frac{dX}{dt} = X_0 \left(1 - \frac{X}{X_{\max}} \right) X \quad \text{(Modelo Logístico)} \quad (3)$$

$$\frac{dX}{dt} = X\mu_{\max} \frac{1}{1 + \frac{c e^{d't}}{\mu_s - c}} \quad \text{(Ecuación de Amrane y Prigent)} \quad (4)$$

Producción de ácido láctico

Los modelos disponibles que describen la producción de ácido láctico [2, 7, 11] son:

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} \quad \text{(Ecuación de producción sencilla)} \quad (5)$$

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X \quad \text{(Ecuación de Luedekin y Piret)} \quad (6)$$

$$\frac{dP}{dt} = K_p SX \quad \text{(Ecuación de Hanson y Tsao)} \quad (7)$$

$$\frac{dP}{dt} = P_0 \left(1 - \frac{P}{P_{\max}} \right) P \quad \text{(Modelo Logístico)} \quad (8)$$

Consumo de sustrato

Las ecuaciones usadas con mayor frecuencia para el consumo de sustrato [2,7,11] son:

$$\frac{dS}{dt} = \mu \frac{X}{Y} = qX \quad \text{(Ecuación de Monod)} \quad (9)$$

$$\frac{dS}{dt} = K_s SX \quad \text{(Ecuación de Hanson y Tsao)} \quad (10)$$

$$\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y} \frac{dX}{dt} + \frac{1}{Y} \frac{dP}{dt} \quad \text{(Ecuación de Yeh y col.)} \quad (11)$$

$$\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y} \frac{dX}{dt} + \frac{1}{Y} \frac{dP}{dt} + mX \quad \text{(Ecuación de Aborhey y Williamson)} \quad (12)$$

donde:

- X = Biomasa (g/L).
- X₀ = Concentración inicial de biomasa (g/L).
- X_{max} = Máxima concentración de biomasa alcanzada en la fermentación (g/L).
- t = Tiempo (h).
- μ = Velocidad específica de crecimiento (h⁻¹).
- μ_{max} = Máxima velocidad específica de crecimiento (h⁻¹).

**TABLA I
COMPOSICIÓN DEL SUERO**

	Suero Fresco	Suero Desproteínizado
Lactosa (g/L)	45,95	46,94
Sólidos Totales, (g/L)	52,5	61,0
Cenizas (g/L)	4,5	3,0
Nitrógeno (%)	0,147	0,005
Proteínas (%)	0,94	0,03
pH	5,11	
Fósforo (g/L)	0,357	

- S = Concentración de sustrato (g/L).
- Y_r = Rendimiento, gramos de biomasa/gramos de sustrato.
- Y_p = gramos de biomasa /gramos de producto.
- q = Cociente metabólico (h⁻¹)
- P = Concentración de producto (ácido láctico) (g/L).
- P₀ = Concentración inicial de ácido láctico (g/L)
- P_{max} = Máxima concentración de ácido láctico alcanzada en la fermentación (g/L).
- K_s = Constante de saturación de sustrato (L/g h ó h⁻¹).
- m = Coeficiente de mantenimiento celular (h⁻¹)
- h = Coeficiente de inhibición de la ecuación de Luedekin - Piret (Ug h).
- c, d' = Coeficientes constantes de la ecuación de Amrane-Prigent (h⁻¹).
- K_p = Constante de inhibición por producto (Ug h ó h⁻¹).
- α = Constante adimensional.
- β = Constante de producción (h⁻¹).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La caracterización del suero se muestra en la TABLA I. El suero desproteínizado tiene una composición ligeramente superior en lactosa, sólidos totales y cenizas que el suero sin desproteínizar. El pH del suero (5,11) lo define como un suero ácido. La desproteínización fue efectiva, ya que se bajó el contenido de proteínas de 0,94% a 0,03%, es decir, se precipitan el 96,8% de las proteínas remanentes.

En la FIG.1 se muestra el máximo crecimiento microbiano a las 8 horas, independientemente de la concentración inicial de lactosa [1, 2, 7]. Se obtuvo una mayor cantidad de biomasa y una mayor velocidad de crecimiento a la mayor concentración inicial del sustrato, sin embargo los rendimientos de biomasa expresados en gramos de biomasa producida por gramos de sustrato consumido fueron de 2,65; 2,23 y de 1,23

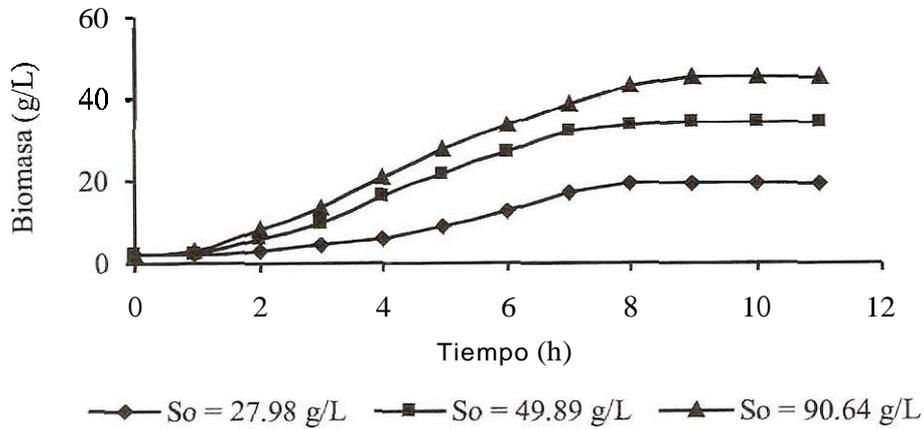


FIGURA 1. **CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE *L. bulgaricus* A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE LACTOSA. FERMENTACIÓN EN EL BIOFLO 4000. T: 42°C Y 100 RPM.**

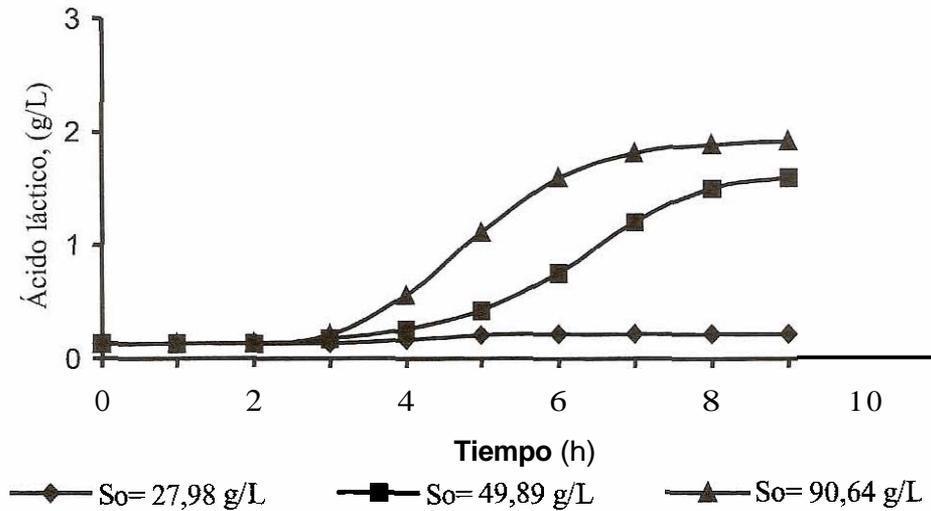


FIGURA 2. **CINÉTICA DE LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO.**

para concentraciones iniciales de sustrato de 27,98; 49,89 y 90,64 g/L respectivamente. El rendimiento disminuyó al aumentar la concentración inicial de lactosa.

La FIG. 2 muestra la producción de ácido láctico. Estas curvas muestran que la mayor concentración de ácido se obtiene. Dado el suero desproteínizado suplementado sin adición de lactosa, el rendimiento de ácido láctico fue de un 10,3%, expresado como gramos de ácido láctico producido por gramos de sustrato consumido: el rendimiento en el suero desproteínizado suplementado con lactosa a 90,64 g/L fue de 5,2% y el del suero desproteínizado diluido fue de 1,3%.

En la FIG. 3 se puede observar que a mayor valor de concentración inicial de sustrato, mayor es la cantidad consumida y también mayor es la velocidad de consumo de sustrato.

La ecuación que mejor ajustó las diferentes curvas de biomasa vs tiempo resultó ser la del modelo logístico, con un coeficiente de regresión de 0,998.

Donde:

- μ_{max} para 27,98 g/L (lactosa) = 0,553 h⁻¹
- μ_{max} para 49,89 g/L (lactosa) = 0,884 h⁻¹
- μ_{max} para 90,64 g/L (lactosa) = 0,723 h⁻¹

En la FIG. 4 se observa el ajuste de los puntos logrado por esta ecuación. La línea continua es la representación del modelo de los datos experimentales. El modelo logístico fue capaz de modelar el crecimiento desde el inicio hasta el final de la fermentación, ventaja que no presentan algunas ecuaciones comunes, las cuales sólo pueden modelar el período de crecimiento exponencial.

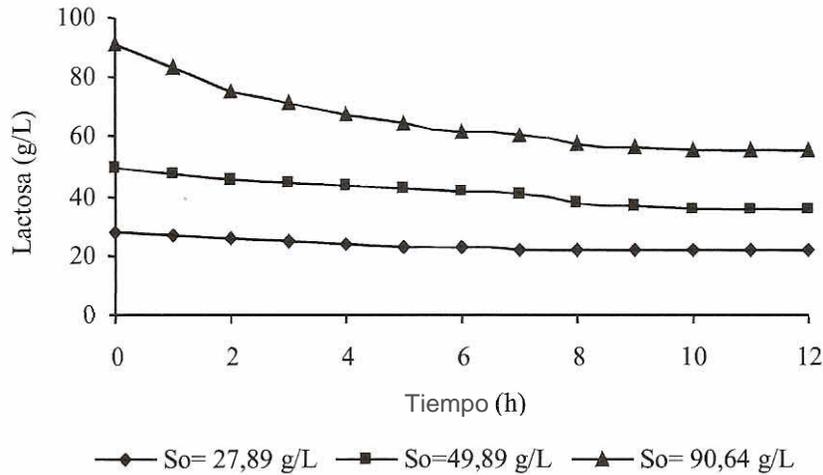


FIGURA 3. CINÉTICA DE CONSUMO DE LACTOSA.

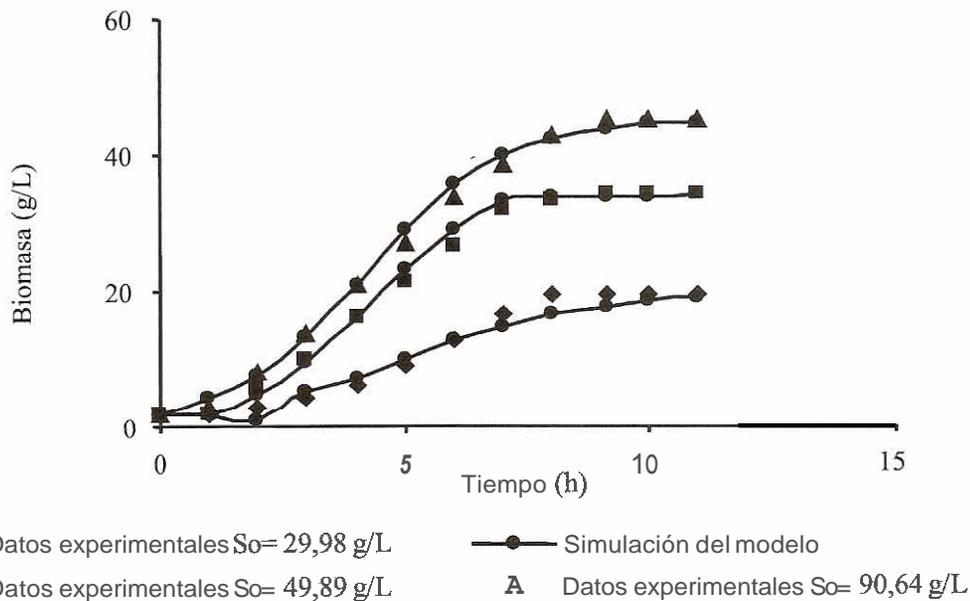


FIGURA 4. SIMULACIÓN POR EL MODELO LOGÍSTICO DE LOS DATOS DE BIOMASA.

El μ_{max} que da la ecuación para cada caso, representa la máxima velocidad específica de crecimiento del microorganismo a esas condiciones de crecimiento [7].

El modelo de Monod no presentó ajustes individuales satisfactorios para cada curva de biomasa vs tiempo.

La ecuación de Luedekin y Piret fue exitosa en representar los datos de una fermentación individual, dando una buena correlación (coeficiente de correlación igual a 0,999) para la fermentación con $S_o = 27,98 \text{ g/L}$. Esta ecuación mostró ser aplicable sólo en la zona de crecimiento exponencial.

La ecuación de Amrane y Prigent no dio un resultado satisfactorio.

En relación a los datos de producción de ácido láctico vs tiempo, la ecuación que ajustó mejor los datos fue la de Luedekin y Piret. Esta ecuación, al igual que la ecuación que ajusta la producción de biomasa propuesta por los mismos auto-

res, sólo es válida en el período de producción exponencial de ácido láctico.

$$P = \alpha(X - X_0) + \beta \int_0^t X(t) dt + P_0$$

Donde:

- Para $S_o = 27,98 \text{ g/L}$ $\alpha = 5,855 \cdot 10^{-2}$ y $\beta = -1,835 \cdot 10^{-2}$
- Para $S_o = 49,89 \text{ g/L}$ $\alpha = -1,348 \cdot 10^{-2}$ y $\beta = 1,429 \cdot 10^{-2}$
- Para $S_o = 90,64 \text{ g/L}$ $\alpha = 4,624 \cdot 10^{-2}$ y $\beta = 2,401 \cdot 10^{-3}$

En esta ecuación, el término $\int_0^t X(t) dt$ fue evaluado numéricamente. Para todos los ajustes el coeficiente de correlación fue mayor 0,999.

En la FIG. 5 se observa el ajuste de los puntos logrado por la ecuación de Luedekin y Piret. La línea continua representa convenientemente las curvas de ácido láctico vs tiempo.

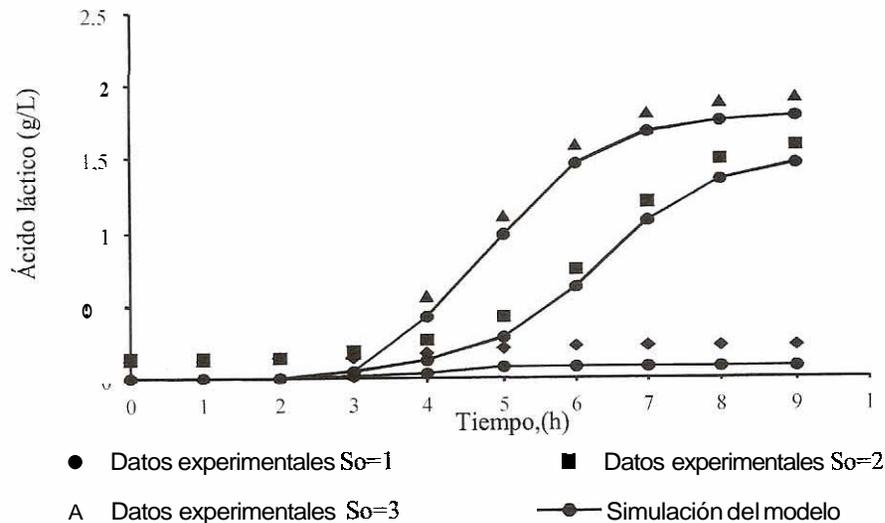


FIGURA 5. SIMULACIÓN DEL MODELO DE LUEDEKIN Y PIRET DE LOS DATOS EXPERIMENTALES DE PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO.

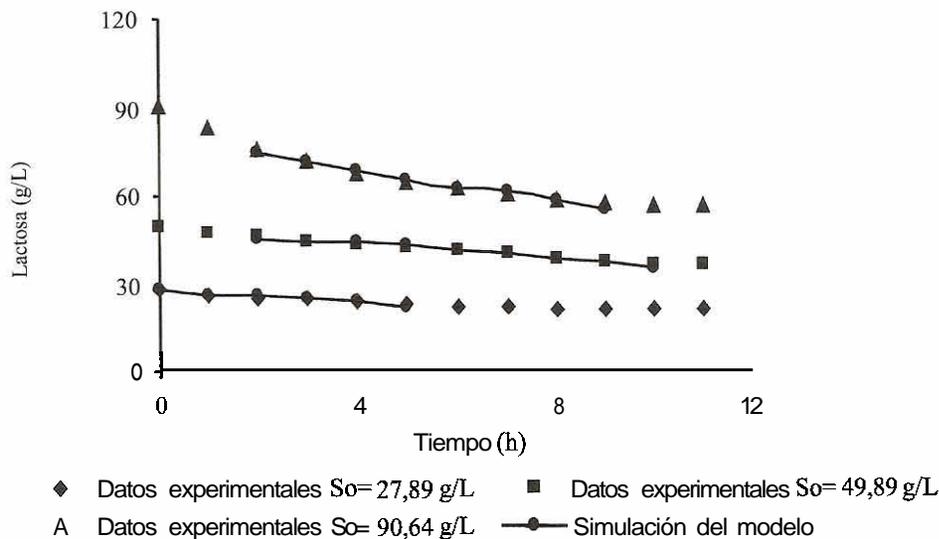


FIGURA 6. SIMULACIÓN DEL MODELO DE HANSON Y TSAO PARA EL CONSUMO DE SUSTRATO.

La ecuación ajusta bien la zona exponencial de producción de ácido, pero no es muy efectiva para ajustar la producción en la fase de adaptación y en la etapa estacionaria.

En los modelos de producción de ácido láctico sencillo y de Hanson y Tsao fueron efectivos en la zona de producción exponencial de ácido, al igual que la ecuación de Luedekin y Piret, pero esta última presentó un mejor coeficiente de correlación. El modelo logístico para la producción de ácido láctico se desplazó en el tiempo. Este modelo no tiene un parámetro para representar el tiempo de adaptación, sin embargo ajustó bien la producción de biomasa, porque el período de adaptación fue de una sola hora, mientras que para ácido láctico fue de dos horas.

En cuanto a la parte de consumo de sustrato, la ecuación que mejor ajustó los datos de concentración de sustrato vs tiempo fue el modelo propuesto por Hanson y Tsao. Sin

embargo, las curvas más comunes, con la excepción del modelo de Monod, ajustaron relativamente bien los datos experimentales, dando resultados particularmente buenos para la concentración inicial de sustrato de 49,89 g/L.

$$-\frac{dS}{dt} = K_s SX \quad (\text{Ecuación de Hanson y Tsao})$$

Donde:

- Para $S_0 = 27,98 \text{ g/L}$ $K_s = 9,42 \cdot 10^{-3} \text{ L/g h}$
- Para $S_0 = 49,89 \text{ g/L}$ $K_s = 1,27 \cdot 10^{-3} \text{ L/g h}$
- Para $S_0 = 90,64 \text{ g/L}$ $K_s = 1,39 \cdot 10^{-3} \text{ L/g h}$

En la FIG. 6 se observa el ajuste que realiza la ecuación de Hanson y Tsao a los puntos de concentración de sustrato vs tiempo. En esta ecuación, el término nuevamente fue evaluado numéricamente.

Los modelos obtenidos simulan efectivamente los datos experimentales, sin embargo la simulación es particularmente buena para el suero sin suplementar con lactosa y sin diluir ($S_0 = 49,89$ g/L), y considerando que los rendimientos en ácido y en biomasa son mejores para este caso que para el suero suplementado con lactosa, podemos asegurar que tal suplementación no fue necesaria. También se observó que cuando el proceso de crecimiento termina, cesan también el consumo de lactosa y la producción de ácido láctico.

CONCLUSIONES

Se obtuvo un máximo rendimiento de ácido láctico (10,3%) para el suero de leche desproteinizado sin suplementar con lactosa.

La producción del ácido láctico origina una disminución del pH en el medio; este bajo pH afecta el crecimiento, el consumo y la misma producción, lo que explica el comportamiento del *Lactobacillus bulgaricus* durante la fermentación.

La concentración inicial de lactosa no afecta la duración de la fermentación.

El *Lactobacillus bulgaricus* creció con un alto rendimiento en el suero de leche. Este rendimiento disminuyó al incrementar la concentración de lactosa en el medio. El microorganismo no fue capaz de consumir totalmente la lactosa del medio.

Las ecuaciones que mejor representan el proceso de fermentación de suero de leche fueron:

- Modelo Logístico para producción de biomasa.

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{\max} \left(1 - \frac{X}{X_{\max}} \right) X$$

$$\text{Para } S_0 = 27,98 \text{ g/L, } \mu_{\max} = 0,553 \text{ h}^{-1}$$

$$\text{Para } S_0 = 49,89 \text{ g/L, } \mu_{\max} = 0,884 \text{ h}^{-1}$$

$$\text{Para } S_0 = 90,64 \text{ g/L, } \mu_{\max} = 0,723 \text{ h}^{-1}$$

- Luedekin y Piret para producción de ácido láctico

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X$$

$$\text{Para } S_0 = 27,98 \text{ g/L } \alpha = 5,855 \cdot 10^{-2} \text{ y } \beta = -1,835 \cdot 10^{-2}$$

$$\text{Para } S_0 = 49,89 \text{ g/L } \alpha = 1,348 \cdot 10^{-2} \text{ y } \beta = 1,429 \cdot 10^{-2}$$

$$\text{Para } S_0 = 90,64 \text{ g/L } \alpha = 4,624 \cdot 10^{-2} \text{ y } \beta = 2,401 \cdot 10^{-3}$$

- Hanson y Tsao para consumo de sustrato.

$$-\frac{dS}{dt} = K_s S X$$

$$\text{Para } S_0 = 27,98 \text{ g/L } K_s = 9,42 \cdot 10^{-3} \text{ L/g h}$$

$$\text{Para } S_0 = 49,89 \text{ g/L } K_s = 1,27 \cdot 10^{-3} \text{ L/g h}$$

$$\text{Para } S_0 = 90,64 \text{ g/L } K_s = 1,39 \cdot 10^{-3} \text{ L/g h}$$

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] AMRANE, A.; PRIGENT, Y. Influence of Media Composition on Lactic Acid Production rate from Whey by *Lactobacillus helveticus*. *Biotechnol. Lett.* 15 (3): 239-244. 1993.
- [2] AMRANE, A.; PRIGENT, Y. Mathematical Model for Lactic Acid Production from Lactose in Batch Culture: Model development and simulation. *J. Chem. Techn. Biotechnol.* 60: 241-246. 1994.
- [3] A.O.A.C. **Official Methods of Analysis**. 15th edition. Association of Official Analytical Chemists. Arlington, Virginia. 1990.
- [4] DUBOIS, M.; GILLES, A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric Method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28 (3): 350-356. 1956.
- [5] MERCIER, P.; YERUSHALMI, L.; ROULEAU, D.; DOCHAIN, D. Kinetics of Lactic Acid Fermentation on Glucose and Corn by *Lactobacillus amylophilus*. *J. Chem. Techn. Biotechnol.* 55: 111-121. 1992.
- [6] Ministerio de Agricultura y Cria. Anuario Estadístico. Región Zuliana. 1997.
- [7] MORESI, M.; TRUNFIO, A.; PARENTE, E. Kinetic of Continuous Whey Fermentation by *Kluyveromyces fragilis*. *J. Chem. Techn. Biotechnol.* 49: 205-222. 1990.
- [8] PIRT, S. **Principles of Microbe and Cell Cultivation**. 1st edition. Blackwell Scientific Publications London: 274 pp 1975.
- [9] ROY, D.; LEDUY, A.; BOULET, J. Kinetic of growth and lactic acid production from whey permeate by *Lactobacillus helveticus*. *Chem. Eng.* 65 (4): 597-603. 1987.
- [10] SEVGI, O.; MUSTAFA, O. Effects of Substrate Concentration on Growth and Lactic Acid Production by Mixed Cultures of *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. *J. Chem. Techn. Biotechnol.* 54: 57-61. 1992.
- [11] STEVERINK, A. Gas-chromatographic Method for the Determination of Volatile Fatty Acids (C₁-C₇) and Lactic Acid. *Analyst*, February, 1984.