

## 2 Proteína microbiana a partir de suero de leche (Microbial protein from cheese whey) Miguel Otero

Miguel A Otero-Rambla y Amaury Alvarez Delgado

Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA)

Vía Blanca 804 y Carr Central La Habana 11000 Cuba

### Resumen

Desde hace más de veinte años algunas especies de bacterias, levaduras y hongos han sido empleadas para la producción de proteína microbiana (PM), a partir de sustratos de bajo valor y residuos como fuente carbonada y energía. El papel de la PM como alimento seguro para animales y humanos, ha sido aún más enfatizado debido a la escasez mundial de proteínas. Aún cuando la PM ha sido comercializada exitosamente por décadas, las diferentes etapas para desarrollar procesos de este tipo no han cambiado. Las condiciones óptimas de propagación, los sustratos potenciales y un amplio rango de microorganismos es aún un blanco perseguido por muchos investigadores. En este artículo los métodos comúnmente empleados para la producción y los diferentes arreglos de propagación sumergida, se destacan como los más apropiados.

Palabras clave: Lactosuero, residuo industrial, biomasa de levadura, condiciones de fermentación, proteína microbiana

### Abstract

Since one score ago, some species of bacteria, yeast and fungi have been used to produce protein biomass or single-cell protein (SCP), with inexpensive feedstock and wastes being used as their sources of carbon and energy. The role of SCP as a safe food and feed is being highlighted more because of the worldwide protein scarcity. Even though SCP has been successfully commercialized for decades by now, the different steps to develop such a process have not change. The optimal fermentation conditions, potential substrates, and a broad range of microorganisms is still being pursued by many researchers. In this paper, commonly used methods for the production of SCP and different fermentation systems are briefly reviewed, with submerged fermentation being highlighted as a more commonly used method.

Keywords: Cheese whey, industrial waste, yeast biomass, Fermentation conditions, microbial protein,

Recibido: 18 de agosto de 2019

Aceptado: 18 de septiembre de 2019

---

### Introducción

El suero de leche es un líquido amarillo verdoso subproducto de la fabricación de quesos que queda después de la coagulación y extracción de la caseína y la grasa de la leche entera. Representa alrededor del 85-90% del volumen inicial de leche.

Uno de los usos más atractivos del suero es el desarrollo de productos basados en las proteínas remanentes (Jelen 2009, Boland *et al* 2011, Jeewanthi 2015) para obtener concentrados de proteínas de excelente calidad para consumo animal y/o humano. Este proceso de aislamiento de proteínas requiere de tecnología de membranas (ultrafiltración) para separarlas y rinde un permeado de suero con alto contenido de lactosa y por tanto un elevado poder contaminante (Atra *et al* 2005). El permeado después de la separación de las proteínas es rico en lactosa (39-48 g/L), las cenizas

originales, que no son retenidas por las membranas y un pequeño remanente de proteínas de bajo peso molecular (1-3 g/L) (Paraskevopoulou *et al* 2003, Ghaly *et al* 2005, Kotoupas *et al* 2007).

La industria láctea genera más de 80 millones de toneladas de suero anualmente, por lo que su adecuada disposición es un importante problema medioambiental dado su elevado poder contaminante, la DBO está en el rango de 30000-50000 mg/l mientras la DQO asciende hasta 60000-80000 mg/L lo que hace imposible su disposición directa en curso de agua alguno. La lactosa es, por mucho, el mayor responsable de esta elevada demanda de oxígeno (Paterson 2009, Panesar y Kennedy 2012).

La lactosa presente puede ser utilizada para la producción de proteínas microbianas (MP) empleando levaduras capaces de asimilar este azúcar como las del género *Kluyveromyces* altamente productivas e seguras para el consumo humano (Babu *et al* 2014). Existen también otras levaduras pertenecientes al género *Candida*, especialmente *Candida kefyr* (anteriormente *Candida pseudotropicalis*). Esta última sin embargo, no es aconsejable para el uso a gran escala por los eventos de toxicidad potenciales (Dufresne *et al* 2014).

Las tecnologías de producción de proteína microbiana se empezaron a estudiar como parte de la solución a la escasez de proteínas en el mundo. Estos enfoques evolucionaron posteriormente como procesos de bioconversión para la utilización de desechos o subproductos industriales y la obtención simultánea de productos de alto valor agregado.

Hay que tener en cuenta que a pesar de que las proteínas microbianas se producen a partir de sustratos de bajo valor, o incluso valor negativo por su impacto ambiental, la rentabilidad de estos procesos es aún incierta y altamente dependiente de la escala de producción por el elevado costo de la instalación requerida (Yanav *et al* 2016).

Aún así, cuando se comparan estas proteínas con otras fuentes convencionales, la producción de proteína microbiana en escalas adecuadas presenta numerosas ventajas, a saber:

- Los microorganismos tienen una alta tasa de multiplicación celular
- Poseen contenidos de proteína (Nx6.25) en el entorno de 50%
- Pueden utilizar una amplia gama de sustratos de bajo valor como lactosuero, vinazas de destilación de alcohol, entre otros subproductos y desechos industriales
- Las áreas de producción ocupan poco espacio y producen elevados rendimientos biomasa/sustrato, y
- Son independientes de las variaciones climáticas o estacionales

Un problema a tener en cuenta si el objetivo es el consumo humano, es el alto contenido de ácidos nucleicos en especial ARN (Otero *et al* 2012, Otero y Almazan 2012). Los tratamientos diseñados para reducir su contenido hasta límites aceptables para la salud humana, son difícilmente escalables.

### **Proceso de producción de proteína microbiana**

La implementación de la producción de proteína microbiana transita a través de diferentes pasos

#### ***Selección de las materias primas:***

Es un aspecto esencial y es preciso enfocarse en la correcta composición de la fuente carbonada de modo que rinda altas producciones de biomasa en el menor tiempo posible.

Los sustratos carbonados para la producción de PM empleados a escalas de laboratorio, planta piloto e industriales pueden clasificarse en tres categorías:

- Fuentes altamente energéticas (gas natural, n-alcanos, gas-oil, metanol, etanol, ácido acético);
- Desechos o subproductos industriales (melazas de caña, licores negros papeleros, lactosuero, desechos de frutas, etc), y
- Recursos renovables (azúcares, almidón, celulosa)

En el caso que nos ocupa, el lactosuero, pertenece a la segunda categoría y es el sustrato a emplear.

Es pertinente aclarar que en la medida que el sustrato real, en el caso del suero la lactosa, está más oxigenado, menores serán los requerimientos de transferencia de oxígeno al medio y por tanto menor el gasto de energía para lograrlo.

#### ***Selección de microorganismos:***

Este es un paso fundamental en el proceso de producción, todo el trabajo lo hará el microorganismo inoculado, por tanto, su selección debe ser muy cuidadosa. Este debe cumplir varios requisitos, a saber:

- altos rendimientos biomasa/sustrato.
- altas tasas de duplicación celular, y
- un elevado contenido de proteínas.

Lo más conveniente es seleccionar las cepas a estudiar de la propia flora natural de la fuente de carbono y energía a utilizar. Estas poblaciones ya traen adelantada la adaptación al sustrato. No es recomendable el empleo de microorganismos modificados genéticamente pues existe la posibilidad de reversión de la mutación durante el proceso. Un método empleado en la selección de microorganismos es el uso de corridas en cultivo continuo por tiempos prolongados y seleccionar las poblaciones que prevalecen en el tiempo y muestran las mejores condiciones de producción (Arai *et al* 2003).

#### ***Ingeniería de proceso:***

Las condiciones técnicas de cultivo para las cepas optimizadas se llevan a cabo a través de estudios de propagación bajo diferentes condiciones a escala de banco (2-5L) y se determinan las rutas metabólicas de asimilación de sustrato, en caso de no ser conocidas, así como las estructuras y el contenido celular.

El proceso en algunos casos precisa ser escalado a escala de planta piloto para establecer los parámetros tecnológicos y obtener datos fidedignos para el estudio económico del proceso.

#### ***Desarrollo de tecnología:***

Este es el siguiente paso en el que se adopta la tecnología a seguir.

- Modo de producción continuo, lotes alimentados (*fed batch*) o por lotes (*batch*).
- Temperatura del proceso. Este es un parámetro de vital importancia y debe estar cercana al óptimo del microorganismo. Sin embargo, la generación de calor biológico en el proceso tiende al incremento de la temperatura y deben instalarse sistemas de refrigeración para mantenerla dentro de límites razonables para las células y la economía del proceso.
- pH. Los microorganismos presentan valores óptimos de pH entre 5 y 7. Este debe mantenerse dentro del rango para garantizar un desarrollo estable de las células. Uno de los productos del metabolismo celular son los ácidos orgánicos de cadena corta (acético, propiónico etc) y por tanto el pH tiende a bajar, así, no se puede dejar flotar libremente este parámetro pues iría en detrimento del proceso.
- Transferencia de oxígeno (agitación). Es consumidor importante de energía
- Adición de antiespumante al cultivo. Esto evita los procesos de cavitación en bombas y separadoras.
- En el caso del cultivo continuo, el flujo de alimentación debe ser óptimo. Flujos bajos incrementan los tiempos de retención y obligan a capacidades de reactores mayores, flujos muy altos pueden producir el lavado del sistema (*wash out*) ante cualquier cambio fortuito. Debe tenerse en cuenta que la tasa de alimentación al sistema en el modo continuo establece la tasa de crecimiento de la población microbiana por lo que el proceso transcurre a tasas de crecimiento inferiores a la máxima.

**Factores económicos asociados:**

Consumo energético y los costes de producción son los factores más importantes para un proceso a gran escala. Esta por tanto debe ser cuidadosamente establecida en función de los costes y la eficiencia del proceso.

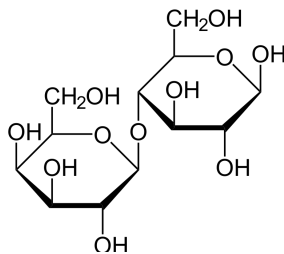
**Demandas de seguridad y protección ambiental:**

Desde que la MP se produce para la alimentación animal o bien directamente para humanos, la seguridad del producto debe quedar fuera de toda duda. En el caso del suero existe la ventaja que las levaduras capaces de utilizar eficientemente la lactosa son del tipo GRAS (*Generally Regarded As Safe*). Una vez que el proceso pasa a la escala de producción se precisa un seguimiento exhaustivo de la presencia de contaminantes en el cultivo, a menos que este se lleve a cabo en condiciones de esterilidad, no recomendables por su alto coste.

La disposición de los residuos finales deben ser objeto de estudio igualmente a fin de cumplimentar las regulaciones ambientales de cada país. Como en general se emplean fuentes carbonadas contaminantes, el proceso tiene la ventaja de servir al mismo tiempo como tratamiento primario de éstas (Chatzipaschali y Stamatis 2012, Chanfrau *et al* 2017).

**Resultados****Factores de influencia en la producción de proteína microbiana****Fuente de carbono**

El lactosuero es rico en lactosa, un disacárido constituido por glucosa y galactosa unidas por enlaces  $\beta$ -1,4 glicosídicos. La Fig 1 muestra la estructura de la lactosa



**Fig 1 Estructura del disacárido lactosa**

El contenido de lactosa en suero varía en función del tipo de leche pero en general se encuentra en el entorno de 50 g/L (Ryan y Walsh 2016). El sustrato, si bien no requiere un tratamiento severo antes de su empleo, no debe ser utilizado directamente. El contenido de proteínas remanente después de la fabricación de queso (ver Tabla 1) está en el entorno de 9-10 g/L. Estas proteínas solo van a la zaga en calidad nutricional a las del huevo entero. En general, el valor biológico (BV), la razón de eficiencia proteica (PER) y la utilización neta de proteínas (NPU) de las proteínas de huevo y suero son 104 y 100, 3.6 y 3.8 y 92 y 94 respectivamente (Smithers 2008). De ahí que sea preferible la separación previa de las proteínas por membranas seguida de secado por atomización y obtener a partir de éstas un polvo comercializable en forma de concentrado (< 85%) o aislado (> 90%), conveniente para la economía global del proceso.

No obstante, es posible también la utilización directa del suero sin previa separación de las proteínas presentes pues los microorganismos son capaces de utilizarla en una proporción importante. A pesar que el suero es rico también en aminoácidos esenciales como lisina, metionina y cisteína (Smithers 2008), es un sustrato pobre en cuanto a su contenido de otros nutrientes esenciales para el crecimiento microbiano, por lo que es precisa su suplementación (Macawan *et al* 2016).

La Tabla 1 muestra la composición típica de suero de leche.

Tabla.1 Composición típica del suero de leche\*

Componente	Suero dulce	Suero ácido	Chana/Paneer
Total solids (%)	7.0	7.0	6.5
Fat (%)	0.3	0.1	0.5
Protein (%)	0.9	1.0	0.4
Lactose (%)	4.9	5.1	5.0
Ash (%)	0.6	0.7	0.5

\*Gupta, 2000

Un producto disponible ampliamente en la industria azucarera son las melazas de caña, subproducto de la cristalización de la sacarosa. Las melazas se han empleado sistemáticamente en Cuba, para el enriquecimiento de vinazas de destilación de alcohol para la producción de biomasa utilizando la levadura *Candida utilis* a escala industrial (Otero *et al* 2003, Martinez *et al* 2004). Los autores emplearon como criterio de formulación del medio de propagación el valor de DQO en vinazas y melazas, proponiendo una composición de medio de 80:20 respectivamente. En el caso del suero se puede aplicar un enfoque similar si se tiene en cuenta que las vinazas de destilación de etanol presentan un valor de DQO entre 60-80 mg/L (Otero *et al* 2002). Las melazas de caña por su parte, han sido empleadas como única fuente de carbono en la producción de etanol en sus dos etapas (propagación aeróbica de levadura y fermentación alcohólica) con la sola suplementación de sales de amonio, lo que demuestra la riqueza de este sustrato.

La Fig 2 muestra el comportamiento de la propagación de *Candida utilis* en mezclas vinazas-melazas (80:20 sobre DQO).

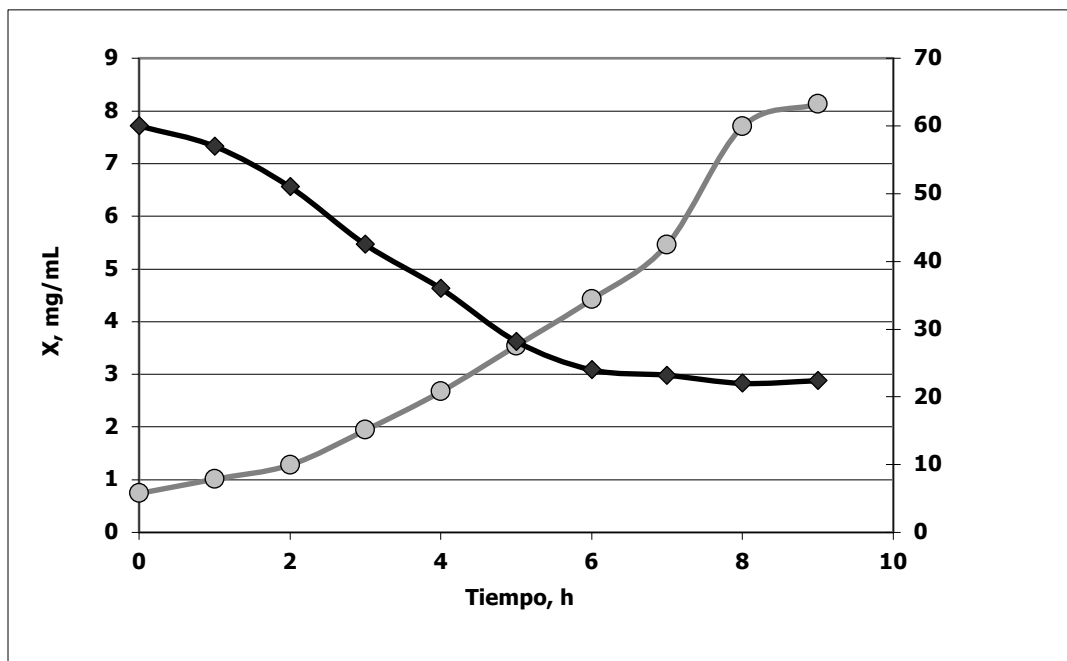
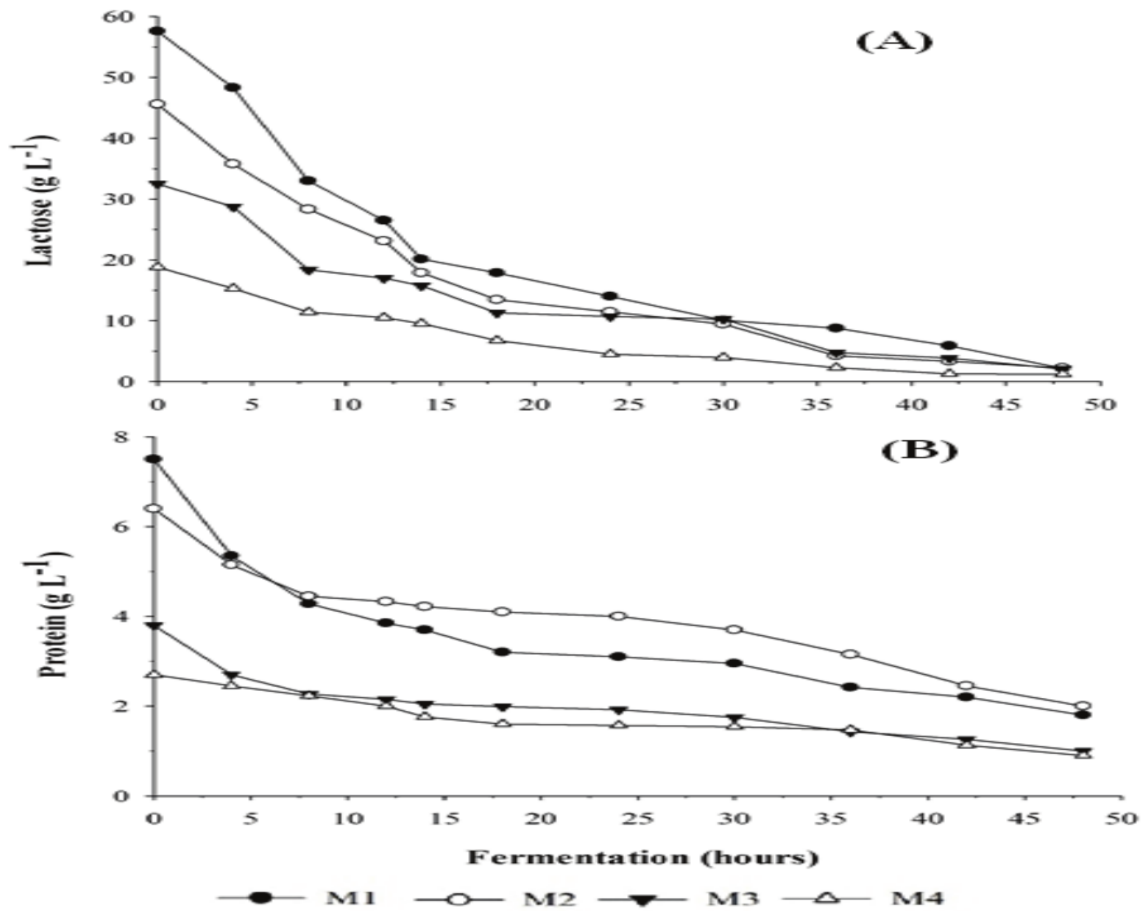


Fig 2 Cinética de crecimiento celular de *C. utilis* en mezclas vinazas-melazas (80:20 base DQO). El proceso se basa en un medio con DQO = 50 000 mg/L

Esta combinación funciona igualmente para el suero libre de proteínas con resultados incluso superiores. Es de esperar incluso resultados superiores, si se tiene en cuenta que el lactosuero es más rico que las vinazas por su alto contenido de lactosa.

Otero *et al* (2009) reportaron el consumo de lactosa por especies de *Kluyveromyces spp.* Los autores obtuvieron concentraciones de levadura utilizando solamente lactosuero suplementado con sales de amonio y de 7 g/L después de 10 horas de propagación. Se ha reportado igualmente el consumo de lactosa y proteínas de lactosuero por células de levadura del mismo género *Kluyveromyces* (Koushki et al 2012, Zoppellari y Bardi 2013). Estos autores observaron un consumo de lactosa superior a 95% del contenido inicial, en tanto que el consumo de proteínas por las células fueron en el entorno de 70.00%.

La reducción de DQO fue también un resultado a destacar en estos estudios. La Fig 3 muestra resultados análogos obtenidos por Murari *et al* 2017.



**Fig 3 Consumo de lactosa (A) y proteína (B) por *K. marxianus* en diferentes concentraciones de suero después de 48 horas de cultivo (Murari *et al* 2017).**

Con relación a DQO presente en el medio inicial, la Fig 4 muestra los resultados obtenidos por estos autores.

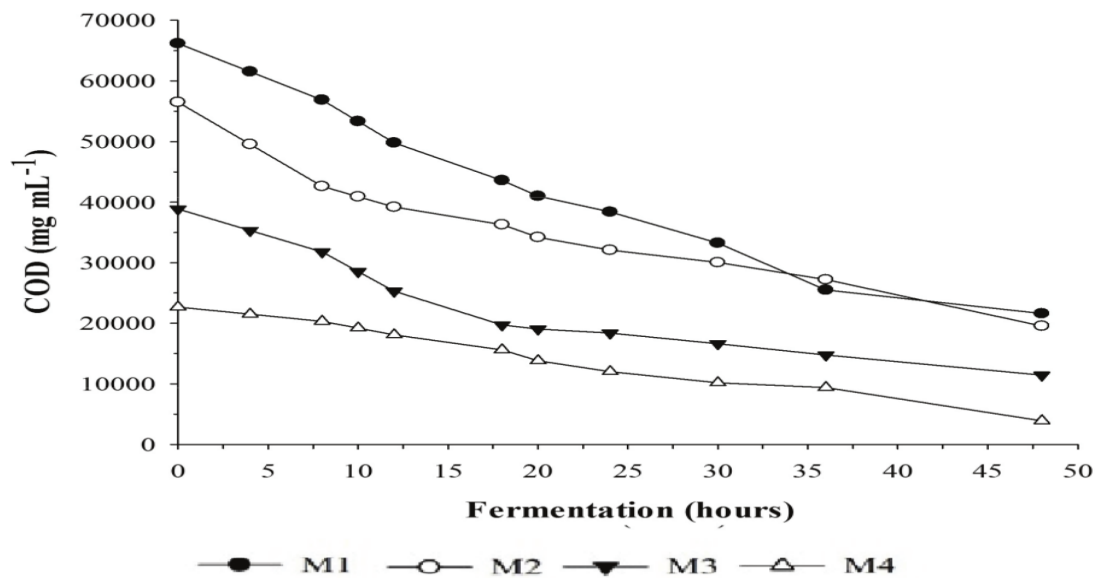


Fig 4 Reducción de DQO durante la propagación de *K. marxianus* en suero de leche crudo (Zoppellari y Bardi 2013)

#### Fuente de nitrógeno

Debido a las propiedades estructurales de las células, es preciso suplementar el medio con fuentes de nitrógeno para garantizar la síntesis de proteínas. La biomasa se calcula para 50% de proteína cruda ( $N \times 6.25$ ) y por tanto la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo debe ser la suficiente para estos propósitos. Estas fuentes pueden ser de origen orgánico o inorgánico. Se prefieren las últimas, sin embargo, por su menor costo. Las fuentes de nitrógeno más empleadas son amonio como tal, urea y sales de amonio (Reihani y Khosravi-Darani 2019). No todas las fuentes conducen a los mismos resultados en cuanto a rendimiento y productividad. Cuando se empleó urea como fuente de nitrógeno en la producción de *Candida utilis* se obtuvieron valores bajos de concentración celular en comparación con otras fuentes como sulfato de amonio (Zhao *et al* 2010). No obstante el empleo de urea combinada con sales de amonio permite controlar el pH en el entorno de 4 lo que es favorable para limitar las contaminaciones por bacterias ambientales si el proceso se lleva a cabo en cultivo continuo.

En la utilización de suero como sustrato puede emplearse una composición de medio parecida al de la producción a partir de vinazas de destilación (Otero *et al* 2002) empleando sulfato de amonio y fosfato de amonio como fuentes de nitrógeno y fósforo en concentraciones similares a las utilizadas en esta tecnología.

#### Aeración

La aeración es una operación importante en el cultivo sumergido pues es la vía de absorción de oxígeno por los microorganismos en la propagación aeróbica. Como se ha mencionado anteriormente mientras más reducido está el sustrato (menos oxígeno en su composición) mayor el rendimiento, pero mayor también la cantidad de oxígeno requerida para su completa oxidación a  $CO_2$  y agua y mayor energía para transferirlo al medio.

Se ha reportado (Nanou *et al* 2011) que la morfología del microorganismo juega un rol esencial en la absorción de oxígeno (Fonseca *et al* 2007). Un estudio realizado ha demostrado que la mejor tasa de aeración (volumen de aire/volumen de medio/minuto -vvm) y el oxígeno disuelto para producir un

mayor rendimiento de *Candida utilis* fueron de 1 vvm y 50% respectivamente (Rajoka *et al* 2006). Un trabajo posterior (Anvari y Khayati 2011) con diferentes cepas de *Kluyveromyces spp.* mostraron que los mayores rendimientos se obtuvieron con una aeración de 1 vvm.

### Temperatura y pH

Ya hemos visto la influencia de la temperatura sobre el crecimiento de los microorganismos y por tanto en la productividad del proceso de producción de MP (Rao *et al* 2010, Ferreira *et al* 2014). Aunque se ha reportado la temperatura ambiente como la óptima para la mayoría de los microorganismos, en el caso de las levaduras como es el caso de *K. marxianus* este valor es significativamente superior y se encuentra entre 33 and 35°C (Ghaly *et al* 2005, Zhao *et al* 2010).

El consumo de lactosa por la levadura requiere de la secreción de la enzima lactasa ( $\beta$ -galactosidasa). Por tanto, las condiciones para una expresión óptima de esta enzima son las del crecimiento del microorganismo y coinciden con las reportadas previamente.

La Tabla 2 muestra el efecto de pH y temperatura sobre la producción de  $\beta$ -galactosidasa producida sobre suero.

pH	Actividad enzimática UI/g peso seco	Temperatura, °C	Actividad enzimática UI/g peso seco
4.0	1370	20	1330
4.5	1460	25	1470
5.0	1490	30	1490
5.5	1480	35	1370
6.0	1440	40	250

Tabla 2. Efecto de pH y temperatura sobre la producción de  $\beta$ -galactosidasa por *Kluyveromyces marxianus*

### Conclusiones

De acuerdo con los estudios realizados por diferentes autores, los factores de mayor influencia en la propagación de biomasa de levadura a partir de suero de leche son los mencionados anteriormente. La selección y aislamiento del (los) microorganismo a emplear debe ser llevada a cabo a partir del sustrato y sus poblaciones autóctonas.

El empleo de cepas certificadas no siempre es recomendable pues la adaptación al sustrato específico no está garantizada y sería preciso además pagar por esta.

Otros factores como temperatura y pH dependerán de los estudios a escala de banco (2-5L) pero en general se pueden establecer en el entorno de pH 3.5-4.5 y temperatura entre 33 y 35°C.

La agitación y aeración deben ser objeto especial de estudio por cuanto son de primordial importancia en la economía del proceso por el consumo energético.

Dado que la mayoría de los estudios se han realizado a escala de banco (< 2L) el escalado a planta piloto, 250-1000L, puede aclarar la influencia de estos parámetros en el proceso global.

Si como se puede suponer, el suero muestra un comportamiento similar al de las vinazas de destilación de alcohol, los resultados cinéticos obtenidos a escala de banco pueden trasladarse sin etapas intermedias a nivel industrial, no así para los consumos de energía.

Un aspecto que no debe olvidarse es la disponibilidad de suero de manera estable para alimentar esta producción durante la mayor parte del año. A estos efectos la posibilidad de asociación de varios productores cercanos puede ser un enfoque apropiado y por tanto sería conveniente estudiar la posibilidad de mezclar diferentes sueros y su influencia en los resultados del proceso.

El cultivo continuo parece ser el modo de propagación más prometedor, no obstante no es descartable el uso del modo de lotes alimentados (*fed batch*) para la reducción de la contaminación por microorganismos indeseados.



## Referencias

1. Anvari M, Khayati G. 2011. Submerged yeast fermentation for cheese whey for protein production and nutritional profile analysis. *Adv J Food Sci Technol* 3 (2):122-126
2. Arai F, Ichikawa A, Fukuda T, Katsuragi T. 2003. Continuous culture and monitoring of selected and isolated microorganisms on a chip by thermal gelation 7th International Conference on Miniaturized Chemical and Biochemical Analysts Systems October 5-9, Squaw Valley, California USA
3. Atra R, Vatai G, Molnar BE, Balint A. 2005. Investigation of ultra- And nanofiltration for utilization of whey protein and lactose. *J Food Eng* 67: 325332
4. Boland M. 2011 Whey proteins. In: Phillips GO, Williams PA, Handbook of Food Proteins. Elsevier, USA.
5. Chanfrau JMP, Pérez JN, Fiallos MVL, Rivera L, Abril VH, Guerrero MJC, Toledo LET. 2017. Milk Whey- From a Problematic Byproduct to a Source of Valuable Products for Health and Industry: An Overview from Biotechnology *Prensa Med Argent* 103 (4)
6. Chatzipaschali AA, Stamatis AG. (2012) Biotechnological Utilization with a Focus on Anaerobic Treatment of Cheese Whey: Current Status and Prospects. *Energies* 5: 3492-3525; doi:10.3390/en5093492energies ISSN 1996-1073 www.mdpi.com/journal/energies
7. Dufresne SF, Marr KA, Sydnor E, Staab JF, Karp JE, Lu K, Zhang SX, Lavallee C, Perl TM, Neofytos D. (2014) Epidemiology of *Candida Kefyr* in Patients with hematologic malignancies *J Clin Microbiol* 52 (6):1830-1837
8. Ferreira JA, Lennartsson PR, Taherzadeh MJ. 2014. Production of ethanol and biomass from thin stillage using food-grade *Zygomycetes* and *Ascomycetes filamentous* fungi. *Energies* 7 (6):3872-3885
9. Fonseca GG, Gombert AK, Heinzle E. 2007. Physiology of the yeast *Kluyveromyces marxianus* during batch and chemostat cultures with glucose as the sole carbon source . *FEMS Yeast Res* 7 (3):422-435
10. Ghaly A E, Kamal M, Correia LR. 2005. Kinetic modelling of continuous submerged fermentation of cheese whey for single cell protein production. *Bioresource Technol.*, 96, 1143-1152.
11. Grba S, Stehlik-Tomas V, Stanzer D, Vahèia N, Škrilin A. 2002. Selection of Yeast Strain *Kluyveromyces marxianus* for Alcohol and Biomass Production on Whey. *Chem Biochem Eng Q.* 16 (1):13-16
12. Gupta VK. 2000. Overview of processing and utilization of dairy by products. *Indian Dairyman* 52: 55-59. Jeewanthi RKC, Lee NK, Paik HD. 2015. Improved Functional Characteristics of Whey Protein Hydrolysates in Food Industry. *Korean J Food Sci Anim Resour* 35: 350-359.
13. Jelen P. 2009. Dried Whey, Whey Proteins, Lactose and Lactose Derivative Products, Dairy Powders and Concentrated Products Society of Dairy Technology. John Wiley & Sons, USA.
14. Kotoupas A, Rigas F, Chalaris M. 2007. Computer-aided process design, economic evaluation and environmental impact assessment for treatment of cheese whey wastewater. *Desalination*, 213, 238-252.
15. Koushki M, Jafari M, Azizi M. 2012. Comparison of ethanol production from cheese whey permeate by two yeast strains. *J Food Sci Technol* 49(5), 14-619.
16. Macwan SR, Dabhi BK, Parmar SC, Aparnathi KD. 2016. Whey and its Utilization *Int J Curr Microbiol App Sci* 5(8): 134-155
17. Martínez JA, Almazan OA, Saura G, Otero MA. 2004 Production of fodder yeast from stillage in Cuba: an environmental approach *Zuckerindustrie* 129 (2):92-95
18. Murari CS, Moraes Niz da Silva DC, da Silva BL, Del Bianchi VL. 2017. Influence of the nutrient concentrations of whey on ethanol and biomass production and COD reduction *Acta Scientiarum Technol* 39, 05, 2017

19. Nanou K, Roukas T, Papadakis E. 2001. Oxidative stress and morphological changes in *Blakeslea trispora* by enhanced aeration during carotene production in a bubble column reactor. *Biochem Eng 54 (3):172-177*
20. Otero MA, Saura G, Valdes IF, Peña MA, Martínez JA, Pascual A. 2002. Análisis operacional del complejo destilería-planta de levadura del CAI Antonio Guiteras. Parte II *Sobre los deriv 36 (2):7-10*
21. Otero MA, Saura G, Martínez JA, Fundora N, Reyes E, Vasallo MC, Almazan OA. 2003 Propagation of yeast biomass from distillery wastes. Process and product evaluation *Int Sugar J 105 (1249):36-39*
22. Otero, MA, Saura G, Wagner JR, Guerrero I (2009) Propagación discontinua de la levadura *Kluyveromyces sp* a partir de suero de queso *Sobre los Deriv 43 (3);3-7*
23. Otero MA, Almazán OA, Álvarez A. 2012. La proteína unicelular. Microorganismos, sustratos y fermentadores Editorial Académica Española, LAP LAMBERT Academic Publishing GmbH & Co. KG. Heinrich-Böcking-Str. 6-8 D - 66121 Saarbrücken ISBN 978-3-8484-7077-8
24. Otero MA, Almazán OA. 2012. Las levaduras como base de una industria. Diferentes aplicaciones Editorial Académica Española, LAP LAMBERT Academic Publishing GmbH & Co. KG. Heinrich-Böcking-Str. 6-8 D - 66121 Saarbrücken ISBN 978-3-659-02736-9
25. Panesar PS. 2008. Production of  $\beta$ -galactosidase from whey using *Kluyveromyces marxianus*. *Res Microbiol J 3 (1):24-29*
26. Panesar PS, Kennedy JF. 2012. Biotechnological approaches for the value addition of whey. *Crit Rev Biotechnol 32: 327-348*
27. Paraskevopoulou A, Athanasiadis I, Kanellaki M, Bekatorou A, Blekas G, Kiosseoglou V. 2003. Functional properties of single cell protein produced by kefir microflora. *Food Res. Int.*, 36, 431-438.
28. Paterson AHJ. 2009. Production and uses of lactose. *Adv. Dairy Chem 3: 105120*.
29. Rajoka MI, Khan SH, JKabbar MA. 2006. Kinetics of batch single cell protein production from rice polishing with *Candida utilis* in continuously aerated tank reactor. *Biores Technol 97 (15):1934-1941*
30. Rao M, Varma AJ, Deshmukh SS. 2010. Production of single cell protein, essential aminoacids, and xylanase by *Penicillium janthinellum*. *Bioresources 5:2470-2477*
31. Reihani FS, Khosravi-Darani K. 2019. Influencing factors on single-cell protein production by submerged fermentation: a review. *Elect J Biotechnol 37:34-40*
32. Ryan MP, Walsh G. 2016. The biotechnological potential of whey. Article in Reviews in Environmental Science and Bio/Technology · August DOI: 10.1007/s11157-016-9402-1
33. Smithers GW (2008) Whey and whey proteins-From 'gutter-to-gold'. *Int Dairy J 18:695-704*
34. Suman G, Nupur M, Anuradha S, Pradeep B. 2015. Single Cell Protein Production: A Review *Int J Curr Microbiol App Sci 4(9): 251-262*
35. Waites MJ, Morgan, Rockey JS, Higton G. 2001. Industrial microbiology: an introduction. Blackwell Publishing, UK, 14, 219-223.
36. Yadav JSS, Yan S, Ajila CM, Bezawada J, Tyagi RD. 2016. Food-grade single-cell protein production, characterization and ultrafiltration recovery of residual fermented whey proteins from whey. *Food Bioprod Process 99: 156165*.
37. Zhao G, Zhang W, Zhang G. 2010. Production of SCP using waste capsicum powder produced during capsanthin extraction. *Letters Appl Microbiol 50 (2):187-191*
38. Zoppellari F, Bardi L. 2013. Production of bioethanol from effluents of the dairy industry by *Kluyveromyces marxianus*. *New Biotechnol 30(6), 607-613*.