

1 Potencialidad del suero de leche en biotecnología (Potential of cheese whey in biotechnology) Amaury Álvarez

Amaury Alvarez-Delgado y Miguel A. Otero-Rambla
Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA)
Vía Blanca 804 y Carretera Central La Habana 11000 Cuba

Autor correspondiente: Miguel A. Otero-Rambla Email: maorambla@yahoo.es

Recibido: 18 de octubre de 2020

Aceptado: 18 de diciembre de 2020

Resumen

El presente trabajo aborda las potencialidades de aplicación de lactosuero en Biotecnología. Se analiza la composición del suero y su valor nutricional, así como su impacto ambiental. Además de los usos tradicionales de este coproducto de la fabricación de queso: uso directo en alimento animal, como fertilizante y la obtención de otros tipos de queso como el pecorino, se ofrecen otras alternativas posibles como alimento humano en forma de bebidas energizantes, mantequilla de suero y etanol para bebidas alcohólicas. El aislamiento de las proteínas presentes en el lactosuero para su venta en la red de gimnasios como reconstituyente parece una opción promisorio de revalorización. De igual forma la producción de proteína microbiana y etanol para bebidas o combustible sugieren aplicaciones con futuro en la revalorización de lactosuero.

Palabras clave: revalorización de lactosuero, aplicaciones biotecnológicas, producción de etanol, aislados de proteínas, proteína microbiana.

Abstract

Present paper deals with cheese whey potential for Biotechnology. Whey composition is analyzed together with its nutritional value and environmental impact. Apart from the traditional uses of this cheese-making co-product, namely: direct use on animal feeding, fertilizer and other cheese production as pecorino cheese, other alternatives are offered as human food as energizing beverages, cheese butter, and ethanol for liquor production. The isolation of soluble proteins remaining in whey after coagulation for muscle rebuild in gymns net, seems to be a promisory option for whey upgrading. Likewise microbial protein production and fuel alcohol forecast future development in whey uses.

Keywords: cheese whey upgradingt, biotechnological usage, ethanol porduction, whey protein isolate, microbial protein.

Introducción

El suero de leche es un líquido amarillo-verdoso que se obtiene como subproducto de la fabricación de queso. El color amarillento se lo da la presencia de Riboflavina (De Wit, 2001). El tipo de suero depende del procesamiento utilizado para eliminar la caseína de la leche. Los tipos más comunes de suero son el dulce (*sweet whey*) y el ácido (*acid whey*).

El primer paso para obtener el suero dulce es la adición de cuajo (*rennet*) que es una mezcla de enzimas, entre éstas, la proteasa quimotripsina. Esta enzima produce la cuajada de la caseína (desnaturalización enzimática). Los grumos son posteriormente separados del líquido remanente que es el conocido lactosuero. El proceso de cuajado se produce a pH en el entorno de 6.5 (Panaser *et al* 2007).

El otro tipo de suero, el ácido, se produce por la acción de microorganismos acidófilos tales como los *lactobacillus* o por la adición de ácido láctico o ácido mineral (sulfúrico o clorhídrico generalmente) y de ahí su pH que es significativamente más bajo, encontrándose en el entorno de 4.5. El pH ácido en general desnaturaliza las proteínas haciéndoles perder sus estructuras superiores, en el caso de la caseína se destruye la estructura terciaria y pierde la solubilidad (presenta punto isoeléctrico a pH 4.5) que conduce a la aparición de los grumos. La Fig 1 presenta una visión esquemática de ambos tipos de tratamiento.

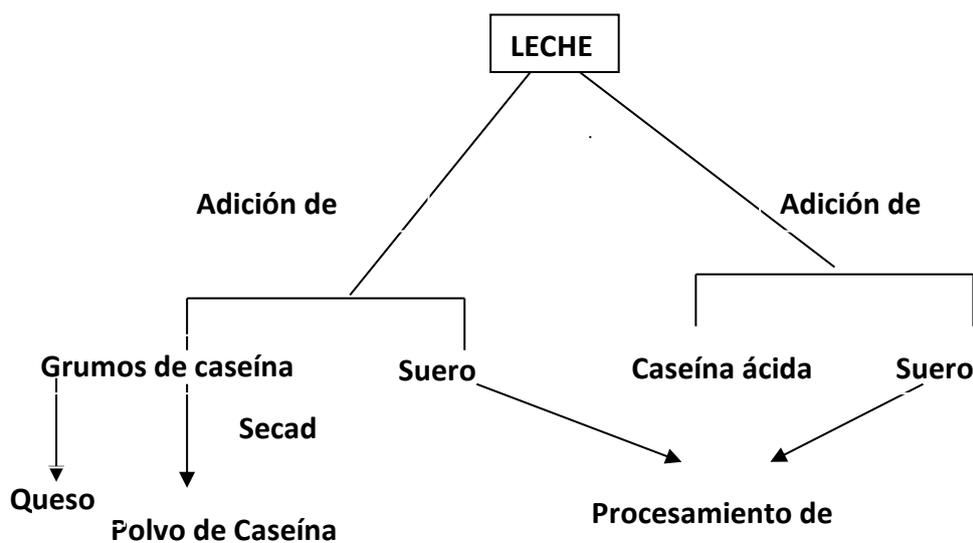


Fig 1 Esquema de tratamientos para la producción de quesos

El suero representa el 85%-95% del volumen original de la leche y retiene cerca del 55% de los nutrientes de ésta. Aproximadamente 20% del total de proteínas de la leche es conservada en el suero (Walsh 2014). El componente mayor del suero es agua, seguido por la lactosa (70%-72% de la materia seca), proteínas (8%-10% de la MSG) y minerales (cenizas 12%-15%). Calcio, potasio, sodio y magnesio proporcionan los componentes mayoritarios en forma de sales generalmente en forma de cloruros y trazas de Zn y Cu (Venetsaneas *et al* 2009). Los dos tipos de suero difieren en su composición en el contenido de proteínas, pH y minerales. En el suero se ha informado la presencia de ácidos cítrico y láctico, urea y ácido úrico y vitaminas del complejo B, pero éstos son componentes minoritarios. (Kosikowski 1979, Marwaha y Kennedy 1988). Por otra parte la composición de suero, como es de esperar, se ve afectada por la procedencia de la leche.

La Tabla 1 muestra la composición de proteínas de suero.

Tabla 1: Constituyentes mayoritarios de la fracción proteica del suero

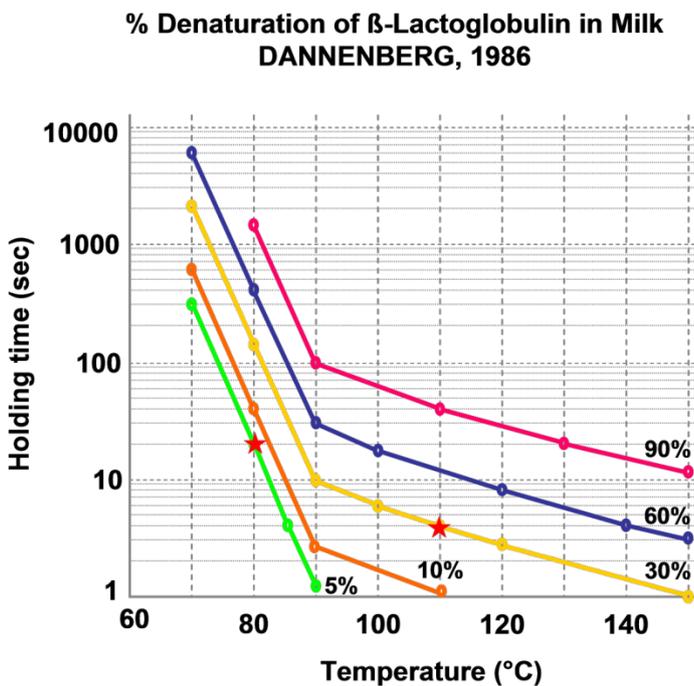


Fig 3 Desnaturalización térmica de β -lactoglobulina en leche

Impacto ambiental de suero de leche

El principal problema en el manejo de suero de leche es su disposición ambiental. Debido a sus componentes biodegradables la DBO se eleva hasta 40,000-60,000 mg/L. La DQO es aún mayor 50,000-80,000 mg/L (Chatzipaschali y Stamatis 2012). Este elevado potencial contaminante hace prohibitiva su disposición ambiental, incluso previo tratamiento de degradación de la materia orgánica. La lactosa, el componente mayoritario, es el principal responsable de éstos valores de DBO y DQO (Patel y Murthy 2011).

La producción de suero de leche a escala mundial es casi igual a los volúmenes de leche procesada en la fabricación de quesos y se estima en el entorno de 190 millones de toneladas por año (Baldasso *et al* 2011). La relación de queso a suero es 9 L de suero/kg de queso y los volúmenes de éste, a nivel mundial, se incrementan en la misma proporción que lo hace la leche destinada a fabricar quesos.

La disposición de suero crudo directamente en los cursos de agua está prohibida en la mayoría de las naciones productoras. Un derrame accidental en un cuerpo acuífero en Ohio en 2008 produjo la muerte de más de 5400 animales silvestres, en su mayoría peces por el consumo total del oxígeno disuelto en las aguas, esencial para la vida acuática. El consumo de oxígeno es debido a su utilización por los microorganismos presentes en el agua para la degradar la lactosa como sustrato.

La aplicación de suero como agua de riego tiene también enormes peligros por la solubilización de Fe y Mn presentes, lo que tiende a incrementar la salinidad de los suelos (Ghaly *et al* 2007).

Las tecnologías de tratamiento de aguas residuales tanto aeróbicas como anaeróbicas pueden mejorar el impacto ambiental del suero, pero son en su mayoría procesos caros. Los sistemas antiguos de tratamiento aeróbico presentan serias dificultades al lidiar con estas altas cargas orgánicas lo que conduce a la necesidad de diluir estos residuos previamente para adecuarlos a las capacidades del sistema (incremento significativo de los volúmenes a manejar) y por tanto, altos tiempos de retención para ser eficientes en la reducción de la carga orgánica hasta límites manejables por los acuíferos receptores (Rivas *et al* 2010). Por otra parte los lodos (biomasa microbiana) producidos también conforman un serio problema para su disposición (Prazeres *et al* 2012). Los sistemas anaeróbicos tienen la ventaja de poder manejar altas cargas orgánicas y producir biogas que puede ser empleado como combustible alternativo en cocinas y plantas de generación eléctrica

(Chatzipaschali y Stamatis, 2012). No obstante, no son aplicables en todo tipo de latitudes además de ser de difícil mantenimiento.

Valor nutricional del suero

Es conocida la excelente calidad nutricional y las propiedades funcionales de los sólidos del suero, en especial de las proteínas (Macwan *et al* 2016). Su valor nutricional solo es superado por las proteínas del huevo. 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. El suero es rico también en aminoácidos esenciales, *i.e.* lisina, metionina y cisteína (Smithers 2008).

Usos tradicionales de suero de leche

La utilización más extendida es su empleo directo en la alimentación animal (cerdos, ovejas y ganado vacuno), o como fertilizante (Watson *et al* 1977). Como alimento animal, usualmente diluido con agua para beber, proporciona proteínas de alta calidad y además lactosa como fuente de energía. Suministra también calcio, fósforo, azufre y vitaminas hidrosolubles. Se ha observado sin embargo, que el exceso de lactosa y minerales puede ocasionar problemas en los animales si no se limitan las cantidades de suero crudo en la dieta (Sienkiewicz y Riedel 1990).

La irrigación presenta también limitaciones significativas por el exceso de K y Mg que puede conducir a la salinización excesiva de los suelos dañando así la fertilidad de éstos. Ambos usos están a su vez limitados por los grandes volúmenes de suero y el alto costo de transportación, sin tener en cuenta que es un material perecedero por la tendencia a la fermentación de la lactosa.

El suero como alimento humano

El suero puede emplearse en la elaboración de productos alimentarios como queso de suero y bebidas. El conocido queso ricotta, al contrario que la cuajada, no se extrae directamente de la leche sino del lactosuero, obtenido en la elaboración de mozzarella, provolone y sobre todo de pecorino. Por esta razón se le denomina con frecuencia queso de suero (Chandan 2003).

Las bebidas más comunes sobre la base de sueros son los jugos de frutas mezclados con suero (Guimarães *et al* 2010). Éste se puede emplear también para producir bebidas alcohólicas.

Es preciso calentar el suero previamente hasta 80°C para desnaturalizar las proteínas presentes y separarlas del medio a fermentar. Los grumos producidos son entonces empleados en la fabricación de queso. La fermentación alcohólica presenta limitaciones con relación a las levaduras a emplear que deben ser capaces de utilizar la lactosa como sustrato como las del género *Kluyveromyces* que desdoblan el disacárido en sus componentes glucosa y galactosa que después son fermentados anaeróbicamente para producir etanol.

La mantequilla de suero es otro producto potencial. La crema de suero es extraída antes de secarlo después de la elaboración de queso o la producción de concentrados de proteínas. La mantequilla producida es ligeramente más blanda que la normal de leche entera y un poco más salada.

Estos productos, no obstante, tienen limitadas opciones comerciales por las dificultades para procesar los enormes volúmenes de suero producidos.

Las proteínas de suero por su parte, poseen muy favorables propiedades funcionales y pueden emplearse como emulsionantes, gelificantes, retenedores de agua y formadores de espuma en los sistemas alimentarios (Svanborg *et al* 2015). Estas propiedades son útiles en numerosos alimentos como sopas, aderezos de ensaladas, carnes procesadas y productos horneados (Walsh 2014). La Tabla 2 muestra algunas de las alternativas de empleo de suero de leche.

Tabla 2: Algunos productos industriales que pueden obtenerse de suero de leche

Productos suero	del	Uso	Producción	Disponible comercialmente
Bioetanol		Combustible, bebidas	Fermentación suero	de Si
Biobutanol		Combustible, industria química	Fermentación suero	de
Antibióticos (Bacteriocinas)		Industrias alimentaria y farmacéuticas	Fermentación permeado del suero	de
Proteína microbiana		Alimento animal	Propagación biomasa microbiana en suero	de Si
Glicerol		Combustible, industria química	Fermentación suero	de
Aceite microbiano		Industrias de alimento y y farmacéuticas	Fermentación suero	de
Vinagre		Industria alimenticia	Fermentación suero	de

Polvos de suero y permeados

El polvo de suero se obtiene mediante el secado por atomización (Kosikowski 1979, Yang y Silva 1995). El secado conserva el suero por un tiempo más prolongado para su transporte y manipulación posterior. El polvo seco se ha empleado básicamente en la alimentación animal mezclado con melazas de caña o harina de soja.

Para la obtención de proteínas de mayor pureza, la lactosa de suero debe ser separada por medio de la tecnología de membranas de ultrafiltración o diafiltración. La ultrafiltración es un proceso gobernado por la presión y usa membranas caracterizadas por su selectividad en relación con el peso molecular de las especies presentes. Esta técnica es adecuada para clarificar soluciones con sólidos suspendidos, bacterias y elevadas concentraciones de macromoléculas. En el proceso los sólidos suspendidos y los solutos con alto peso molecular, son retenidos en tanto que el agua y los componentes de bajo peso molecular pasan a través de la membrana hacia el permeado. La ultrafiltración puede ser aplicada en flujo tangencial (*cross flow*) o de extremo muerto (*dead end*) en dependencia del tipo de membrana empleada. La primera es mucho más eficiente en el control de la formación de artefactos (*fouling*) por deposición de los sólidos sobre la superficie interna de la membrana (Singh 2015).

La técnica de diafiltración continua (conocida como diafiltración a volumen constante) es usada mayormente para el lavado de impurezas de bajo peso molecular en la muestra por la adición de agua o buffer. Es un proceso más amable en el procesamiento de macromoléculas que la ultrafiltración (Lipnizki 2010).

Suero de leche como recurso biotecnológico

Concentrados de proteína de suero

Las membranas de UF poseen un corte de peso molecular (*cut-off*) entre 3000 y 100,000 Da. El más común en esta industria es el standard de 10,000 Da. Este es el corte tradicional para eliminar la lactosa y retener las proteínas (Patel *et al* 1990). De esta forma se producen tanto los concentrados (WPC) entre 35% y 85% de proteínas, como los aislados (WPI) con 90% o más de contenido proteico. La alternativa de secado directo de suero no compete en calidad con los productos procesados por tecnologías de membrana debido a su granulometría y baja solubilidad.

El problema principal de uso de membranas radica en la formación de artefactos en la superficie sobre todo cuando el suero presenta contenidos relativamente altos de fosfato de calcio. El control de estas deposiciones puede llevarse a cabo si se emplea diafiltración a volumen constante para mantener la sal disuelta. El inconveniente es que genera altos volúmenes de permeado libre de proteínas altamente contaminante (Mollea *et al* 2013).

Proteínas y péptidos de suero

Comercialmente la proteína de suero se ofrece en tres diferentes formas:

- **Concentrados** (WPC) usualmente tienen un contenido bajo de grasas y colesterol, aunque aún es significativo, pero en general, contienen entre 35% y 85% de proteínas por unidad de peso.
- **Aislados** (WPI) son procesados para eliminar tanto la lactosa como las grasas presentes. Contienen 90% o más de proteínas. Ambos WPC y WPI tienen sabor ligeramente lácteo.
- **Hidrolizados** (WPH) son las mismas proteínas de suero predigeridas e hidrolizadas parcialmente para facilitar el metabolismo pero el costo de producción es alto (Foegeding *et al* 2002)

Las proteínas de suero son térmicamente sensibles y en ese sentido, el tratamiento térmico de suero para la obtención de WPC o WPI debe ser estrictamente controlado para conservar la solubilidad de las proteínas una propiedad deseada para las aplicaciones posteriores (Wijayanti *et al* 2014, Qian *et al* 2017).

Lactosa

Lactosa o azúcar de leche puede recuperarse del permeado que se obtiene en los procesos de filtración (UF o DF) por cristalización (Patterson 2009). La lactosa se utiliza ampliamente en la industria alimenticia por su bajo poder edulcorante. Se emplea en los productos horneados para promover el oscurecimiento de la corteza por la reacción de Maillard.

Otro uso potencial es hidrolizarla y obtener sus componentes glucosa y galactosa. Este proceso es catalizado por la enzima β -Galactosidasa que puede inmovilizarse en diferentes soportes. La solución resultante muestra un poder edulcorante muy superior al de la lactosa tal cual (Joesten *et al* 2006) y tiene aplicaciones en la industria alimentaria.

Bioconversión de suero en otros productos útiles

Bioetanol

Se ha venido llevando a cabo esfuerzos en todo el mundo con el objetivo de revalorizar el suero como alimento mediante la producción de productos de alto valor agregado. La producción de bioetanol es una de las más estudiadas por el conocimiento actual sobre las tecnologías de fermentación, deshidratación y purificación en columnas de destilación (Ling 2008, Pasoti *et al* 2017). Se ha estudiado igualmente la producción de vinagre (Parrondo *et al* 2009), levadura para producción de extracto (Revillion *et al* 2003) y proteína microbiana (SCP) entre otras aplicaciones (Schultz *et al* 2006).

En las últimas tres décadas muchos autores han investigado la producción de etanol a partir de lactosa por medio de la fermentación directa del permeado de suero con levaduras tales como *K. fragilis*, *K. marxianus* y *Candida kefir* (previamente *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). El empleo de *S. cerevisiae* para la producción de etanol a partir de suero, ha atraído mucha atención. Inicialmente su empleo obligaba a la prehidrólisis por cuanto esta levadura no es capaz de degradar la lactosa. Sin embargo el desarrollo de técnicas modernas de manipulación genética ha hecho posible la obtención de cepas de *S. cerevisiae* capaces de consumir lactosa por medio de fusión de protoplastos y expresión de β -galactosidasa y permeasa heteróloga que son segregadas al medio. El sistema operando en reactor continuo resultó en una productividad de etanol de $\sim 10\text{g/L/h}$ (Domingues *et al* 2010).

Hasta la fecha, sin embargo, estas investigaciones no han ido más allá de los estudios de laboratorio. Solo unos pocos procesos han sido implementados a escala comercial para producir etanol a partir de suero, con plantas en Irlanda, Estados Unidos, Nueva Zelanda, Dinamarca y Alemania.

El Grupo Carbery (Cork, Irlanda) fue la primera compañía en el mundo en operar un proceso de producción de etanol de suero. La planta se inauguró en 1978. El proceso fue diseñado para producir etanol para bebidas, usos farmacéuticos y productos industriales. Los dos primeros requieren etanol de superior calidad. A partir de 2005 la fábrica derivó su producción hacia la obtención de etanol combustible (Doyle 2005, Ling 2008). La planta opera el sistema de fermentación *batch* empleando *K. marxianus*. Antes de la fermentación el permeado de suero se concentra por ósmosis inversa para elevar la concentración de lactosa en el medio hasta 80 g/l. La levadura se recupera al final y se reincorpora al sistema como inóculo varias veces. La concentración de etanol fluctúa entre 2.5–4.2% (v/v). El medio fermentado se destila en un sistema de columnas. Carbery produce alrededor de 10.5 millones de litros de etanol por año (Irish Bioenergy Association 2012).

En Nueva Zelanda, Anchor Ethanol, opera tres plantas que convierten suero en etanol y produce en total alrededor de 15 millones de litros/año (Lee-Jones 2009). Las plantas producen etanol de diferentes calidades, desde etanol para bebidas hasta etanol anhidro combustible.

Los mercados principales para etanol de suero han sido: farmacéutico, cosméticos, solventes industriales y por supuesto la industria de alimentos y bebidas (Thiele 2005). Desde 2007 se ha suministrado por esta compañía etanol combustible a una empresa petrolera para producir E10 (10% de etanol en gasolina).

Aunque como se ha dicho anteriormente el proceso varía entre las diferentes plantas, en general comparten los principios básicos comunes y etapas de proceso. Así, después de separadas las proteínas presentes por ultrafiltración se inocula el microorganismo al permeado rico en lactosa. La lactosa se fermenta por cepas de levadura especialmente adaptadas (se piensa sea *K. marxianus* en el proceso Carbery, *Streptococcus fragilis* en el proceso Dansk Gaerings y *K. fragilis* en el proceso Milbrew aunque no se tiene la certeza absoluta por formar parte del *know how* del proceso) todas eficientes en la fermentación de lactosa.

El proceso de producción de etanol a partir de suero es sin dudas muy atractivo pero desde el punto de vista económico no es competitivo cuando se compara con la producción de etanol de otras fuentes como la caña de azúcar o maíz. El costo de etanol de suero se estima alrededor de \$1.60-1.85/galón, en tanto que el etanol de maíz se obtiene a costo de \$1.14/galón y el de caña de azúcar aún menor en el entorno de \$0.83/galón (Ling 2008).

Biobutanol

La producción de biobutanol a partir de suero se ha investigado también. Este tiene la ventaja sobre el etanol combustible que puede ser empleado directamente en los motores de petróleo mientras que el uso del etanol requiere modificaciones. No obstante, los estudios se han limitado al empleo de hongos del género *Clostridia* para la producción de butanol de suero (Raganati *et al* 2013, Qureshi *et al* 2014).

Proteína microbiana (SCP)

La proteína microbiana o como se conoce también *Single-cell protein* (SCP) es una referencia a las fuentes de proteínas mezcladas que se extraen de cultivos puros o mixtos de microalgas, levaduras, bacterias y hongos. En general estas se producen a partir de residuos agro-industriales.

En el caso de suero de leche, la producción se lleva a cabo bien por la propagación directa sobre éste o el permeado de suero con microorganismos capaces de utilizar lactosa como sustrato. También se ha aplicado la hidrólisis previa de ésta, por vía enzimática o química (Moeini *et al* 2004).

La lactosa puede ser convertida directamente en biomasa microbiana por muchos microorganismos. En su mayoría los estudios se han conducido empleando levaduras, mayormente cepas de *K. fragilis*

o *Kluyveromyces marxianus* que ofrecen buen rendimiento biomasa/sustrato, altas tasas de crecimiento y son microorganismos GRAS (Ghaly *et al* 2005, Otero *et al* 2009, Anvari y Khayati 2011). Es importante tener en cuenta que la proteína microbiana en este caso se produce sobre la base del principal contaminante del suero, la lactosa por lo que la obtención de un producto valioso va a acompañada de la reducción de DBO y DQO reduciendo significativamente su poder de polución.

Conclusiones

Para el inicio de producciones a partir de suero existen numerosas alternativas. Algunas requieren de tecnologías relativamente poco costosas, bien conocidas en la actualidad, en tanto otras precisan de una inversión mayor.

El factor económico dependerá de la escala de producción cualquiera sea el producto y el precio más probable de éste en el mercado local principalmente. La instalación de sistemas de membranas (UF/DF) para la separación de las proteínas del suero y posterior secado por atomización para obtener WPC o WPI parece viable aún a escalas no muy grandes. Existen en el mercado equipos de filtración por membrana de diferentes capacidades (laboratorio, planta piloto y escala industrial). La limitación radicará en los volúmenes de suero disponibles para su procesamiento que permitan una recuperación de la inversión en un período de tiempo razonable.

Para el caso de volúmenes pequeños, la disposición de suero como alimento animal –previo secado– puede resultar lo más atractivo pues no requiere grandes inversiones ni tecnologías complicadas; probablemente solo un evaporador y un secador de tambor (*drum dryer*). Estos equipos pueden obtenerse de segunda mano a precios no muy elevados.

La recuperación de proteínas es una alternativa igualmente interesante para obtener concentrados o aislados, pero esto requerirá de equipos de filtración por membranas que en general son caros, aunque su precio varía en función de las capacidades de procesamiento.

La proliferación actual de gimnasios y el consumo en aumento de productos para la rápida recuperación corporal sugieren un mercado en expansión que siempre podrá colocar nuevos productores que sean capaces de producirse con los estándares de calidad necesarios. En el mercado norteamericano (USA) por ejemplo un frasco de 2 libras (984 g) se vende en \$44.99. La disposición de permeado rico en lactosa puede ser la alimentación animal mezclado con otros productos disponibles en el mercado local.

Finalmente, la producción de etanol y de proteína microbiana precisa de inversiones mayores que no pueden ser asumidas por pequeños productores. Una alternativa interesante pudiera ser la unión de diferentes productores suficientemente cercanos para evitar los costos de transportación y comenzar una producción conjunta a mayor escala.

Otras producciones que se han estudiado en los últimos años como antibióticos, glicerol por vía fermentativa parecen más lejanos. En el caso de éste último la industria de producción de jabón produce volúmenes importantes de glicerol a partir de sebo de res.

La obtención de grasas microbianas, el llamado single-cell oil, no parece una opción viable por varias razones.

Las cepas de levadura capaces de acumular aceites no están dentro de las que utilizan la lactosa y sería preciso hidrolizar previamente el disacárido o manipular genéticamente estos microorganismos. Adicionalmente, la extracción de aceite de las células precisa la ruptura celular y por último las productividades son en general modestas (Suman *et al* 2015).

Referencias

1. Anon (2012) Final Report The Economic Benefits of the Development of Bioenergy in Ireland
2. Anvari M, Khayati G. (2011) Submerged Yeast Fermentation of Cheese Whey for Protein Production and Nutritional Profile Analysis *Adv JFood Sci Technol* 3(2): 122-126,

4. Baldasso C, Barros TC, Tessaro IC (2011) Concentration and purification of whey proteins by ultrafiltration. *Desalination* 278:381-386
5. Beaulieu J, Dupont C, Lemieux P (2006) Whey proteins and peptides: beneficial effects on immune health. *Therapy* 3:69-78
6. Chandan RC. **Cheeses. Soft and Special Varieties.** In **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition), 2003**
7. Chatzipaschali AA, Stamatis AG (2012) Biotechnological utilization with a focus on anaerobic treatment of cheese whey: current status and prospects. *Energies* 5:3492-3525
8. De Wit JN (2001) Lecturer's Handbook on Whey and Whey Products. 1st edn. European Whey Products Association, Brussels, Belgium <http://ewpa.euromilk.org/nc/publications.html>
9. Domingues L, Guimarães PMR, Oliveira C. (2010) Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for lactose/whey fermentation *Bioeng Bugs*. 1(3): 164–171.
10. 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
11. Foegeding EA, Davis JP, Doucet D, McGuffey MK. 2002. Advances in modifying and understanding whey protein functionality. *Trends in Food Science y Technology*. 13 (5): 151–159
12. Ghaly AE, Kamal M, Correia LR (2005) Kinetic modelling of continuous submerged fermentation of cheese whey for single cell protein production. *Biores Technol* 96:1143-1152
13. Ghaly AE, Mahmoud N, Rushton D, Arab F. (2007) Potential environmental and health impacts of high land application of cheese whey. *AJABS* 2:106-117.
14. Guimarães PMR, Teixeira JA, Domingues L (2010) Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey. *Biotechnol Adv* 28:375-384
15. Joesten MD, Hogg JL, Castellion ME (2006) *The World of Chemistry: Essentials: Essentials*. Thomson Brooks/Cole.
16. Kosikowski FV (1979) Whey Utilization and Whey Products. *J Dairy Sci* 62:1149-1160
17. Krissansen GW (2007) Emerging Health Properties of Whey Proteins and Their Clinical Implications. *JACN* 26:713S-723S
18. Lee-Jones D. (2009) GAIN Report Number:NZ9009 New Zealand Post: Wellington New Zealand Biofuel Report Report Categories: Bio-Fuels
19. Ling C (2008) Whey to Ethanol: A Biofuel Role for Dairy Cooperatives? USDA Rural Development, Research Report 214 <http://www.rurdev.usda.gov/supportdocuments/RR214.pdf>
20. Lipnizki F (2010) Membrane Technology. A Practical Guide to Membrane Technology and Applications in Food and Bioprocessing. Chapter 7 - Membrane Processes for the Production of Bulk Fermentation Products. pp 121-153
21. Macwan SR, Dabhi BK, Parmar SC, Aparnathi KD. (2016) Whey and its Utilization. *Int J Curr Microbiol Appl Sci* 5 (8):134-155
22. Mejía-López A, Rodas S, Baño D. (2017) La desnaturalización de las proteínas de la leche y su influencia en el rendimiento del queso fresco. *Enfoque UTE* 8 (2):121-130
23. Moeini H, Chamran S, Nahvi I, Tavassoli M. (2004) Improvement of SCP production and BOD removal of whey with mixed yeast culture *Electronic J Biotechnol* 7 3:252-258
24. Mollea C, Marmo L, Bosco F. 2013. Valorisation of Cheese Whey, a By-Product from the Dairy Industry: Food industry, Chapter: 24, Publisher: InTECH, Editors: Innocenzo Mazzalupo, pp.549-588
25. Murray BA, FitzGerald RJ (2007) Angiotensin Converting Enzyme Inhibitory Peptides Derived from Food Proteins: Biochemistry, Bioactivity and Production. *Curr Pharm Des* 13:773- 791 27
26. Ohr LM (2004) Nutraceuticals and functional foods. *Food Technol* 58:71-74
27. 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

28. Panesar PS, Kennedy JF, Gandhi DN, Bunko K (2007) Bioutilisation of whey for lactic acid production. *Food Chem* 105:1-14
29. Parrondo J, Garcia LA, Diaz M. (2009) Whey Vinegar *Vinegars of the World* Chapter 17 pp 273-288
30. Pasotti L, Zucca S, Casanova M, Micoli G, Cusella-De Angelis MG, Magni P. (2017) Fermentation of lactose to ethanol in cheese whey permeate and concentrated permeate by engineered *Escherichia coli*
31. *BMC Biotechnology* 17:48
32. Patel S, Murthy ZVP (2011) Waste valorization: Recovery of lactose from partially deproteinated whey by using acetone as anti-solvent. *Dairy Sci Technol* 91:53-63 28
33. Paterson AHJ (2009) Production and Uses of Lactose. In: McSweeney P, Fox PF (eds) *Advanced Dairy Chemistry*. Springer New York, pp 105-120.
34. Prazeres AR, Carvalho F, Rivas J (2012) Cheese whey management: A review. *J Environ Manage* 110:48-68
35. Qian F, Sun J, Cao D, Tuo Y, Jiang S, Mu G. (2017) Experimental and Modelling Study of the Denaturation of Milk Protein by Heat Treatment *Korean J Food Sci Anim Res.* 37(1): 44–51.
36. Qureshi N, Friedl A, Maddox IS. (2014) Butanol production from concentrated lactose/whey permeate: Use of pervaporation membrane to recover and concentrate product. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:9859-9867.
37. Raganati F, Olivieri G, Procentese A, Russo ME, Salatino P, Marzocchella A (2013) Butanol production by bioconversion of cheese whey in a continuous packed bed reactor. *Biores Technol* 138:259-265
38. Revillion JP, Brandelli A, Ayub MAZ (2003) Production of yeast extract from whey using *Kluyveromyces marxianus*. *Braz Arch Biol Technol* 46:121-128
39. Rivas J, Prazeres AR, Carvalho F, Beltrán F. 2010. Treatment of Cheese Whey Wastewater: Combined Coagulation–Flocculation and Aerobic Biodegradation. *J Agri Food Chem* 58:7871-7877.
40. Rynne M, Beresford P, Kelly L, Guinee P. (2004). Effect of milk pasteurization temperature and in situ whey protein denaturation on the composition, texture and heat-induced functionality of half-fat Cheddar cheese. *Int Dairy J* 14 (11): 989-1001.
41. Schultz N, Chang L, Hauck A, Reuss M, Sylatk C (2006) Microbial production of single-cell protein from deproteinized whey concentrates. *Appl Microbiol Biotechnol* 69:515-520
42. Sienkiewicz T, Riedel CL. (1990) Utilization of Whey. *Whey and Whey Utilization*, Ed. Verlag Th. Mann, Gelsenkirchen, 215
43. Singh R. *Membrane Technology and Engineering for Water Purification* (2nd Ed). Application, Systems, Design and Operation. Chapter 1. Introduction to Membrane Technology. 2015, pp. 1-80
44. Smithers GW (2008) Whey and whey proteins-From 'gutter-to-gold'. *Int Dairy J* 18:695-704
45. 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
46. Svanborg S, Johansen AG, Abrahamsen RK, Skeie SB. 2015. The composition and functional properties of whey protein concentrates produced from buttermilk are comparable with those of whey protein concentrates produced from skimmed milk. *J Dairy Sci.* 98(9):5829-40.
47. Thiele J (2005) Estimate of the energy potential for fuel ethanol from putrescible waste in New Zealand. Waste Solutions Ltd <http://www.bioenergy.org.nz/documents/liquidbiofuels/energy-potential-for-fuel-ethanolfrom-putrescible-waste-in-nz-report-05.pdf>
48. Venetsaneas N, Antonopoulou G, Stamatelatos K, Kornaros M, Lyberatos G (2009) Using cheese whey for hydrogen and methane generation in a two-stage continuous process with alternative pH controlling approaches. *Bioresour Technol* 100:3713-3717
49. Walsh G (2014) *Proteins: Biochemistry and Biotechnology*, 2nd edn. Wiley y Sons, London

50. Wijayanti HB, Bansal N, Deeth HC. (2014) Stability of Whey Proteins during Thermal Processing: A Review. *Comprehensive Rev Food Sci Food Safety* 13:1235-1251
51. Wright R. (2008) Low-carbon biofuel is being brewed from cheesemaking leftovers Independent Tuesday 6 November 2007
52. Yang P, Zhang R, McGarvey JA, Benemann JR (2007) Biohydrogen production from cheese processing wastewater by anaerobic fermentation using mixed microbial communities. *Int J Hydrogen Energy* 32:4761-4771
53. Yang ST, Silva EM (1995) Novel Products and New Technologies for Use of a Familiar Carbohydrate, Milk Lactose. *J Dairy Sci* 78:2541-2562