

Selection of key factors in the performance of *Kluyveromyces fragilis* biomass from serum of cheese by using a Plackett-Burman design

Jimmy Oblitas^{1,2}, Jordana Morales¹, Fanny Rimarachin², Wilson Castro³, Tony Chuquizuta⁴

¹ Universidad Privada del Norte, Perú. jimy.oblitas@upn.edu.pe

² Universidad Nacional de Cajamarca, Perú, frimarachinc@unc.edu.pe

³ Universidad Nacional de frontera, Perú, wcastro@unfs.edu.pe

⁴ Universidad Autonoma de Chota, Perú. tchuquizuta@unach.edu.pe

Abstract – In this work a study of biomass production from deproteinized serum of cheese was made by using yeast Kluyveromyces fragilis from the Spanish Type Culture Collection with the objective of providing an alternative of use for the subproduct “serum of cheese”, since this product is highly pollutant. Ammonium salts, potassium, magnesium, calcium, iron, zinc and manganese were added to the deproteinized serum obtained by acidification and warming. PH was adjusted to 4.5; the yeast was sterilized and inoculated. The maximum rate of growing for the yeast was of 0.0398 h⁻¹ and the coefficient of biomass produced per unit of mass of substrate consumed was of 0.272. A model of screening of Plackett Burman design with 11 variables was generated, resulting as the most important ones: the deproteinized serum of cheese, yeast extract and ferrous sulfate FeSO₄, being the first one the most significant (p<0.05) for the obtaining of Kluyveromyces fragilis biomass.

Keywords– Kluyveromyces fragilis, biomass, Plackett Burman, screening, Cheese whey

Digital Object Identifier (DOI):

<http://dx.doi.org/10.18687/LACCEI2020.1.1.219>

ISBN: 978-958-52071-4-1 ISSN: 2414-6390

Selección de factores clave en el rendimiento de biomasa de *Kluyveromyces fragilis* a partir de suero de queso usando un diseño Placket-Burman

Jimmy Oblitas^{1,2}, Jordana Morales¹, Fanny Rimarachin², Wilson Castro³, Tony Chuquizuta⁴

¹ Universidad Privada del Norte, Perú, jimy.oblitas@upn.edu.pe

² Universidad Nacional de Cajamarca, Perú, frimarachinc@unc.edu.pe

³ Universidad Nacional de frontera, Perú, wcastro@unfs.edu.pe

⁴ Universidad Autónoma de Chota, Perú, tchuquizuta@unach.edu.pe

Resumen- En el presente trabajo se hizo un estudio de la producción de biomasa a partir de suero desproteínizado de queso usando la levadura *Kluyveromyces fragilis* de la Colección Española de Cultivos Tipo con el objetivo de brindar una alternativa de uso al subproducto "suero de quesería" ya que este producto es altamente contaminante. Al suero obtenido se separó de la proteína a través de la acidificación y calentamiento, se añadieron sales de amonio, potasio, magnesio, calcio, hierro, zinc y manganeso, se ajustó el pH a 4.5, se esterilizó y se inoculó la levadura. La tasa máxima de crecimiento para la levadura fue de 0.0398 h⁻¹ y un coeficiente de biomasa producida por unidad de masa de sustrato consumido de 0.272. Se generó un modelo de Screening tipo Placket Burman de 11 variables resultando los más importantes el Suero desproteínizado de queso, extracto de levadura y Sulfato de Hierro FeSO₄, siendo el primero el más significativo ($p < 0.05$), para la obtención de biomasa de *Kluyveromyces fragilis*.

Palabras claves— *Kluyveromyces fragilis*, biomasa, Placket Burman, screening, suero de queso

Abstract – In this work a study of biomass production from deproteinized serum of cheese was made by using yeast *Kluyveromyces fragilis* from the Spanish Type Culture Collection with the objective of providing an alternative of use for the subproduct "serum of cheese", since this product is highly pollutant. Ammonium salts, potassium, magnesium, calcium, iron, zinc and manganese were added to the deproteinized serum obtained by acidification and warming. PH was adjusted to 4.5; the yeast was sterilized and inoculated. The maximum rate of growing for the yeast was of 0.0398 h⁻¹ and the coefficient of biomass produced per unit of mass of substrate consumed was of 0.272. A model of screening of Placket Burman design with 11 variables was generated, resulting as the most important ones: the deproteinized serum of cheese, yeast extract and ferrous sulfate FeSO₄, being the first one the most significant ($p < 0.05$) for the obtaining of *Kluyveromyces fragilis* biomass.

Keywords-- *Kluyveromyces fragilis*, biomass, Placket Burman, screening, Cheese whey

Digital Object Identifier (DOI):

<http://dx.doi.org/10.18687/LACCEI2020.1.1.219>

ISBN: 978-958-52071-4-1 ISSN: 2414-6390

I. INTRODUCCIÓN

El incremento en la población mundial exige una demanda considerable de proteína que por métodos tradicionales de producción cada vez se suplen menos, creándose la necesidad de nuevas fuentes de producción de proteína. Durante los últimos años las fuentes convencionales de alimentos son escasas, por eso existe un considerable interés por la producción de microorganismos como alimento, debido a su alto contenido de proteínas y vitaminas, ya que cuentan con grandes cantidades de fuentes de carbohidratos baratos [1]

El suero de queso (lactosuero) es un subproducto de la industria láctea, su contenido de materia orgánica se debe principalmente a la presencia de carbohidratos y proteínas de la leche, como la lactosa (4.5–5%) y caseína, respectivamente. Además, el contenido de lípidos (0.4–0.5%), sólidos en suspensión (0.6–0.8%) y nutrientes (N y P) que contribuyen a la contaminación [2]. El componente principal es la lactosa, lo que contribuye al alto contenido de su Demanda bioquímica de Oxígeno (DBO) y su demanda química de oxígeno (DQO). Debido a esto la carga orgánica representa a los agentes altamente contaminantes y su eliminación sigue siendo un problema para el sector lácteo[3].

Existe a nivel mundial una gran variedad de tecnología para la utilización de suero de queso; sin embargo recientemente la biotecnología ha abierto alternativas muy interesantes para ella, fundamentalmente porque permite la transformación de la lactosa, sólido más abundante en el suero de queso, pero con poca demanda y escaso valor, en productos de mayor valor agregado como es la obtención de biomasa a partir de células de levadura, designadas con la expresión "proteína unicelular" que se desarrollan a partir de

desechos orgánicos que hasta hoy solo sirven para aumentar la contaminación ambiental [4]

Dada la amplia gama de microorganismos capaces de utilizar esta fuente de carbono (lactosa) es necesario realizar una selección de aquellos que pueden ser utilizados comercialmente, entre ellos se encuentran: *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces lactis*, *Candida utilis* y *Candida pseudotropicalis*, este género de levaduras poseen la maquinaria enzimática para producir biomasa [5].

Entre los pocos microorganismos capaces de fermentar la lactosa, la levadura perteneciente al género *Kluyveromyces sp.* destaca por su alta diversidad metabólica y su grado sustancial de polimorfismos intraespecíficos y características que se reflejan en los diversos entornos de los que está aislado[6]

El suero de queso es un medio con bajo contenido de proteínas residuales que permanecen después de la coagulación de las caseínas y lactoglobulinas[7]. Posee, un contenido elevado de vitaminas y macronutrientes entre los que destacan la lactosa un disacárido formado por glucosa y galactosa, que algunos microorganismos pueden utilizar como fuente de carbono y energía para producir biomasa. Estos procesos fermentativos han sido extensivamente estudiados en países desarrollados y muchos de ellos, de aplicación en la industria, son objeto de patentes y requieren de tecnologías costosas[8]

Para eliminar el suero de las queserías existe pocas alternativas de tratamiento, por lo cual éste es descargado en ríos o lagos con toda su secuela de contaminación, en todos los casos, no existen procesos fermentativos dirigidos hacia el aprovechamiento racional del desecho. La utilidad económica generada es prácticamente nula y el único beneficio es el de eliminar parte de la carga orgánica disminuyendo la contaminación ambiental. [9]

Con el desarrollo de nuevas técnicas, el suero se ha estudiado y tratado como un sustrato alternativo para la producción de coproductos de alto valor comercial (etanol, proteína de células individuales, ácido láctico, butanol, β -galactosidasa y otros bioproductos) utilizando microorganismos capaces de metabolizar directamente el suero [10]. Pero al inicio de un proceso de optimización biotecnológica, cuando no se tiene un buen conocimiento del comportamiento del proceso, la lista de variables que pueden influir en el proceso son muchas por lo que es necesario un Screening, esta etapa identifica aquellas variables que verdaderamente aumenten la eficiencia de un proceso. El diseño estadístico de Plackett-Burman se usa con mucha frecuencia para estudiar los efectos de los componentes en procesos biotecnológicos. Es un diseño de dos factores (es decir, -1 y +1), puede reducir significativamente el número de experimentos repetitivos que se llevarán a cabo en un estudio de optimización adicional como una metodología de superficie de respuesta [11]

Por este motivo este trabajo busca realizar un screening de variables para el uso de suero de quesería utilizando la levadura *Kluyveromyces fragilis*, los resultados de este trabajo

permitirán incrementar los conocimientos sobre el efecto combinado de diferentes nutrientes del medio de fermentación para obtener el mejor rendimiento de biomasa (proteína unicelular).

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Acondicionamiento de Cepa de *Kluyveromyces fragilis*.

Se utilizó la cepa de *Kluyveromyces fragilis* procedente de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT 1442) [12]. El suero de queso utilizado se obtuvo como un subproducto de la elaboración de quesos madurados. Procedió de la fábrica de Alimentos “Huacariz” de Cajamarca – Perú, en estado fresco. Para la activación de la cepa liofilizada de *Kluyveromyces fragilis* se siguió las instrucciones para la recuperación de los cultivos liofilizados alcanzados por la Colección Española de Cultivos Tipo CECT, de la Universidad de Valencia. Luego de ser activada, se sembró la cepa en placas petri conteniendo el medio de cultivo de Tipo 138 LM [13], para verificar su crecimiento se incubó durante 24 - 48 horas a 28 °C.

2.2 Acondicionamiento de los biorreactores.

Los biorreactores empleados durante la fermentación fueron de vidrio de 750 ml de capacidad, las cuales fueron desinfectados con agua caliente (90°C) durante 5 minutos. A cada fermentador se le conecto a una compresora; el oxígeno suministrado al biorreactor fue medido por un manómetro diferencial. El aire suministrado a los biorreactores fue esterilizado a través de una solución de Permanganato de potasio (KMnO₄). Cada fermentador tuvo un suministro de aire de 0.02 vvm. Los biorreactores fueron colocados en un ambiente cerrado a una temperatura de 15°C.

Terminado el proceso de fermentación se centrifugó los medios fermentativos a 5000 rpm durante 20 minutos. El sedimento sirvió para obtener el peso seco celular (biomasa), para la determinación de la producción de biomasa. Se eliminó el sobrenadante y se lavaron las células por dos veces con agua destilada. Finalmente se realizó la lectura de la absorbancia por espectrofotometría de la biomasa suspendida y se obtuvo los valores de la curva patrón elaborada [14].

2.3 Diseño Placket Burman.

Para evaluar el efecto de las variables más importantes en un amplio número de posibles variables es el diseño se utilizó el Diseño Matemático Estadístico de Plackett-Burman [15], lo que permitió identificar el efecto combinado de los nutrientes como sulfato de amonio, extracto de levadura y suero desproteinizado de queso en la producción de biomasa a partir de *Kluyveromyces fragilis*, esto permitió evaluar 11 variables en 12 grupos experimentales con 3 réplicas, teniendo en cuenta una concentración alta (+1) y una baja (-1) de cada uno de los nutrientes. El ordenamiento se observa en la Tabla I.

TABLA I
MATRIZ DE DISEÑO PLACKETT-BURMAN

N	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10	X11
1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1
2	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1
3	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1
4	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1
5	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1
6	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1
7	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1
8	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1
9	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1
10	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1
11	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1

Donde:

- X1: Suero desproteínizado de queso
- X2: Sulfato de Amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- X3: Extracto de levadura
- X4: Fosfato ácido de potasio K_2HPO_4
- X5: Sulfato de Magnesio MgSO_4
- X6: Sulfato de Fierro FeSO_4
- X7: Cloruro de Calcio $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- X8: Sulfato de Zinc $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- X9: Sulfato de Manganeseo $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- X10: Extracto de Malta
- X11: Carbonato de calcio CaCO_3

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Composición química del suero de queso fresco

En lo que se refiere a proteínas cuyo valor encontrado fue de 0.791%, este coincide con los reportados por Lech [8] quienes indican un rango de 0.7 – 1.0% de proteínas. El lactosuero contiene proteínas que no han precipitado ni por efecto de la acidificación ni por la acción del cuajo. Las principales son las lactoalbúminas y lactoglobulinas [4]. Mientras que el valor de lactosa encontrado en el suero de queso de 4.92% coincide con el dato proporcionado por Conde [16] quien indica un rango de 4.5 – 5.5% de lactosa, esto debido a la gran cantidad de azúcar presente el suero de queso. Todos estos valores de la composición química del lactosuero pueden variar según el tipo de queso.

3.2 Crecimiento de *Kluyveromyces fragilis*

Con respecto a la lectura espectrofotométrica expresada en logaritmo del rendimiento de biomasa en los 12 tratamientos, se puede observar que la primera hora iniciada la fermentación empiezan con una lectura que oscila en un rango de 0.3878 – 0.477, mientras transcurre el tiempo se puede observar que alcanzan un máximo crecimiento en la novena hora, en la cual se observa una lectura en un rango de 0.8061 – 0.8949; finalmente en la ultima hora (once hora) terminan con una lectura que oscila en un rango de 6.3990 – 7.8513. Mientras que el tratamiento de suero sin enriquecimiento

empieza con un valor bajo de 0.3508 y solo llega en las once horas a un valor de 0.7382.

En la figura 1 se observa la curva de crecimiento de la biomasa de *Kluyveromyces fragilis*, en 12 tratamientos, donde la fase de latencia se encuentra bien marcada en el tratamiento 1, a comparación del resto de tratamientos que tienen un crecimiento exponencial sin presentar la fase de latencia. Esta diferencia en el crecimiento microbiano durante la fermentación, puede haberse debido a muchos factores; por eso según Susan [17], un microorganismo solo crecerá en un medio de cultivo si contiene todos los nutrientes necesarios disponibles como macroelementos (Carbono, Nitrógeno, Azufre, Fósforo, Potasio y Magnesio), microelementos (Sales de Fierro, Manganeseo, Molibdeno, Calcio, Zinc y Cobalto) y factores de crecimiento (vitaminas y aminoácidos) [18]; y si son adecuados el resto de los factores ambientales, esto se observa en la curva de suero de queso sin enriquecimiento presenta una curva típica de crecimiento microbiano, pero esta se encuentra por debajo de las demás curvas de los diferentes tratamientos los cuales están enriquecidos con diferentes nutrientes que van a influir en el crecimiento de la levadura.

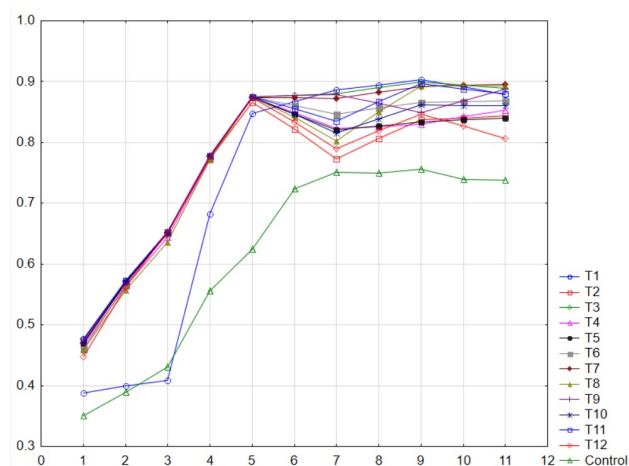


Fig. 1 Curva de crecimiento de los 12 tratamientos en el rendimiento de biomasa de *Kluyveromyces fragilis*

Según Najafpour [19] en los procesos comerciales es conveniente reducir la fase de latencia tanto como sea posible no solo para evitar la pérdida de tiempo sino también porque se consumen nutrientes para mantener el cultivo viable en dicho periodo previo al crecimiento. Por eso la corta fase de latencia durante el crecimiento de la levadura *Kluyveromyces fragilis* ha dependido del porcentaje de inóculo agregado (5% de inóculo), esto se ha observado en otras investigaciones con comportamientos similares. [4], [8]

Con respecto a la determinación del tiempo de generación se observa que es de 17.42 horas lo cual es muy alto, ya que el tiempo de duplicación de las levaduras es de aproximadamente de 10 a 120 minutos [20]. En la estimación de la velocidad específica de crecimiento se tiene que $\mu = 0.0398 \text{ h}^{-1}$, este valor se justifica con los datos obtenidos, este

valor encontrado coincide velocidad específica de crecimiento de $0.02 - 0.05 \text{ h}^{-1}$ [21], lo que quiere decir que se podría suministrar oligoelementos trazas, aminoácidos, vitaminas y aminos, para incrementar el crecimiento de la levadura. Además, este valor es debido a que el microorganismo tiene una gran afinidad por el sustrato limitante y por lo tanto la velocidad específica de crecimiento del microorganismo en un cultivo discontinuo no es afectada hasta que la concentración de sustrato disminuya hasta niveles muy bajos. También se considera la morfología del microorganismo, el cual influye invariablemente en la velocidad de crecimiento y en la formación de productos.

El valor de Y_{xs} (coeficiente de rendimiento de biomasa producida por unidad de masa de sustrato consumido) encontrado es de 0.272, el cual es un valor bajo, el cual coincide con el dato encontrado según Buitrago [4] que oscila dentro de un rango de $0.2 - 0.5$, pero este coeficiente de biomasa producida por unidad de sustrato consumido (Y_{xs}) se encuentra en el rango del valor mínimo, lo que puede deberse a que algunas fracciones de sustrato, fueron utilizadas para actividades de mantenimiento de la membrana y del pH interno, la recuperación de componentes celulares y la movilidad celular. Todas estas funciones requieren sustrato, pero no producen necesariamente biomasa celular, CO_2 y H_2O .

3.3 . Selección de factores

Los gráficos estandarizados de Pareto, que representan los efectos estimados de los parámetros en las respuestas, pueden permitirnos verificar la significación estadística [22], el diagrama de Pareto estandarizado generado está diseñado en barras con una longitud proporcional al valor absoluto de los efectos estimados dividido por el error estándar[23]. Este se puede observar en la Figura 2.

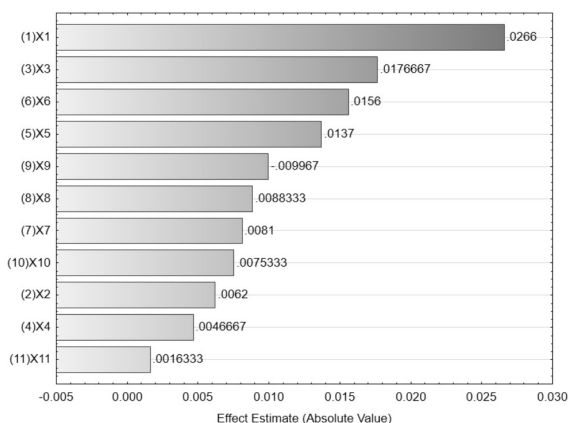


Fig. 2 Gráfico de efectos de Pareto estandarizado para producción de *Kluyveromyces fragilis*

Con el objetivo de observar agrupaciones de variables se usó un dendrograma con un algoritmo de clustering jerárquico,

donde se observa que la variable X1y X6 son parte de un grupo con una alta similitud (figura 3).

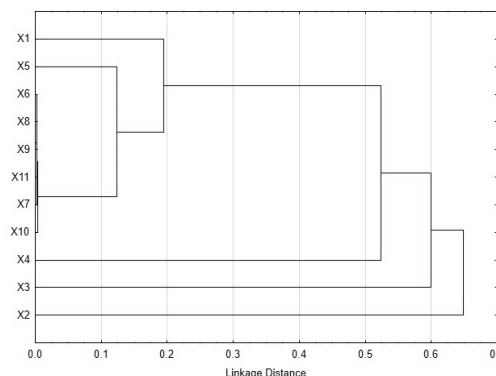


Fig. 3. Dendrograma jerárquico

Se puede observar que los 11 parámetros no tuvieron efectos significativos sobre la producción de biomasa. Sin embargo, de acuerdo al modelo Plackett Burman observamos que tuvieron impactos relativamente más fuertes en el crecimiento los parámetros (X1) Suero desproteínizado de queso, (X3) Extracto de levadura y (X6) Sulfato de Hierro FeSO_4 . (Figura 4)

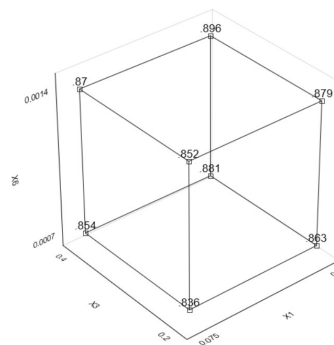


Fig. 4 Resultados de Plackett Burman

Para investigar más a fondo los factores más efectivos elegidos del modelo Plackett-Burman, se analizó el crecimiento de *Kluyveromyces fragilis* usando un modelo de superficie de respuesta con las variables Suero desproteínizado de queso (X1), Extracto de levadura (X3) y Sulfato de Hierro FeSO_4 (X6). Se encontró que el suero desproteínizado de levadura ejerce un efecto significativo en el crecimiento de *Kluyveromyces fragilis* ($p < 0,05$), esto se observa en la figura 5.

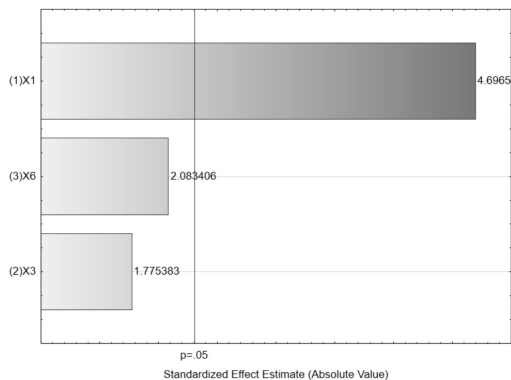


Fig. 5. Gráfico de efectos de Pareto estandarizado para producción de *Kluyveromyces fragilis* usando X1, X3 y X6.

Se generó el gráfico de superficie de respuesta para ver los efectos de cada variable en estudio en el rendimiento de biomasa de *Kluyveromyces fragilis*, se observa en la Figura 6 que el mayor rendimiento de biomasa se obtiene a partir de una concentración alta de suero desproteínado de queso (X1), tal como se aprecia en la zona roja más oscura, esto comportamiento se observa en estudios similares [24].

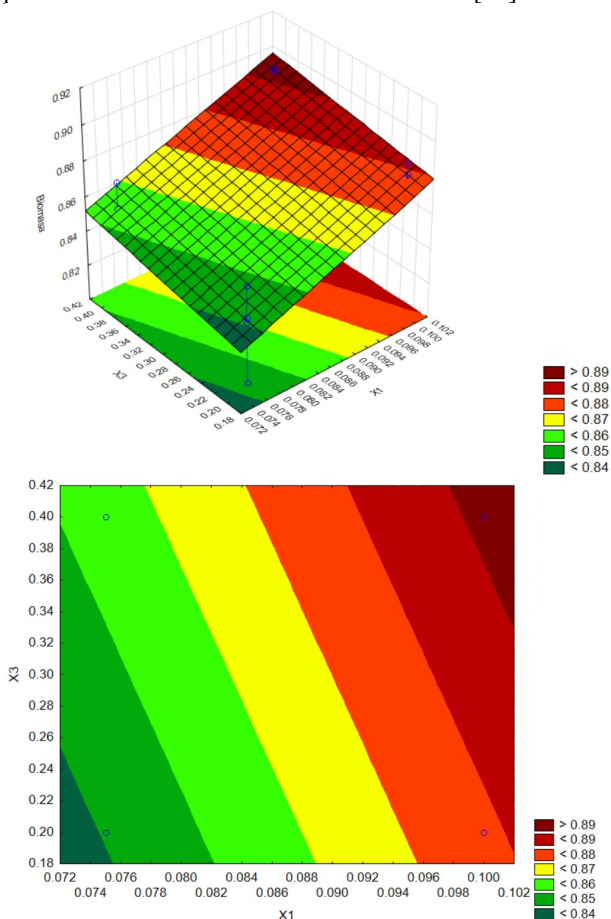


Fig. 6 Superficies estimadas en base a (X1) Suero desproteínado de queso, (X3) Extracto de levadura y (X6) Sulfato de Hierro FeSO₄

Este comportamiento observado en la superficie de respuesta puede deberse al alto porcentaje de lactosa presente en el suero de queso [25], además en el mejor crecimiento de *Kluyveromyces fragilis* como biomasa se usó un 5% de lactosa, 0.8% de proteínas, 0.7 % de minerales y 0.2 – 0.6% de ácido láctico pero no presenta ningún efecto significativo de las concentraciones de estos nutrientes en la producción de biomasa; se puede decir que no es necesario suplementar el suero de queso, lo que nos evitaría un costo adicional por estos nutrientes.

IV. CONCLUSIONES

La cantidad excedente actual de suero de queso puede transformarse potencialmente en varios productos de valor agregado para abordar los problemas ambientales. El suero es, sin duda, un excelente medio de crecimiento para diversos tipos de microorganismos, sin embargo, la conversión completa de la lactosa no se puede lograr en un proceso celular y parece ser uno de los principales problemas encontrados por las investigaciones en este campo. Por lo tanto, el éxito de estos procesos podría depender de la optimización, tal como se realizó en la presente investigación donde a través de un screening inicial, con el modelo Plackett Burman, de 11 parámetros solo se determinó los 3 principales y de ellos solo uno resultó ser el más significativo en el proceso de fermentación para lograr una alta estabilidad junto con una alta productividad. Finalmente, el uso de la biotecnología recientes y el diseño de los biorreactores más eficientes, seguirán siendo temas de gran interés al tratar de resolver el principal problema ambiental que enfrenta la industria láctea.

REFERENCES

- [1] A. Chacón, «Perspectivas actuales de la proteína unicelular (scp) en la agricultura y la industria», *Agron. Mesoam.*, vol. 15, n.º 1, pp. 93-106, 2004.
- [2] S. F. S. Reihani y K. Khosravi-Darani, «Influencing factors on single-cell protein production by submerged fermentation: A review», *Electron. J. Biotechnol.*, vol. 37, pp. 34-40, ene. 2019, doi: 10.1016/j.ejbt.2018.11.005.
- [3] T. Zotta, L. Solieri, L. Iacumin, C. Picozzi, y M. Gullo, «Valorization of cheese whey using microbial fermentations», *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2020, doi: 10.1007/s00253-020-10408-2.
- [4] G. Buitrago, L. Soto, G. Páez, K. Araujo, Z. Mármol, y M. Rincón, «Continue production of single cell protein of *Kluyveromyces marxianus* var. *Marxianus* from diluted cheese whey», *Rev. Tec. Fac. Ing. Univ. Zulia*, vol. 31, n.º SPEC. ISSUE, 2008.
- [5] G. Rabaioli Rama, D. Kuhn, S. Beux, M. Jachetti Maciel, y C. F. Volken de Souza, «Cheese Whey and Ricotta Whey for the Growth and Encapsulation of Endogenous Lactic Acid Bacteria», *Food Bioprocess Technol.*, vol. 13, n.º 2, pp. 308-322, 2020, doi: 10.1007/s11947-019-02395-8.
- [6] C. S. Murari, W. R. C. Machado, G. L. Schuina, y V. L. Del Bianchi, «Optimization of bioethanol production from cheese whey using

- Kluyveromyces marxianus URM 7404», *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, vol. 20, p. 101182, jul. 2019, doi: 10.1016/j.bcab.2019.101182.
- [7] R. A. Ibáñez, S. Govindasamy-Lucey, J. J. Jaeggi, M. E. Johnson, P. L. H. McSweeney, y J. A. Lucey, «Low- and reduced-fat milled curd, direct-salted Gouda cheese: Comparison of lactose standardization of cheesemilk and whey dilution techniques», *J. Dairy Sci.*, vol. 103, n.º 2, pp. 1175-1192, 2020, doi: 10.3168/jds.2019-17292.
- [8] M. Lech, «Optimisation of protein-free waste whey supplementation used for the industrial microbiological production of lactic acid», *Biochem. Eng. J.*, vol. 157, 2020, doi: 10.1016/j.bej.2020.107531.
- [9] G. F. Sampaio, A. M. dos Santos, P. R. da Costa, R. P. Rodriguez, y G. P. Sancinetti, «High rate of biological removal of sulfate, organic matter, and metals in UASB reactor to treat synthetic acid mine drainage and cheese whey wastewater as carbon source», *Water Environ. Res.*, vol. 92, n.º 2, pp. 245-254, 2020, doi: 10.1002/wer.1235.
- [10] B. Geiger *et al.*, «From by-product to valuable components: Efficient enzymatic conversion of lactose in whey using β -galactosidase from *Streptococcus thermophilus*», *Biochem. Eng. J.*, vol. 116, pp. 45-53, 2016, doi: 10.1016/j.bej.2016.04.003.
- [11] S. Seveda, A. Singh, y A. Singh, *Mathematical and Statistical Applications in Food Engineering*. CRC Press, 2020.
- [12] «CECT». [En línea]. Disponible en: <https://www.cect.org/vstrn.php?lan=es&cect=1442>. [Accedido: 29-feb-2020].
- [13] «Instrucciones de uso de productos CECT». [En línea]. Disponible en: <https://www.uv.es/uvweb/coleccion-espanola-cultivos-tipo/es/documentacion/instrucciones-tecnicas-procedimientos/instrucciones-uso-productos-cept-1285953961369.html>. [Accedido: 21-feb-2020].
- [14] L. I. Oria, J. L. Martínez, y C. Arnaiz, «Determinación de la biomasa en procesos biológicos», *Tecnol. Agua*, vol. 20, n.º 205, pp. 45-52, 2000.
- [15] R. G. Brereton, «Chemometrics and Statistics | Optimization Strategies», en *Encyclopedia of Analytical Science (Third Edition)*, P. Worsfold, C. Poole, A. Townshend, y M. Miró, Eds. Oxford: Academic Press, 2013, pp. 500-509.
- [16] L. Conde-Báez, A. López-Molina, C. Gómez-Aldapa, C. Pineda-Muñoz, y C. Conde-Mejía, «Economic projection of 2-phenylethanol production from whey», *Food Bioprod. Process.*, vol. 115, pp. 10-16, 2019, doi: 10.1016/j.fbp.2019.02.004.
- [17] S. Featherstone, «1 - Microbiology of canned foods», en *A Complete Course in Canning and Related Processes (Fourteenth Edition)*, S. Featherstone, Ed. Oxford: Woodhead Publishing, 2015, pp. 3-25.
- [18] B. Singh y T. Satyanarayana, «1 - Basic Microbiology», en *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*, A. Pandey y J. A. C. Teixeira, Eds. Elsevier, 2017, pp. 1-31.
- [19] G. D. Najafpour, «Chapter 1 - Industrial Microbiology», en *Biochemical Engineering and Biotechnology (Second Edition)*, G. D. Najafpour, Ed. Amsterdam: Elsevier, 2015, pp. 1-18.
- [20] R. Pérez-Torrado, E. Gamero, R. Gómez-Pastor, E. Garre, A. Aranda, y E. Matallana, «Yeast biomass, an optimised product with myriad applications in the food industry», *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 46, n.º 2, Part A, pp. 167-175, dic. 2015, doi: 10.1016/j.tifs.2015.10.008.
- [21] P. M. R. Guimarães, J. A. Teixeira, y L. Domingues, «Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey», *Biotechnol. Adv.*, vol. 28, n.º 3, pp. 375-384, may 2010, doi: 10.1016/j.biotechadv.2010.02.002.
- [22] R.-S. Liu y Y.-J. Tang, «Tuber melanosporum fermentation medium optimization by Plackett-Burman design coupled with Draper-Lin small composite design and desirability function», *Bioresour. Technol.*, vol. 101, n.º 9, pp. 3139-3146, 2010, doi: 10.1016/j.biortech.2009.12.022.
- [23] R. Ravanfar, A. M. Tamaddon, M. Niakousari, y M. R. Moein, «Preservation of anthocyanins in solid lipid nanoparticles: Optimization of a microemulsion dilution method using the Plackett-Burman and Box-Behnken designs», *Food Chem.*, vol. 199, pp. 573-580, may 2016, doi: 10.1016/j.foodchem.2015.12.061.
- [24] T. Wang *et al.*, «Fermentation optimization and kinetic model for high cell density culture of a probiotic microorganism: *Lactobacillus rhamnosus* LS-8», *Bioprocess Biosyst. Eng.*, vol. 43, n.º 3, pp. 515-528, 2020, doi: 10.1007/s00449-019-02246-y.
- [25] A. R. Prazeres, F. Carvalho, y J. Rivas, «Cheese whey management: A review», *J. Environ. Manage.*, vol. 110, pp. 48-68, nov. 2012, doi: 10.1016/j.jenvman.2012.05.018.