

بهینه سازی تولید پروتیین تک یاخته^۱ از آب پنیر تحت شرایط کشت غیر مداوم و مداوم

سید عباس شجاع‌الساداتی*، محمدرضا رضایی** و بهنام رسولی***
گروه بیوتکنولوژی - بخش مهندس شیمی دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه تربیت مدرس
(دریافت مقاله: ۱۳۷۷/۵/۲۷ - دریافت نسخه نهایی: ۱۳۷۷/۱۱/۲۱)

چکیده - در این تحقیق ابتدا میکروارگانیسم مورد نظر جدا سازی، خالص سازی و پس از ارزیابی براساس مقدار کاهش COD آب پنیر و تولید توده زیستی، انتخاب شد. جنس این میکروارگانیسم مخمر *تریکوسپرون*^۲ تعیین شد. پس از بهینه سازی شرایط، دمای °C ۳۰، pH = ۶ اولیه، میزان هوادهی ۲ v.v.m و دور به هم زن ۸۰۰ دور در دقیقه به عنوان مناسبترین شرایط به دست آمد. تحت این شرایط شدت رشد ویژه^۳، $\mu = 0.59 \text{ h}^{-1}$ و زمان دو برابر شدن^۴ توده زیستی ۱/۱۶ h محاسبه شد. با به کارگیری شرایط بهینه، میزان کاهش COD در ظرف مدت ۲۴ ساعت، ۵۲ درصد و تولید توده زیستی $8/73 \text{ g L}^{-1}$ به دست آمد.
تحت شرایط کشت مداوم دمای °C ۳۴، دور به هم زن ۸۰۰ دور در دقیقه، میزان هوادهی ۲ v.v.m، شدت رقیق سازی^۵ $0.42-0.36 \text{ h}^{-1}$ و pH حین تخمیر ۵.۴ به عنوان بهترین شرایط به دست آمد. تحت این شرایط مقدار توده زیستی تولید شده $8/17 \text{ L}$ ، درصد کاهش COD ۵۳/۲۱ و محصول دهی^۶ $3/4 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ حاصل شد.
توده زیستی تولید شده از نظر میزان پروتیین، اسیدهای نوکلئیک، چربی، خاکستر و رطوبت مورد بررسی قرار گرفت. براساس نتایج به دست آمده پروتیین تک یاخته حاصله از نظر ارزش تغذیه ای برای طیور و دام مناسب است.

Optimization of Single Cell Protein Production from Cheese Whey under Batch and Continuous Cultivation

S.A. Shojaosadati, M.R. Rezaei and B. Rasouli

Biotechnology Group, Chemical Engineering Department, School of Engineering,
Tarbiat Modarres University

ABSTRACT- *In this research the microorganism was initially isolated and selected after evaluation based on COD reduction of cheese whey and biomass production. The selected microorganism was identified as Trichosporon sp. The cultivation conditions of the microorganism were optimized under batch: temperature; 30 °C; initial pH = 6; aeration speed = 2 v.v.m; and agitation rate: 800 rpm. Under these conditions, the specific growth rate and biomass doubling time were measured as 0.59 h⁻¹ and 1.16 h, respectively. The COD reduction and biomass production under optimized batch conditions after 24 hours were obtained as 52% and*

* دانشیار ** کارشناس ارشد

فهرست علائم	
میزان اکسیژن خواهی شیمیایی	COD
حجم هوا به ازای حجم محیط	v.v.m
شدت رقیق سازی، μ شدت رشد ویژه	D
اکسیژن خواهی بیولوژیکی	BOD
	کشت در دقیقه

8.73 g L⁻¹, respectively. The optimized conditions under continuous cultivation were: temperature, 30°C; agitation rate, 800 rpm; aeration speed, 2 v.v.m; dilution rate, 0.42 h⁻¹; pH in fermentor, 4-5. Under these conditions the biomass production, COD reduction and productivity were obtained as: 8.17 g L⁻¹, 53.21%, and 3.4 g L⁻¹ h⁻¹ respectively.

The nutritional value of biomass was evaluated for crude protein, nucleic acid, fat, ash and moisture content. According to the results, the single cell protein obtained in this research is suitable and valuable for animal and poultry feed.

۱- مقدمه

میزان کاهش COD و همچنین تولید توده زیستی، مورد ارزیابی قرار گرفت. با توجه به نیاز شدید کشور به واردات پروتئین مکمل خوراک دام و طیور از یک طرف و از طرف دیگر حذف این پساب با بار آلودگی بالا از محیط زیست، امید می رود پس از ارزیابی و توجیه اقتصادی طرح، امکان انتقال به مرحله صنعتی فراهم شود. از جمله نکات قابل توجه در اجرای این تحقیقات که بدیع است، استفاده از مخمر تریکوسپورون است که از نظر ارزش غذایی و سلامتی مورد تأیید است.

آب پنیر مایعی است زرد متمایل به سبز که پس از حذف چربی و کازئین شیر در طی فرایند پنیرسازی به دست می آید. آب پنیر دارای BOD بالا در حدود ۳۲۰۰۰ تا ۶۰۰۰۰ است [۱]. به همین دلیل و با توجه به حجم بسیار زیادی از این مایع که در کشورهای مختلف دنیا تولید می شود، باعث به وجود آمدن معضلات زیست محیطی شده است. بخش اعظم این مایع را آب تشکیل می دهد و مابقی آن شامل ۴/۹ درصد لاکتوز، ۰/۹ درصد پروتئین و ۰/۶ تا ۰/۷۵ درصد املاح است [۲].

۲- مواد و روشها

در این تحقیق از میکروارگانیسم جداسازی شده از محیط طبیعی ایران که از گونه تریکوسپورون بود، استفاده شد. آب پنیر مورد نیاز از شرکت صنایع شیر ایران تهیه و پس از آماده سازی مورد استفاده قرار گرفت. سایر مواد شیمیایی و بیوشیمیایی مورد نیاز از شرکت های معتبر و با خلوص بالا تهیه شد.

روشهای مختلفی برای استفاده از آب پنیر وجود دارد، از قبیل: تغلیظ و پودر کردن، تولید لاکتوز به عنوان خوراک دام، تولید فراورده های تخمیری نظیر الکل، زیست پلیمرها [۳] و غیره.

تجهیزات و دستگاه های مورد استفاده، علاوه بر مواردی که به طور عمومی در آزمایشگاه های بیوتکنولوژی به کار گرفته می شوند عبارت اند از: دستگاه اولترافیلتراسیون^۷ نیمه صنعتی سارتریوس^۸، ساتریفیوژ با سرعت بالا از نوع پک من^۹، دستگاه اسپکتروفوتومتر UV۱۲۰۱ شیمادزو^{۱۰} و فرمنتوریک لیتری نیوبراونزویک^{۱۱}.

تولید پروتئین تک یاخته از آب پنیر به عنوان پروتئین مکمل خوراک دام و طیور مورد توجه قرار گرفته است [۴ و ۵]. با توجه به اینکه آب پنیر از نظر منابع کربن و ازت غنی است، لذا از آن می توان به عنوان محیط کشت مناسب برای رشد میکروارگانیسم و به منظور تولید پروتئین افزودنی به خوراک دام و طیور به خوبی استفاده کرد [۶-۱۰]. با توجه به اینکه میکروارگانیسم های موجود و در دسترس قادر به رشد در محیط کشت حاوی لاکتوز نیستند، لذا در این طرح تحقیقاتی ابتدا از پساب کارخانه پنیر، میکروارگانیسم مناسب جداسازی و مورد ارزیابی قرار گرفت، سپس شرایط کشت مداوم و غیرمداوم برای میکروارگانیسم انتخاب شده با توجه به

۲-۱- محیطهای کشت

ترکیب شیمیایی محیط کشت غنی سازی (برحسب گرم برلیتر):
(+)D لاکتوز: ۲۰، $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: ۱/۲، $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$: ۶/۱۲،
عصاره مخمر: ۵/۰، HPO_4K : ۱۰، MgSO_4 : ۲۵/۰ و
 $\text{pH} = 4/5$. به منظور جداسازی و خالص سازی میکروارگانیسمهای
مصرف کننده لاکتوز از سه محیط کشت به شرح زیر استفاده شد
۱- محیط کشت S: مواد تشکیل دهنده این محیط کشت مانند محیط
کشت غنی سازی است.

۲- محیط کشت P: (٪ ۱/۵) آگار + آب پنیر اولترافیلتر شده،
 $\text{pH} = 4/5$

۳- محیط کشت N: آگار ٪ ۱/۵ + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g/L) ۱/۵۹ + آب
پنیر اولترافیلتر شده، $\text{pH} = 4/5$

۲-۲- روش جداسازی مخمر

ابتدا از قسمتهای مختلف خروجی پساب چند کارگاه پنیرسازی
نمونه برداری شد و پس از غنی سازی در محیط کشتهای مشخص،
برابر روش معمول و با استفاده از محیطهای کشت اختصاصی
جداسازی مخمرها انجام گرفت [۱۱].

۲-۳- روش انتخاب بهترین میکروارگانیسم

هرکدام از کلنی های^{۱۲} جدا شده در محیط کشت حاوی آب پنیر
اولترافیلتر شده در دمای 30°C با سرعت به هم زدن ۲۵۰ دور در
دقیقه و برای مدت ۲۴ ساعت کشت داده شد. سپس تولید توده زیستی
و کاهش COD را برای هرکدام از مخمرها محاسبه کرده و بدین ترتیب
مخمر با بیشترین کارایی، انتخاب و سپس شناسایی شد [۱۱].

۲-۴- روش اندازه گیری COD

برای اندازه گیری COD از روش آمپول^{۱۳} مورد استفاده در
آزمایشگاه بیوتکنولوژی و محیط زیست دانشگاه تربیت مدرس
استفاده شد [۱۱].

۲-۵- روش اندازه گیری غلظت لاکتوز

برای اندازه گیری غلظت لاکتوز از روش سوموگی - نلسون^{۱۴} [۱۲]
استفاده شد. جزییات این روش در مرجع [۱۱] آورده شده است.

۲-۶- روش تهیه آب پنیر اولترافیلتر شده

به منظور تهیه آب پنیر اولترافیلتر شده از دستگاه
اولترافیلتراسیون سارتریوس استفاده شد. بدین منظور حجم
مشخصی از آب پنیر را از روی فیلتر با مانع ۱۰۰۰۰ عبور داده تا
پروتیین از لاکتوز و سایر اجزای آب پنیر جدا شود. از مایع پشت
فیلتر^{۱۵} حاوی لاکتوز و املاح برای تهیه محیط کشت استفاده شد.

۲-۷- روش اندازه گیری پروتیین خام، کربوهیدراتها،

چربی، اسیدهای نوکلئیک و خاکستر

برای اندازه گیری ارزش تغذیه ای توده زیستی حاصله از روشهای
استاندارد موجود و معمول استفاده شد [۱۱ و ۱۲]. بدین منظور
مقدار پروتیین خام با کربوهیدراتها، چربی یا اسیدهای نوکلئیک و
خاکستر که از نظر ارزش تغذیه ای برای خوراک دام و طیور مهم اند،
مورد ارزیابی کمی قرار گرفتند.

۲-۸- روش اندازه گیری توده زیستی

برای اندازه گیری توده زیستی از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول
موج ۶۰۰ نانومتر یا روش شمارش سلولی با استفاده از
میکروسکوپ استفاده شد [۱۱].

۲-۹- بهینه کردن شرایط کشت برای مخمر تریکوسپرون

برای بهینه کردن شرایط کشت غیرمداوم و مداوم علاوه بر
آزمایشهای مربوط به کاهش COD و میزان تولید توده زیستی با
روش اسپکتروفتومتری از روش شمارش سلولی برای تعیین میزان
توده زیستی و همچنین اندازه گیری لاکتوز نیز استفاده شد. در همه
آزمایشهای بهینه سازی دو عامل میزان کاهش COD و تولید توده
زیستی تعیین کننده اند و به منظور رعایت دقت، همه آزمایشها به
صورت دوبار تکرار انجام شد.

۲-۱۰- بهینه کردن شرایط کشت مخمر در روش غیرمداوم

به منظور بهینه کردن شرایط کشت از روش مستقل در نظر گرفتن
پارامترها که در این نوع آزمایشهای بیولوژیکی معمول است،
استفاده شد [۱۳ و ۱۴]. برای بهینه سازی این پارامترها از فلاسک
لرزان^{۱۶} و فرمانتور دولیتری استفاده شد.

جدول ۱- نتایج وزن توده زیستی خشک در مرحله گزینش نهایی میکروارگانیسم

واریانس	میانگین	وزن بیومس خشک (g/L)				کد شناسایی مخمر
		کشت ۴	کشت ۳	کشت ۲	کشت ۱	
۰/۱۰۶	۶/۳۹	۶/۴۲	۶/۵۱	۶/۲۶	—	SyT111a
۰/۰۷۵	۵/۵۲	۵/۶۱	۵/۴۹	۵/۴۷	—	SyB1311b
۰/۰۷۵	۶/۱۷	۶/۲۵	۶/۱۸	۶/۱۰	—	SyT11a

جدول ۲- نتایج درصد کاهش COD در مرحله گزینش نهایی میکروارگانیسم

واریانس	میانگین	میزان کاهش COD				کد شناسایی مخمر
		کشت ۴	کشت ۳	کشت ۲	کشت ۱	
۲/۱۰	۴۶/۸۷	۴۴/۱۶	۴۶/۴۰	۴۷/۷۴	۴۹/۱۱	SyT111a
۲/۱۲	۴۲/۴۹	۴۰/۵۶	۴۴/۷۶	۴۲/۱۶	—	SyB1311b
۲/۶۳	۴۳/۴۰	۴۳/۱۲	۴۲/۱۹	۴۷/۱۷	۴۱/۱۵	SyT11a

نتایج، گزینش بعدی صورت گیرد. در طی این آزمایشها مشخص شد که مخمرها دارای فعالیت به مراتب بیشتری نسبت به سایر میکروارگانیسمهای جدا شده، هستند. در مرحله چهارم تمامی کلنی‌هایی که قادر به کاهش بیش از ۳۵ درصد COD آب پنی‌ر بودند مجدداً مورد آزمایش قرار گرفتند که از بین کلنی‌های موجود تنها ۸ مورد گزینش شدند و نهایتاً از بین ۸ کلنی، ۳ مورد که توانایی بهتری داشتند برای آزمایشهای بعدی انتخاب شدند. نتایج مربوط به این مخمرها در جداول (۱) و (۲) آورده شده است. با توجه به اینکه از بین این سه مخمر، با کد SyT11a از نظر میانگین تولید توده زیستی و کاهش COD برتری داشت، برای شناسایی و آزمایشهای بهینه‌سازی انتخاب شد. شناسایی این مخمر برابر روشهای معمول تا حد جنس انجام شد و برابر نتایج به دست آمده از جنس تریکوسپورون است.

۳-۲- pH

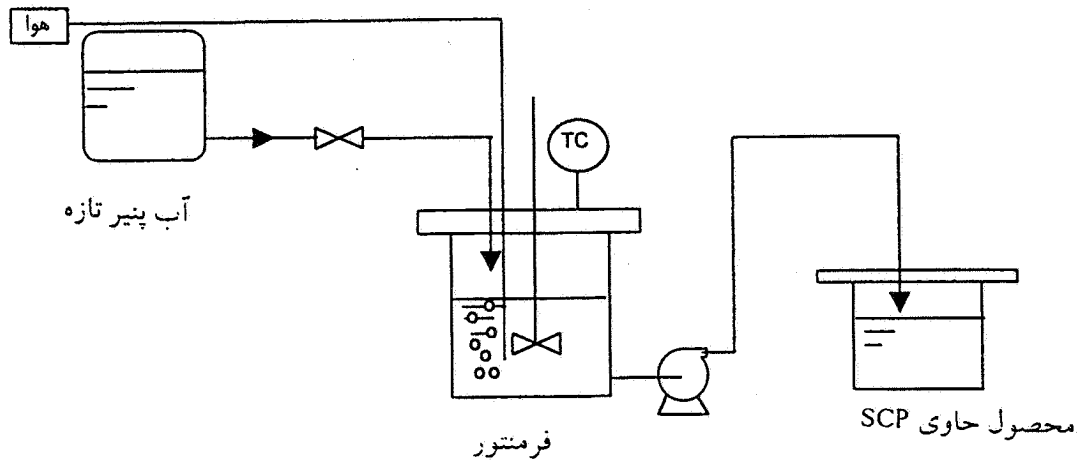
به منظور بهینه‌سازی pH سایر شرایط کشت ثابت نگه داشته شد و فقط مقدار pH تغییر داده شد. برای این آزمایش pH اولیه محیط کشت، در روش مداوم و غیرمداوم اندازه‌گیری شد، بدین ترتیب که pH محیط کشت قبل از تخمیر در محدوده ۲/۵ تا ۷ تغییر داده شد و پس از تخمیر، کاهش COD و تولید توده زیستی و pH

۲-۱۱- روش برقراری کشت مداوم و بهینه کردن شرایط بدین منظور از فرمتور آزمایشگاهی با حجم کاری^{۱۷} یک لیتر و مجهز به سیستمهای کنترل دما، دور به هم زن و هوادهی استفاده شد. شمای کشت مداوم به کار گرفته شده در این تحقیقات در شکل (۱) نشان آورده شده است. به منظور بهینه‌سازی پارامترهای رشد مخمر در روش مداوم، پس از برقراری حالت پایدار، هر کدام از پارامترها به مدت ۷۵ ساعت تحت این شرایط مورد ارزیابی قرار گرفتند.

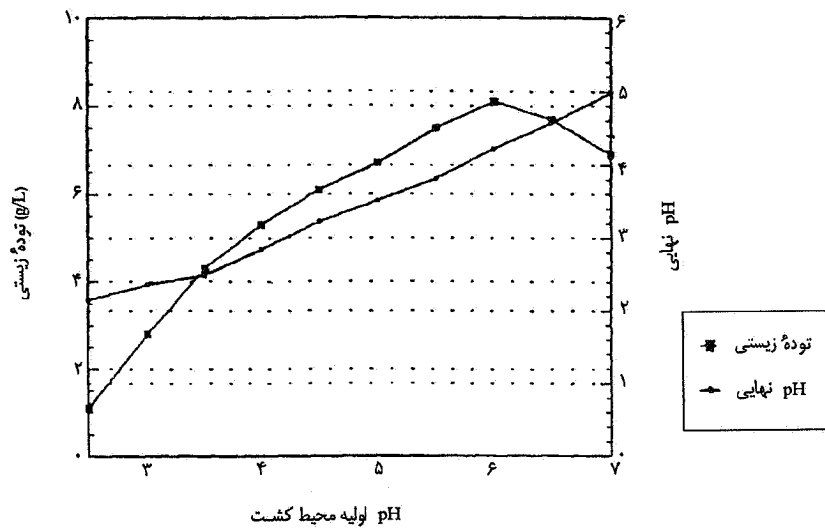
۳- نتایج و بحث

۳-۱- جداسازی و انتخاب میکروارگانیسمها

مجموعاً ۷۰ میکروارگانیسم با به کارگیری سه محیط کشت N,P,S از انواع مخمرها، ژئوتریکوم و باکتری دیپلوکوکوس از نمونه‌های پساب جداسازی شد. میزان رشد باکتری‌های دیپلوکوکوس در مقایسه با سایر میکروارگانیسمها ضعیفتر بود، به همین دلیل از بین این کلنی‌های جدا شده در گزینش اول ۴۷ کلنی انتخاب شد. در مرحله دوم هر کدام از کلنی‌های منتخب را مجدداً در سه محیط کشت به صورت غوطه‌ور^{۱۸} کشت داده و میزان کاهش COD و تولید توده زیستی اندازه‌گیری شد. در مرحله سوم تمامی کلنی‌هایی که قادر به کاهش بیش از ۳۰ درصد COD آب پنی‌ر بودند مجدداً مورد آزمایش قرار گرفتند تا ضمن اطمینان از تکرارپذیری



شکل ۱- شمای دستگاهی روش کشت مداوم



شکل ۲- تغییرات توده زیستی و pH نهایی محیط کشت با pH اولیه. دمای 34°C ، شدت رقیق سازی 0.42h^{-1} ، شدت هوادهی 27.7v.m دور همزن 800r.p.m

مطلوب است. مسلماً به دلیل گرمازا بودن واکنش تولید توده زیستی در دمای بالاتر در مقیاس صنعتی اقتصادیتر است.

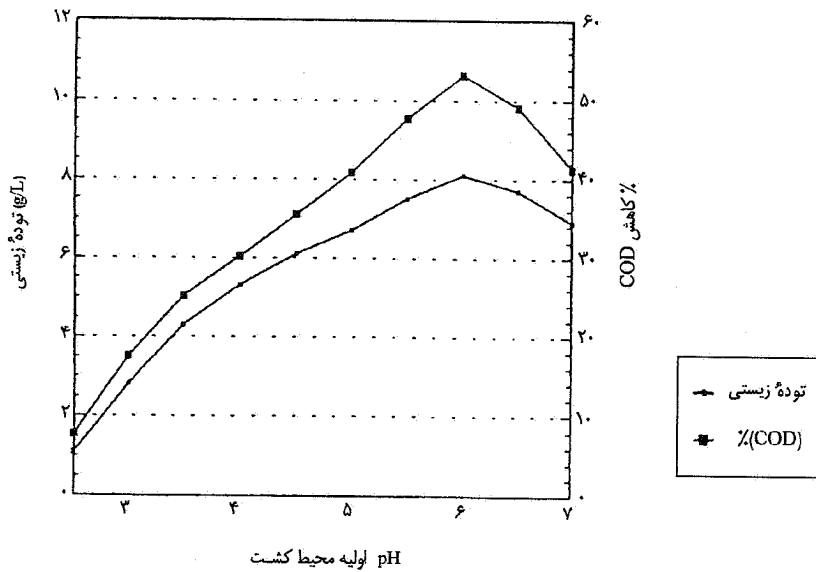
۳-۴- هوادهی

یکی از شرایط لازم برای رشد میکروارگانیسمها فراهم بودن اکسیژن موردنیاز آنهاست که باید به صورت محلول در دسترس آنها قرار گیرد. میزان اکسیژن محلول موردنیاز برای رشد میکروارگانیسمها را می توان با دمیدن هوا به درون محیط کشت و به هم زدن آن تأمین کرد. براساس نتایج به دست آمده، شکل (۵) در سیستم غیرمداوم و مداوم با افزایش شدت هوادهی تا مقدار 27.7v.m

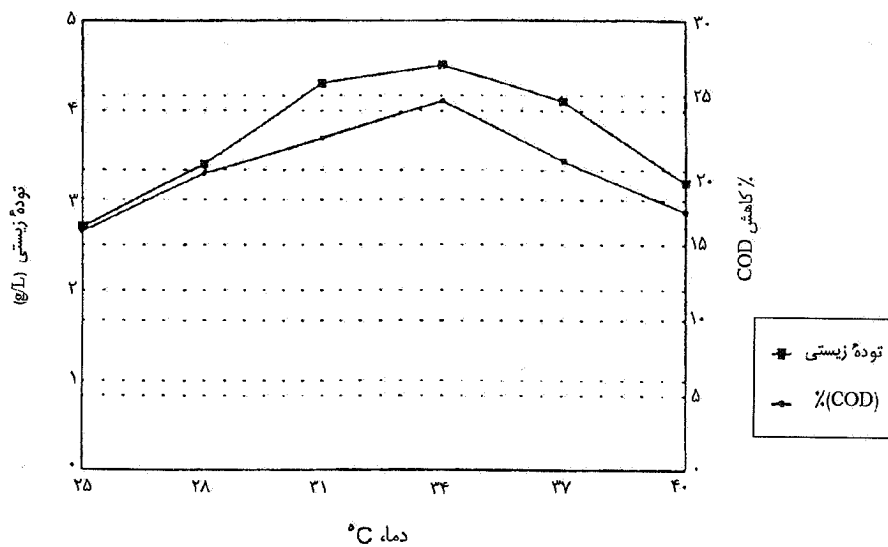
نهایی اندازه گیری شد. نتایج حاصل در شکلهای (۲) و (۳) آورده شده است. براساس این نتایج بیشترین تولید توده زیستی و کاهش COD در $\text{pH} = 6$ اولیه است و این کمیت با $4/4 - 4 = \text{pH}$ در درون فرمتور مطابقت دارد.

۳-۳- دما

بدین منظور تغییرات میزان کاهش COD و تولید توده زیستی از دمای 27 تا 39 درجه سانتیگراد مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده در شکل (۴) نشان داده شده است. براساس این نتایج محدوده 31 تا 35 درجه سانتیگراد برای رشد مخمر تریکوسپورن



شکل ۳- تغییرات توده زیستی و درصد کاهش COD با pH اولیه. دمای 34°C ، شدت رقیق سازی $0/42\text{h}^{-1}$ ، شدت هوادهی 27v.m pH اولیه محیط کشت ۳/۵

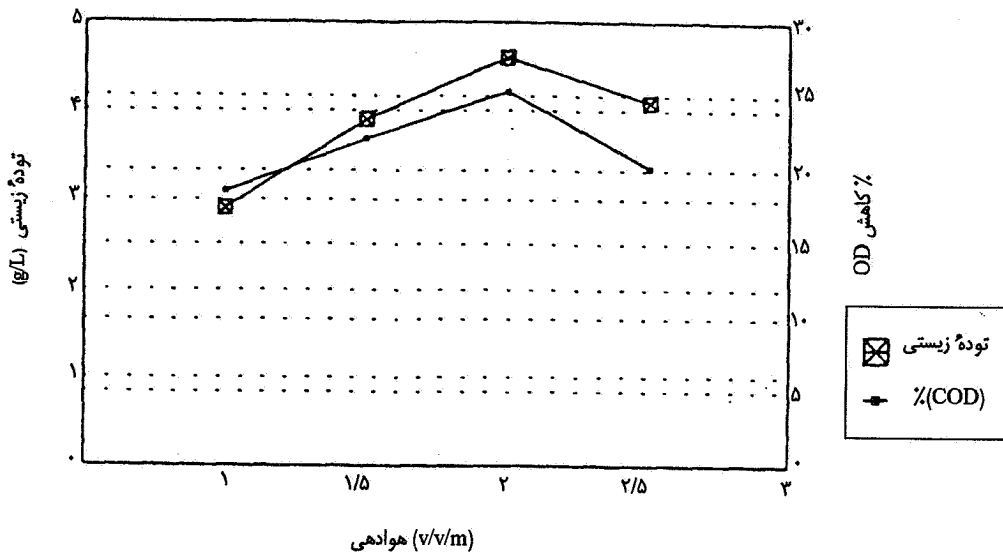


شکل ۴- تغییرات توده زیستی و درصد کاهش COD با دما، شدت رقیق سازی $0/42\text{h}^{-1}$ ، شدت هوادهی 27v.m دورهمزن 800r.p.m ، pH اولیه محیط کشت ۳/۵

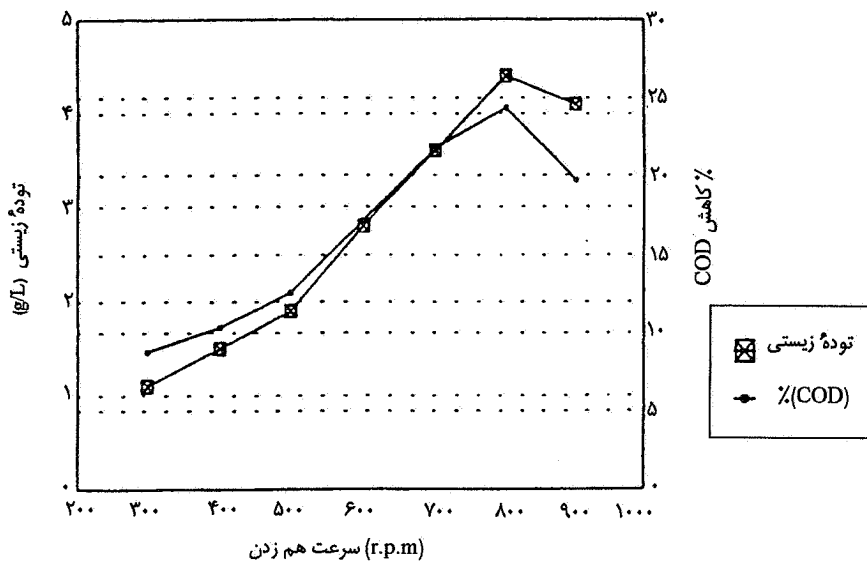
۳-۵- دوره همزن

به هم زدن محیط کشت علاوه بر یکنواخت کردن غلظت اجزای محیط کشت و در دسترس قرار دادن سوبسترا و کاهش اختلاف دما در محیط رشد میکروارگانیسمها از سه طریق باعث افزایش شدت انتقال اکسیژن بین دو فاز مایع و گاز می شود: ۱- کاهش قطر حبابهای

بازدهی افزایش یافته است که این امر به دلیل افزایش مقدار اکسیژن محلول و در نتیجه افزایش رشد مخمر بوده است. افزایش شدت هوادهی بیش از این مقدار باعث کاهش بازدهی شده است، این امر می تواند ناشی از افزایش کف و در نتیجه تخریب سلولهای مخمر باشد.



شکل ۵- تغییرات توده زیستی و درصد کاهش COD با شدت هوادهی. دمای 34°C ، شدت رقیق سازی $0/42\text{h}^{-1}$ ، دور به هم زن 800r.p.m ، pH اولیه محیط کشت $3/5$



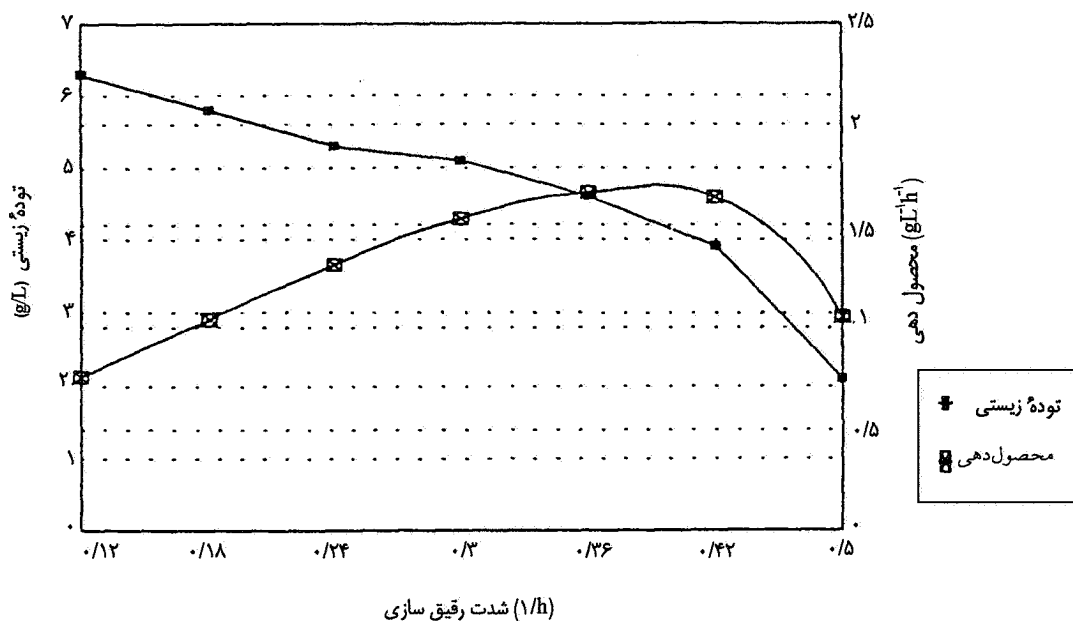
شکل ۶- تغییرات توده زیستی و درصد کاهش COD با دور هم زن. دمای 34°C ، شدت رقیق سازی $0/42\text{h}^{-1}$ ، شدت هوادهی 27v.v.m ، pH اولیه محیط کشت $3/5$

بهینه انتخاب شد. افزایش بیشتر دور به هم زن باعث اثرات نامطلوب فیزیکی و تخریب سلولها می شود.

۳-۶- شدت رقیق سازی

یکی از عوامل مهم در روش کشت مداوم، شدت رقیق سازی

هوا، ۲- افزایش زمان تماس بین دو فاز مایع و گاز، ۳- کاهش ضخامت لایه مایع ساکن روی حبابها. لذا با ثابت نگاه داشتن سایر شرایط دور به هم زن را در محدوده ۳۰۰ تا ۹۰۰ دور در دقیقه مورد آزمایش قرار داده و نتایج به دست آمده در شکل (۶) آورده شده است. براساس این نتایج سرعت ۸۰۰ دور در دقیقه به عنوان مقدار



شکل ۷- تغییرات توده زیستی و محصول دهی با شدت رقیق سازی. دمای ۳۴°C، شدت هوادهی ۲۷.۷.م، دور هم‌زن ۸۰۰ r.p.m pH اولیه محیط کشت ۳/۵

جدول ۳- مقایسه کیفیت شیمیایی مخمر تریکوسپورون با چند قارچ مهم صنعتی [۱۵]

تحلیلهای (%)	مخمر تریکوسپورون	کاندیدا یوتیلیس	فوزاریوم گرامیناریوم	پسیلومیسس واریوتی
پروتئین خام (%N×۶/۲۵)	۵۲	۴۸	۵۴/۱	۵۵
کربوهیدرات	۲۱/۸	—	—	—
چربی	۰/۹	۱/۳۵	۱	۱
اسیدهای نوکلئیک	۸/۹	—	—	—
خاکستر	۸/۶	۱۱/۲	۶/۱	۵
رطوبت	۱/۸	۹	۵/۸	۴

شد. مقادیر شدت رقیق‌سازی در محدوده ۰/۱۲h^{-۱} تا ۰/۵h^{-۱} مورد آزمایش قرار گرفت. براساس این نتایج، بیشترین محصول دهی در شدت رقیق‌سازی ۰/۴۲h^{-۱} برابر ۳/۴gL^{-۱}h^{-۱} به دست آمد. شکل‌های (۷) و (۸) این نتایج را نشان می‌دهد. با به کارگیری سینتیک و روابط مربوط به کشت مداوم، یا با رسم منحنی رشد و محاسبه شیب در شرایط کشت غیرمداوم مقادیر μ و t_d محاسبه شد که به ترتیب برابرند با ۰/۵۹h^{-۱} و ۱/۱۶۳h^{-۱} [۱۱]. این

است که میزان خوراک ورودی به فرمنتور را تنظیم می‌کند. برای بهینه‌سازی شدت رقیق‌سازی، ابتدا فرمنتور به صورت غیر مداوم راه‌اندازی شد و پس از اینکه میکروارگانیسم به انتهای فاز لگاریتمی رسید، کشت مداوم با شدت رقیق‌سازی ۰/۱۲h^{-۱} برقرار شد. آنگاه با کنترل و ثابت نگه داشتن دما، دوره هم‌زن، میزان هوادهی، مقدار خوراک ورودی و حجم کاری فرمنتور، حالت پایدار با کنترل جذب نوری محیط کشت و اندازه‌گیری pH نهایی محیط کشت جستجو

3. Dalamini, A. M., and Peiris, P.S., "Biopolymer Production by a *Klebsiella oxytoca* Isolate Using Whey as Fermentation Substrate," *Biotechnology Letters*, Vol.V 90, No. 2, pp. 12-130, 1997.
4. Litchfield, J. H., "Production of Single-Cell Protein for Use in Food or Feed," In *Microbial Technology*, ed. Pepler H. J., and Perlaman D., Vol. 1, 2nd ed., pp. 93-155. Academic, New York, 1979.
5. Shojaosadati, S. A., Ghazali, M. N., "Single Cell Protein production from Methanol-Utilizing Bacteria in I. R. Iran," *Amirkabir*, Vol. 8, NO.30, pp. 33-41,1996.
6. Tahoun, M. K., El - Merheb, Z., Salam, A. and Youssef, A., "Biomass and Lipids from Lactose or Whey by *Trichosporon beiglii*," *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 24, pp. 358-360, 1987.
7. Barraquio, V. L., Silverio , Revilleza, R. P. and Fernadez, W.L., "Production of Protein - Rich Animal Feed Supplement from Cheese Whey," *Milchwissenschaft*, 36 (4), 1981.
8. El-Dien, H. N., and Halasz, A., "Attempts to Utilize Whey for the Production of Yeast Protein," *Acta Alimentaria*, Vol. 11 (1), pp. 11-19, 1982.
9. Muller, L. L., "Yeast products from Whey," *Process Biochemistry*, pp. 21-23, January 1969.
10. Mawson, A. J., "Yeast Biomass Production From Acid Whey Permeate," *Biotechnology Letters*, Vol. 10 (7), pp. 503-508, 1988.
11. شجاع الساداتی، سیدعباس، "تولید SCP از آب پنیر"، گزارش نهایی طرح تحقیقاتی، ص ۶۴-۸۱، بهار ۱۳۷۷.
12. AOAC, "*Official Methods of Analysis*," (13th ed.), Association Official Analytical Chemists, Washington, 1980.
13. Sandra, R. C. V., and Tauk, S. M., "Optimal Conditions For SCP Production by Mixed Cultures of *A. niger* and CR. Laurentii Grown in Sugar Cane Vinasse Medium," *Rev. Microbial, sto pallo*, 25(2), pp. 129-135, 1994.
14. Algur, O. F., and Gokalp, H. Y., "Same Fermentation Parameters Influencing Single Cell Protein Production by *Rhizopus arrizus* and *Actinomucor elegans*," *J. Biology*, 15. pp. 190-197, 1991.
15. Olsen, J., and Allerman, K., *Microbial Biomass as a Protein Source, Basic Biotechnology*, Academic Press, London, pp. 225-307, 1987.