

ETHANOL PRODUCTION POTENTIAL OF *Saccharomyces fragilis* IZ 275 USING CHEESE WHEY POWDER SOLUTION

POTENCIAL DE PRODUCCIÓN DE ETANOL DE *Saccharomyces fragilis* IZ 275 USANDO SOLUCIÓN DE POLVO DE SUERO DE QUESO

Geyci de Oliveira **Colognesi**¹, Leandro Freire **dos Santos**^{1*}, Raul J. H. Castro **Gomez**², Salvador Masseguer **Roig**¹, Hélio Hiroshi **Sugimoto**¹

¹North Paraná University, Centre for Postgraduate Studies and Research, Science and Technology of Dairy Products, Londrina – PR, Brazil. (leandrofreire@onda.com.br). ²State University of Londrina, Department of Animal Husbandry, Londrina – PR, Brazil.

ABSTRACT

The use of residues from dairy industry is interesting because of the ease of acquisition and a relatively low cost. The objective of this study was to analyze ethanol production by the *Saccharomyces fragilis* varying the concentration of cheese whey powder (CWP) solution, initial pH and inoculum concentration using a factorial design technique; besides, semi-batch operations to add lactose was investigated. Statistical analysis was performed by ANOVA ($p \leq 0.05$). The concentrations of CWP solution and initial pH were significant in the fermentation medium for ethanol production. The optimum conditions were CWP solution 15 %, pH 5.0, inoculum concentration 5 % and a fermentation time of 18 h, and ethanol production reached 7.6 % (v/v). Additionally, semi-batch operations performed to add lactose also modified the ethanol yield (10.67 % v/v). This would be the first time that a high ethanol production rate was obtained from *S. fragilis* using cheese whey powder solution and a factorial design technique.

Key words: Ethanol, *Saccharomyces fragilis*, cheese whey powder solution.

INTRODUCTION

Dairy production is unique because it is produced every day of the year (Doughrath *et al.*, 2013). The modern dairy industry produces high amounts of residues (wastewater) due to scale-up approaches and inherent manufacturing

RESUMEN

El uso de residuos de la industria lechera es interesante por la facilidad de adquisición y costo relativamente bajo. El objetivo de este estudio fue analizar la producción de etanol por *Saccharomyces fragilis* variando la concentración de solución de suero en polvo de queso (CWP), pH inicial y concentración del inóculo, con una técnica de diseño factorial; además, se investigaron operaciones de semi lotes para agregar la lactosa. El análisis estadístico realizado fue ANOVA ($p \leq 0.05$). Las concentraciones de la solución CWP y el pH inicial fueron significativas en la fermentación del medio para la producción de etanol. Las condiciones óptimas fueron 15 % de solución CWP, pH 5.0, concentración de inóculo de 5 % y tiempo de fermentación de 18 h, y la producción de etanol alcanzó 7.6 % (v/v). Además, por operaciones de semi lotes realizadas para agregar lactosa también se modificó la producción de etanol (10.67 % v/v). Esta sería la primera vez que se obtiene una tasa alta de producción de etanol de *S. fragilis* usando solución de polvo de suero de queso y una técnica de diseño factorial.

Palabras clave: etanol, *Saccharomyces fragilis*, solución de polvo de suero de queso.

INTRODUCCIÓN

La producción de leche es única porque se produce todo el año (Doughrath *et al.*, 2013). La industria lechera moderna produce altas cantidades de residuos (aguas residuales) debido a la aproximación de producción de gran escala y procesos inherentes de fabricación (Krzeminska *et al.*, 2013). El suero de queso (CW), un residuo importante de la industria lechera, es un problema ambiental importante debido a su contenido alto de materia orgánica

*Author for correspondence ❖ Autor responsable.

Received: February, 2014. Approved: March, 2015.

Published as NOTE in *Agrociencia* 49: 291-298. 2015.

processes (Krzeminska *et al.*, 2013). Cheese whey (CW), an important residue from dairy industry, is a significant environmental problem because of its high organic matter content (Carvalho *et al.*, 2013). The world production of CW is 10^8 t year⁻¹ but only a small amount is used by industries for producing value-added compounds such as organic acids, oligonucleotides and biodegradable plastics (Hungaro *et al.*, 2013; Madureira *et al.*, 2013; Sharma and Luzinov, 2012). Thus, using CW for producing green energy or ethanol and CW powder (CWP) would give better results due to its high lactose content (Guo *et al.* 2010; Koushki *et al.* 2012). So far, there are only a few reports available about CWP fermentation.

Saccharomyces cerevisiae, the most used yeast for ethanol production and the common distiller's yeast, cannot ferment lactose because it lacks both lactose permease and β -galactosidase, which transport lactose into the cytoplasm and hydrolyze it into glucose and galactose (Zou *et al.*, 2013). Cheese whey contains lactose as a carbon source which would prevent its fermentation by *S. cerevisiae* (Pisponen *et al.*, 2013), although this yeast might use whey/lactose by means of hybrid recombination and co-immobilization strategies (Guo *et al.*, 2012; Kisieleska, 2012; Tahoun *et al.*, 2002). Besides, there are metabolic differences, such as those in the glucose and fructose consumption, in various *Saccharomyces* wine species (Tronchoni *et al.*, 2009). Thus, the question is whether other *Saccharomyces* spp. would possess lactose permease and β -galactosidase levels. Singh *et al.* (2009) isolated and purified β -galactosidase from *S. fragilis*, suggesting that this yeast could ferment cheese whey and produce ethanol. Therefore, the objective of the present study was to determine a factorial design to produce ethanol by *S. fragilis* using CWP solution, and besides to investigate other metabolic aspects.

MATERIALS AND METHODS

Cheese whey powder was obtained from Central Cooperative of Agro-industrial (Confepar[®]). For the preparation of CWP solution, an appropriate CWP amount was dissolved in 0.5 - 1 L of distilled water and autoclaved - continuous flow (100 °C, 30 min) and the precipitate (mostly proteins) was removed by filtration. The lactose content in the cleared solution was determined and the solution was diluted with sterile water in

(Carvalho *et al.*, 2013). La producción mundial de CW es 10^8 t año⁻¹ pero solo una cantidad pequeña es usada por las industrias para producir compuestos con valor agregado, como ácidos orgánicos, oligonucleótidos y plásticos biodegradables (Hungaro *et al.*, 2013; Madureira *et al.*, 2013; Sharma y Luzinov, 2012). Por tanto, utilizar CW para producir energía verde o etanol y polvo de CW (CWP) daría mejores resultados debido a su contenido alto de lactosa (Guo *et al.*, 2010; Koushki *et al.*, 2012). Hasta ahora, hay sólo unos pocos informes disponibles sobre fermentación de CWP.

Saccharomyces cerevisiae, la levadura más usada para la producción de etanol y la levadura común de destilería, no fermenta lactosa porque carece de lactosa permeasa y β -galactosidasa, que transportan la lactosa al citoplasma y la hidrolizan a glucosa y galactosa (Zou *et al.*, 2013). El suero de queso contiene lactosa como una fuente de carbono que impediría su fermentación por *S. cerevisiae* (Pisponen *et al.*, 2013), aunque esta levadura puede usar suero de leche/lactosa mediante estrategias de recombinación de híbridos y co-inmovilización (Guo *et al.*, 2012; Kisieleska, 2012; Tahoun *et al.*, 2002). Además, hay diferencias metabólicas, como en el consumo de glucosa y fructosa, en varias especies de *Saccharomyces* del vino (Tronchoni *et al.*, 2009). Así, la pregunta es si otras *Saccharomyces* spp. poseen niveles de lactosa permeasa y β -galactosidasa. Singh *et al.* (2009) aislaron y purificaron la β -galactosidasa de *S. fragilis* y sugieren que esta levadura puede fermentar el suero de queso y producir etanol. Por tanto, el objetivo del presente estudio fue determinar un diseño factorial para producir etanol con *S. fragilis* usando solución CWP, y además investigar otros aspectos metabólicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Polvo de suero de queso se obtuvo de la Cooperativa Agro-industrial Central (Confepar[®]). Para preparar la solución CWP, una cantidad apropiada de CWP se disolvió en 0.5 a 1 L de agua destilada esterilizada con flujo continuo (100 °C, 30 min) y el precipitado (principalmente proteínas) fue eliminado por filtración. El contenido de lactosa se determinó en la solución clarificada y la solución se diluyó con agua estéril para ajustar la concentración de lactosa inicial (8.58 g L⁻¹; pH 4.8) (Silva *et al.*, 2010). Cuando fue necesario, los niveles de glucosa y la lactosa se midieron con un espectrofotómetro utilizando los métodos

order to adjust the initial lactose concentration (8.58 g L^{-1} ; pH 4.8) (Silva *et al.*, 2010). When required, glucose and lactose levels were measured with a spectrophotometer using glucose oxidase and methylamine reaction methods (Ohizumi *et al.*, 1989).

Saccharomyces fragilis IZ 275 (SF), obtained from the Centre for Postgraduate Studies and Research – UNOPAR, Brazil, was first cultured on PDA; the colonies were inoculated into 100 mL of CWP solution (250 mL Erlenmeyer flasks) supplemented with yeast extract (12 g L^{-1}), KH_2PO_4 (5 g L^{-1}), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (6 g L^{-1}) and MgSO_4 (0.6 g L^{-1}), pH 5.5, and incubated 24 h at $35 \text{ }^\circ\text{C}$ by shaking them at 3 g. After incubation growth was suspended in sterile peptone (1 %) and the number of viable cells in suspension was evaluated by colony-forming units (CFU) methodology (Pereira *et al.*, 2013). To carry out the growth kinetic experiments, ethanol, glucose and lactose content were evaluated (Silva *et al.*, 2010). Ethanol levels were measured with the potassium dichromate method (Nair and Zuhara, 2008).

Factorial planning was used during the optimization stage to assess concentration of CWP solution, initial pH and inoculum concentration and, according to Santos *et al.* (2013), a factorial design can be a strategy to increase the productivity of the desired product. Thus, a complete factorial design 3^3 with three replications at the central point was used (Table 1) to determine the optimal concentration of CWP solution, initial pH and inoculum concentration for ethanol production by *S. fragilis*. The temperature and fermentation time was fixed at $35 \text{ }^\circ\text{C}$ and 18 h (Yong *et al.*, 2013). The generated model was validated using the best conditions obtained. The Statistica 5.0 software by Statsoft was used for planning and analyzing the data (Santos *et al.*, 2013).

RESULTS AND DISCUSSION

The ANOVA shows that the ethanol production was influenced ($p \leq 0.05$) by CWP solution (Table 1). This result would give a better understanding about the improvement in fermentation performance (ethanol production) and lactose content, which is linearly related to the concentration of CWP solution (Guo *et al.*, 2010; Koushki *et al.*, 2012). Ethanol production was modeled by the equation $z = 15.26 - 0.26y - 0.15y^2 - 8.92x + 0.99x^2 + 1.05xy - 0.13yx^2 + 0.2y^2x - 0.28 * 2.86y + 0.01 * 2.86y^2 - 0.02 * 2.86x + 3.4$. The value of the adjusted R^2 was acceptable (0.81) and the lack of fit of the model was not significant ($p > 0.05$). The mathematical model may explain 97 % of the responses because R^2 was 0.97.

de glucosa oxidasa y reacción de la metilamina (Ohizumi *et al.*, 1989).

Saccharomyces fragilis IZ 275 (SF), obtenidos del Centro de Estudios de Posgrado e Investigación – UNOPAR, Brasil, primero fue cultivada en PDA; las colonias fueron inoculadas en 100 mL de solución de CWP (matraces Erlenmeyer de 250 mL) más un suplemento con extracto de levadura (12 g L^{-1}), KH_2PO_4 (5 g L^{-1}), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (6 g L^{-1}) y MgSO_4 (0.6 g L^{-1}), pH 5.5 y se incubó 24 h a $35 \text{ }^\circ\text{C}$ agitando a 3 g. Después de la incubación el crecimiento fue suspendido en peptona estéril (1 %) y el número de células viables en suspensión se evaluó mediante metodología (CUF) de unidades formadoras de colonias (Pereira *et al.*, 2013). Para realizar los experimentos de cinética de crecimiento, los contenidos de etanol, glucosa y la lactosa fueron evaluados (Silva *et al.*, 2010). Los niveles de etanol se midieron con el método de dicromato de potasio (Nair y Zuhara, 2008).

La planificación factorial se usó en la fase de optimización para evaluar la concentración de la solución CWP, el pH inicial y la concentración de inóculo y, según Santos *et al.* (2013), un diseño factorial puede ser una estrategia para aumentar la productividad del producto deseado. Por tanto, se usó un diseño factorial completo 3^3 con tres repeticiones en el punto central (Cuadro 1) para determinar la concentración óptima de la solución CWP, el pH inicial y la concentración de inóculo para la producción de etanol por *S. fragilis*. La temperatura y el tiempo de la fermentación se fijó en $35 \text{ }^\circ\text{C}$ y 18 h (Yong *et al.*, 2013). El modelo generado se validó usando las mejores condiciones obtenidas. El software Statistica 5.0 de Statsoft se usó para planificar y analizar los datos (Santos *et al.*, 2013).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El ANDEVA muestra que la producción de etanol fue influenciada ($p \leq 0.05$) por la solución de CWP (Cuadro 1). Este resultado daría una comprensión mejor sobre el incremento en el rendimiento de la fermentación (producción de etanol) y contenido de lactosa, que está relacionado linealmente con la concentración de la solución CWP (Guo *et al.*, 2010; Koushki *et al.*, 2012). La producción de etanol fue modelada por la ecuación $z = 15.26 - 0.26y - 0.15y^2 - 8.92x + 0.99x^2 + 1.05xy - 0.13yx^2 + 0.2y^2x - 0.28 * 2.86y + 0.01 * 2.86y^2 - 0.02 * 2.86x + 3.4$. El valor ajustado de la R^2 fue aceptable (0.81) y la falta de ajuste del modelo no fue significativa ($p > 0.05$). El modelo matemático puede explicar 97 % de las respuestas porque R^2 fue 0.97.

El ANDEVA muestra que la producción de etanol fue influenciada ($p \leq 0.05$) por la solución de

Table 1. Central composite design on ethanol production by *Saccharomyces fragilis*.
Cuadro 1. Diseño de compuesto central en la producción de etanol por *Saccharomyces fragilis*.

Runs	Coded variables			CWP solution %	Initial pH %	Inoc. conc. %	Ethanol yield % (v/v)
1	-1	-1	0	5	3.5	1	2.6
2	1	-1	0	15	3.5	3	3.4
3	-1	1	0	5	6.5	3	2.2
4	1	1	0	15	6.5	3	5.3
5	-1	0	-1	5	5.0	1	1.7
6	1	0	-1	15	5.0	1	6.3
7	-1	0	1	5	5.0	5	2.4
8	1	0	1	15	5.0	5	7.6
9	0	-1	-1	10	3.5	1	4.6
10	0	1	-1	10	6.5	1	3.8
11	0	-1	1	10	3.5	5	4.1
12	0	1	1	10	6.5	5	3.0
13	0	0	0	10	5.0	3	3.7
14	0	0	0	10	5.0	3	5.0
15	0	0	0	10	5.0	3	4.8

13, 14, 15 Central runs ❖ 13, 14, 15 Corridas centrales.

The ANOVA shows that the ethanol production was influenced ($p \leq 0.05$) by CWP solution (Table 1). This result would give a better understanding about the improvement in fermentation performance (ethanol production) and lactose content, which is linearly related to the concentration of CWP solution (Guo *et al.*, 2010; Koushki *et al.*, 2012). Ethanol production was modeled by the equation $z = 15.26 - 0.26y - 0.15y^2 - 8.92x + 0.99x^2 + 1.05xy - 0.13yx^2 + 0.2y^2x - 0.28 \cdot 2.86y + 0.01 \cdot 2.86y^2 - 0.02 \cdot 2.86x + 3.4$. The value of the adjusted R^2 was acceptable (0.81) and the lack of fit of the model was not significant ($p > 0.05$). The mathematical model may explain 97 % of the responses because R^2 was 0.97.

The optimum conditions for ethanol production (7.6 % v/v) were CWP solution 15 %, pH 5.0, inoculum concentration 5 % and 18 h of fermentation (Figure 1A and Table 1). To confirm the validity of the statistical experimental model, two runs of additional confirmation experiments were carried out. Guo *et al.* (2010) show that high ethanol production (5.3% v/v) from lactose fermentation was possible using mixed cultures of immobilized cells of *Kluyveromyces marxianus* and *S. cerevisiae*. Thus, the monocultures of *S. fragilis* are very desirable in ethanol fermentation using whey as medium. This result also agrees with those published by Guo *et al.* (2012), who used CWP

CWP (Cuadro 1). Este resultado daría una mejor comprensión sobre la mejora en el rendimiento de la fermentación (producción de etanol) y contenido de lactosa, que está relacionado linealmente con la concentración de la solución CWP (Guo *et al.*, 2010; Koushki *et al.*, 2012). La producción de etanol fue modelada por la ecuación $z = 15.26 - 0.26y - 0.15y^2 - 8.92x + 0.99x^2 + 1.05xy - 0.13yx^2 + 0.2y^2x - 0.28 \cdot 2.86y + 0.01 \cdot 2.86y^2 - 0.02 \cdot 2.86x + 3.4$. El valor ajustado de la R^2 fue aceptable (0.81) y la falta de ajuste del modelo no fue significativa ($p > 0.05$). El modelo matemático puede explicar 97 % de las respuestas porque R^2 fue 0.97.

Las condiciones óptimas para la producción de etanol (7.6 % v/v) fueron solución CWP al 15 %, pH 5.0, concentración del inóculo de 5 % y 18 h de fermentación (Figura 1A y Cuadro 1). Dos análisis de confirmación adicional de experimentos se realizaron para corroborar la validez del modelo estadístico experimental. Guo *et al.* (2010) muestran que la producción alta de etanol (5.3% v/v) de la fermentación de lactosa fue posible usando cultivos mixtos de células inmovilizadas de *Kluyveromyces marxianus* y *S. cerevisiae*. Así, los monocultivos de *S. fragilis* son muy deseables en la fermentación de etanol usando suero como medio. Este resultado concuerda también con los publicados por Guo *et al.* (2012), quienes usaron CWP

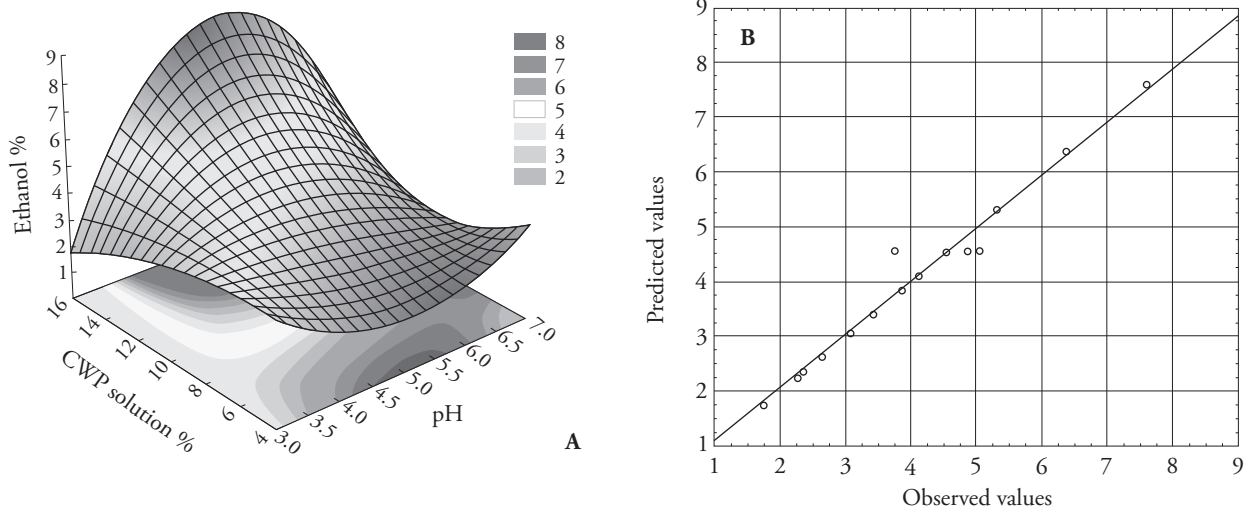


Figure 1. A) Surface-response for independent variables: concentration of CWP solution and pH for ethanol production by *Saccharomyces fragilis*. B) Predictive ability of the model: predicted and observed values.

Figura 1. A) superficie de respuesta para las variables independientes: concentración de la solución CWP y pH para la producción de etanol por *Saccharomyces fragilis*. B) Capacidad predictiva del modelo: valores predichos y observados.

and intergeneric fusion technique, and obtained 3.8 % (v/v).

The predictive ability of the model (Figure 1B) shows a good correlation between the observed and the predicted values. The promising results of ethanol production from *S. fragilis* IZ 275 using cheese whey powder solution were possible only because of the lactose permease and β -galactosidase expression, which facilitates the passage of lactose into the cytoplasm and hydrolysis of lactose into glucose and galactose (Zou *et al.*, 2013); thus, glucose and galactose may follow to glycolytic pathway. In conclusion, this result agrees with those published by Singh *et al.* (2009) which isolated and purified β -galactosidase from *S. fragilis*.

Figure 2A shows the kinetic parameters (ethanol, glucose, lactose and CFU) at optimum conditions (CWP 15 %, pH 5.0 and inoculum concentration 5 %) for ethanol production, which increased linearly between 6 and 16 h at a rate of 0.67 % h⁻¹ (R²=0.991). This linear production behaviour is observed using other experimental designs; thus, Xiao *et al.* (2010) report a linear production of acetoin while increasing the inoculum biomass.

Ethanol production was 8.21 % at 16 h of fermentation, but lactose depletion was detected at 14 h (Figure 2A). These results lead to a key question: Could ethanol production increase with semi-

y la técnica de fusión intergenérica, y obtuvieron 3.8% (v/v).

La capacidad predictiva del modelo (Figura 1B) muestra una correlación buena entre los valores observados y predichos. Los resultados prometedores de la producción de etanol por *S. fragilis* IZ 275 utilizando solución de polvo de suero de queso fueron posibles sólo por la expresión de la lactosa permeasa y la β -galactosidasa, que facilitan el paso de la lactosa en el citoplasma y la hidrólisis de la lactosa en glucosa y galactosa (Zou *et al.*, 2013); así, la glucosa y la galactosa pueden seguir la vía glucolítica. En conclusión, este resultado concuerda con los publicados por Singh *et al.* (2009) que aislaron y purificaron β -galactosidasa de *S. fragilis*.

La Figura 2A muestra los parámetros cinéticos (etanol, glucosa, lactosa y CFU) en condiciones óptimas (CWP 15 %, pH 5.0 y concentración de inóculo de 5 %) para la producción de etanol, que aumentó linealmente entre 6 y 16 h a una tasa de 0.67 % h⁻¹ (R²=0.991). Este comportamiento de producción lineal se observó con otros diseños experimentales; así, Xiao *et al.* (2010) reportan una producción lineal de acetoina mientras aumenta la biomasa del inóculo.

La producción de etanol fue 8.21 % a las 16 h de fermentación, pero el agotamiento de lactosa se detectó a las 14 h (Figura 2A). Estos resultados llevan a una pregunta clave: ¿podría la producción de etanol

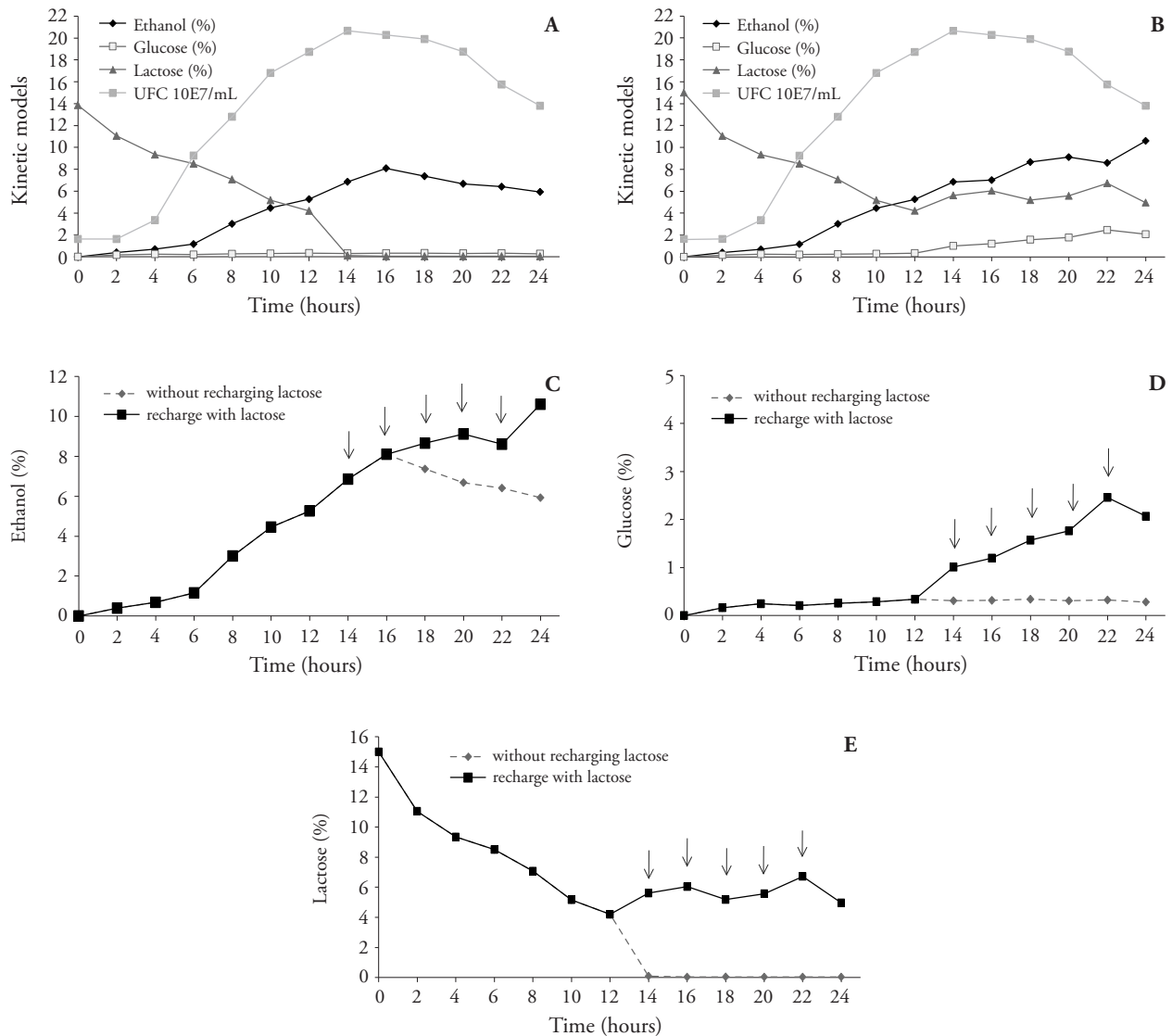


Figure 2. Kinetic models. A) Data collection on kinetic parameters of *Saccharomyces fragilis* without recharging lactose. B) Data collection on kinetic parameters of *Saccharomyces fragilis* supplemented with lactose. C) Compared kinetics of ethanol production with and without lactose. D) Compared kinetics of glucose concentration with and without lactose. E) Compared kinetics of lactose concentration with and without lactose. Recharging pulses (↓).
Figura 2. Modelos cinéticos. (A) Recopilación de datos sobre los parámetros cinéticos de *Saccharomyces fragilis* sin recarga de lactosa. (B) Recopilación de datos sobre los parámetros cinéticos de *Saccharomyces fragilis* con suplemento de lactosa. (C) Comparación de la cinética de producción de etanol con y sin lactosa. (D) Comparación de la cinética de la concentración de glucosa con y sin lactosa. (E) Comparación de la cinética de concentración de lactosa con y sin lactosa. Recarga de pulsos (↓).

batch process (recharge with lactose)? The results of own study indicate that the ethanol production significantly increased (10.67 % v/v) (Figures 2B, C), when lactose was added (Figure 2E) and, certainly, β -galactosidase activity was increased when the degradation product of lactose was analysed (Figure 2D). Potential benefits of semi-batch operations for ethanol production were also reported by Davis *et*

aumentar con el proceso por semi-lotes (recarga con lactosa)? Los resultados de nuestro estudio indican que la producción de etanol aumentó significativamente (10.67 % v/v) (Figuras 2B, C) cuando se agregó lactosa (Figura 2E) y, ciertamente, la actividad de la β -galactosidasa aumentó según el análisis del producto de la degradación de la lactosa (Figura 2D). Los beneficios potenciales de las operaciones

al., 2006). Besides, this observation agrees with that of Maria and Cocuz (2011), who point out that semi-batch reactors may be advantageous considering the feeding policy.

CONCLUSION

To our knowledge, this is the first time that a high ethanol production rate was obtained from *Saccharomyces fragilis* using cheese whey powder solution and a design factorial technique. Besides, semi-batch operations to add lactose modified the ethanol yield. Probably, ethanol production from *S. fragilis* using cheese whey powder solution cannot replace the available strategies for ethanol production from sugar cane bagasse (traditional Brazilian perspective), but it might complement them.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors gratefully acknowledge the Coordination of Personnel Improvement – Superior Level (CAPES), North Paraná University, Fundação André Tosello, Confepar and Brazil's National Council for Scientific and Technologic Development (CNPq), Brazil, for financial support and technical assistance.

LITERATURE CITED

- Carvalho, F., A. R. Prazeres, and J. Rivas. 2013. Cheese whey wastewater: characterization and treatment. *Sci. Total Environ.* 445: 385-396.
- Davis, L., P. Rogers, J. Pearce, and P. Peiris. 2006. Evaluation of Zymomonas-based ethanol production from a hydrolysed waste starch stream. *Biomass Bioenerg.* 30: 809-814.
- Douphrate, D. I., G. R. Hagevoort, M. W. Nonnenmann, C. L. Kolstrup, S. J. Reynolds, M. Jakob, and M. Kinsel. 2013. The dairy industry: A brief description of production practices, trends, and farm characteristics around the world. *J. Agromedicine* 18: 187-197.
- Guo, X., R. Wang, Y. Chen, and D. Xiao. 2012. Intergeneric yeast fusants with efficient ethanol production from cheese whey powder solution: Construction of a *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* AY-5 hybrid. *Eng. Life Sci.* 12: 656-661.
- Guo, X., J. Zhou, and D. Xiao. 2010. Improved ethanol production by mixed immobilized cells of *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* from cheese whey powder solution fermentation. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 160: 532-538.
- Hungaro, H. M., N. O. Calil, A. S. Ferreira, A. K. Chandel, and S. S. Silva. 2013. Fermentative production of ribonucleotides from whey by *Kluyveromyces marxianus*: Effect of temperature and pH. *J. Food Sci. Technol.* 50: 958-964.
- semi-lotes de producción de etanol también fueron observados por Davis *et al.* (2006). Además, esta observación coincide con la de Maria y Cocuz (2011), quienes señalan que los reactores semi-lotes pueden ser ventajosos, considerando la política de alimentación.

CONCLUSIÓN

Por lo que sabemos, ésta es la primera vez que se obtuvo una tasa alta de producción de etanol con *Saccharomyces fragilis* usando solución de polvo de suero de queso y una técnica de diseño factorial. Además, las operaciones semi-lotes para añadir lactosa modificaron la producción de etanol. Probablemente, la producción de etanol por *S. fragilis* usando solución de polvo de suero de queso no puede reemplazar los procesos disponibles para la producción de etanol de bagazo de caña de azúcar (perspectiva brasileña tradicional), pero puede complementarlos.

—Fin de la versión en Español—



- Kisielewska, M. 2012. Ultrasonic stimulation of co-immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells and beta-galactosidase enzyme for enhanced ethanol production from whey ultrafiltration permeate. *Pol. J. Environ. Stud.* 21: 387-393.
- Koushki, M., M. Jafari, and M. Azizi. 2012. Comparison of ethanol production from cheese whey permeate by two yeast strains. *J. Food Sci. Technol.* 49: 614-619.
- Krzeminska, D., E. Neczaj, and K. Parkitna. 2013. Application of fenton reaction for supporting biological wastewater treatment from the dairy industry. *Rocz. Ochr. Sr.* 15: 2381-2397.
- Madureira, A. R., J. C. Soares, M. Amorim, T. Tavares, A. M. Gomes, M. M. Pintado, and F. X. Malcata. 2013. Bioactivity of probiotic whey cheese: Characterization of the content of peptides and organic acids. *J. Sci. Food Agric.* 93: 1458-1465.
- Maria, G., and A. Cocuz. 2011. Operating alternatives for the (semi) batch reactor used for D-glucose enzymatic oxidation with free-enzymes. *Rev. Chim.* 62: 318-327.
- Nair, T. D. R., and M. Zuhara. 2008. Kinetic studies on the oxidation of 1-phenyl ethanol and its para-substituted derivatives by potassium dichromate in aqueous acetic acid medium. *Asian J. Chem.* 20: 4388-4392.
- Ohizumi, T., T. Arai, and Y. Oki. 1989. Measurement of lactose concentrations in milk of microtus-montebelli with methylamine reaction. *Exp. Anim.* 38: 353-355.
- Pereira, C. A., A. C. B. P. Costa, C. B. Carreira, J. C. Junqueira, and A. O. C. Jorge. 2013. Photodynamic inactivation of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* biofilms *in vitro*. *Lasers Med. Sci.* 28: 859-864.

- Pisponen, A., S. Pajumaegi, H. Mootse, A. Karus, and V. Poikalainen. 2013. The lactose from ricotta cheese whey: the effect of pH and concentration on size and morphology of lactose crystals. *Dairy Sci. Technol.* 93: 477-486.
- Santos, L. F., F. C. B. C. Melo, W. J. M. Paiva, D. Borsato, M. L. C. C. Silva, and M. A. P. C. Celligoi. 2013. Characterization and optimization of levan production by *Bacillus subtilis* NATO. *Roman. Biotechnol. Lett.* 18: 8413-8422.
- Sharma, S., and I. Luzinov. 2012. Water aided fabrication of whey and albumin plastics. *J. Polym. Environ.* 20: 681-689.
- Silva, A. C., P. M. R. Guimares, J. A. Teixeira, and L. Domingues. 2010. Fermentation of deproteinized cheese whey powder solutions to ethanol by engineered *Saccharomyces cerevisiae*: Effect of supplementation with corn steep liquor and repeated-batch operation with biomass recycling by flocculation. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 37: 973-982.
- Singh, A. K., S. Sinha, and K. Singh. 2009. Study on beta-Galactosidase isolation, purification and optimization of lactose hydrolysis in whey for production of instant energy drink. *Int. J. Food Eng.* 5: 5.
- Tahoun, M. K., T. M. Ei-Nemr, and O. H. A. Shata. 2002. Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain for efficient conversion of lactose in salted and unsalted cheese whey into ethanol. *Nahrung* 46: 321-326.
- Tronchoni, J., A. Gamero, F. N. A. Lopez, E. Barrio, and A. Querol. 2009. Differences in the glucose and fructose consumption profiles in diverse *Saccharomyces* wine species and their hybrids during grape juice fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 134: 237-243.
- Xiao, Z., S. Qiao, and C. Ma. 2010. Acetoin production associated with the increase of cell biomass in *Bacillus pumilus* ATCC 14884. *Afr. J. Microbiol. Res.* 4: 1997-2003.
- Yong, C., Q. Liu, T. Zhou, B. Li, S. Yao, J. Wu, and H. Ying. 2013. Ethanol production by repeated batch and continuous fermentations by *Saccharomyces cerevisiae* immobilized in a fibrous bed bioreactor. *J. Microbiol. Biotechnol.* 23: 511-517.
- Zou, J., X. Guo, T. Shen, J. Dong, C. Zhang, and D. Xiao. 2013. Construction of lactose-consuming *Saccharomyces cerevisiae* for lactose fermentation into ethanol fuel. *J. Ind. Microbiol. Biot.* 40: 353-363.