

Uso de lactosuero ácido para la producción sustentable de aroma a rosas (2-feniletanol) con *Kluyveromyces marxianus*

Laura Conde-Báez¹, Javier Castro-Rosas¹, J. Bernardo Páez-Lerma²,
J.Roberto Villagómez-Ibarra¹ y Carlos Alberto Gómez-Aldapa^{1*}

Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería¹, Departamento de Ingeniería Química-Bioquímica²
Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo¹, Instituto Tecnológico de Durango²
Mineral de la Reforma, Hgo.¹; Durango, Dgo.²; México
*aldapa@hotmail.com

Abstract—The objective was to assess the production of scent of roses (2-phenylethanol) by *Kluyveromyces marxianus* using a substrate acid whey cheese producer in the State of Hidalgo, México. The identification and quantification of 2-phenylethanol was performed by gas chromatography. Experimental data were adjusted in mathematical models Gompertz, Richards, Logistic and Monod. The data were analyzed using an analysis of variance of a single via. *K. marxianus* was capable of producing 202 mg L⁻¹ (96 h) of 2-phenylethanol, product formation rate (rp) of 0.05 g L⁻¹h⁻¹ (R² 0.99). The substrate consumption rate (-rs) of 0.16 g L⁻¹h⁻¹ (R² 0.99) and consumption of lactose was 86% (24 h).

Keyword— 2-phenylethanol, acid whey, *Kluyveromyces marxianus*.

Resumen—El objetivo del estudio fue evaluar la producción de aroma a rosas (2-feniletanol) por *Kluyveromyces marxianus* utilizando como sustrato lactosuero ácido de una productora de quesos en el Estado de Hidalgo, México. La identificación y cuantificación de 2-feniletanol se realizó por cromatografía de gases. Los datos experimentales se ajustaron a los modelos matemáticos Gompertz, Richards, Logístico y Monod. Los resultados fueron evaluados mediante análisis de varianza de una vía. *K.marxianus* fue capaz de producir hasta 202 mg L⁻¹ (96 h) de 2-feniletanol, con una tasa de formación de producto (rp) de 0.05 g L⁻¹h⁻¹ (R² 0.99). La tasa de consumo de sustrato (-rs) fue de 0.16 g L⁻¹h⁻¹ (R² 0.99) y un consumo de lactosa del 86 % (24 h).

Palabras claves— 2-feniletanol, lactosuero ácido, *Kluyveromyces marxianus*

I. INTRODUCCIÓN

El lactosuero, es el líquido amarillo-verdoso que queda después de la separación de la cuajada durante el proceso de fabricación del queso [1]. Representa alrededor del 90-95 % del volumen de la leche y retiene cerca del 55% de los nutrientes de la misma [2]. Los principales componentes del lactosuero son lactosa (4.5 – 5%), proteínas solubles (0.6 -0.8%), lípidos (0.4-0.5 %) y sales minerales (8-10%) [3]. En el Valle de Tulancingo, Hidalgo se generan aproximadamente 492,000 litros de lactosuero al día, de los cuales el 72% son vertidos sin tratamiento al drenaje, a los arroyos o al suelo de la región, convirtiéndolo en un contaminante potencial, debido al elevado contenido en materia orgánica [4-6].

La alta carga orgánica, es originada principalmente por el contenido en lactosa (90%), seguido de grasas y proteínas que son responsables de la contaminación orgánica con valores que se encuentran en el rango de 0.99 – 10.58 g/L y de 1.4-8.0 g/L, respectivamente [7,8]. Dicha composición, conduce a valores elevados de la Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO) (30-50 g/L) y de la Demanda Química de Oxígeno (DQO) (60-80 g/L) que sobrepasan los límites establecidos por las normas, generando efectos negativos al ambiente. Dentro de estos efectos, se encuentra un rápido consumo de oxígeno, fenómenos de eutrofización, grasas de flotación, formación de espuma, salinización, acidificación,

liberación de olores desagradables entre otros [9]. Sin embargo, su alta capacidad contaminante, el superávit de la disponibilidad de lactosuero y el valor nutritivo de sus componentes proporcionan una oportunidad para transformarlo en compuestos de valor agregado mediante su tratamiento [10].

Desde el punto de vista de su valorización, la hidrólisis de lactosa representa un tratamiento de bajo costo, que se puede lograr de dos formas, por hidrólisis química y por hidrólisis enzimática [6]. La hidrólisis química, presenta algunas desventajas tales como la desnaturalización de las proteínas, la necesidad de pre-desmineralización, la presencia de un color marrón por las reacciones de Maillard y la formación de productos indeseables [11]. Como consecuencia de ello la hidrólisis enzimática es la ruta preferencial para la hidrólisis de lactosa, a través de la enzima lactasa o β -galactosidasa (que se encuentra en los animales, plantas, bacterias, hongos y levaduras) [12].

Hidrolizar la lactosa presente en el lactosuero permite la conversión de este residuo en productos de valor añadido. Dentro de éstos compuestos, el 2-feniletanol (2-FE) es un alcohol que se caracteriza por su aroma a rosas [13]. 2-FE es utilizado para la modificación de las composiciones organolépticas del sabor (fórmulas frutales, helados, dulces, bebidas sin alcohol, gelatinas, pudines, goma de mascar), tiene aplicación como anestésico local, y es utilizado también en la elaboración de perfumes y cosméticos [14-16]. Actualmente, la mayor producción de 2-FE (> 10,000 ton/año) se lleva a cabo por métodos químicos, bajo tres síntesis principales (Friedel Craft, óxido de etileno y níquel Raney) [15].

Como consecuencia de ello, la demanda de 2-FE procedente de fuentes naturales es cada vez mayor [17]. En levaduras, puede ser sintetizado, a través de dos rutas por la vía novo o como resultado de la bioconversión de L-fenilalanina (vía de Ehrlich) [18]. Entre los diferentes productores de 2-feniletanol (2-FE), *K. marxianus* presenta varias ventajas, que hacen de esta una cepa prometedora para emplearla en un proceso industrial [17]. Posee una alta capacidad de conversión de sustrato en biomasa y la más alta tasa de crecimiento específico entre los eucariotas [19]. La biosíntesis de 2-FE puede tener lugar por dos vías diferentes: a) la vía catabólica a partir de los aminoácidos por descarboxilación después de la reducción de los α -cetoácidos obtenidos por transaminación (mecanismo de Ehrlich), y b) la vía anabólica de los aminoácidos a partir de α -cetoácidos correspondientes a partir de los azúcares [20].

Los estudios con lactosuero utilizado como fuente de carbono para producir 2-FE, son escasos y prácticamente no hay reportes del uso de lactosuero ácido (LA) utilizado en crudo, para producir aroma a rosas. Debido a ello, el objetivo de este trabajo es evaluar el uso de lactosuero proveniente del Valle de Tulancingo, Hidalgo sobre la producción de 2-FE.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

A. Pre-tratamiento del lactosuero

El lactosuero ácido (LA) fue proporcionado por la empresa PROUNILAC, del Valle de Tulancingo (Hidalgo, México). Se pasteurizó por calentamiento a 63°C / 30 min. Se realizaron 4 lotes de fermentación por duplicado. Las muestras fueron tomadas directamente de la producción de la elaboración de queso, y se colocaron en 12 contenedores de polietileno de 4 L. Éstos fueron transportados en hielo hasta el laboratorio y almacenados a 4°C, hasta su uso.

B. Determinación del contenido de azúcares reductores

El contenido de lactosa en las muestras de LA se determinó por el método de azúcares reductores con ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) tal y como lo presenta Hortsch [21]. Las muestras fueron centrifugadas previamente a 6000 rpm durante 6 minutos.

C. Material biológico

El microorganismo utilizado fue la cepa de *K. marxianus* ITD00262, ésta fue conservada en placas con medio AME [Agar para métodos estándar (Bioxon, México)] a 4 °C, hasta su uso.

D. Producción de 2-feniletanol

La activación de la cepa, se realizó por siembra masiva en placa con medio AME, incubada 24 h/30°C (Arsa, México). Posteriormente, se tomó un asa de siembra de la cepa de *K.marxianus*, para inocular un matraz Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de caldo LPY (20 g/L de lactosa, 20 g/L de peptona de caseína, 10 g/L de extracto de levadura). Se incubó durante 12 h manteniendo una agitación de 180 rpm a 30°C (Shaker Thermo Scientific). Posteriormente, se prepararon 4 lotes de fermentación en matraces de 250 mL, con 100 mL de lactosuero para cada matraz, añadiendo un inóculo inicial de 1×10^6 células/mL. El tiempo de monitoreo fue 96 h, con un tiempo de 24 h entre cada toma de muestra. Periódicamente, a partir de cada matraz se efectuó el recuento de las levaduras mediante la técnica de conteo directo al microscopio utilizando la cámara de Neubauer (Marienfeld), usando volúmenes de 20 μ L para el conteo en cada muestra. Las células teñidas con azul fueron consideradas como viables. La lectura de la muestras se realizó por triplicado.

E. Cuantificación de 2-feniletanol

Para el análisis de 2-feniletanol, 1 mL de las muestras de lactosuero contenidas en los tubos Eppendorf, fueron centrifugadas a 6000 rpm / 3 min. Posteriormente, la fase acuosa se microfiltró y analizó directamente por cromatografía de gases. La muestra filtrada fue analizada en un cromatógrafo de gases (GC; Perkin Elmer), equipado con un detector de flama de ionización (FID), provisto de una columna DB WAX J&W Scientifics (60 m x 0.25 mm x 0.25 μ m). Las temperaturas del inyector, detector y horno fueron 220, 250 y 150 ° C, respectivamente. Se utilizó nitrógeno como gas portador a un flujo de 1 mL/min, para todas las muestras. El extracto de las muestras inyectadas fue de 2 μ L. Los compuestos se identificaron y se cuantificaron por comparación con patrones. Las inyecciones de las muestras se realizaron por duplicado.

F. Modelos matemáticos

Los parámetros cinéticos: velocidad específica de crecimiento (μ), velocidad de formación de producto (rp), velocidad de crecimiento (rg), velocidad de consumo de sustrato (-rs); se determinaron utilizando las ecuaciones matemáticas del modelo de Monod. Los datos experimentales se ajustaron de manera independiente en las ecuaciones matemáticas de Gompertz, Richards y Logístico por regresión no lineal de acuerdo a Zwietering [22], con el algoritmo de Marquardt. La obtención de los valores de las constantes a, xc, k y d, se realizó con ayuda del programa OriginPro versión 8.1, usando el método de mínimos cuadrados, con un intervalo de confianza de 95 %. Una vez calculados los valores de a, xc y k, como solución al modelo aplicado, se obtuvieron los valores de A, μ m y λ , mediante la ecuación correspondiente con su solución [22].

G. Análisis estadístico

Los datos fueron analizados con un análisis de varianza de una sola vía (ANOVA), por comparación de medias por LSD (desviación de mínimos cuadrados) con un nivel de confianza del 95%, utilizando el software STATISTICA versión 8.0.

III. RESULTADOS

Para las fermentaciones de lactosuero ácido, las velocidades máxima de crecimiento específico (μ_m), obtenidas del ajuste de los modelos de crecimiento sigmoidal Gompertz, Richards y Logístico (figura 1) fueron 0.17, 0.20 y 0.18 h^{-1} , respectivamente. Con una variación en el tiempo de generación (t_g), con valores de 1.75, 1.58 y 1.62 h para cada modelo. Para la aplicación del modelo de Monod, se asume que la fase lag no existe, ya que partimos de un inóculo activo, ésta premisa se comprobó también con los modelos de crecimiento sigmoidal (Gompertz, Richards y Logístico) en donde se obtuvo una fase lag de 0.09, 0.19 y 0.10 h^{-1} , respectivamente. Para todos los modelos, los coeficientes de correlación fueron superiores al 95 %.

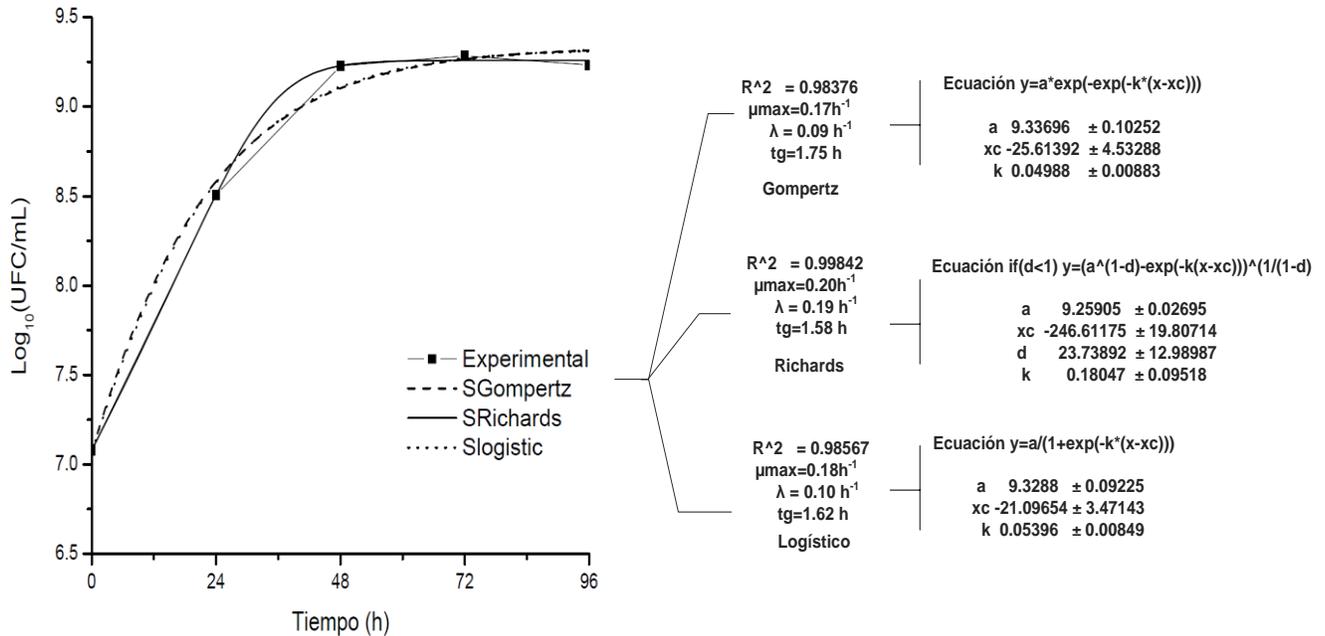


Fig. 1. Ajuste del modelo Gompertz, Richards y Logístico para las fermentaciones de LA a 30 °C/180 rpm.

Utilizando la ecuación de Monod, se obtuvo una velocidad de consumo de sustrato ($-r_s$) de 0.16 $g L^{-1} h^{-1}$ (R^2 0.99) con una concentración de lactosa residual de 1.69 $g L^{-1}$. Para éstas fermentaciones, el recuento celular fue de 1.93×10^9 UFC/mL a las 72 h (Tabla 1). Se obtuvo un rendimiento de biomasa ($Y_{x/s}$, en base a lactosa) de 0.82 g/g, que corresponden de acuerdo con los resultados obtenidos en el recuento celular, con una formación de 0.82 g de biomasa por cada gramo de sustrato. El consumo total de lactosa para las fermentaciones de LA fue del 96 % en un tiempo de 96 h. La máxima producción de 2-FE fue de 202 $mg L^{-1}$ (96 h) con una velocidad de formación de producto (r_p) de 0.05 $g L^{-1} h^{-1}$ y un coeficiente de correlación (R^2) de 0.99.

Tabla I. Concentración los distintos parámetros de las fermentaciones de LA con *K.marxianus* a 30°C/180 rpm.

Tiempo (h)	2-feniletanol	Lactosa (g L ⁻¹)	Recuento de células (UFC/mL)	Etanol (g L ⁻¹)
0	ND*	41.07 ± 1.05	1.20 x10 ⁷ ± 1.2 x10 ⁶	ND*
24	38 ± 0.003	5.82 ± 0.49	3.21 x10 ⁸ ± 2.9 x10 ⁷	13.82 ± 3.713
48	51 ± 0.001	1.91 ± 0.02	1.69 x10 ⁹ ± 2.8 x10 ⁸	32.53 ± 5.128
72	118 ± 0.004	1.83 ± 0.08	1.93 x10 ⁹ ± 5.2 x10 ⁸	23.05 ± 2.171
96	202 ± 0.010	1.69 ± 0.04	1.71 x10 ⁹ ± 3.5 x10 ⁸	22.75 ± 0.747

*ND no detectado

La velocidad de formación de producto (rp) se calculó de acuerdo a la ecuación de Monod (1). Se obtuvieron concentraciones de etanol máximas de 32.53 g L⁻¹ a las 48 h (Tabla 1), con una productividad de 0.67 g L⁻¹h⁻¹.

La tasa de formación de producto se calculó de la siguiente manera:

$$rp = rgY(p/s) \quad (1)$$

donde rg es la tasa de crecimiento (g L⁻¹ h⁻¹), Y_{p/s} rendimiento del producto (Y_{p/s}, base lactosa)

IV. DISCUSIÓN

Respecto a los tiempos de generación obtenidos con los modelos de crecimiento sigmoideal Gompertz, Richards y Logístico, estos concuerdan con lo reportado para *K.marxianus* en medios nutritivos [23-25]. Adicionalmente a ello, los tiempos de generación (tg 1.75, 1.58 y 1.62 h) son superiores que el reportado por Mendoza [26] quienes obtuvieron un tg de 1.65 h en lactosuero desproteinizado. Se obtuvo una fase lag utilizando los modelos de crecimiento sigmoideal (Gompertz, Richards y Logístico) de 0.09, 0.19 y 0.10 h, respectivamente. Estos resultados son esperados ya que se utilizó un inóculo activo, lo que permite aplicar el modelo de Monod. Respecto a la velocidad de consumo de sustrato (-rs), se obtuvo un consumo del 96 % de lactosa en LA a las 96 h, lo que explica el contenido residual de lactosa de 1.69 g L⁻¹. Para este método diferencial, se consideró una reacción isotérmica en un reactor intermitente, de volumen constante, registrando la concentración en función del tiempo, observándose una reducción considerable del sustrato (86%) a los 24 h. La máxima producción de 2-FE en estas fermentaciones (LA) fue de 202 mg L⁻¹ (96 h), estos resultado son superiores a los reportado por Dragone [5]. La velocidad de formación de producto (rp) descrita por el modelo de Monod, describe la formación del producto asociado al crecimiento, con un crecimiento exponencial a lo largo de las fermentaciones de lactosuero ácido, acompañado de la formación de 2-FE. Este comportamiento ya ha sido reportado [14, 27,28], el cual se atribuye a la complejidad del sustrato empleado. Además de lo antes mencionado, otros nutrientes como el nitrógeno fácilmente asimilable (NFA), pudieron haber influido en la formación de 2-FE [20]. El contenido de NFA presente en el LA fue de 169.5 mg L⁻¹. Además del sustrato y la concentración de levaduras, se ha reportado que la producción de etanol puede influir en la formación de 2-FE. Respecto a la formación de etanol, éste estuvo presente a lo largo de las fermentaciones con una productividad de 0.67 g L⁻¹h⁻¹. Estos resultados, pueden deberse al efecto Crabtree conocido de la cepa de *K. marxianus* capaz de fermentar la lactosa. Tanto la productividad (0.67 g L⁻¹h⁻¹) como la concentración de etanol (32.53 g L⁻¹) se encuentra por

encima de la reportada por algunos autores en lactosuero desproteinizado y concentrado, en condiciones similares de lactosa [29,30].

V. CONCLUSIONES

K. marxianus fue capaz de producir 2-FE a partir de los desechos de la industria quesera, presentados como lactosuero ácido. Respecto a la concentración de 2-FE aún sigue siendo baja. Debido a ello, se recomienda realizar posteriores experimentos con el lactosuero adicionando fuentes de nitrógeno para incrementar la producción del metabolito. Este estudio podría representar un uso alternativo para este tipo de desecho y disminuir con ello su impacto ambiental.

RECONOCIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada (263643) y a la Productora de lácteos PROUNILAC por el apoyo al acceso de las muestras.

REFERENCIAS

- [1] Prudêncio, S., Müller, C., Fritzen-Freire, B., Castanho, R., Cunha, C. 2014. Effect of whey nanofiltration process combined with diafiltration on the rheological and physicochemical properties of ricotta cheese. *Food Research International*. 56, 92–99.
- [2] Spălățelu, C. 2012. Biotechnological valorisation of whey. *Innovative Romanian Food Biotechnology*. 10,1-8.
- [3] Graciano, F.G., Heinzle, E., Wittmann, C., Gombert, K.A. 2008. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Appl Microbiol Biotechnol*. 79,339–354.
- [4] Gupte, A.M., Nair, J.S. 2010. β -galactosidase production and ethanol fermentation from whey using *Kluyveromyces marxianus* NCIM 3551. *J Sci Ind Res*. 69, 855-859.
- [5] Dragone, G., Mussatto, I.S., Silva, A.J.B., Teixeira, A.J. 2011. Optimal fermentation conditions for maximizing the ethanol production by *Kluyveromyces fragilis* from cheese whey powder. *Biomass and Bioenergy*. 35,1977-1982.
- [6] Guimarães, M.R., Teixeira, A.J., Domingues, L. 2010. Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey. *Biotechnology Advances*. 28, 375-384.
- [7] Gannoun, H., Khelifi, E., Bouallagui, H., Touhami, Y., Hamdi, M. 2008. Ecological clarification of cheese whey prior to anaerobic digestion in upflow anaerobic filter. *Bioresource Technology*. 99,6105-6111.
- [8] Dragone, G., Mussatto, I.S., Oliveira, M.J., Teixeira, A.J. 2009. Characterisation of volatile compounds in an alcoholic beverage produced by whey fermentation. *Food Chemistry*. 112,929-935.
- [9] Prazeres, A.R., Carvalho, F., Rivas, J. 2013. Fenton-like application to pretreated cheese whey wastewater. *Journal of Environmental Management*. 129, 199-205.
- [10] Yadav, J.S.S, Bezawada, J., Ajila, C. M., Yan, S., Tyagi, R.D., Surampalli, R.V. 2014. Mixed culture of *Kluyveromyces marxianus* and *Candida krusei* for single-cell protein production and organic load removal from whey. *Bioresource Technology*. 164,119-127.
- [11] Smithers, G.W. 2008. Whey and whey proteins—from gutter to gold. *Int Dairy*. 18,695-704.
- [12] Zhou, X. H., Xu, L.J., Chi, Z., Liu, L.G., Chi, M.Z. 2013. β -Galactosidase over-production by *mig1* mutant of *Kluyveromyces marxianus* KM for efficient hydrolysis of lactose. *Biochemical Engineering Journal*. 76, 17-24.
- [13] Mihal M, Krištofiková L, Marcős J. 2013. Production of 2-phenylethanol in hybrid system using airlift reactor and immersed hollow fiber membrane module. *Chem Eng Process*. 72, 144-52.

- [14] Garavaglia, J., Hickmann, F.S., Mara, P.T., Carmo, P.M., Záchia, A.M. 2007. Bioconversion of L-phenylalanine into 2-phenylethanol by *Kluyveromyces marxianus* in grape must cultures. *World J Microbiol Biotechnol.* 23,1273–1279.
- [15] Lomascolo, A., Lesage, M.L., Haon, M., Navarro, D., Antona, C., Faulds, C., Marcel, A. 2001. Evaluation of the potential of *Aspergillus niger* species for the bioconversion of L-phenylalanine into 2-phenylethanol. *World Journal of Microbiology & Biotechnology.* 17, 99-102.
- [16] Etschmann, M.M.W., Bluemke, W., Sell, D., Schrader, J. 2002. Biotechnological production of 2-phenylethanol. *Appl Microbiol Biotechnol.* 59, 1-8.
- [17] Wittmann, C., Hans, M., Bluemke, W. 2002. Metabolic physiology of aroma-producing *Kluyveromyces marxianus*. *Yeast.* 19, 1351–1363.
- [18] Celińska, E., Kubiak, P., Bialas, W., Dziadas, M., Grajek, W. 2013. *Yarrowia lipolytica*: the novel and promising 2-phenylethanol producer. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 40,389-392.
- [19] Morrissey, J.P., Maria, M., Etschmann, W., Schrader, J., Billerbeck, G.M. 2015. Cell factory applications of the yeast *Kluyveromyces marxianus* for the biotechnological production of natural flavour and fragrance molecules. *Yeast.* 32,3-16. Äyräpää, T. 1965. The formation of phenethyl alcohol from ¹⁴C labelled phenylalanine. *Journal Institute of Brewing.* 71, 341–347.
- [20] Hortsch, R., Loser, C., Bley, T. 2008. A Two-stage CSTR Cascade for Studying the Effect of Inhibitory and Toxic Substances in Bioprocesses. *Eng. Life Sci.* 6,650-657.
- [21] Zwietering, M. H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M., Van't Riet. 1990. Modeling of the Bacterial Growth Curve. *Applied and Environmental Microbiology.* 6,1875-1881.
- [22] Aggelopoulos, T., Katsieris, K., Bekatorou, A., Pandey, A., Banat, M.I., Koutinas, A.A. 2014. Solid state fermentation of food waste mixtures for single cell protein, aroma volatiles and fat production. *Food Chem.* 145, 710-716.
- [23] Bouamra, M., Chavas, J.P., Cox, T.L., Requillart, V. 2002. Partial market liberalization and the efficiency of policy reform: The case of the European dairy sector. *American Journal of Agricultural Economics* 4,1003-1020.
- [24] Singh, D., Nigam, P., Banat, I.M., Marchant, R., McHale, A.P. 1998. Review: Ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentrations. Part II. Use of *Kluyveromyces marxianus* IMB3. *World J Microbiol Biotechnol.* 14, 823-34.
- [25] Mendoza, C.M.E., Rivas, N., Emperatriz, D.B., Delahaye, P., Bertsch, A. 2006. Obtención y Caracterización de dos concentrados proteicos a partir de biomasa de *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* cultivada en suero lácteo desproteínizado. *Revista Científica, FCV-LUZ.* 16, 315-324.
- [26] Etschmann, M.M.W., Schrader, J. 2006. An aqueous–organic two-phase bioprocess for efficient production of the natural aroma chemicals 2-phenylethanol. *Appl Microbiol Biotechnol.* 71, 440–443.
- [27] Stark, D., Münch, T., Sonnleitner, B., Marison, I.W., Stockar, von U. 2003. Extractive bioconversion of 2-phenylethanol from L-phenylalanine by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Prog.* 18,514-523.
- [28] Ghaly, A.E., Kamal, M. A. 2004. Submerged yeast fermentation of acid cheese whey for protein production and pollution potential reduction. *Water Research.* 38, 631-644.
- [29] Lee, H., Song, M., Yu, Y., Hwang, S. 2004. Production of *Ganoderma lucidum* mycelium using cheese whey as an alternative substrate: response surface analysis and biokinetics. *Biochem Eng.* 15,93-99.
- [30] Eun, K.M., Chang, K.S., 2007. Phenethyl alcohol (PEA) application slows fungal growth and maintains aroma in strawberry. *Postharvest Biol Tec.* 12, 234-39.