

Encapsulación mediante coacervación compleja y secado por aspersión de *Kluyveromyces marxianus* cultivada en medios basados en lactosuero para la obtención de un bioproducto con potencial probiótico

C. J. Montenegro¹, F.M. Zoppas², E. Burna², A.E. Ermilio³, M. N. Morelli³, R. J. Leonardi³

¹ Grupo de Ingeniería de Bioprocesos (GiiB), Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (FBCB), Universidad Nacional del Litoral (UNL), Santa Fe, Argentina
(caleb.j.montenegro@outlook.com)

² Laboratorio de Operaciones y Procesos Biotecnológicos (OPB), Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (FBCB), Universidad Nacional del Litoral (UNL), Santa Fe, Argentina.

³ Grupo de Ingeniería de Bioprocesos (GiiB), Laboratorio de Operaciones y Procesos Biotecnológicos (OPB), Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (FBCB), Universidad Nacional del Litoral (UNL), Santa Fe, Argentina.

La levadura *Kluyveromyces marxianus* cultivada en lactosuero representa un sistema con potencial de valorización funcional. Este trabajo evaluó su secado por aspersión mediante encapsulación proteico-polisacárida basada en WPC y pectina. La formulación con trehalosa y extracto de levadura mejoró la viabilidad post-secado respecto a las células libres, alcanzando una supervivencia del 23,83 % y preservando parcialmente la viabilidad celular y respaldando su potencial desarrollo como producto probiótico.

Palabras clave: *Kluyveromyces marxianus*; encapsulación; secado spray; lactosuero; probiótico.

INTRODUCCIÓN

La levadura *K. marxianus* destaca en la biotecnología industrial y alimentaria debido a su rápido crecimiento, termotolerancia y versatilidad metabólica para asimilar diversas fuentes de carbono (BILAL et al., 2022). Esta capacidad le permite desarrollarse con éxito en sustratos no convencionales como melazas, hidrolizados vegetales o lactosuero. Este último representa un medio compatible y de bajo costo que, además de permitir la valorización de un subproducto agroindustrial, contribuye a mitigar el impacto ambiental derivado de su alta carga orgánica y demanda biológica de oxígeno (DREŽEK et al., 2023; TESFAW et al., 2021).

Más allá de la aptitud industrial de *K. marxianus*, la levadura posee un reconocido potencial probiótico respaldado por ensayos que demuestran capacidades de autoagregación, formación de biopelículas, adhesión a células intestinales y resistencia a condiciones gastrointestinales simuladas de pH ácido y sales biliares (MACCAFERRI et al., 2012). Por ejemplo, la cepa *K. marxianus* B0399 exhibe efectos

inmunomoduladores *in vitro* como la reducción de citoquinas proinflamatorias, mientras que el análisis genómico de la cepa DMKU3-1042 revela genes específicos de respuesta a la desecación y tolerancia térmica (LERTWATTANASAKUL et al., 2015; MACCAFERRI et al., 2012). Estos atributos funcionales se complementan con antecedentes favorables de seguridad para la especie: *K. marxianus* se encuentra incluida en la lista QPS de EFSA para su evaluación en aplicaciones alimentarias y/o de alimentación animal, mientras que la FDA ha emitido una carta *no questions* para biomasa de *K. marxianus* inactivada por calor de una cepa específica (FDA, 2025; EFSA, 2026). Estos antecedentes respaldan el interés biotecnológico de la especie.

En el presente estudio se evaluó una cepa en particular, *K. marxianus* UP810, la cual ha sido investigada previamente por el GiiB por su potencial como levadura probiótica en el ámbito de la nutrición animal, posicionándose como un candidato de interés estratégico. En ensayos previos realizados sobre terneros *in vivo* se han identificado propiedades probióticas asociadas a una reducción sostenida del colesterol y modulación de proteínas plasmáticas. A

su vez, la cepa demostró una notable tolerancia a condiciones gastrointestinales simuladas, requisito indispensable para su supervivencia antes de colonizar el nicho intestinal, así como una significativa capacidad de co-agregación con patógenos, alcanzando un 63,79 % con *Escherichia coli* y un 50,68 % con *Salmonella Typhimurium*. Estos indicadores sugieren un potencial prometedor para la exclusión competitiva de patógenos en el tracto digestivo veterinario.

No obstante, la traslación de estas aptitudes biológicas desde el laboratorio hasta las raciones animales exige obtener un producto tecnológicamente viable. El secado por aspersión (spray drying) surge como la alternativa más eficiente y escalable para generar formulaciones en polvo, aunque el estrés térmico y osmótico del proceso compromete severamente la supervivencia celular, haciendo de la preservación de la viabilidad durante el secado y almacenamiento un desafío crítico que usualmente requiere el diseño de matrices poliméricas de encapsulación (OLIVEIRA et al., 2024).

En este ámbito, las revisiones globales sobre la protección de levaduras exponen limitaciones fisicoquímicas en los enfoques previos. Al analizar el uso de polímeros como el quitosano combinados con coberturas proteicas de suero, se reporta que los valores de pH ácido provocan la protonación del quitosano; esto no solo altera la dinámica de la matriz, sino que activa su acción antimicrobiana inherente, comprometiendo la viabilidad de las propias levaduras encapsuladas (OLIVEIRA et al., 2024). Adicionalmente, existe un vacío en el desarrollo de matrices diseñadas exclusivamente para el sector veterinario y, dado que la tolerancia al estrés térmico y al tránsito digestivo es estrictamente cepa-dependiente, resulta inviable generalizar los hallazgos de la literatura para nuevos aislamientos.

Como la tolerancia al estrés térmico y osmótico presenta una alta variabilidad fenotípica entre diferentes aislamientos, no siempre es posible extrapolar los resultados de la bibliografía a nuevos materiales biológicos. Por lo tanto, se vuelve fundamental evaluar el comportamiento específico de *K. marxianus* UP810 en nuevas matrices de protección, justificando este estudio para desarrollar un sistema compatible y fijar un precedente robusto para esta cepa.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de matrices basadas en coacervados y adyuvantes sobre la viabilidad possecado de *K. marxianus* UP810. Para ello, se realizaron cultivos en lactosuero, se cosechó la biomasa obtenida y se aplicaron estrategias

de encapsulación como protección celular frente al proceso de deshidratación. El estudio permitió identificar una condición preliminar favorable de formulación y secado, contribuyendo al aprovechamiento y valorización biotecnológica del lactosuero, y a la obtención de un producto estable con potencial función probiótica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismo y condiciones de activación

Se utilizó una cepa de *K. marxianus* UP810 licenciada por UNL-CONICET a la empresa UpBio S.A.S. Para su activación, se inoculó un medio de cultivo compuesto por 20 g/L de lactosa y 10 g/L de extracto de levadura. El escalado de biomasa se realizó de forma secuencial en Erlenmeyers, iniciando en un volumen de 100 mL hasta alcanzar los 500 mL. En todos los estadios de reactivación se mantuvo un volumen de llenado equivalente al 20 % de la capacidad total del recipiente, garantizando una adecuada transferencia de oxígeno mediante agitación orbital constante.

Producción de biomasa

Una vez verificada la fase de crecimiento exponencial de la levadura, se procedió a la preparación del cultivo en un sistema operado en modalidad batch. Para ello, se empleó una botella de vidrio borosilicato de 2 L cargada con agua destilada, equipada con un agitador magnético y un sistema de difusión de aire, la cual fue esterilizada en su conjunto mediante autoclave. Posteriormente, y bajo condiciones asépticas, se incorporó lactosuero en polvo comercial (Yeruvá S.A.), asumiendo una carga microbiana nativa despreciable frente al inóculo hasta alcanzar un volumen final de 1,8 L con una concentración de 62,5 g/L (6,25 % p/v), seleccionada para equiparar la carga de lactosa presente de forma natural en el lactosuero líquido. Finalmente, el sistema fue inoculado para iniciar el proceso fermentativo.

Tras 24 horas de fermentación, se determinó la concentración celular mediante recuento en cámara de Neubauer, fijando como criterio de aceptación una densidad superior a 1×10^8 células/mL. La biomasa total fue cosechada por centrifugación y el sedimento húmedo resultante (barro de levadura) fue pesado para su posterior acondicionamiento.

Preparación de la matriz base de encapsulación y acondicionamiento

La encapsulación de la biomasa de *K. marxianus* UP810 se realizó mediante coacervación compleja en un sistema ternario compuesto por concentrado de proteína de suero (WPC) y pectina como polímeros encapsulantes, e incluyendo lactosa como agente protector. Las concentraciones finales de los componentes en la matriz base, previo a la inducción, fueron de 1,0 % p/v de WPC, 0,25 % p/v de pectina, 2,5 % p/v de lactosa y una carga de biomasa celular equivalente al 12,5 % p/v, expresada como biomasa húmeda.

La transición de fase y formación de las cápsulas se indujo por el descenso controlado del pH hasta un valor crítico de 3,3, mediante la adición de ácido cítrico al 10 % p/v. Tras un periodo de maduración y equilibrio térmico a ~ 4 °C durante 12 horas, la fase inferior concentrada (coacervado que contiene las células encapsuladas) se separó por decantación del sobrenadante acuoso y se reservó como alimentación para el proceso de secado por aspersión.

Diseño experimental y preparación de tratamientos adyuvantes

Con el propósito de realizar un ensayo de *screening* tecnológico preliminar para evaluar el efecto de la encapsulación y de la incorporación secuencial de diferentes agentes de carga y termoprotectores sobre la viabilidad celular post-secado, se definieron seis condiciones experimentales. La levadura sin encapsular se utilizó como control de células libres frente al proceso de secado (sC), mientras que la levadura encapsulada únicamente en la matriz WPC-pectina-lactosa se consideró como control encapsulado (C). A partir de esta condición se incorporaron adyuvantes de manera secuencial.

Las condiciones evaluadas se definieron de la siguiente manera:

- sC: levadura sin encapsular, utilizada como control del efecto del secado por aspersión sobre células libres.
- C: levadura encapsulada en la matriz base WPC-pectina-lactosa, sin adición posterior de adyuvantes.
- C+M: matriz base complementada con maltodextrina como agente de carga.

- C+M+L: matriz base complementada con maltodextrina y leche en polvo descremada.
- C+M+L+T: matriz base complementada con maltodextrina, leche en polvo descremada y trehalosa como agente termoprotector y estabilizante frente a la deshidratación.
- C+M+L+T+E: matriz base complementada con maltodextrina, leche en polvo descremada, trehalosa y extracto de levadura como aditivo nutricional complementario.

Los componentes adyuvantes se prepararon individualmente en soluciones concentradas justo antes del proceso de secado, asegurando su correcta homogeneización y ajustando su pH a un rango de 3,3–3,5, equivalente al de la matriz de las cápsulas, para evitar la desestabilización del coacervado. Posteriormente, las soluciones de adyuvantes correspondientes a cada tratamiento se incorporaron y mezclaron suavemente con la suspensión de cápsulas en una relación estandarizada 1:1 (v/v), previo al secado por aspersión.

Secado por atomización (*spray drying*)

El secado de la fase concentrada se llevó a cabo en un secador por aspersión a escala de laboratorio (Yamato Spray Dryer ADL311S, Japón), facilitado por el Departamento de Tecnología de Alimentos de la Facultad de Ingeniería Química (FIQ-UNL, Santa Fe, Argentina). Las condiciones operativas del equipo se mantuvieron constantes bajo los siguientes parámetros de control:

- Temperatura de entrada del aire: 120 °C
- Temperatura de salida del aire: 60 °C
- Presión del aire de atomización: 0,15 – 0,20 MPa
- Flujo del soplador: 3 m³/min
- Caudal de alimentación: 2,5 mL/min

Caracterización del polvo obtenido

Las muestras en polvo deshidratadas fueron evaluadas en función de tres variables de respuesta:

- Humedad residual: determinada analíticamente mediante balance de masa gravimétrico por desecación.
- Rendimiento del proceso: calculado como la relación porcentual entre los sólidos secos recuperados y los sólidos totales alimentados al sistema.
- Viabilidad celular post-secado: cuantificada mediante recuento microbiológico utilizando la técnica de siembra por gota en superficie. Los resultados se expresaron en unidades formadoras de colonias por gramo de producto seco (UFC/g). La supervivencia pos-secado se calculó como el cociente entre las UFC recuperadas después del secado y las UFC presentes en la alimentación antes del secado, expresado como porcentaje

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Mecanismo propuesto de ensamblaje electrostático

A partir de las propiedades de carga de los componentes a pH 3,3, se propone un modelo conceptual de interacciones electrostáticas para explicar la formación de la matriz protectora (Figura 1). Teóricamente, el proceso se regiría bajo un mecanismo de coacervación compleja y ensamblaje electrostático capa sobre capa, viéndose favorecido por las características superficiales de los materiales bajo las condiciones operacionales del ensayo. A este valor de pH, la pared celular de *K. marxianus* exhibe una carga neta negativa debido a la ionización de los grupos funcionales (como fosfatos y carboxilos) de sus componentes de pared. Esta condición permitiría el establecimiento de interacciones electrostáticas directas con el WPC, dado que el pH de trabajo se encuentra por debajo del punto isoeléctrico promedio de las proteínas del suero (~4,5-5,2), el WPC adquiere una carga neta positiva, actuando tentativamente como una primera capa de recubrimiento acoplada a la superficie celular. Por su parte, la pectina (con carga neta negativa) se incorporaría en la periferia de este complejo al interactuar con los grupos positivos remanentes del WPC, generando una red de coacervado capaz de conferir rigidez estructural al sistema y atrapar moléculas neutras hidrofílicas como la lactosa.

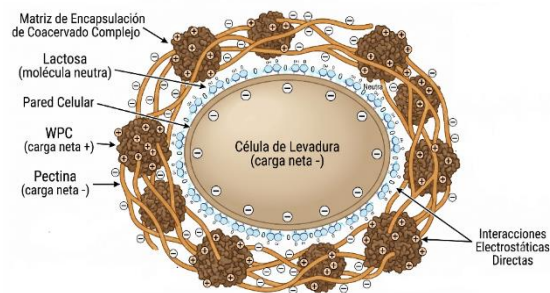


Figura 1. Esquema conceptual propuesto de las probables interacciones electrostáticas entre la levadura y los polímeros encapsulantes. Generada por IA.

Rendimiento del proceso y humedad residual

El rendimiento del proceso de secado por aspersión para las cápsulas de *K. marxianus* UP810 se ubicó en un promedio del 52,79 %. En este tipo de operaciones, balancear la recuperación de polvo sin comprometer la supervivencia de las células representa un desafío técnico complejo, debido a que los fenómenos de termoplasticidad de los azúcares, como la lactosa presente en la matriz, suelen generar pérdidas por adherencia en las paredes de la cámara.

Por su parte, los polvos obtenidos exhibieron una humedad residual de 6,87 %. La elección de 120 °C como temperatura de entrada se fundamentó en ensayos preliminares de screening, donde temperaturas inferiores resultaron en una deshidratación insuficiente y humedades residuales elevadas, mientras que temperaturas superiores afectaron drásticamente la viabilidad celular. Bajo la condición seleccionada de 120 °C, el sistema alcanzó un compromiso adecuado. Controlar este valor es fundamental debido a que una alta humedad residual compromete la estabilidad física del polvo durante el almacenamiento, asimismo, la composición y concentración de los aditivos utilizados como materiales de pared modifican la estructura de la matriz durante el proceso, influyendo directamente en la transferencia y retención de agua en las partículas finales (PUDŽIUVELYTĖ et al., 2025).

Efecto de la encapsulación y de los adyuvantes sobre la viabilidad post-secado

La evaluación de la supervivencia celular post-secado (Figura 2) reflejó marcadas tendencias de variación entre las distintas formulaciones analizadas. La levadura sin encapsular (sC) presentó una viabilidad residual de 0,17 %, lo que evidencia la elevada sensibilidad de las células libres frente a las

condiciones combinadas de estrés térmico y deshidratación propias del secado por aspersión.

La aplicación de la matriz base de coacervado (C) incrementó la viabilidad hasta 1,58 %, equivalente a una mejora relativa cercana a 9,3 veces respecto de sC. Este resultado sugiere que la matriz base (WPC-pectina-lactosa) funcionó como una barrera física inicial que atenuó parcialmente el daño por deshidratación celular. Esta protección se potenció de forma moderada pero progresiva mediante la adición secuencial de maltodextrina (C+M, 3,89 %) y leche en polvo descremada (C+M+L, 4,27 %). De acuerdo con Broeckx *et al.* (2016), la incorporación de estos adyuvantes combina proteínas y carbohidratos de alto peso molecular que mejoran las propiedades de transición vítrea de la corteza de la partícula durante la atomización; esto restringe la velocidad de transferencia de calor hacia el núcleo celular durante los primeros estadios del secado, lo cual podría contribuir al incremento gradual observado en la viabilidad residual.

El incremento más marcado en la supervivencia se observó con la incorporación de trehalosa en el sistema (C+M+L+T), alcanzando una viabilidad de 14,9 %. Mecanísticamente, la eficacia de la trehalosa radica en su capacidad para formar puentes de hidrógeno directos con las cabezas polares de los fosfolípidos en ausencia de agua, previniendo la transición de fase de cristal líquido a gel, un fenómeno crítico de letalidad celular por colapso de membrana. Este fenómeno de estabilización de membranas por azúcares ha sido reportado ampliamente en bacterias lácticas (GAGNETEN *et al.*, 2024) y otros microorganismos expuestos a deshidratación, no obstante, en este diseño secuencial, dicho efecto protector se potencia al montarse sobre la barrera física y el control de la transición vítrea previamente aportados por la maltodextrina y la leche en polvo descremada.

Finalmente, el tratamiento completo C+M+L+T+E alcanzó la mayor supervivencia registrada, con una viabilidad post-secado de 23,83 %. El notable incremento en el tratamiento C+M+L+T+E es compatible con un efecto protector acumulativo de la matriz completa enriquecida. En esta formulación final, las propiedades estructurales y termoprotectoras de los adyuvantes previos se complementarían con la incorporación de extracto de levadura, el cual aportaría compuestos nitrogenados, vitaminas y otros factores nutricionales de rápida disponibilidad capaces de favorecer la reparación de células dañadas subletalmente durante la etapa de rehidratación. En conjunto, los resultados demuestran que la viabilidad alcanzada responde a una estrategia de optimización

incremental, donde la máxima protección depende de la complementariedad e integración de todos los componentes de la matriz.

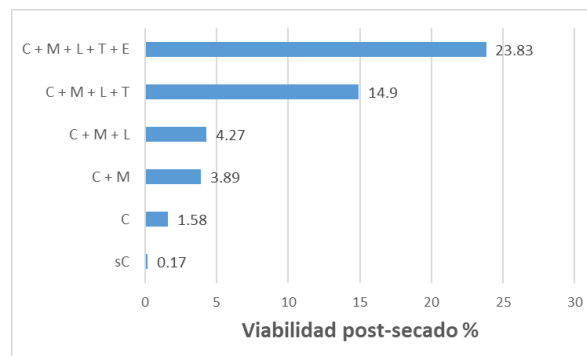


Figura 2. Porcentaje de viabilidad para los diferentes tratamientos post-secado. C: levadura encapsulada; M: maltodextrina; L: leche en polvo; T: trehalosa; E: extracto de levadura; sC: levadura sin encapsular.

CONCLUSIONES

De las experiencias de cultivo en sistema aireado de laboratorio se concluye que el lactosuero resulta un sustrato adecuado y de bajo costo para obtener biomasa de *K. marxianus* UP810.

Respecto del diseño “capa sobre capa” implementado con concentrado de proteína de suero y pectina, los resultados indican que el sistema funcionó adecuadamente a nivel físico, contribuyendo a estabilizar la suspensión y a favorecer la recuperación de polvo en el secador, alcanzando un rendimiento del 52,79 %.

Durante la etapa de puesta a punto del proceso de secado por aspersión, se observó que una temperatura de entrada de 120 °C permitió alcanzar un compromiso adecuado entre la eficiencia de evaporación y la preservación de la viabilidad celular. A partir de los ensayos preliminares de screening, se constató que temperaturas inferiores dificultaron la remoción eficiente de agua, mientras que temperaturas superiores incrementaron el daño térmico sobre las células de levadura.

La humedad residual obtenida, de 6,87 %, indica que las condiciones seleccionadas permitieron una deshidratación efectiva del material. Estos resultados sugieren que la estabilidad del proceso no depende únicamente de la temperatura del aire de entrada, sino también de la velocidad de remoción de agua desde las partículas durante el secado, ya que la exposición prolongada a un ambiente de alta humedad y

temperatura puede comprometer la supervivencia celular.

La supervivencia post-secado obtenida para el tratamiento C+M+L+T+E, de 23,83 %, refuerza la importancia de una estrategia de protección combinada. La matriz externa de encapsulación actuaría como una primera barrera física frente al estrés térmico y de deshidratación, mientras que la incorporación de trehalosa y extracto de levadura podría contribuir a la estabilización de estructuras celulares y a la recuperación de células subletalmente dañadas durante la rehidratación. En conjunto, estos resultados sugieren que la mayor viabilidad alcanzada no depende de un único mecanismo de protección, sino de la integración entre la matriz encapsulante y los adyuvantes incorporados.

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (FBCB), al Departamento de Tecnología de Alimentos de la Facultad de Ingeniería Química (FIQ) y a la Universidad Nacional del Litoral (UNL), por el apoyo institucional brindado.

REFERENCIAS

- BILAL, M.; JI, X.; XU, Z.; XU, D.; LIN, H.; IQBAL, H. M. N.; CHENG, H. Bioprospecting *Kluyveromyces marxianus* as a robust host for industrial biotechnology. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, [S.L.], v. 10, art. 851768, 2022. Frontiers Media SA. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.851768>.
- BROECKX, Géraldine; VANDENHEUVEL, Dieter; CLAES, Ingmar J. J.; LEBEER, Sarah; KIEKENS, Filip. Drying techniques of probiotic bacteria as an important step towards the development of novel pharmabiotics. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 505, n. 1-2, p. 303-318, 2016. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.04.002>.
- DREŹEK, K.; SOBCZYK, M. K.; KALLAI, Z.; DETMAN, A.; BARDADYN, P.; MIERZEJEWSKA, J. Valorisation of Whey Permeate in Sequential Bioprocesses towards Value-Added Products—Optimisation of Biphasic and Classical Batch Cultures of *Kluyveromyces marxianus*. *International Journal of Molecular Sciences*, [S.L.], v. 24, n. 8, p. 7560, abr. 2023. MDPI AG. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/ijms24087560>.
- EFSA PANEL ON BIOLOGICAL HAZARDS (BIOHAZ); ALLENDE, A.; ALVAREZ-ORDÓÑEZ, A.; BORTOLAIA, V.; BOVER-CID, S.; DE CESARE, A.; DOHMEN, W.; GUILLIER, L.; JACXSENS, L.; NAUTA, M.; MUGHINI-GRAS, L.; OTTOSON, J.; PEIXE, L.; PEREZ-RODRIGUEZ, F.; SKANDAMIS, P.; SUFFREDINI, E.; CHEMALY, M.; COCCONCELLI, P. S.; FERNÁNDEZ ESCÁMEZ, P. S.; MARADONA, M. P.; HERMAN, L. Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feeds as notified to EFSA. *EFSA Journal*, [S.L.], v. 24, n. 1, art. e9823, jan. 2026. Wiley. Disponible en: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2026.e9823>.
- GAGNETEN, M.; PASSOT, S.; CENARD, S. *et al.* Mechanistic study of the differences in lactic acid bacteria resistance to freeze- or spray-drying and storage. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 108, p. 361, 2024. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00253-024-13186-3>.
- LERTWATTANASAKUL, N.; KOSAKA, T.; HOSOYAMA, A.; SUZUKI, Y.; RODRUSAMEE, N.; MATSUTANI, M.; MURATA, M.; FUJIMOTO, N.; SUPRAYOGI; TUCHIKANE, K.; LIMTONG, S.; FUJITA, N.; YAMADA, M. Genetic basis of the highly efficient yeast *Kluyveromyces marxianus*: complete genome sequence and transcriptome analyses. *Biotechnology for Biofuels*, [S.L.], v. 8, art. 47, mar. 2015. BioMed Central. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0227-x>.
- MACCAFERRI, S.; KLINDER, A.; BRIGIDI, P.; CAVINA, P.; COSTABILE, A. Potential probiotic *Kluyveromyces marxianus* B0399 modulates the immune response in Caco-2 cells and peripheral blood mononuclear cells and impacts the human gut microbiota in an in vitro colonic model system. *Applied and Environmental Microbiology*, [S.L.], v. 78, n. 4, p. 956–964, fev. 2012. American Society for Microbiology. Disponible en: <https://doi.org/10.1128/AEM.06385-11>.
- OLIVEIRA, W. d. C.; BRITO, L. P. d.; SOUZA, E. A. G. d.; LOPES, I. L.; OLIVEIRA, C. A. d.; CALAÇA, P. R. d. A.; OLIVEIRA, M. B. P. P.; COSTA, E. D. The Yeast-Based Probiotic Encapsulation Scenario: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Applied Sciences*, [S.L.], v. 14, n. 13, p. 5461, jun. 2024. MDPI AG. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/app14135461>.
- PUDŽIUVELYTĖ, L.; PETRAUSKAITĖ, E.; STABRAUSKIENĖ, J.; BERNATONIENĖ, J. Spray-Drying Microencapsulation of Natural Bioactives: Advances in Sustainable Wall Materials. *Pharmaceutics*, Basel, v. 18, n. 7, p. 963, 2025. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/ph18070963>.
- TESFAW, A.; ONER, E. T.; ASSEFA, F. Evaluating crude whey for bioethanol production using *Kluyveromyces marxianus*. *SN Applied Sciences*, [S.L.], v. 3, n. 1, art. 42, jan. 2021. Springer Science and Business Media LLC. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s42452-020-03996-1>.
- U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). GRAS Notice No. 1248: Heat-killed *Kluyveromyces marxianus* yeast biomass—No questions letter. Silver Spring, MD: Center for Food Safety and Applied Nutrition, 2025. Disponible en: <https://www.fda.gov/food/generally-recognized-safe-gras/gras-notice-inventory>.