

Utilização do soro de leite não suplementado para a produção de β -galactosidase e proteína microbiana de *Kluyveromyces lactis*

Gabriela F. Alvarenga^{*1}, Bianca M. P. e Silveira¹, Bruna G. S. Souza¹, Julia S. Pinheiro¹, Tiago J. Guedes², Nísia A.V. D. Pinto³, Janaína T. de Faria⁴, Fábio C. Sampaio⁵

Resumo

O soro de leite, um coproduto da indústria de laticínios, foi avaliado como meio alternativo para a produção de biomassa celular de *Kluyveromyces lactis*. Após cultivo da levedura em batelada a 35°C e 150 rpm, por 23 h, em soro de leite *in natura* (SL) e soro de leite duas vezes concentrado (SLC), foram determinados a velocidade específica de crescimento (μ), a produtividade volumétrica de biomassa (Q_x), o rendimento de biomassa por substrato consumido ($Y_{x/s}$), a atividade de β -galactosidase (β -gal) a partir das células permeabilizadas e a composição proteica da biomassa íntegra. Os valores de μ , Q_x e $Y_{x/s}$ variaram de 0,33 a 0,58 h⁻¹, 0,36 a 0,47 g L⁻¹h⁻¹ e 0,16 a 0,23 g g⁻¹, respectivamente. Enquanto maior valor de μ foi obtido com cultivo em SL, maiores valores de Q_x e $Y_{x/s}$ foram obtidos para o cultivo em SLC. A atividade específica de β -gal variou de 12.212,0 a 27.363,5 U g⁻¹, sendo o maior valor obtido com SL. A biomassa íntegra de *K. lactis* apresentou um teor de proteína igual a 5,73% (m/m), um valor aproximadamente 9 vezes maior que a composição proteica do SL utilizado. Estes resultados confirmaram as possibilidades de utilização do SL como meio de cultivo alternativo e das células de *K. lactis* cultivadas nesse meio como fonte de β -galactosidase, com possível utilização da biomassa remanescente do processo de recuperação da enzima como *single cell protein*.

Palavras-chave: Biomassa íntegra. Composição centesimal. *Single Cell Protein*.

Use of unsupplemented whey for the production of β -galactosidase and microbial protein of *Kluyveromyces lactis*

Abstract

Whey, a by-product from the dairy industry, was evaluated as an alternative growth medium for the production of cellular biomass of *Kluyveromyces lactis*. After the yeast growth in batch culture at 35°C and 150 rpm for 23 h in raw whey (RW) and double concentrated whey (DCW), growth velocity (μ), volumetric productivity ($Y_{x/s}$), β -galactosidase (β -gal) activity from the permeabilized cells, and protein composition of the whole biomass were evaluated. The results of μ , Q_x and $Y_{x/s}$ varied from 0.33 to 0.58 h⁻¹, 0.36 to 0.47 g L⁻¹ h⁻¹ and 0.16 to 0.23 g g⁻¹, respectively. While the highest value of μ was obtained for

¹Discentes, Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, UFVJM, Diamantina, Brasil

^{*}Autora para correspondência: gabrielafalvarenga@gmail.com

²Técnico, Instituto Ciências e Tecnologia de Alimentos, UFVJM, Diamantina, Brasil

³Docente, Departamento de Nutrição, UFVJM, Diamantina, Brasil

⁴Docente, Instituto de Ciências Agrárias, UFMG, Montes Claros, Brasil

⁵Docente, Departamento de Microbiologia, UFV, Viçosa, Brasil

Recebido para publicação em 15 de novembro de 2017

Aceito para publicação em 15 de dezembro de 2017

culture on RW, the highest values of Q_x and $Y_{x/s}$ were obtained for culture on DCW. The specific activity of β -gal varied from 12,212.0 to 27,363.5 U g⁻¹, with the highest value obtained for culture on RW. The whole *K. lactis* biomass showed a protein content of 5.73% (w/w), approximately 9-fold higher than the protein composition of the RW used. These results confirm the possibilities of using RW as an alternative culture medium and *K. lactis* cells cultured in that medium as a source of β -galactosidase, with a possible utilization of biomass from of the enzyme recovery process as single cell protein.

Keywords: Whole biomass. Centesimal composition. Single Cell Protein.

Introdução

De acordo com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, o Brasil ocupa o sexto lugar no *ranking* mundial de produção de leite (USDA, 2016), tendo produzido 33,6 bilhões de litros de leite no ano de 2016, segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2017). Grande parte desse leite é utilizada para produção de diferentes produtos lácteos e estima-se que as indústrias desse setor produzam aproximadamente 4 bilhões de litros de soro de leite como coproduto (CARVALHO e CARNEIRO, 2016).

O soro de leite (SL) é formado durante a coagulação da caseína do leite e contém 55% dos nutrientes do leite, podendo ser utilizado para a produção de outros compostos de alto valor agregado (SISO, 1996; GUIMARÃES *et al.*, 2010). O SL consiste principalmente de água e aproximadamente (m/v) 4,5-5,0% de lactose, 0,6-0,8% de proteínas solúveis, 0,4-0,5% de lipídios, dentre outros componentes (SISO, 1996; GHALY; KAMAL, 2004).

A lactose do SL é responsável pelas altas demanda de oxigênio biológico (DOB = 30-50 g L⁻¹) e demanda química de oxigênio (DQO = 60-80g L⁻¹) desse coproduto (GUIMARÃES *et al.*, 2010). Assim, sua utilização como fonte de carbono em diferentes bioprocessos pode reduzir significativamente os problemas ambientais relacionados com parte desse coproduto que ainda é descartado.

A levedura *Kluyveromyces lactis* é um dos micro-organismos capazes de utilizar a lactose residual presente no SL como fonte de carbono e energia, uma vez que possui as enzimas lactose permease e β -galactosidase, necessárias para o metabolismo da lactose (RUBIO-TEIXEIRA, 2006). A partir das células de *K. lactis* cultivadas em SL pode-se extrair e purificar a β -galactosidase, uma enzima de interesse industrial que, além de poder ser utilizada na produção de leite

sem lactose (leite hidrolisado), é estudada para processos de conversão de lactose em diferentes produtos de interesse comercial, como por exemplo os prebióticos galacto-oligossacarídeos (RICHARDS, 1997). Além disso, a própria biomassa celular de *K. lactis*, como *single cell protein*, pode ser utilizada como alternativa para fontes proteicas convencionais (RAVINDRA, 2000).

Por possuir o *status* de GRAS (*Generally Recognized as Safe*) segundo o FDA (*Food and Drug Administration*), é possível a utilização dessa levedura e de seus produtos em alimentos para consumo humano (VAN OUYEN *et al.*, 2006). Além disso, a *K. lactis* apresenta o fenótipo Crabtree negativo, ou seja, o metabolismo da lactose é predominantemente oxidativo, favorecendo a formação de biomassa (DE DEKEN, 1966; GONZÁLEZ-SISO *et al.*, 2000).

Assim, no presente trabalho o SL foi avaliado como meio alternativo para a produção de biomassa de *K. lactis*. Além do cultivo em SL *in natura*, foi avaliado o cultivo utilizando o SL concentrado para selecionar a melhor condição para maiores produtividade e rendimento de biomassa e, conseqüentemente, de proteína unicelular (*single cell protein*), além de maior atividade de β -galactosidase a partir das células permeabilizadas.

Material e métodos

Micro-organismo e manutenção

A levedura *Kluyveromyces lactis* (CBS 2359), mantida em YPG-Glicerol (2,0 g L⁻¹ de extrato de levedura, 4,0 g L⁻¹ de peptona, 4,0 g L⁻¹ de glicose e 300 g L⁻¹ de glicerol) a -80°C, foi inicialmente repicada em ágar YPD (10 g L⁻¹ de extrato de levedura, 20 g L⁻¹ de peptona, 20 g L⁻¹ de dextrose e 20 g L⁻¹ de ágar) utilizando a técnica *spread plate*. As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 48-72 h e, posteriormente, armazenadas a 2-4°C em geladeira. A etapa de repicagem foi repetida

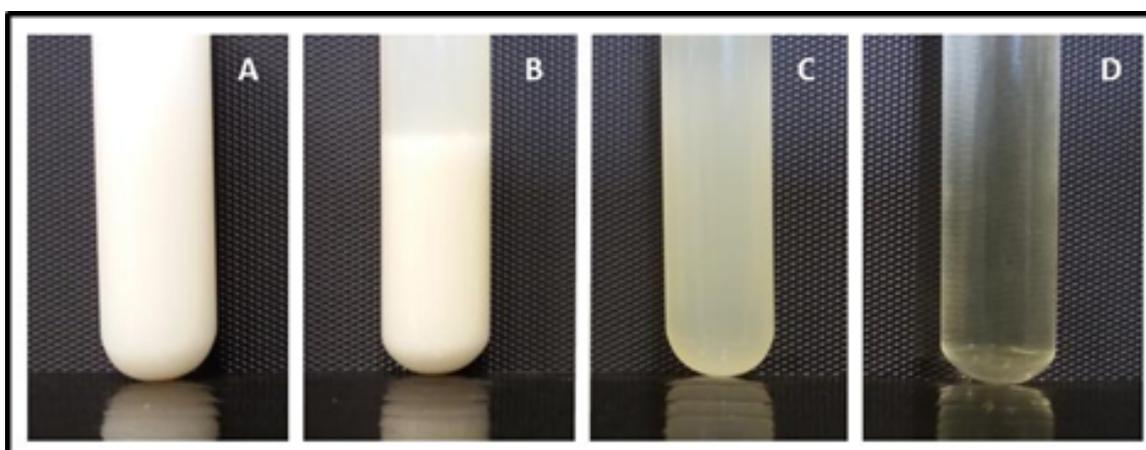
quinzenalmente para manutenção das células e quando necessária para as etapas experimentais.

Preparo do soro de leite

Para a obtenção do soro, o pH de 400 mL de leite desnatado UHT (Figura 1A), a 15-18°C e sob agitação, foi modificado para aproximadamente 4,7 utilizando uma solução de HCl (33% v/v). O leite foi, então, (i) deixado em repouso por 30 minutos à temperatura ambiente, (ii) aquecido em forno micro-ondas

até temperatura de fervura e (iii) novamente deixado em repouso por 30 minutos em caixa térmica (Figura 1B). Após esse procedimento, todo volume foi centrifugado a 2.500 rpm por 5 minutos. O soro de leite (sobrenadante) foi coletado e autoclavado a 121°C por 15-20 minutos (Figura 1C) e centrifugado assepticamente a 2.000 rpm por 5 min para separação do precipitado (Figura 1D). Quando necessário e antes da esterilização, o SL foi concentrado (SLC) duas vezes em rotavapor à temperatura de 70-90°C.

Figura 1 – Preparo do soro de leite: A - Leite UHT desnatado a 15-18°C, B - Precipitado após acidificação (pH 4,7) e aquecimento do leite, C - Soro de leite após esterilização e D - Soro de leite após esterilização e centrifugação estéril



Fonte: Elaborada pelos autores, 2017.

Preparo do inóculo e padronização do inóculo

Uma alçada de células novas (48-72 h de incubação) de *K. lactis* cultivadas em ágar YPD foi inoculada em frascos Erlenmeyers de 125 mL contendo 20 mL de SL. O frasco foi incubado em agitador rotacional a 150 rpm e 35°C por 14-18 h. Após esse período o SL foi centrifugado assepticamente a 2.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi então lavado duas vezes, assepticamente, com água estéril e ressuscitado em 6 mL de água estéril.

A densidade óptica (DO) da suspensão de células foi aferida a 600 nm (DO_{600nm}) em espectrofotômetro. A partir desse valor de absorvância e usando essa suspensão, foi padronizado um inóculo inicial correspondente à DO_{600nm} igual a 0,06-0,30 para os próximos experimentos, ou seja, 0,036-0,18 g L⁻¹ de biomassa seca de *K. lactis* (1 DO_{600nm} = 0,60 g L⁻¹ de biomassa seca).

Produção de biomassa de *K. lactis*

Erlenmeyers de 125 mL contendo 25 mL de soro de leite (*in natura* e concentrado) foram inoculados com células de *K. lactis* e incubados a 35°C por 24 h. Amostras de 1 mL foram retiradas em diferentes intervalos de tempo para determinação da DO_{600nm} , sendo os soros não inoculados utilizados como branco. As células acumuladas após 23 h de cultivo foram separadas por centrifugação (200 rpm, 5 min) e utilizadas para determinação da atividade de β -galactosidase. Estes experimentos foram executados em quadruplicata.

Determinação dos parâmetros cinéticos

A velocidade específica de crescimento (μ) foi determinada graficamente como a inclinação da curva na fase de crescimento exponencial (fase log) em um gráfico de $\ln(DO)_{600nm}$ versus tempo de cultivo segundo a Equação 1:

$$\ln X = \ln X_0 + \mu t \quad (1)$$

onde t é o tempo (h) e X e X_0 são as concentrações de biomassa (g L^{-1}) no tempo t e no tempo inicial, respectivamente.

A produtividade volumétrica de biomassa (Q_x) foi determinada segundo a Equação 2:

$$Q_x = \frac{X_f - X_i}{t_f - t_i} \quad (2)$$

onde X_f é a concentração final de biomassa (g L^{-1}) após 23 h de cultivo, X_i é a concentração inicial de biomassa (inóculo inicial, em g L^{-1}), t_f é o tempo final (h) e t_i é o tempo inicial (h).

O rendimento de biomassa ($Y_{x/s}$) foi determinado segundo a Equação 3:

$$Y_{x/s} = \frac{X_f - X_i}{S_i - S_f} \quad (3)$$

onde S_f e S_i correspondem às concentrações finais e iniciais de lactose no SL (g L^{-1}), respectivamente.

A concentração de lactose inicial foi de $50,0 \text{ g L}^{-1}$ para o SL e o consumo considerado total após 23 h de cultivo, segundo resultados prévios (não apresentados).

Os valores apresentados nos resultados correspondem à média e desvio padrão dos resultados dos cultivos em quadruplicata.

Atividade de β -galactosidase

A atividade de β -galactosidase para as

células de *K. lactis* após 23 h de cultivo (triplicata) foi determinada de acordo com a metodologia de Gietz *et al.* (1977), com modificações. Os *pellets* de 1 mL das amostras coletadas foram ressuspensos em 1,0 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,2) contendo 0,1 mM de MgSO_4 . Foi utilizado apenas clorofórmio como agente permeabilizante e 8 minutos para a reação realizada à temperatura ambiente. O *pellet* residual após o término da reação foi removido por centrifugação (2.000 rpm, 2 min) e a absorvância a 420 nm foi aferida em espectrofotômetro. Uma unidade de β -gal (U) foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 μmol de *o*-nitrofenol (*o*-NP) por minuto. A concentração de *o*-NP liberada foi determinada utilizando o coeficiente de extinção molar de $4,53 \text{ L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para esse composto. A atividade específica de β -gal foi calculada dividindo a quantidade de unidade de enzima (U) pela quantidade de biomassa (em grama) em 500 μL .

Composição centesimal da biomassa íntegra

A composição centesimal do soro de leite e a composição proteica da biomassa microbiana íntegra (sem rompimento celular) foram determinadas segundo as metodologias descritas pelo Laboratório Nacional Agropecuário - LANAGRO/RS (BRASIL, 2003). Para determinação do teor de proteína foi utilizado fator de conversão da relação nitrogênio/proteína igual a 6,38, enquanto a acidez foi determinada em ácido láctico. A composição do SL é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1 – Composição centesimal do soro de leite utilizado como meio de cultivo

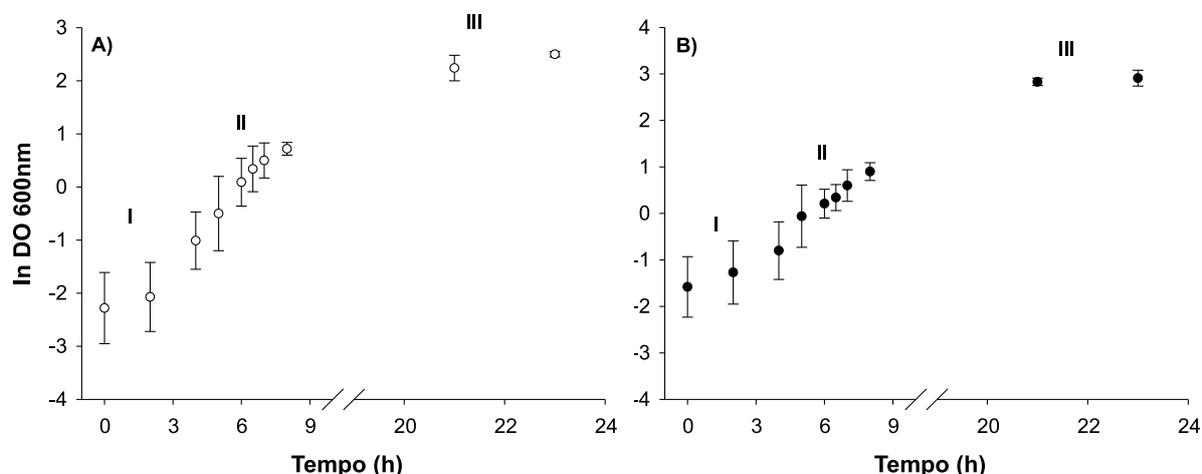
Componentes	Soro de Leite
Proteína (% m/m)	0,65 \pm 0,00
Cinzas (% m/m)	0,87 \pm 0,00
Extrato Seco (% m/m)	6,98 \pm 0,00
Acidez (% m/m)	0,28 \pm 0,00
pH	4,82 \pm 0,04

Fonte: Elaborado pelos autores, 2017.

Resultados e Discussão

Para o cultivo da levedura *Kluyveromyces lactis* em soro de leite *in natura* (SL) e concentrado (SLC), as curvas de crescimento correspondentes são apresentadas na Figura 2. Nelas foram detectadas as três fases características do

crescimento dos micro-organismos (*lag*, exponencial e estacionária), sendo que na fase estacionária do crescimento (III) observou-se o maior valor de absorvância, ou seja, o maior acúmulo de biomassa seca (aproximadamente $8,0 \text{ g L}^{-1}$ para SL e $11,3 \text{ g L}^{-1}$ para SLC).

Gráfico 1 – Curva de crescimento para o cultivo de *K. lactis* em soro de leite *in natura* (SL) e concentrado (SLC): I - Fase de crescimento lag, II - exponencial e III - estacionária

Fonte: Elaborado pelos autores, 2017.

Como pode ser observado na Tabela 2, o maior valor para velocidade específica de crescimento ($\mu = 0,58 \pm 0,08 \text{ h}^{-1}$) foi observada para o SL. A concentração do SL, com aumento dos macros e micronutrientes, possivelmente determinou o menor valor de μ nas condições

experimentais avaliadas. Por outro lado, a concentração do SL beneficiou o acúmulo de biomassa de *K. lactis*, sendo obtidos os maiores valores de produtividade volumétrica e de rendimento ($Q_x = 0,47 \pm 0,06 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, $Y_{x/s} = 0,23 \pm 0,19 \text{ g g}^{-1}$, respectivamente) (Tabela 2).

Tabela 2 – Parâmetros cinéticos para o cultivo de *K. lactis* em soro de leite

Meio de cultivo	μ (h^{-1})	Q_x ($\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	$Y_{x/s}$ (g g^{-1})
SL	$0,58 \pm 0,08$	$0,34 \pm 0,0$	$0,16 \pm 0,01$
SLC	$0,32 \pm 0,09$	$0,47 \pm 0,13$	$0,23 \pm 0,06$

Legenda: SL = Soro de leite, SLC = Soro de leite concentrado, μ = velocidade específica de crescimento, Q_x = produtividade volumétrica de biomassa e $Y_{x/s}$ = rendimento de biomassa

Fonte: Elaborado pelos autores, 2017.

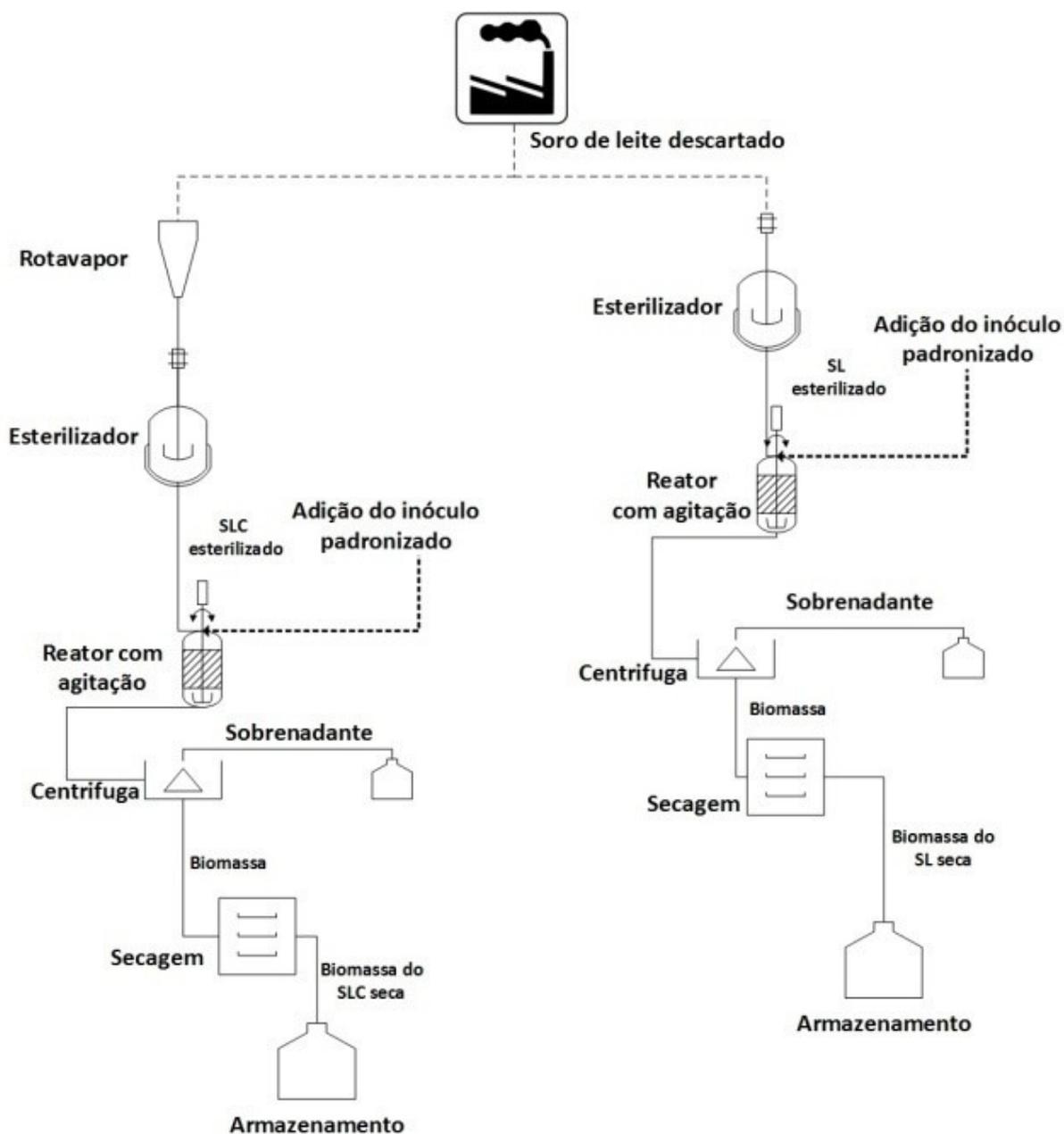
Os resultados obtidos no presente estudo foram semelhantes aos apresentados em alguns estudos com espécies do gênero *Kluyveromyces*. Moeini *et al.* (2004) observaram acúmulo de biomassa variando entre $11,09$ e $11,79 \text{ g L}^{-1}$ em SL para *K. lactis*. Hun *et al.* (2013), em meio sintético com $60,0 \text{ g L}^{-1}$ lactose e outras suplementações, observaram acúmulo de $6,32 \text{ g L}^{-1}$ de biomassa para *K. lactis*. Para o cultivo de *Kluyveromyces marxianus*, Yadav *et al.* (2014) observaram acúmulo de $6,0 \text{ g L}^{-1}$ e produtividade de $0,16 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ utilizando SL e inóculo inicial de $2,0 \text{ g L}^{-1}$. Entretanto, Sampaio *et al.* (2016), para *K. lactis* em SL, observaram um valor de produtividade ($1,78 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) superior ao do presente estudo, provavelmente devido às condições de cultivo por eles utilizadas.

Para as células de *K. lactis* acumuladas após 23 h de cultivo foi determinada a atividade de β -galactosidase (β -gal) após permeabilização com clorofórmio (dados não apresentados). A permeabilização de células cultivadas em SL permitiu a liberação de $1,68 \mu\text{mol } \sigma\text{-NP min}^{-1}$ na mistura de reação como resultado da atividade de β -gal, o que corresponde a 1,68 Unidade (U) da enzima. Para um grama de biomassa seca de *K. lactis* foram detectadas $27.363,5 \text{ U}$ de β -gal, ou seja, uma atividade específica igual a $27.363,5 \text{ U g}^{-1}$. Já para o SLC esses valores foram menores ($0,74 \text{ U}$ e $12.212,0 \text{ U g}^{-1}$), demonstrando menor potencial das células cultivadas sob esta condição para extração da enzima β -gal.

Para a possível utilização da biomassa de *K. lactis* para a produção de *single cell protein*, foi determinada a composição proteica da biomassa íntegra (CPBI) acumulada após 23 h de cultivo (dados não apresentados). A CPBI de *K. lactis* cultivada em SL (5,73%, m/m) foi aproximadamente 9 vezes maior que a composição proteica do SL utilizado, apresentada na Tabela 1 (0,65%, m/m). Assim, a utilização do SL permitiu a obtenção de um produto com maior valor proteico e pode-se concluir que a produção de biomassa pode agregar valor à utilização desse coproduto.

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho é sugerido o diagrama esquemático geral para a produção de biomassa de *K. lactis* a partir de SL (Figura 2). Nele são apresentadas diferentes etapas do processo: (i) obtenção do SL a partir da indústria, (ii) concentração do SL, (iii) produção de biomassa de *K. lactis* em sistema em batelada, (iv) separação da biomassa do SL (com possibilidade de extração da enzima β -gal), (v) secagem da biomassa e, por fim, (vi) armazenamento da biomassa.

Figura 2 – Diagrama esquemático geral de um possível processo para produção de biomassa microbiana e enzima β -gal utilizando SL e *K. lactis*



Fonte: Elaborada pelos autores, 2017.

Conclusão

O soro de leite mostrou-se uma boa alternativa para produção de biomassa de *Kluyveromyces lactis*. A biomassa íntegra de *K. lactis* apresentou teor de proteína maior que o encontrado no soro de leite desproteinizado, associado também a uma alta atividade de β -galactosidase. Estes resultados estimulam novos estudos para, concomitantemente, utilizar a biomassa para extração da enzima β -galactosidase e a biomassa remanescente como *single cell protein*. Posteriormente será necessário definir

a composição de aminoácidos das proteínas, de ácidos graxos dos lipídios e de minerais, bem como realizar os testes biológicos necessários para avaliar o aproveitamento nutricional das proteínas da biomassa de *K. lactis*.

Agradecimentos

Ao Departamento de Farmácia (Laboratório de Bioprocessos) e ao Departamento de Nutrição (Laboratório de Café e Biomassa do Cerrado), ambos da FCBS/UFVJM, pela disponibilidade dos ambientes e equipamentos para o desenvolvimento deste trabalho.

Referências

- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Laboratório Nacional Agropecuário - LANAGRO/RS**. Brasília: Ministério da Agricultura, 2013. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/laboratorios/metodos/arquivos-metodos-da-area-poa-iaq/met-poa-11-02-proteinas.pdf>>. Acesso em: 04 jun. 2017.
- CARVALHO, G. R.; CARNEIRO, A. V. Indicadores: Leite E Derivados. Juiz de Fora: **Embrapa Gado de Leite**, v. 7, n. 55, jun. 2016.
- CHIOU, P. W. S. *et al.* Value of *Aspergillus niger* fermentation product as a dietary ingredient for broiler chickens. **Animal Feed Science and Technology**, v. 91, p. 171-182, 2001.
- DE DEKEN, R. H. The Crabtree effect: A regulatory system in yeast. **Journal of Genetics Microbiology**, v. 44, p. 149-156, 1966.
- GHALY, A. E.; KAMAL, M. A. Submerged yeast fermentation of acid cheese whey for protein production and pollution potential reduction. **Water Resource**, v. 38, p. 631-644, 2004.
- GONZÁLEZ-SISO, M. I. *et al.* Respiro fermentative metabolism in *Kluyveromyces lactis*: insights and perspectives. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 26, p. 699-705, 2000.
- GUIMARÃES, P. M. R. *et al.* Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 375-384, 2010
- HUN, C. H. *et al.* Bioprocess development for high biomass production of the probiotic yeast *Kluyveromyces lactis*. **IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences**, v. 59, p. 49-59, 2013.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. **Produção da pecuária municipal (PPM) – Resultados**. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html?&t=resultados>>. Acesso em: 22 out. 2017.
- MOEINI, H.; NAHVI, I.; TAVASSOLI, M. Improvement of SCP production and BOD removal of whey with mixed yeast culture. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 7, p. 252-258, 2004.
- RAVINDRA, P. Value-added food: Single cell protein. **Biotechnology Advances**, v. 18, n. 6, p. 459-479, 2000.
- RICHARDS, N. S. P. S. Emprego racional do soro láctico. **Indústria de Laticínios**, mai/jun, p. 67-69, 1997.
- RUBIO-TEXEIRA, M. Endless versatility in the biotechnological applications of *Kluyveromyces LAC* genes. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 212-225, 2006.
- SAMPAIO, F. C. *et al.* Batch production of *Kluyveromyces lactis* cells from deproteinized whey: Response Surface Methodology versus Artificial Neural Network\Genetic Algorithm approach. **Biochemical Engineering Journal**, v. 109, p. 305-311, 2016.
- SISO, M. I. G. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. **Bioresource Technology**, v. 57, p. 1-11, 1996.
- UNITED STATES DEPARTMENT AGRICULTURE – USDA. **World Agricultural Projections**. Disponível em: <<https://www.fas.usda.gov/regions/brazil>>. Acesso em: 10 maio 2017.
- VAN OUYEN, A. J. *et al.* Heterologous protein production in the yeast *Kluyveromyces lactis*. **FEMS Yeast Res**, v. 6, p. 381-392, 2006.
- YADAV, J. S. *et al.* Simultaneous single-cell protein production and COD removal with characterization of residual protein and intermediate metabolites during whey fermentation by *K. marxianus*. **Bioprocess Biosystems Engineering**, v. 37, p. 1017-1029, 2014.