

## DETERMINACION DEL CRECIMIENTO DE *Saccharomyces cerevisiae* EN EXTRACTOS FORMULADOS CON DESECHOS AGROINDUSTRIALES II.

(Determination of the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in extracts formulated with agroindustrial waste II.)

R. Ochoa & E. Valenzuela

Instituto de Microbiología. Facultad de Ciencias.  
Universidad Austral de Chile. Casilla 167. Valdivia. Chile.

Palabras clave: *Saccharomyces cerevisiae*, proteína unicelular, desechos agroindustriales.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*, single-cell protein, agroindustrial wastes products.

### RESUMEN

Con miras a la producción de proteínas unicelulares (SCP), poblaciones de  $1.2 \times 10^5$  ufc/100ml de *Saccharomyces cerevisiae* se cultivaron en extractos obtenidos de los desechos agroindustriales, *Lactuca sativa* - *Brassica oleracea* (lechuga - repollo), aserrín de *Pinus radiata*, papel de diario de desecho y melaza, solos y suplementados con glucosa o  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . Como sustrato control se utilizó caldo malta al 2% (CAM). Se inocularon los extractos con la cepa y se mantuvieron en agitación constante a 150 rpm, 23°C por 24 h.

Terminado el periodo de incubación se determinó: el rendimiento de SCP, mediante análisis colorimétricos de los cultivos, leyendo la  $A^\circ$  a 560 nm y por recuento viable en AEM al 2%. Por el método de Biuret se estimó la concentración de proteínas, tanto las fracciones líquidas y las retenidas en filtros millipore de 0.2µm, por último el peso fresco (PF) y el peso seco (PS), se obtuvo pesando los filtros en los cuales quedaron retenidas las poblaciones de levaduras.

La mayor población de levaduras ( $5.6 \times 10^7$  ufc/ml con una  $A^\circ$  de 1.222), se obtuvo luego de cultivar la cepa en el extracto de vegetales (lechuga-repollo). En el extracto vegetal adicionado de glucosa se obtuvo la más alta concentración de proteínas (588.57 mg/ml), en la fracción retenida en los filtros. Los extractos de vegetales adicionado de glucosa y  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  respectivamente. Los mayores PF de 1.2885 g/100 ml y PS 0.2484 g/100 ml, se registraron en los cultivos de extractos de vegetales adicionado de glucosa y  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  respectivamente.

### INTRODUCCION

La presente investigación corresponde a la continuación del estudio sobre crecimiento poblacional de

### SUMMARY

With the purpose of producing single cell protein (SCP)  $1.2 \times 10^5$  ufc/100ml populations of *Saccharomyces cerevisiae* were cultivated in extracts collected from agroindustrial waste matters such as *Lactuca sativa* - *Brassica oleracea* (lettuce - cabbage), *Pinus radiata* sawdust, waste newspaper and molasses, in pure form and with the addition of glucose or  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . Extracts were inoculated with the strain and they were constantly agitated at 150 RPM, 23°C for 24 h. Malt extract (EM 2%) was used as a substrate control.

After the incubation period, the growth of SCP was determined by means of the colorimetric analysis of cultures, by reading the  $A^\circ$  at 560 nm and by 2% viable recount in AEM. By using the Biuret method, the protein concentration was estimated, both the liquid fractions and those retained in 0.2µm Millipore filters; finally fresh (PF) and dry weights (PS) were obtained by weighing those filters wherein populations of yeasts were retained.

The greatest population of yeasts ( $5.6 \times 10^7$  ufc/ml and  $A^\circ$  1.222) was obtained after cultivating the strain with vegetal extract (lettuce-cabbage). The vegetal extract added with glucose revealed the highest concentrations of protein (588.57 mg/ml) in the fraction retained in the filter. The highest 1.2885 g/ml PF and 0.2484g/100 ml PS were found in cultures of vegetal extract added with glucose and  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  respectively.

*Saccharomyces cerevisiae* en sustratos alternativos (Ochoa, 1997), formulados en base a los extractos vegetales obtenidos de desechos agroindustriales *Lactuca sativa* - *Brassica oleracea* (lechuga-repollo), aserrín de *Pinus radiata*, papel de diario de desecho y melaza, solos y suplementados con glucosa o  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , con miras a su utilización para la obtención de proteína unicelular (SCP). Las

SCP, podrían ser utilizadas para el mejoramiento de piensos o pellets destinados a la alimentación animal y al mismo tiempo permitiría darle un uso rentable a los desechos antes citados, que cada vez van en aumento contaminando el medio ambiente.

## MATERIALES Y METODOS

Se usó una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* de origen australiano (empresa Burn Hilps), que se masificó sembrándola por estrías en placas Petri con AEM al 2 %. Las placas se incubaron por 48 horas a 25 °C.

Los extractos de vegetales (lechuga-repollo), aserrín, papel de diario de desecho y melaza, empleados para el cultivo de *S. cerevisiae*, se prepararon de acuerdo a lo señalado por Ochoa (1997).

Para la elaboración de las curvas de crecimiento y determinación poblacional de la levadura, se utilizaron dos métodos de uso frecuente y complementarios:

**a) Análisis de crecimiento poblacional por cambios de turbidez del cultivo.** Un set de matraces conteniendo cada uno de ellos 100 ml del extracto a ensayar, se sembraron individualmente con una población de levaduras inicial de  $1.2 \times 10^5$  ufc/100ml (tiempo cero). A continuación los matraces permanecieron en agitación constante a 150 rpm, 23 °C por 24 h, en un agitador Orbil. Para realizar las mediciones de  $A^\circ$ , cada hora a partir de los cultivos se extrajeron en forma estéril alicuotas de 8 ml que se depositaron en forma independiente en tubos estériles y se leyeron en un espectrofotómetro a 560 nm versus el blanco caldo malta estéril (CM al 2%).

**b) Análisis de crecimiento poblacional por recuento viable.** Cada hora se extrajeron 0.2 ml de los cultivos indicados en «a» y se depositaron independientemente en tubos con 2 ml de  $MgSO_4$  0.01 M. A partir de cada tubo se realizaron diluciones seriadas, de estas se tomaron en forma independiente 0.1 ml y se sembraron por triplicado en placas Petri que contenían AEM al 2 %, luego se incubaron a 25 °C por 48 h. Posteriormente se realizó el recuento de las colonias y los títulos obtenidos se expresaron como ufc/ml.

El sustrato control (CM al 2%) con la levadura, fue sometido a los mismos procedimientos antes señalados y bajo las mismas condiciones.

La determinación colorimétrica de proteínas, como medida del crecimiento poblacional de *S. cerevisiae* se realizó por el método de Biuret. Previamente se realizaron dos análisis: una curva de calibración, usando como proteína patrón albúmina de bovino (10 mg/ml) y la determinación de proteínas en los extractos a ensayar, para lo cual de cada uno de ellos en forma independiente se filtraron 100 ml a través de filtros millipore de 0.2  $\mu$ m, obteniéndose dos

fracciones, una retenida en los filtros (FR) que fue resuspendida en 4 ml de  $MgSO_4$  y la otra fracción líquida (F).

Para determinar cuantitativamente las proteínas en los extractos sembrados con la cepa, partidas por triplicado de 100 ml de cada extracto (contenidos en matraces) se inocularon con una población inicial de  $1 \times 10^4$  células de levaduras y se dejaron en agitación constante a 150 rpm, 23 °C por 24 h, en un agitador Orbil. Al tiempo cero y final del ensayo, el contenido de los matraces se filtró de la forma antes señalada, obteniéndose las fracciones FR y F a las cuales se les determinaron la concentración de proteínas. Se depositó por separado en tubos de spectronic, 1 ml de la fracción respectiva, luego se adicionaron 4 ml de reactivo de Biuret, se dejó estabilizar el color durante 30 min y se leyó la  $A^\circ$  a una longitud de onda de 540 nm contra el blanco. Para obtener la concentración de proteínas de cada muestra (mg/ml), se utilizó la siguiente relación:

$$\text{Absorbancia} = \text{Factor de calibración} \times \text{concentración} \\ (\text{Factor de calibración} = 0.056)$$

Para la determinación del Peso fresco (PF) y seco (PS) de la población de levaduras cultivadas en los distintos extractos, se procedió como se señala a continuación: matraces conteniendo 100 ml del extracto respectivo, se inocularon con una población inicial de  $1 \times 10^4$  células de levaduras y en paralelo se cultivaron idénticos volúmenes de los extractos sin inocular. Los matraces se dejaron en agitación constante a 150 rpm, 23 °C por 24 h en un agitador Orbil. Al cabo de este tiempo, el contenido de cada matraz en forma independiente se filtró, con filtros de membrana Millipore de 0.2  $\mu$ m (de peso conocido). Los filtros se pesaron obteniéndose el peso fresco (PF) de las poblaciones, tras restarle el peso del filtro utilizado y del usado para el extracto sin inocular. Para determinar el peso seco (PS), los mismos filtros se dejaron en una estufa a 80 °C, hasta alcanzar un peso constante. Luego se determinó el PS, restando el peso del filtro y del usado para el extracto sin inocular, secados en idénticas condiciones.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Las curvas de crecimiento de *S. cerevisiae* en el sustrato control CM al 2 %, y en los extractos donde se registraron el mejor y peor crecimiento, extracto de vegetales y de papel respectivamente. Las curvas se elaboraron en base a la  $A^\circ$  leída a una longitud de onda de 560 nm y el recuento poblacional expresado en su logaritmo versus tiempo (Figuras. 1,2,3).

Al tiempo cero la  $A^\circ$  fue de 0.004 en CM al 2%. La fase de latencia abarca las 6 primeras horas y a continua-

ción la fase de crecimiento exponencial que se prolonga hasta las 24 h donde se cuantificó el máximo desarrollo poblacional  $6.3 \times 10^7$  ufc/ml con una  $A^\circ$  de 1.222; deduciéndose además que la fase estacionaria comienza después de las 24 h. La curva de crecimiento de *S. cerevisiae* elaborada a partir de los recuentos viables, tras su cultivo en CM al 2% (Fig. 1), es semejante a la obtenida por Cook (1968), quien en experimentos similares, luego de cultivar una cepa de *S. cerevisiae* por 24 h, estableció un título de  $1.7 \times 10^7$  ufc/ml. Además, las distintas fases de la curva de crecimiento (latencia, crecimiento exponencial y estacionaria), obtenida en el presente ensayo son semejante en cuanto a duración y recuento de células viables a las presentadas por este autor.

La Figura 2, expone la curva de crecimiento de *S. cerevisiae* en extracto de vegetales. Se aprecia que *S. cerevisiae* durante las 6 primeras horas se encuentra en su fase de latencia, seguida de la fase de crecimiento exponencial que dura hasta las 24 h, donde se registraron  $5.6 \times 10^7$  ufc/ml y una  $A^\circ$  de 1.222. A continuación sigue la fase estacionaria.

En la curva de crecimiento de *S. cerevisiae* en extracto de papel (Fig.3), se detectó un pobre crecimiento poblacional, al tiempo cero la  $A^\circ$  fue de 0.004 y se registraron  $1.2 \times 10^5$  ufc/ml; además se deduce que las 8 primeras horas corresponden a la fase de latencia y entre las 10 y 12 horas la fase de crecimiento exponencial, prosiguiendo con la fase estacionaria hasta las 24 h, donde no se registraron grandes variaciones con un título de  $8.7 \times 10^5$  ufc/ml y una  $A^\circ$  de 0.046.

En trabajos similares, Win *et al.* (1996) cultivaron una cepa de *S. cerevisiae* por 24 h en los sustratos alternativos, jarabe de glucosa provenientes de yuca y melaza de caña de azúcar, estableciendo una población levaduriforme de  $4.8 \times 10^7$  y  $2.1 \times 10^8$  ufc/ml respectivamente. Los resultados de estos autores, reflejan que se pueden obtener altas poblaciones de levaduras, cuando se cultivan en sustratos elaborados a base de desechos agrocelulósicos, con miras a obtener proteínas unicelulares. Lamentablemente en la literatura consultada no se encontraron trabajos donde se utilizaran medios de cultivos elaborados en base a papel, no obstante, Scaminathan *et al.* (1989), han señalado que desechos de fábricas de papel y pulpa se han usado como sustratos en la producción de proteínas unicelulares.

La Tabla 1, presenta los resultados de la determinación colorimétrica de proteínas de las fracciones retenidas en filtros (FR) y líquida (F). Luego de cultivar la cepa de *S. cerevisiae* en los diferentes extractos agroindustriales ensayados.

En la Tabla 1, se observa que la concentración de proteínas de la fracción FR del sustrato control a las 24 h post inoculación con la cepa de *S. cerevisiae* fue de 389.29

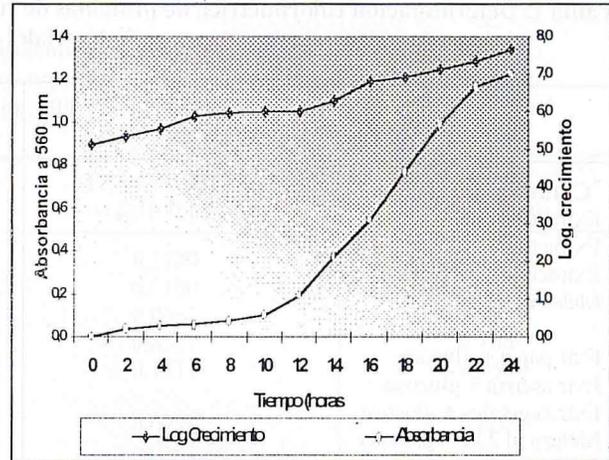


Fig. 1.- Crecimiento poblacional de *S. cerevisiae* en CM al 2% por cambio de turbidez y recuento viable

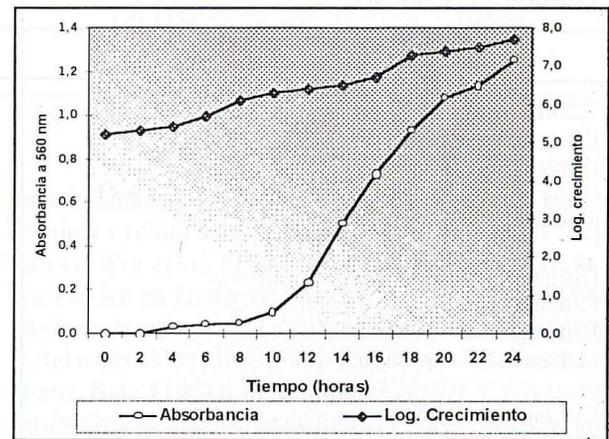


Fig. 2.- Crecimiento poblacional de *S. cerevisiae* en extracto de vegetales por cambio de turbidez y recuento viable

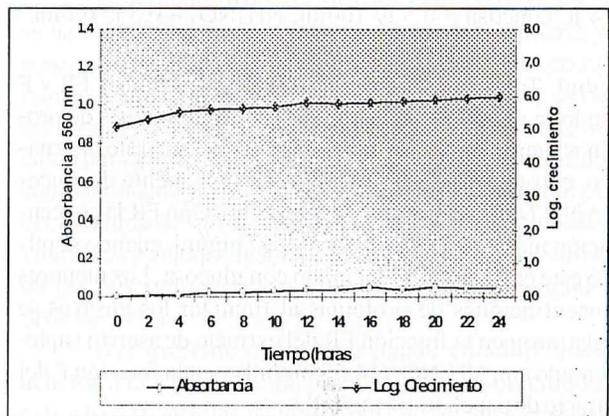


Fig.3.- Crecimiento poblacional de *S. cerevisiae* en extracto de papel por cambio de turbidez y recuento viable

**Tabla 1. Determinación colorimétrica de proteínas de cultivos de *Saccharomyces cerevisiae* en extractos elaborados a base de desechos agroindustriales con y sin adición de glucosa y  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ .**

FRACCION RETENIDA EN FILTROS (FR)	Proteínas (mg/ml) al $T_0$	Proteínas (mg/ml) al $T_{24}$
<b>*Caldo malta al 2 %</b>	<b>0.46</b>	<b>389.29</b>
Extracto de papel	3.80	17.00
Extracto de aserrín	5.72	15.43
Extracto de vegetales	18.58	515.00
Melaza al 2 %	0.89	150.00
Extr.papel + glucosa	5.49	17.86
Extr.aserrín + glucosa	8.54	18.71
Extr.vegetales + glucosa	17.72	588.57
Melaza al 2 % + glucosa	0.63	158.57
Extr.papel + $\text{NH}_4\text{NO}_3$	4.57	15.43
Extr.aserrín + $\text{NH}_4\text{NO}_3$	6.00	14.57
Extr.vegetales + $\text{NH}_4\text{NO}_3$	17.86	499.29
Melaza al 2 % + $\text{NH}_4\text{NO}_3$	1.05	152.14
<b>FRACCION LIQUIDA (F)</b>		
<b>*Caldo malta al 2 %</b>	<b>1.40</b>	<b>1.54</b>
Extracto de papel	0.07	0.07
Extracto de aserrín	1.58	1.07
Extracto de vegetales	6.10	4.09
Melaza al 2 %	2.09	1.73
Extr.papel + glucosa	0.27	0.32
Extr.aserrín + glucosa	1.85	1.36
Extr.vegetales + glucosa	7.26	3.96
Melaza al 2 % + glucosa	2.34	1.64
Extr.papel + $\text{NH}_4\text{NO}_3$	0.08	0.13
Extr.aserrín + $\text{NH}_4\text{NO}_3$	1.74	1.13
Extr.vegetales + $\text{NH}_4\text{NO}_3$	6.41	4.29
Melaza al 2 % + $\text{NH}_4\text{NO}_3$	2.45	1.6

\*Caldo malta al 2 % = sustrato control.  $T_0$ = tiempo cero de los ensayos.  $T_{24}$ = tiempo final de los ensayos, 24 h. Glucosa = 0.5 g/ 100ml.  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  = 0.5 g/100ml.

mg/ml. También se observa que en las fracciones FR y F donde se registraron las mayores concentraciones de proteínas fueron en las obtenidas a partir del sustrato alternativo, extracto de vegetales con y sin suplemento de glucosa ó  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , determinándose en la fracción FR la concentración más alta de proteínas 588.57 mg/ml, cuando se utilizó este extracto suplementado con glucosa. Las menores concentraciones de proteínas al finalizar los ensayos se registraron en la fracción FR del extracto de aserrín suplementado con  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (14.57 mg/ml) y en la fracción F del extracto de papel, (0.07 mg/ml).

En lo que respecta al contenido de proteínas para las levaduras, Reed (1983), señala que su porcentaje varía entre 47 a 56 %, mientras para *S. cerevisiae* (Litchfield

, 1983) fue de un 53 %.

En experimentos semejantes destinados a la obtención de SCP, Gharsallah (1993) al cultivar *Candida krusei*, *Saccharomyces chevalieri* y *Zygosaccharomyces rouxii* sobre aguas residuales de plantas aceituneras, determinó que *Z. rouxii* produjo las más altas concentración de proteínas, 3.35 g/l. Patel (1995), utilizó para el cultivo de *S. cerevisiae* y *Candida utilis*, licor de *Medicago sativa* (alfalfa) modificado químicamente, registrando para esta última especie un incremento de un 10.59 % en el contenido de proteínas. Gomez & Castillo (1983), han determinado que al cultivar *Candida pseudotropicalis* en suero de queso al 2 % desproteínizado y suplementado con extracto de levadura y  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , el contenido de proteínas fue de 2.3 g/l. Azzam (1992), utilizando bagazo de caña de azúcar

**Tabla 2. Determinación de peso fresco y seco de poblaciones de *Saccharomyces cerevisiae*, tras ser cultivadas en extractos elaborados a base de desechos agroindustriales con y sin adición de glucosa y  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ .**

SUSTRATOS	PESO FRESCO (g/100 ml)	PESO SECO (g/100 ml)
*Caldo malta al 2 %	0.3729	0.1072
Extracto de papel	0.0180	0.0046
Extracto de aserrín	0.0662	0.0012
Extracto de vegetales	0.8527	0.1849
Melaza al 2 %	0.1411	0.0519
Extr.de papel + glucosa	0.0236	0.0028
Extr.de aserrín + glucosa	0.6207	0.0051
Extr.de vegetales + glucosa	1.2885	0.2428
Melaza al 2 % + glucosa	0.0558	0.0473
Extr.de papel + $\text{NH}_4\text{NO}_3$	0.0276	0.0006
Extr.de aserrín + $\text{NH}_4\text{NO}_3$	0.2432	0.0037
Extr.de vegetales + $\text{NH}_4\text{NO}_3$	1.0480	0.2484
Melaza al 2 % + $\text{NH}_4\text{NO}_3$	0.1136	0.0532

\* = sustrato control. Glucosa = 0.5 g/100ml.  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  = 0.5 g/100ml.

tratado con un cultivo mixto de *C. utilis* y *Trichoderma viride*, obtuvo 35.5 % de proteína cruda. Por último, Rale (1984), tras cultivar *Hansenula sydowiorum* en efluentes de fábricas conserveras de piñas, suplementados con 0.3 % de amonio, estableció una concentración de 21.9 g/l de proteínas para esta levadura. Como se deduce de lo expuesto y de acuerdo a lo que señalan Saddler (1993) y Monroy & Viniegra (1981), es posible obtener un incremento en las poblaciones de levaduras y por ende en el rendimiento de SCP en medios de cultivos no convencionales suplementados, ya sea con una fuente de nitrógeno como el amonio o algún azúcar simple, en este último caso, esta actúa como iniciadora del crecimiento, tras lo cual se degradan las moléculas más complejas como el almidón, pectina, hemicelulosa y celulosa.

En la Tabla 2, se observa que los mayores PF de las poblaciones de *S.cerevisiae* se obtuvieron luego de cultivarla en el extracto de vegetales solo (0.8527 g/100 ml) y adicionado de glucosa (1.2885 g/100 ml) o  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (1.0480 g/100 ml), y el menor PF se registró luego de cultivarla en extracto de papel (0.0180 g/100 ml), en comparación con el PF de cultivos obtenidos en el sustrato control (0.3729 g/100 ml).

Los mayores PS se registraron en las poblaciones de levaduras obtenidas luego de cultivarlas solo en el extracto de vegetales (0.1849 g/100 ml) y adicionado de glucosa (0.2428 g/100 ml) o  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (0.2484 g/100 ml) y el menor PS mediante el cultivo de *S.cerevisiae* en extracto de papel suplementado con  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (0.006 g/100 ml), en comparación con el PS de cultivos obtenidos en el sustrato control (0.1072 g/100 ml).

En trabajos similares, Gharsallah (1993) determinó que la biomasa de *Z. rouxii* fue de 0.45 g/g de glucosa, cuando se cultivó en aguas residuales de plantas aceiteras. Win *et al.* (1996), tras cultivar una cepa de *S. cerevisiae* en jarabe de glucosa provenientes de yuca y melaza de caña de azúcar, establecieron una producción celular de 0.23 y 0.18 g/g de azúcar respectivamente, por su parte Rale (1984), al estudiar *C.utilis* y *Hansenula sydowiorum* en efluente de fábricas conserveras de piñas estableció una biomasa celular de 45 g/l para *H. sydowiorum*. Por último Sandhu & Waraich (1983), determinaron que *Wingea robertsii* cultivada en suero de queso produjo una biomasa celular de 2.54 mg/h.

Utilizando diversos sustratos no convencionales se ha tratado de mejorar la productividad en biomasa y el contenido de proteínas de algunas levaduras. Los componentes hemicelulósicos presentes en los residuos agrícolas hacen de estos materiales una atractiva fuente de azúcares para la producción de SCP con el fin de ser usadas como fuente de suplemento proteico para el ganado, pues el contenido de fibra es despreciable, el alto contenido en vitaminas y ácidos nucleicos hacen que pueda ser utilizado por los rumiantes sin ningún problema (Singhal & Sharma, 1993).

Del presente estudio se puede concluir que de acuerdo a la concentración proteica, PF y PS obtenidos, el extracto de vegetales resultó ser el con mejores perspectivas para el crecimiento de *S. cerevisiae*, con miras a la producción de SCP. Por el contrario, el sustrato que presentó una menor calidad nutritiva para la levadura fue el extracto de papel.

### AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer a la DID. proyecto S-98-28 Universidad Austral de Chile, por el apoyo económico conce-

dido para esta investigación y a la T.M. Sra. Oriole Alonso por su ayuda en la elaboración del summary.

### REFERENCIAS

- Azzam, A.** (1992). Pretreatments of agrocellulosic waste for microbial biomass production with a defined mixed culture. *Journal of Environmental Science and Health. Part-A. Environmental Science and Engineering* 27:1643-1654
- Cook, A.** (1968). *The Chemistry and Biology of Yeast*. Academic Press Inc. Publishers. New York. pp. 251-317
- Gharsallah, N.** (1993). Production of single cell protein from olive mill wastewater by yeast. *Environmental Technology* 14:391-395
- Gomez, A. & Castillo, F.** (1983). Production of Biomass and B-D-Galactosidase by *Candida pseudotropicalis* grown in continuous culture on whey. *Biotechnology and Bioengineering* 25:1341-1357
- Litchfield, J.** (1983). Single-cell protein. *Science* 219: 740-746
- Monroy, O & Viniegra, G.** (1981). *Bioteología para el aprovechamiento de los desperdicios orgánicos*. A.G.T Editor S.A. México.
- Ochoa, R.** (1997). *Saccharomyces cerevisiae* como modelo para la producción de proteínas unicelulares utilizando como sustratos desechos agroindustriales. Tesis de Licenciatura. Escuela de Ciencias, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile.
- Patel, G.** (1995). Utilization of chemically modified liquor of *Medicago sativa* (alfalfa) for yeast SCP production. *Indian Journal of Agricultural Research* 29:139-144
- Rale, V.** (1984). SCP from pineapple cannery effluents. *Applied Microbiology and Biotechnology* 19:106-109
- Reed, G.** (1983). Microbial biomass, single cell protein and other microbial products. In: Prescott and Dunn's *Industrial Microbiology*, AVI Publ. Co. N.Y. USA. pp.541
- Saddler, J.** (1993). Bioconversion of forest and agricultural plant residues. C.A.B International, U.K.
- Sandhu, D. & Waraich, K.** (1983). Conversion of cheese whey to Single-Cell Protein. *Biotechnology and Bioengineering* 25:797-808
- Singhal, K. & Sharma, D.** (1993). Single Cell Protein for animal production. *Agricultural- Reviews- Karnal.* 14:93-101
- Seaminathan, S.; Joshi, S. & Parhad, N.** (1989). Bioconversion to single cell protein: A potential resource recovery from paper mill solid waste. *J. Ferment. Bioeng.* 67:427-429
- Win, S.; Impoolsup, A. & Noomhorm, A.** (1996). Growth kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* in batch and fed-batch cultivation using sugarcane molasses and glucose syrup from cassava starch. *Journal of Industrial Microbiology.* 16:117-123