

ISSN 2178-3659



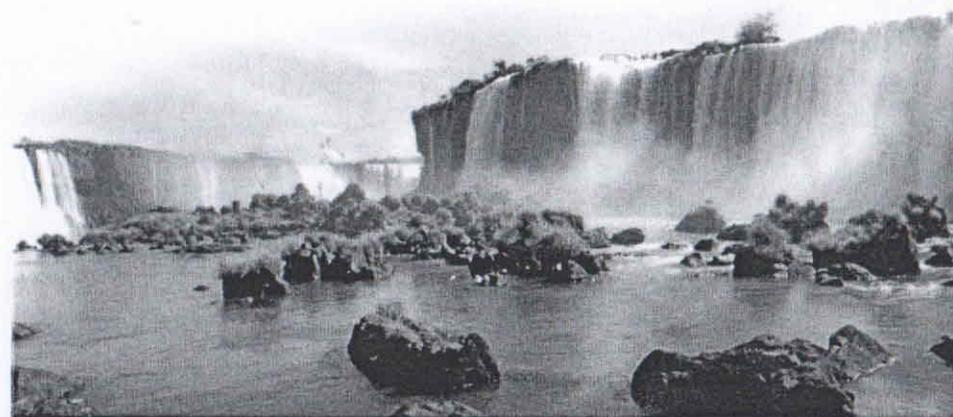
REALIZAÇÃO



APOIO



PATROCÍNIO



Departamento de Engenharia Química - UEM  
Faculdade de Engenharia Química - UNICAMP  
Associação Brasileira de Engenharia Química - ABEQ



## QUANTIFICAÇÃO INDIRETA DO CRESCIMENTO DE *Aspergillus niger* EM MEIO CONTENDO SÓLIDOS VISANDO À PRODUÇÃO DE CELULASES

A. L. G. BACCHIN<sup>1,2</sup>, F. M. da CUNHA<sup>1,2</sup>, T. C. ZANGIROLAMI<sup>1</sup> e C. S. FARINAS<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Engenharia Química  
e-mail: [laura\\_bacchin@hotmail.com](mailto:laura_bacchin@hotmail.com); [teresacz@power.ufscar.br](mailto:teresacz@power.ufscar.br); [cunha\\_fm@yahoo.com.br](mailto:cunha_fm@yahoo.com.br)

<sup>2</sup>EMBRAPA Instrumentação Agropecuária – São Carlos  
e-mail: [cristiane@cnpdia.embrapa.br](mailto:cristiane@cnpdia.embrapa.br)

**RESUMO** – A rota enzimática é uma alternativa promissora para a conversão de bagaço de cana-de-açúcar em etanol, porém requer a redução no custo das enzimas celulolíticas. O processo no qual este trabalho se insere objetiva combinar as vantagens da fermentação semi-sólida (FSS) e submersa (FS) em um único equipamento visando à produção de celulases. No entanto, torna-se fundamental a padronização do preparo do inóculo de forma a permitir a transição da FSS para a FS. Neste trabalho foram estudadas as melhores condições para preparo do inóculo assim como foi desenvolvida uma metodologia para estimar o crescimento celular de *Aspergillus niger* no processo combinado. A modelagem matemática mostrou que o crescimento celular segue o modelo de Contois, com  $\mu_{\text{máx}}$  de  $0,034\text{h}^{-1}$ ,  $Y_{x/s}$  de  $0,297\text{ g/g}$  e constante de morte de  $0,005\text{h}^{-1}$ . Esse modelo foi aplicado aos cultivos realizados para obtenção dos perfis de crescimento celular a partir do consumo de glicose.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Aspergillus niger*, bagaço de cana-de-açúcar, fermentação, celulases

### 1. INTRODUÇÃO

No Brasil são produzidas cerca de 350 milhões de toneladas por ano de resíduos agrícolas e agro-industriais de composição lignocelulósica, que acarretam em problemas ambientais, além dos custos adicionais relacionados à sua disposição (Pereira Jr., 2008). O bagaço de cana-de-açúcar é um subproduto do processo de extração do caldo (destinado à produção de açúcar ou de álcool), representando um resíduo industrial disponível em grande escala e a baixo custo. De acordo com BARTHOLOMEU (2004), cada tonelada de cana-de-açúcar moída produz aproximadamente 260 quilos de bagaço.

Parte desse bagaço já vem sendo usada para gerar energia elétrica, mas uma

grande aposta tem sido no etanol celulósico, também chamado de etanol de segunda geração.

Entre as tecnologias de produção de etanol celulósico existem oportunidades de desenvolvimentos utilizando a hidrólise química e a hidrólise enzimática. A conversão enzimática de materiais lignocelulósicos para a obtenção de açúcares fermentescíveis tem sido apontada como a rota alternativa mais promissora e de grande interesse industrial para o aumento da produtividade do etanol de forma sustentável (OGIER et al., 1999; WYMAN, 1999; KNAUF e MONIRUZZAMAN, 2004).

No entanto, a utilização da rota enzimática para a hidrólise da celulose, apesar de ser uma alternativa de menor impacto ambiental, ainda requer o



desenvolvimento de tecnologias que possam reduzir os custos de produção das enzimas. Alguns especialistas asseguram que está na obtenção de enzimas capazes de reduzir os custos de produção de etanol celulósico a chave do sucesso do mercado mundial de biocombustíveis nos próximos anos (TENGERDY e SZAKACS, 2003).

Essas enzimas podem ser produzidas pelo cultivo de fungos em processos de fermentação semi-sólida (FSS) ou em fermentação submersa (FS). Cada processo tem vantagens e desvantagens bem conhecidas. A principal diferença entre os dois processos está no teor de água presente no meio reacional. Entre os biorreatores já avaliados para a fermentação submersa estão os do tipo tanque agitado e os pneumáticos, incluindo o tipo coluna de bolhas e o airlift, o último com crescente interesse devido a estudos com fungos filamentosos (CERRI, 2005).

Neste contexto, o estudo no qual este trabalho se insere visa avaliar a produção de celulases em um processo de fermentação combinado, que agrega as vantagens da FSS e FS em um único equipamento, um biorreator airlift. No entanto, para o cultivo no processo combinado se faz necessária a padronização do inóculo de forma a permitir a transição da FSS para a FS.

O processo de fermentação combinada tem por característica a presença de sólidos no meio de cultivo. O cultivo é iniciado em FSS e continuado com a adição de meio líquido. Devido à dificuldade de realizar a quantificação celular neste processo dada à presença de sólidos, se faz necessária uma metodologia de quantificação indireta desta biomassa.

A metodologia desenvolvida neste trabalho consistiu em fazer uma estimativa indireta do crescimento da biomassa tendo como base o consumo de substrato, no caso, glicose. Esta estimativa foi feita desenvolvendo um modelo matemático para simulação deste crescimento.

O presente trabalho, portanto, teve por objetivos a implementação de um procedimento de preparo de inóculo e a avaliação da metodologia de quantificação indireta do crescimento celular em cultivos de *Aspergillus niger* em biorreator pneumático do tipo airlift visando à produção de celulases.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Microrganismo

O agente das fermentações foi uma linhagem do fungo filamentoso *Aspergillus niger*, da coleção da EMBRAPA-CTAA.

### 2.2 Meio de cultivo

Foi utilizado o meio de Mandels (1976) composto por: 0,14% de  $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ , 0,20% de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,03% de  $\text{CaCl}_2$ , 0,02% de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,50% de peptona, 0,20% de extrato de levedura, 0,03% de uréia, 0,10% de Tween 80, 0,10% de solução de sais (5mg/L de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1,6 mg/L  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 1,4 mg/L  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2,0mg/L  $\text{CoCl}_2$ ). Para a o preparo do meio líquido adicionado após a etapa de FSS foi também incorporada aos componentes acima 30 g/L de glicose para efeito de avaliação da metodologia de estimativa do crescimento celular o ao longo do tempo em função do consumo de glicose.

### 2.3 Procedimento para preparação do inóculo

A suspensão de esporos obtida por meio de sabugo de milho foi inoculada em fermentação semi-sólida tendo como substrato bagaço de cana-de-açúcar, sendo inoculados  $10^7$  esporos/g de substrato. Na etapa de cultivo FSS, foi utilizada uma massa de 5 g de substrato e 12 mL do meio descrito em 2.2 sem a adição de glicose, resultando em uma umidade de 70 % em base úmida. O cultivo em FSS foi realizado em estufa, em



condições estáticas, a 32°C até a fase de formação de micélios. Após este tempo foi adicionado o volume desejado do meio de Mandels enriquecido com glicose, sendo testados os volumes de 100 e 200 mL, e o cultivo foi continuado em shaker, com agitação contínua, temperatura de 32°C e pH inicial de 6,0. Durante os experimentos, foram retiradas amostras a cada 12 horas para determinação do consumo de glicose ao longo do tempo, gerando os dados para estimativa indireta da concentração de biomassa.

## 2.4 Seleção das condições operacionais

As variáveis avaliadas na produção do inóculo foram: volume de submersão, sendo avaliados 200 mL e 100 mL do meio de Mandels, com agitação do shaker de 50 e 200 rpm e tempo de fermentação em FSS antes da adição do meio líquido, sendo realizados ensaios com 24h, 48h e 72h.

## 2.5 Determinação dos parâmetros cinéticos de crescimento em meio líquido

Foram realizados ensaios para determinação dos parâmetros cinéticos de crescimento. O ensaio para determinação de parâmetros foi realizado utilizando o meio descrito em 2.2 com adição de 30 g/L de glicose e tendo como inóculo a suspensão de esporos obtida no sabugo de milho. Os frascos foram inoculados com uma suspensão contendo  $10^7$  esporos/mL e pH de 6,0. Foram retiradas amostras a cada 4 horas e as concentrações celulares e de glicose foram medidas como descrito em 2.6 e 2.7 respectivamente. Os valores de  $Y_{x/s}$  e  $\mu_{\max}$  foram calculados por regressão linear. O programa Análise de Bioreatores Anabio 1.2 (Silva et al. 2003) foi utilizado para simular um modelo simples não estruturado, consistindo nas equações de balanço de massa, (Equação 1 e 2), com cinética de

crescimento descrita pelo modelo de Contois (Equação 3) (Shuler and Kargi 2002).

$$\frac{dC_x}{dt} = (\mu - k_d)C_x \quad (1)$$

$$\frac{dC_s}{dt} = -\left(\frac{1}{Y_{x/s}}\right)C_x \quad (2)$$

$$\mu = \frac{\mu_{\max} * S}{K_{sx} * X + S} \quad (3)$$

Onde  $\mu$  é a velocidade específica de crescimento da biomassa ( $h^{-1}$ );  $\mu_{\max}$  velocidade máxima específica de crescimento ( $h^{-1}$ );  $k_d$  constante de morte celular ( $h^{-1}$ );  $K_{sx}$  coeficiente de saturação (g/L);  $C_s$  concentração de substrato (g/L);  $Y_{x/s}$  fator de conversão de substrato em biomassa e  $C_x$  concentração celular (g/L).

## 2.6 Determinação da concentração celular

Foi utilizado o método da massa seca. Membranas de filtração foram colocadas em estufa a 60°C por 12 h antes da retirada da amostra. Estas membranas foram resfriadas em dessecador, pesadas e a amostra de volume conhecido foi filtrada em bomba de vácuo. A membrana e o material retido foram secos por 24 h a 60°C, colocados em dessecador, resfriados e então pesados. A diferença entre as massas da membrana antes e depois da filtração representa a massa seca do material recolhido, que dividida pelo volume da amostra fornece a concentração celular no meio de cultivo no momento de retirada da amostra.

## 2.7 Determinação da concentração de glicose

A quantificação da glicose foi realizada pelo método "Reativo enzimático para a determinação do nível de glicose no soro ou plasma", fabricado por Laborlab, Guarulhos



– SP, Brasil, seguindo o procedimento descrito pelo fabricante.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

#### 3.1 Seleção das condições operacionais no preparo do inóculo

Nesta etapa foi avaliada a influência das variáveis operacionais no crescimento do microrganismo durante a preparação do inóculo e na passagem da FSS para a FS. As variáveis analisadas foram o volume de submersão, agitação e tempo de fermentação em FSS antes da adição do meio líquido. A Figura 1 representa o consumo de glicose com uma agitação de 50 rpm, para um volume adicionado de 100 mL e tempo de FSS de 24 h.

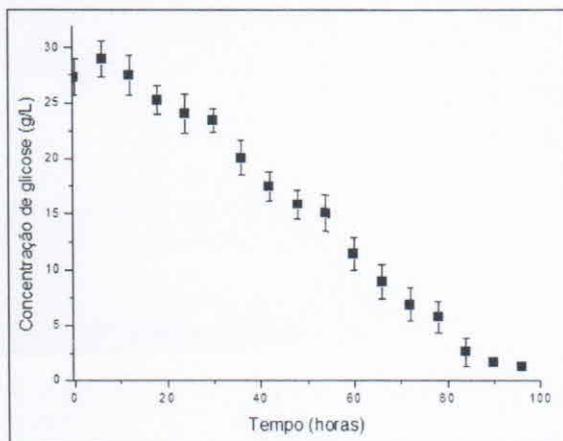


Figura 1 – Perfil de consumo de glicose na condição de agitação 50 rpm, tempo de FSS 24 horas e volume de submersão de 100 mL

Podemos observar que toda glicose foi consumida em torno de 96 horas. No entanto, esta condição de agitação foi descartada, pois, por ser baixa, não permitiu uma completa homogeneização no crescimento do fungo, apresentando crescimento superficial no meio líquido.

A Figura 2 apresenta o consumo de glicose no experimento com agitação de 200 rpm e volume de 200 mL. Foram avaliados

três diferentes tempos de incubação em FSS antes da adição do meio, 24, 48 e 72 horas.

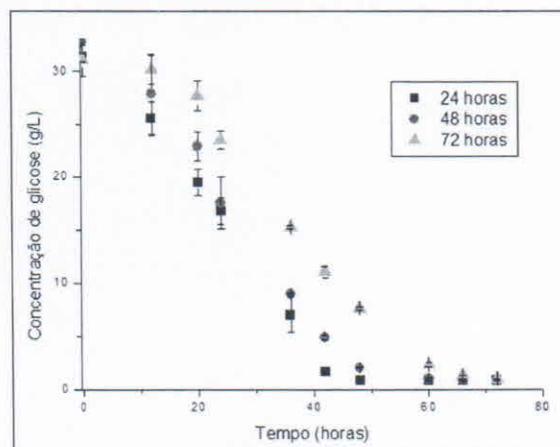


Figura 2 – Perfil do consumo de glicose na condição de agitação 200 rpm, volume de submersão 200 mL para os tempos de incubação em FSS de 24, 48 e 72h

Todos os ensaios foram feitos em duplicata. Podemos observar que a curva referente ao cultivo realizado com a adição de meio líquido após 24 horas de FSS apresentou um consumo de glicose mais semelhante ao incubado em FSS por 48 h e mais rápido do que o de 72 h, alcançando uma concentração de aproximadamente 0,5 g/L em 48 horas. Outro fator importante a ser destacado é que com o tempo de 24 horas de fermentação semi-sólida, a morfologia do fungo durante os cultivos com adição de meio líquido se caracterizava pela presença de micélios. Já nos cultivos iniciados com material incubado por 48 e 72 horas em FSS, foi detectada grande presença de esporos, que podem levar ao surgimento de pellets ou outras formações morfológicas complexas.

A formação de pellets em *A. niger* pertence ao tipo coagulativa (Yanagita and Kogane, 1963), onde os esporos coagulam durante a germinação e dão origem à uma rede de entrelaçamento de hifas. Uma relação clara entre a morfologia do fungo e sua produtividade não foi estabelecida ainda. (Grimm, 2005). Para alguns fungos filamentosos uma forma morfológica



particular pode ser preferida para alcançar o máximo rendimento. Crescimento na morfologia micelial de *Aspergillus niger* são preferidos para a produção de enzimas pectinases enquanto o crescimento na forma de pellets tem preferência na produção de ácido cítrico. (Steel et al., 1954; Kristiansen and Bullock, 1988)

A Figura 3 apresenta o mesmo experimento anterior, mas com redução do volume de 200 mL para 100 mL.

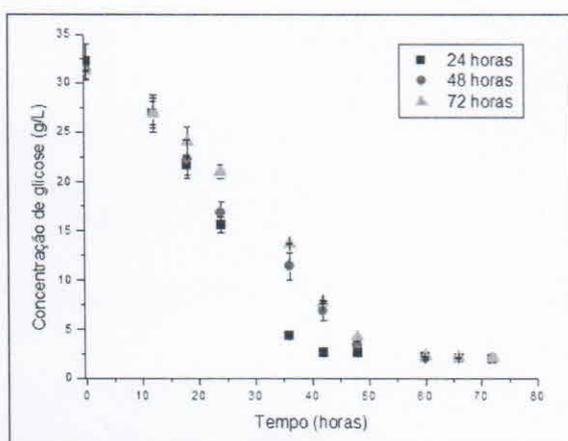


Figura 3 – Perfil do consumo de glicose na condição de agitação 200 rpm, volume de submersão 100 mL para os tempos de incubação em FSS de 24, 48 e 72 h

Pode-se observar o mesmo comportamento que no ensaio com 200 mL, isto é, o tempo de 24 horas de incubação em FSS novamente forneceu os melhores resultados. Neste ensaio, o consumo de glicose se estabilizou por volta de 2,5 g/L em todos os tempos de incubação em FSS, o que ocorreu devido ao menor volume de meio nutriente. No entanto, um volume menor de meio líquido não se mostrou vantajoso devido à menor fluidez da suspensão e maior dificuldade para a posterior transferência ao biorreator no momento da inoculação.

Posteriormente, desenvolvido o modelo matemático para o crescimento microbiano através de parâmetros obtidos experimental e graficamente, os dados de consumo de substrato apresentados acima para cada um

dos ensaios servirão como parâmetro indireto para obtenção da curva do crescimento microbiano em cada situação analisada, a fim de quantificar a massa celular nos ensaios na presença de sólidos. Os dados serão introduzidos no software Anabio e os parâmetros ajustados de forma a obter o melhor ajuste visual da curva do modelo à curva dos dados experimentais de consumo de glicose. A partir deste melhor ajuste o modelo fornecerá a curva de crescimento microbiano que melhor se adapta a cada perfil de consumo de substrato.

### 3.2 Determinação dos parâmetros cinéticos

Nos ensaios para determinação dos parâmetros cinéticos, o cultivo do *A. niger* foi realizado em meio líquido na ausência de bagaço de cana, de forma que tanto as variações na concentração de glicose como na concentração celular pudessem ser acompanhados ao longo do ensaio. O ensaio foi realizado utilizando o meio descrito em 2.2 adicionado de glicose e inoculado com a suspensão de esporos obtida em sabugo de milho com uma concentração de  $10^7$  esporos/mL, conforme a metodologia descrita em 2.4. A Figura 4 apresenta os perfis de consumo de glicose e crescimento de massa celular. Podemos observar a presença de uma fase lag de 8 horas, com um crescimento exponencial até aproximadamente 42 horas, iniciando-se então a fase de crescimento estacionário. A concentração de células atingida neste ponto foi de aproximadamente 10 g/L, no qual o consumo de glicose caiu para uma concentração de 3 g/L. Observou-se que após 68 horas de cultivo houve um decaimento da concentração celular, provável decorrência da falta de oxigenação ou nutrientes no meio, uma vez que o ensaio não possuía aeração ou reposição do meio nutriente, pois este foi desenvolvido em erlenmeyer fechado.

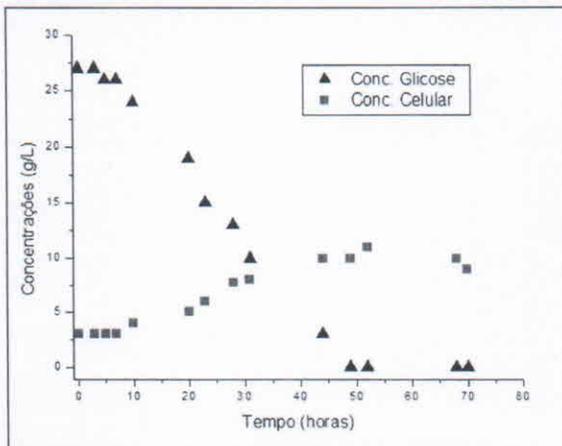


Figura 4 – Concentração de glicose e de biomassa no ensaio para determinação de parâmetros cinéticos

Utilizando os dados experimentais correspondentes à fase exponencial de crescimento obtidos durante os ensaios, foram calculados os valores de  $Y_{x/s}$  e  $\mu_{m\acute{a}x}$  por regressão linear, conforme ilustrado nas Figuras 5 e 6, respectivamente. Os valores referentes à fase que o crescimento se apresentou estacionário e decrescente não foram incluídos aos cálculos, uma vez que apenas a fase exponencial descreve a velocidade máxima específica de crescimento ( $\mu_{m\acute{a}x}$ ) e coeficiente de rendimento ( $Y_{x/s}$ ) (Shuler and Kargi 2002).

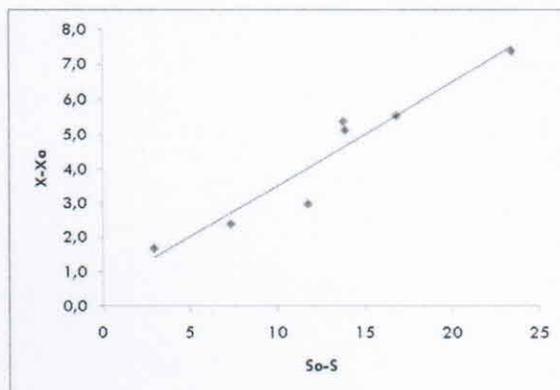


Figura 5 – Determinação do fator de conversão de substrato em biomassa ( $Y_{x/s}$ ) por regressão linear dos dados experimentais

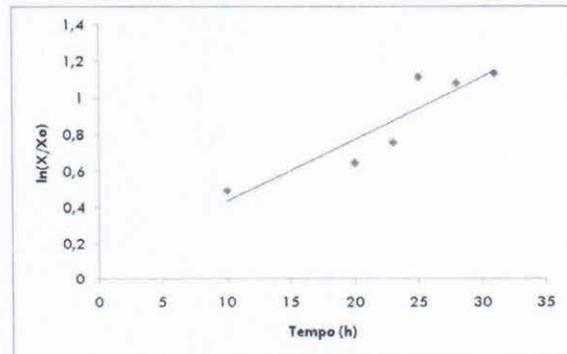


Figura 6 – Determinação da velocidade máxima específica de crescimento ( $\mu_{m\acute{a}x}$ ) por regressão linear de dados experimentais

A regressão linear dos dados apresentados na Figura 5 forneceu o coeficiente angular, que corresponde ao valor de  $Y_{x/s}$  igual a 0,2975 g células secas/g glicose. Já a regressão linear dos dados da Figura 6 forneceu o coeficiente angular, que corresponde ao valor de  $\mu_{m\acute{a}x}$  igual a 0,034 h<sup>-1</sup>.

O programa Análise de Bioreatores Anabio 1.2 foi utilizado para simular o conjunto de equações diferenciais (1-2) que descrevem as variações na concentração de células e de glicose com o tempo, juntamente com a expressão cinética de Contois para representar o crescimento celular. Os valores dos outros parâmetros, isto é, da constante do modelo de Contois ( $K_{sx}$ ) e constante de morte ( $k_D$ ) foram estimados por meio de atribuição de valores no programa Anabio, sendo escolhidos aqueles que permitiram melhor ajuste do modelo aos dados experimentais. Seguindo esse procedimento, os valores estimados foram para  $K_{sx}$ , 0,15 g/L e para  $k_D$ , 0,005 1/h, quando o valor da concentração de substrato a partir da qual inicia a morte celular,  $C_{s1}$ , tiver um valor de 0,5 g/L. A Figura 7 apresenta os valores experimentais e os simulados para as concentrações normalizadas de células e glicose. A Figura 7 mostra que o modelo descreve bem os dados experimentais.

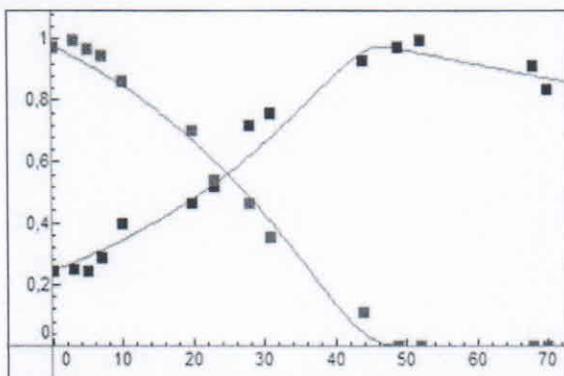


Figura 7 – Resultados experimentais e simulados do ensaio para o cultivo em meio líquido

Os valores determinados para os parâmetros estão resumidos na Tabela 1.

Tabela 1 – Valores obtidos para os parâmetros cinéticos

Parâmetros Cinéticos			
$\mu_{\text{máx}}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	$Y_{x/s}$	$K_{sx}$ (g/L)	$k_d$ ( $\text{h}^{-1}$ )
0,034	0,2975	0,15	0,005

### 3.3 Aplicação do modelo para estimativa da concentração celular nos cultivos submerso na presença de em sólidos

Os parâmetros obtidos do modelo (Tabela 1) foram aplicados para simular o perfil de consumo de glicose e gerar o perfil simulado de crescimento celular no meio contendo sólidos. Os dados experimentais de consumo de glicose obtidos nos experimentos descritos no item 3.1 foram introduzidos no software Anabio, e o ajuste foi realizado por meio da atribuição de valores para a concentração celular inicial buscando identificar o valor que levasse ao melhor ajuste aos dados da concentração de glicose. As Figuras 8, 9 e 10 mostram os perfis celulares simulados para o experimento 2, com 24, 48 e 72 h de FSS. Os valores encontrados para a concentração celular inicial foram de 3,5, 2,65 e 1,8 g/L

para os tempos de 24, 48 e 72 horas de FSS respectivamente.

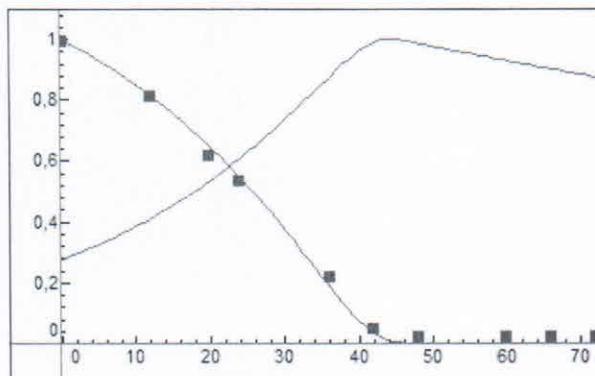


Figura 8 – Perfis normalizados de consumo de glicose e de crescimento celular (simulado) para o inóculo com 5 g de bagaço e 200 mL de meio de Mandels adicionado depois de 24 horas de incubação em FSS.  $C_{x0} = 3,5$  g/L

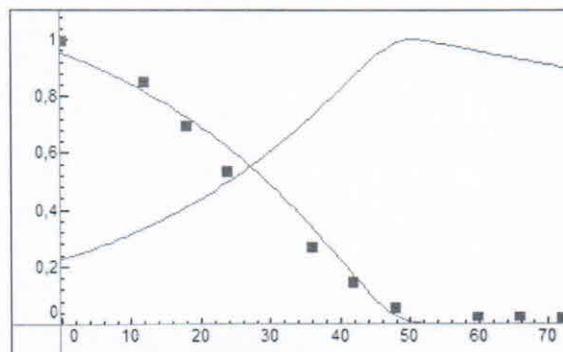


Figura 9 – Perfis normalizados de consumo de glicose e de crescimento celular (simulado) para inóculo com 5 g de bagaço e 200 mL de meio de Mandels adicionado depois de 48 horas de incubação em FSS.  $C_{x0} = 2,65$  g/L

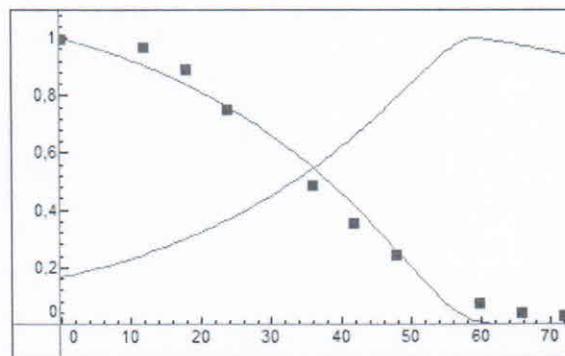


Figura 10 – Perfis normalizados de consumo



de glicose e de crescimento celular (simulado) para inóculo com 5 g de bagaço e 200 mL de meio de Mandels adicionado depois de 72 horas de incubação em FSS.  $C_{X0} = 1,8 \text{ g/L}$

Pode-se observar pelas Figuras que há um pico de concentração celular em todos os ensaios. Este pico é referente ao momento em que o fungo tem máxima concentração celular, ou seja, momento ideal para a transferência do inóculo para o biorreator. Comparando as três Figuras, na Figura 8, referente ao ensaio com adição do meio após 24 horas de FSS, este pico se concretiza em menor tempo, levando cerca de 42 horas para atingir sua concentração máxima, comparado com 48 e 58 horas dos tempos 48 e 72 horas de FSS, respectivamente. Além disso, é interessante observar que os valores de  $C_{X0}$  estimados refletem a condição da biomassa incubada em FSS, sendo menores para os inóculos produzidos a partir de biomassa incubada por 48 ou 72 h, na qual a presença de esporos foi detectada.

#### 4. CONCLUSÕES

A metodologia desenvolvida para quantificação indireta da biomassa demonstrou ser viável, pois o modelo proposto se ajustou muito bem aos dados experimentais de 3 experimentos diferentes, sendo que apenas um parâmetro ( $C_{X0}$ ) foi alterado na simulação dos 3 cultivos. Quanto à padronização do inóculo para o cultivo em maior escala, os resultados mostraram que o melhor procedimento para produzir um inóculo com maior concentração celular em menor tempo é: etapa 1) o cultivo em FSS com incubação por 24 horas; etapa 2) adicionar um volume de 200 mL de meio de Mandels e incubar em shaker com agitação de 200 rpm. Esta condição de produção de inóculo apresenta também fatores adicionais que a favorecem, como a presença predominante de morfologia micelial e a

maior fluidez da suspensão resultante para a inoculação.

#### 5. NOMENCLATURA

$C_{S1}$  concentração de substrato na qual inicia-se a morte celular (g/L)

$C_{X0}$  concentração celular inicial (g/L)

FS fermentação submersa

FSS fermentação semi-sólida

$k_d$  constante de morte celular ( $\text{h}^{-1}$ )

$K_{sx}$  coeficiente de saturação (g/L)

S concentração de substrato (g/L)

$Y_{x/s}$  fator de conversão de substrato em biomassa

X concentração celular (g/L)

$\mu$  velocidade específica de crescimento da biomassa ( $\text{h}^{-1}$ )

$\mu_{\text{máx}}$  velocidade máxima específica de crescimento ( $\text{h}^{-1}$ )

#### 6. REFERÊNCIAS

CERRI, M.O. Avaliação de transferência de calor e massa de um biorreator airlift de circulação interna de bancada para a produção de ácido clavulânico, Dissertação de Mestrado, UFSCar, São Carlos, 2005

GRIMM L.H.; KELLY S.; KRULL R.; HEMPEL D.C.; Morphology and productivity of filamentous fungi. *Appl Microbiol Biotechnol*, 69: 375–384, 2005.

KRISTIANSEN B.; BULLOCK J.D.; Developments in industrial fungal biotechnology. *Fungal biotechnology*. London: Academic Press; p. 203–23, 1988.



KNAUF, M.; MONIRUZZAMAN, M. Lignocellulosic biomass processing: A perspective. **International Sugar Journal**, v. 106, n. 1263, p. 147-150, 2004.

MANDELS, M.; STERNBERG, D. Recent advances in cellulases technology. **J. Ferment Technol.**, v. 54, p. 267-286, 1976.

OGIER, J.C. et al. Production d'éthanol à partir de biomasse lignocellulosique. **Oil & Gas Science and Technology**, v. 54, n. 1, p. 67-94, 1999.

PEREIRA JR., N.; COUTO, M.A.P.G.; ANNA, L.M.M.S.B. Biomass of Lignocellulosic Compostion for Fuel Ethanol Production and the Context of Biorefinery. **Series on Biotechnology**. Biblioteca Nacional: Rio de Janeiro, v. 2, p. 45, 2008.

SILVA, F.H.; MOURA, L.F.; BADINO JR, A.C. AnaBio 1.0: Um Programa para Análise de Biorreatores, **XIV Simpósio Nacional de Fermentação, anais**. Florianópolis, Santa Catarina, 2003.

SHULER, M.L.; KARGI, F. Bioprocess engineering: basic concepts. Prentice Hall, Englewood Cliffs, 2002.

STEEL R.; LENTZ C.P.; MARTIN S.M. A standard inoculum for citric acid production in submerged culture. **Can J Microbiol**, 1:150 – 7., 1954.

TENGERDY, R.P.; SZAKACS, G.; Bioconversion of lignocelluloses in solid substrate fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v13, p. 169-179, 2003.

WYMAN, C.E. Biomass ethanol: technical progress, opportunities, and commercial challenges. **Annual Review of Energy and the Environment**, v. 24, p. 189-226, 1999.

YANAGITA T.; KOGANE F. Cytochemical and physiological differentiation of mould pellets. **J Gen Appl Microbiol** , 9:171 – 87, 1963.