

1067 – PQ2 - 219

CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO: QUANTIFICAÇÃO DE BIOMASSA EM BIORREATOR CILÍNDRICO HORIZONTAL AGITADO

Rutsatz, M.D.¹; Casagrande, W.B.¹; Santos J.H.Z. dos³; Ayub, M.A.Z.², Secchi, A.R.¹

- 1 - Grupo de Integração, Modelagem, Simulação, Controle e Otimização de Processos (GIMSCOP).
Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).
R. Eng. Luis Englert, s/n. Campus Central. CEP: 90040-040 - Porto Alegre - RS – Brasil.
Telefone: xx51 3316 3315. Fax: xx51 3316 3278. Email: {marcus, arge}@enq.ufrgs.br
- 2 - Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).
Av. Bento Gonçalves, 9500. Prédio 43212, Campus do Vale. CEP 91540-000 – Porto Alegre – RS – Brasil.
Email: mazayub@ufrgs.br
- 3 - Instituto de Química (IQ), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).
Av. Bento Gonçalves, 9500 – Campus do Vale. CEP 91501-970, Caixa Postal 15003, Porto Alegre – RS – Brasil
Email: jhzds@iq.ufrgs.br

RESUMO – A quantificação de biomassa em processos fermentativos é de importância fundamental para caracterizar o crescimento microbiano e essencial nos estudos de cinética e modelagem do processo. Em cultivos em estado sólido (CES), entretanto, a natureza insolúvel do meio impede a utilização das metodologias tradicionalmente consagradas para cultivos submersos (CSm). Desta forma, várias alternativas já foram propostas na literatura, e uma das mais promissoras e analisada neste trabalho envolve a determinação da taxa de produção de CO₂, que é relacionada ao crescimento. A técnica tem a vantagem de ser uma medida *on-line*, não-destrutiva e de resposta rápida. Os resultados apresentados neste trabalho relacionam biomassa à produção de CO₂ em um CES em biorreator cilíndrico horizontal agitado (BCHA) usando modelos comumente propostos na literatura.

PALAVRAS-CHAVE: Cultivo em estado sólido, estimação de biomassa, crescimento, taxa de produção de CO₂, transferência de massa.

ABSTRACT – Biomass measurement has fundamental importance in the characterization of microbial growth and is essential for kinetics and modeling studies of the process. In solid-state cultivations (SSC), however, the substrate is insoluble and therefore the traditional techniques used in submerged cultivations (SmC) cannot be applied. Many alternatives have been proposed, and one of the most promising will be analyzed in this work, involving the determination of the CO₂ production rate, which is growth-related. This method has the advantage of being an *on-line*, non-destructive, fast-response technique. The results presented in this work relate biomass to CO₂ production in CSS in a mixed-drum bioreactor using models commonly described in the literature.

1. INTRODUÇÃO

Em bioprocessos, cultivo em estado sólido (CES), ou cultivo semi-sólido (CSS), pode ser definido como o cultivo envolvendo sólidos insolúveis na ausência (ou quase ausência) de água livre. Entretanto, o substrato deve conter umidade suficiente para sustentar o crescimento e o metabolismo microbiano (Pandey, 2003). Assim, o CES se distingue dos cultivos submersos (CSm), onde os substratos e microrganismos se encontram dissolvidos ou suspensos em grande quantidade de água.

Gervais e Molin (2003) lembram que, mesmo em CES, os microrganismos estão em meio líquido, já que as transferências de massa ocorrem em um filme líquido que circunda os microrganismos. Desta forma, três fases estão presentes nos CES, sólido, líquido e gás, em oposição aos sistemas bifásicos do CSm.

Pandey (1994) aponta que, embora os registros da utilização de CES venham desde a Antigüidade, na fabricação de pães, queijos e koji (alimento fermentado típico do Extremo Oriente), a partir da década de 1940, início da biotecnologia moderna, os processos em meio sólido foram completamente negligenciados no Ocidente em benefício dos processos submersos. O autor afirma não haver uma razão clara para esta escolha, mas talvez tenha sido decorrência do sucesso da produção da penicilina em CSm. Poucos trabalhos foram realizados em CES nas décadas seguintes, até que na década de 1980 ressurgiu o interesse por estes processos.

Atualmente, vários trabalhos apontam vantagens na utilização de CES em comparação a CSm (Lonsane, 1994; Raimbault, 1998), que incluiriam a utilização de resíduos agro-industriais como substratos baratos, menor gasto energético, menor uso de água e maior concentração final de produtos, reduzindo custos do processamento “downstream”.

Entretanto, o nível de desenvolvimento dos processos de CES ainda está bastante aquém do obtido pelos processos de CSm. Isto decorre do fato de que muitos importantes aspectos científicos e de engenharia ainda estão pouco caracterizados em CES. A maior parte dos trabalhos ainda é qualitativa ou empírica, devido às dificuldades encontradas na quantificação de parâmetros importantes como biomassa (Mitchell e Lonsane, 1992). Por isso, ainda não há informação suficiente sobre a cinética de reações em CES e a modelagem dos processos ainda precisa ser muito estudada (Pandey, 2003).

Os trabalhos em CES concentram-se, quase que totalmente, na utilização de fungos filamentosos. Em geral, acredita-se que tais organismos seriam mais adequados, devido à capacidade de gerar hifas que penetram no substrato sólido e por sua maior adaptabilidade a condições de baixa atividade de água. Entretanto, já há um bom número de trabalhos que obtêm sucesso no uso de bactérias em CES (Heck, 2005).

A natureza insolúvel do meio no CES impede a utilização das metodologias tradicionalmente consagradas para CSm. Desta forma, várias alternativas já foram propostas na literatura para a quantificação de biomassa (Mitchell, 1992), sendo a determinação da taxa de produção de CO₂, que é relacionada ao crescimento, uma das mais promissoras e analisada neste trabalho.

2. QUANTIFICAÇÃO DA BIOMASSA

A biomassa é um parâmetro fundamental na caracterização do crescimento microbiano, logo, sua medida é essencial para estudos cinéticos de cultivos em estado sólidos. Entretanto, a medida direta da biomassa em CES é bastante difícil, devido à dificuldade de separar o microrganismo do substrato (Mitchell, 1992), e técnicas consagradas nas culturas submersas não podem ser aplicadas. Segundo Lekha e

Lonsane (1994), a cinética e a modelagem matemática do crescimento microbiano em CES têm recebido pouca atenção devido à dificuldade em estimar a biomassa.

Mitchell (1992) aponta ainda a questão de como expressar a quantidade de biomassa em CES: em termos absolutos (gramas de peso seco) ou como concentração (grama de peso seco por grama de meio de cultivo). Esses valores irão diferir porque normalmente a massa do meio diminui significativamente ao longo do cultivo devido à conversão do substrato em dióxido de carbono. Além disso, há a questão de se usar base seca ou úmida para a concentração de biomassa no meio. De qualquer forma, é importante que o método de expressar estes valores seja cuidadosamente descrito, para que comparações possam ser feitas. Segundo o mesmo autor, métodos ideais para estimar biomassa em CES devem apresentar as seguintes características:

- Obtenção de resultados com rapidez, de forma a permitir tomada de decisões durante o processo.
- Ser barato, tanto em termos de aparelhagem como de reagentes.
- Ser simples em sua execução, já que operadores deverão precisar apenas de treinamento básico.
- Ser reprodutível, preciso e não-suscetível à interferência por componentes do substrato.

Há uma grande variedade de metodologias utilizadas para quantificar biomassa, e, novamente, a grande maioria se destina aos cultivos envolvendo fungos filamentosos. Percebe-se que cada trabalho pode exigir uma metodologia diferente, de acordo com o sistema trabalhado (microrganismo, substrato).

As metodologias utilizadas se encaixam basicamente nestas categorias (Lekha e Lonsane, 1994; Mitchell, 1992; Rimbault, 1998):

- Métodos diretos, com a separação direta da biomassa da matriz sólida. Exemplo: contagem em placas.
- Métodos indiretos, com medida de algum componente da biomassa ou medidas de atividade metabólica (respiração, produção de enzimas).

Os autores concordam que, no caso de bactérias e leveduras, os métodos de contagem em placas são aplicáveis.

Entre os métodos indiretos, a medida da atividade respiratória merece destaque. A respiração é o processo metabólico pelo qual microrganismos aeróbios obtêm a maior parte de sua energia para o crescimento, consumindo O_2 e produzindo CO_2 . Estas atividades estão, portanto, associadas ao crescimento e podem ser utilizadas para a estimativa da biomassa (Mitchell, 1992; Rimbault, 1998). É interessante notar que todos os trabalhos na literatura utilizam a medição de apenas um dos dois gases (oxigênio e gás carbônico) na estimativa de biomassa.

A determinação da produção de CO_2 (CPR – *carbon dioxide production rate*) envolve a medida da concentração do gás no ar de entrada e saída do biorreator. Conhecendo-se a vazão de ar que entra e sai, além da quantidade de meio de cultivo contida no biorreator, obtém-se o valor de CPR, conforme Koutinas et al. (2003):

$$CPR = \frac{F \cdot (C_{out}^{CO_2} - C_{in}^{CO_2})}{M} \cdot \frac{M_{CO_2}}{v_{CO_2}} \quad (1)$$

onde CPR é expressa em $g_{CO_2}/(g_{leito} \cdot h)$; F é a vazão de ar que entra e sai no biorreator (L/h); $C_{out}^{CO_2}$, a concentração de CO_2 no ar que sai do biorreator (v/v); $C_{in}^{CO_2}$, a concentração de CO_2 no ar que entra no biorreator (v/v); M, a massa do leito (g_{leito}); M_{CO_2} , a massa molar do CO_2 (g_{CO_2}/mol); e v_{CO_2} , o volume molar do CO_2 (L/mol).

Esta medida tem a grande vantagem de ser uma técnica *on-line* e não-destrutiva (Raimbault, 1998), mas para poder ser utilizada na estimação de biomassa, precisa ser calibrada por algum outro método.

Conforme Mitchell (1992), a medida da produção de CO₂ é mais poderosa quando acoplada a um modelo matemático para correlação da quantidade de biomassa com a medida de CO₂. Estes modelos não são de crescimento, já que não fazem predição sobre o comportamento do parâmetro medido. Sua utilidade reside no fato de que, acompanhando-se o perfil do parâmetro medido, pode-se construir um perfil de biomassa.

A correlação entre CPR e biomassa costuma ser descrita por modelos do tipo Luedeking-Piret, que consideram um termo associado ao crescimento e outro termo de manutenção, não associado ao crescimento (Sugama e Okazaki, 1979; Sato et al., 1983), conforme a Equação 2:

$$\text{CPR} = Y_{\text{CO}_2/\text{X}} \cdot \frac{dX}{dt} + m_{\text{CO}_2} \cdot X \quad (2)$$

onde $Y_{\text{CO}_2/\text{X}}$ é o coeficiente de rendimento da produção de CO₂ em relação à biomassa ($g_{\text{CO}_2}/\text{UFC}$); X , a biomassa (UFC); e m_{CO_2} , o coeficiente de produção de CO₂ não associado ao crescimento, $g_{\text{CO}_2}/(\text{UFC}\cdot\text{h})$.

Sato et al. (1983) levanta a questão de que os parâmetros deste modelo podem não ser constantes ao longo do cultivo, o que representaria uma limitação da técnica. De qualquer forma, o monitoramento da produção de CO₂ produz uma boa medida da atividade metabólica do microrganismo, sendo muito interessante como ferramenta no controle do processo. Saucedo-Castañeda et al. (1992) desenvolveram um sistema de controle para um biorreator de leito fixo, tendo como parâmetro de controle a taxa de aeração do leito, de forma a manter a concentração de CO₂ no ar de saída constante em níveis baixos

e assim conseguir rendimentos ótimos na produção de biomassa em todas as alturas do leito.

3. BIORREATORES DE CES

A literatura traz um grande número de tipos de biorreatores que têm sido utilizados para desenvolver trabalhos em cultivo em estado sólido, como leito fixo, bandejas, tambor rotatório, leito fluidizado.

Este trabalho se concentra na utilização de um biorreator cilíndrico horizontal agitado (BCHA), conforme descrito por Heck (2005). Este tipo de biorreator tem sido pouco explorado pelos trabalhos descritos na literatura, por ser pouco adequado ao cultivo de fungos filamentosos. Entretanto, possui grande potencial para a aplicação no caso de microrganismos como bactérias e leveduras.

Os trabalhos que utilizam este tipo de biorreator costumam considerá-lo como homogêneo (Mitchell et al., 2003; Nagel et al., 2000). Não foram encontrados na literatura modelos que descrevessem as possíveis heterogeneidades da mistura.

Nagel et al. (2000) realizaram experimentos com grãos de trigo coloridos e concluíram que o grau de mistura obtido é função do número de revoluções das pás, e não do tempo de agitação. Além disso, perceberam que a mistura radial é bastante rápida, enquanto a axial é mais lenta. Para o desenvolvimento de estratégias de controle do processo, no mesmo trabalho, o biorreator foi considerado homogêneo.

Heck (2005), utilizando o mesmo sistema apresentado neste trabalho, desconsiderou as eventuais heterogeneidades do leito.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Biorreator cilíndrico horizontal agitado (BCHA):

O biorreator utilizado nos experimentos e apresentado nas Figuras 1 e 2 compõe-se de um corpo cilíndrico em aço inox 304, com encamisamento para circulação de água. As dimensões do cilindro são 40cm de comprimento e 20cm de diâmetro.



Figura 1: Visão externa do BCHA



Figura 2: Visão interna do BCHA.

Nota-se que o biorreator possui pás de agitação retas, sem inclinação, ligadas a um eixo central por onde também entra o fluxo de ar.

4.2 Preparo de inóculo:

O inóculo para os cultivos em BCHA é preparado em 400mL de meio LB. O meio é esterilizado a 120°C por 15min, resfriado à temperatura ambiente e inoculado com *Bacillus circulans* BL53. O inóculo cresce durante 18 a 20h em shaker a 37°C com agitação orbital.

4.3 Preparo do meio de cultivo:

O meio de cultivo utilizado foi o resíduo industrial fibroso de soja (RIFS), subproduto da produção de proteína isolada de soja, que foi obtido junto a uma empresa da região.

A composição do meio de cultivo é a utilizada por Heck (2005): 800g de RIFS (granulometria média mesh 30) a 4000mL de meio mineral. O meio foi transferido para o biorreator e o conjunto foi esterilizado a 120°C por 30min.

O meio mineral é composto de sais dissolvidos em água de acordo com a tabela 2.

Tabela 2: Composição do meio mineral

$MgSO_4 \times 7H_2O$	0,41 g.L ⁻¹
$CaCl_2$	0,02 g.L ⁻¹
KH_2PO_4	1,00 g.L ⁻¹
K_2HPO_4	1,00 g.L ⁻¹
NH_4NO_3	1,00 g.L ⁻¹
$FeCl_3 \times 6H_2O$	0,05 g.L ⁻¹

O meio foi resfriado até 37°C, sendo então adicionados 800mL de inóculo padronizado para absorbância 1,0.

4.4 Condições do cultivo:

A agitação do biorreator foi ajustada a 4rpm, o fluxo de água no encamisamento foi mantido a 37°C, e a aeração foi feita com ar umidificado a 37°C, a uma vazão de 4L.min⁻¹.

4.5 Quantificação de biomassa:

Em intervalos regulares, pequenas amostras foram retiradas do biorreator para quantificação de biomassa.

Imediatamente, procedeu-se a diluição seriada da amostra com água peptonada e plaqueamento em meio PCA (plate count agar) pela técnica do espalhamento com alça de Drigalski. As placas foram armazenadas em estufa a 37°C, e a contagem das colônias foi feita após 12 a 18h.

4.6 Análise do CO₂ liberado:

O ar de saída do biorreator foi continuamente conduzido a um cromatógrafo a gás (CG) modelo Shimadzu GC-14B, equipado com uma válvula de injeção automática marca VICI, coluna Supelco Carboxen 1006 Plot 30m x 0,53mm, detector TCD (a 230°C). O gás de arraste e referência utilizado foi hélio a 30mL.min⁻¹ (arraste) e 10mL.min⁻¹ (referência), medidos com a coluna a 35°C. O perfil de temperatura na coluna iniciou com 6min a 35°C, seguindo-se de aquecimento de 25°C.min⁻¹ até 110°C, mantendo-se esta temperatura por 3min. Segue-se resfriamento até 35°C. Nestas condições, o tempo de retenção do CO₂ foi de aproximadamente 4,0min. A amostragem automática do gás de saída do biorreator era realizada a cada 20min.

Para quantificar o CO₂ no ar que entra no biorreator, necessário para calcular a taxa de produção de CO₂, foram feitas análises cromatográficas do ar antes e depois do cultivo.

4.7 Calibração da medida de CO₂

A calibração do CG para a medição do CO₂ foi realizada pela técnica de calibração externa (Smith, 1988), através da injeção de volumes conhecidos de gás puro, utilizando-se seringa de injeção comum para cromatografia. O volume injetado foi convertido em

concentração de CO₂ dividindo-se pelo volume do loop do injetor automático (280μL). Assim, o sinal gerado no cromatograma foi relacionado com a concentração de CO₂. Para obter maior precisão, as injeções foram repetidas várias vezes para cada volume utilizado.

Este método de calibração mostrou-se bastante reprodutível, o que foi comprovado pelo alto coeficiente de correlação, conforme apresentado na Figura 3.

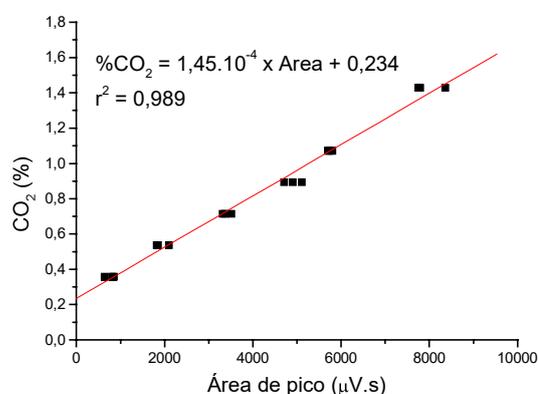


Figura 3: Curva de calibração obtida para análise de CO₂ em CG.

4.8 Estimação de parâmetros

Como as medidas da taxa de produção de CO₂ são discretas no tempo (medidas tomadas a cada 20 minutos), foi utilizada a interpolação cúbica *spline* para gerar os pontos intermediários e resolver o modelo para qualquer instante de tempo.

Os parâmetros $Y_{CO_2/X}$ e m_{CO_2} foram estimados de forma a minimizar a soma dos quadrados dos erros na estimação da biomassa, utilizando o método *Particle Swarm Optimization* (PSO) de busca aleatória, para obtenção de soluções aproximadas, e refinado pelo método de Levenberg-Marquardt com atualização da matriz Hessiana pela técnica de BFGS (Edgar e Himmelblau, 1988), ambos implementados em MATLAB v.6.1. Utilizou-se uma tolerância relativa de 10⁻⁶ para as

variáveis de decisão e para a função objetivo. Neste problema de estimação, a função objetivo é bastante simples, mas apresenta vários mínimos locais, o que prejudica o desempenho dos métodos de busca multivariável e analíticos, que acabam sendo muito dependentes de uma boa estimativa inicial.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados de uma triplicata do cultivo em BCHA foram utilizados para estimar os parâmetros do modelo de Luedeking-Piret (Equação 2), que relaciona a produção de CO₂ à biomassa.

Os valores obtidos para os parâmetros foram:

$$Y_{CO_2/X} = 2,76 \cdot 10^{-12} \text{ g}_{CO_2} \cdot \text{UFC}^{-1}$$
$$m_{CO_2} = 2,36 \cdot 10^{-13} \text{ g}_{CO_2} \cdot \text{UFC}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$$

A Figura 4 compara os resultados preditos pelo modelo, a partir dos dados de produção de CO₂, com a biomassa medida em UFC. Percebe-se que o modelo só conseguiu descrever satisfatoriamente a evolução da curva de biomassa durante as primeiras 20h de cultivo, ou seja, até a fase estacionária. Após este período, foi observada queda na contagem de células viáveis, o que não foi possível descrever com o modelo utilizado.

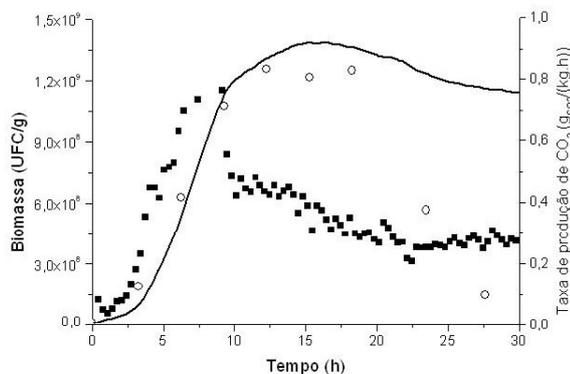


Figura 4: Predição do modelo. Linha sólida = predição do modelo (UFC/g); ○ = biomassa (UFC/g); ■ = taxa de produção de CO₂ (gCO₂/(kg.h)).

Este é um resultado comum nos trabalhos que buscam estimar biomassa em CES a partir de dados de atividade metabólica (produção de CO₂, consumo de O₂, atividade enzimática). Mitchell (1992) já apontava a dificuldade de estimar a biomassa a partir dos dados de produção de CO₂ após a fase de crescimento exponencial. Matcham et al. (1984) mostraram que a atividade da enzima laccase é bom parâmetro para estimação de biomassa de *Agaricus bisporus* apenas nas primeiras 56h de cultivo.

6. CONCLUSÕES

A quantificação de biomassa, apesar de ser um parâmetro fundamental para o desenvolvimento de bioprocessos, ainda tem de ser muito estudada em CES. As técnicas desenvolvidas têm se destinado basicamente aos processos envolvendo fungos filamentosos, enquanto a análise por contagem em placas, tradicionalmente recomendada para bactérias, ainda não mostra a precisão desejada.

Por outro lado, a estimação da biomassa por métodos indiretos, através da medida da produção de CO₂, representa uma perspectiva muito promissora para o monitoramento e controle de bioprocessos.

Os próximos passos deste trabalho envolvem o estabelecimento de balanços de água e energia no sistema. Para tanto, haverá o monitoramento da umidade no leito, da umidade relativa e temperatura do ar de entrada e saída do biorreator, além do monitoramento da temperatura de entrada e saída da água da camisa.

Será determinada a relação entre produção de CO₂ e redução de massa seca do leito. Segundo Nagel et al. (2000), esta relação é linear, já que os sólidos do leito são convertidos em CO₂ pelo metabolismo microbiano. A medida da massa seca do leito é importante para que se possa escolher a melhor forma de expressar a quantidade de

biomassa, conforme citado por Mitchell (1992).

7. REFERÊNCIAS

GERVAIS, P.; MOLIN, P. The role of water in solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.*, v.13, p.85-101, 2003.

HECK, J.X. *Produção, purificação e caracterização de uma xilanase (EC 3.2.1.8) excretada pelo isolado amazônico Bacillus circulans BL53 em cultivo semi-sólido*. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. UFRGS, 2005.

EDGAR, T.F.; HIMMELBLAU, D.M. *Optimization of Chemical Processes*. McGraw-Hill, New York, 1988.

KOUTINAS, A.A.; WANG, R.; WEBB, C. Estimation of fungal growth in complex, heterogeneous culture. *Biochem. Eng. J.*, Berlin, v.14, p.93-100. 2003.

LEKHA, P.K.; LONSANE, B.K. Biomass estimation in solid state fermentation. In: PANDEY, A. (ed.). *Solid state fermentation*. Wiley: New Delhi, India. 1994.

LONSANE, B.K. Resurgence of interest in solid-state fermentation: Reasons and justification. In: PANDEY, A. (ed.). *Solid state fermentation*. Wiley: New Delhi, India. 1994.

MATCHAM, S.E.; JORDAN, B.R.; WOOD D.A. Estimation of fungal biomass in a solid substrate by 3 independent methods. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* v.21(1-2): 108-112. New York: Springer. 1985.

MITCHELL, D.A. Biomass estimation in solid-state cultivation. In: DOELLE, H.W.; MITCHELL, D.A.; ROLZ, C.E. (Eds.) *Solid substrate cultivation*. Cap.4, p.53-63. London: Elsevier. 1992.

MITCHELL, D.A.; LONSANE, B.K. Definition, characteristics and potential. In: DOELLE, H.W.; MITCHELL, D.A.; ROLZ, C.E. (Eds.) *Solid substrate cultivation*. Cap.4, p.53-63. London: Elsevier. 1992.

MITCHELL D.A.; MEIEN, O.F. von; KRIEGER, N.; DALSENER, F.D.H. A review of recent developments in modeling of microbial growth kinetics and intraparticle phenomena in solid state fermentation. *Biochem. Eng. J.*, Berlin, v.17, p.15-26. 2004.

NAGEL, F.-J.J.I.; TRAMPER, J.; BAKKER, M.S.N.; RINZEMA, A. Temperature control in a continuously mixed bioreactor for solid-state fermentation. *Biotechnol. Bioeng.*, New York. v.72(2), p.219-230. 2001.

PANDEY, A. Solid-state fermentation: An overview. In: PANDEY, A. (ed.). *Solid state fermentation*. Wiley: New Delhi, India. 1994.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.*, v.13, p.81-84, 2003.

RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *J. Biotech.*, Amsterdam, v.1, p.1-15, 1998.

SATO, K.; NAGATANI, M.; NAKAMURA, K.; SATO, S. Growth estimation of *Candida lipolytica* from oxygen uptake in a solid state culture with forced aeration. *J. Ferment. Technol.* v.61, no.6, p.623-629, 1983.

SAUCEDO-CASTAÑEDA, G.; LONSANE, B.K.; NAVARRO, J.M.; ROUSSOS, S.; RAIMBAULT, M. Control of carbon dioxide in exhaust air as a method for equal biomass yields at different bed heights in a column fermentor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.37, p.580-582, 1992.

SMITH, R.M. *Gas and Liquid Chromatography in Analytical Chemistry*. Wiley, Suffolk, 1988.

SUGAMA, S.; OKAZAKI, N. Growth estimation of *Aspergillus oryzae* cultured on solid media. *J. Ferment. Technol.* v.57, no.5, p.408-412, 1979.