

# "SACARIFICAÇÃO DO CAULE DO ABACAXIZEIRO E SUA FERMENTAÇÃO POR *Saccharomyces cerevisiae*"

Dr. Raúl J. H. Castro-Gómez<sup>a</sup>

## RESUMO

A informação apresentada neste trabalho mostra resultados preliminares da pesquisa na produção de hidrolisados enzimáticos do caule de abacaxizeiro e sua subsequente fermentação a etanol pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*. O caule do abacaxizeiro seco e moído (tamanho partícula entre 0.84 e 0.42 mm) foi submetido a um pré-tratamento térmico a 100°C durante diferentes tempos antes da sua sacarificação com a enzima amiloglucosidase (50 UI/mg). Quando o caule do abacaxizeiro foi submetido a 100°C durante 10 minutos, forneceu um substrato mais susceptível à hidrólise enzimática em relação ao fornecido pelo caule sem pré-tratamento. Tempos maiores de pré-tratamento a 100°C não melhoraram a susceptibilidade do substrato à enzima. A sacarificação do amido presente inicialmente no caule foi de 71,77%. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi capaz de transformar os hidrolisados do caule do abacaxizeiro obtidos de acordo ao indicado acima, a etanol, sob as condições de fermentação de 30°C, pH 3,5 e 50 cpm de agitação. A fermentação alcoólica foi realizada em meio contendo 1% de extrato de levedura, 1% de sulfato de amônio e 3,3% de açúcares redutores de hidrolisado enzimático do caule do abacaxizeiro. Foram produzidos 0,431 g de etanol e 0,044 g de biomassa por grama de açúcar redutor consumido. O rendimento alcoólico foi 84,46% do valor teórico. Na base destes resultados o caule seco do abacaxizeiro pode proporcionar 282 litros de etanol/ton.

**Palavras-chave:** Produção de etanol; Sacarificação, Resíduos agrícolas; *Saccharomyces cerevisiae*.

## 1- INTRODUÇÃO

Nos últimos anos a utilização de resíduos agrícolas tem sido tema de muitos projetos de pesquisa devido a que estes constituem fontes de matéria prima renováveis e de grande potencial para a produção de energia<sup>5,6,7</sup>.

O Brasil é um dos maiores produtores de abacaxi ocupando em 1983 o terceiro lugar na produção mundial. A produção brasileira concentra-se nas regiões Nordeste e Sudeste, destacando-se o Estado da Paraíba como o maior produtor nacional, seguido de Minas Gerais, que vem tendo posição de destaque no mercado nacional<sup>1</sup>. Este Estado teve sua produção aumentada em cerca de 78% do ano de 1980 a 1984, o que evidência o crescente progresso desta cultura<sup>9</sup>.

O fruto, parte comestível e comercializável, representa apenas 22,5% do abacaxizeiro sendo os 77,5% restante, folhas, caules e raízes, considerados resíduos agrícolas<sup>3</sup>.

De acordo com OLIVEIRA & COUTO<sup>17</sup> 1 hectare de abacaxizeiro produz 15,4 toneladas de matéria prima seca, ou seja, soqueira seca. A importância de se dar uma utilização a soqueira cresce ao relacionarmos a área plantada de abacaxizeiro em Minas Gerais de 10.436 ha estando 9.198 ha concentrados no Triângulo Mineiro com a produção de soqueira de 15,4 t/ha e verificarmos que 160.714 e 141.649 toneladas de soqueira seca vêm sendo consideradas resíduos agrícolas ainda não aproveitáveis em Minas Gerais e no Triângulo Mineiro, respectivamente. Este resíduo possui uma composição química rica destacando-se com altos teores de amido, proteína e enzimas proteolíticas (bromelinas)<sup>3,17</sup>.

Trabalhos realizados por MARZOLA & BARTHOLOMEW<sup>14</sup> e CARVALHO et alii<sup>4</sup>, demonstram que a parte vegetativa e particularmente o caule do abacaxizeiro apresentam teores de amido elevados próximos ou superiores aos da mandioca. CARVALHO et alii<sup>4</sup> estudando 17 cultivares de abacaxi demonstraram que caules das cultivares "Smooth Cayenne Liso" e "Smooth Cayenne Espinhoso" sobressairam com altos teores de amido próximos a 20%, e que este poderá ser

utilizado como matéria prima para produção de amido comercial, álcool etílico e em usos alimentares, porém a qualidade deste amido, para estas finalidades industriais ainda não está caracterizada, necessitando de estudos nesta área.

O presente trabalho tem como objetivo realizar experimentos preliminares sobre o aproveitamento do amido do caule do abacaxizeiro na produção de etanol, deixando assim para uma segunda etapa a otimização do processo.

## 2 - MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 - Material

#### 2.1.1 - Microorganismos

A levedura utilizada neste trabalho foi a *Saccharomyces cerevisiae* isolado do fermento de panificação, mantida em agar inclinado de extrato de malte (10%) e transferido regularmente para manter a sua viabilidade.

#### 2.1.2 - Caule de abacaxizeiro

O caule de abacaxizeiro foi obtido em Piumhi, MG. Seco à 60°C e moído em moinho Arno Mod. AMt 48b até um tamanho de partículas entre 0.84 e 0.42mm. Este produto continha 57,46% amido, 9,41% celulose, 14,54% hemicelulose e 2,14% de lignina em base seca.

#### 2.1.3 - Enzima

A enzima para a sacarificação do caule do abacaxizeiro foi amiloglucosidase da Merck com 50UI/mg de atividade, à 60°C e pH 4.8.

### 2.2 - Métodos

#### 2.2.1 - Determinação do Tempo de Pré-tratamento Térmico do Caule do Abacaxizeiro

O caule do abacaxizeiro seco e moído foi tratado à 100°C durante 5, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos em solução tampão citrato 0,05 M, pH 4,8 (10ml) e uma concentração de sólidos de 1%. Após estes tempos de aquecimento os tubos foram

a Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos - CCA/UFL

imediatamente esfriados e seu volume ajustado a 10 ml com solução tampão. A seguir foram adicionadas 2,0mg da enzima amiloglucosidase (100UI) a cada tubo e colocados à 60°C em banho maria durante 3,0 horas. O teor de açúcares redutores antes e após a sacarificação foi determinada pelo método de SOMOGYI & NELSON<sup>15</sup>. O melhor tempo de aquecimento a 100°C foi determinado tendo como critério a produção de açúcares redutores.

#### 2.2.2 – Hidrólise Enzimática do Caule de Abacaxizeiro

A hidrólise enzimática do caule do abacaxizeiro consistiu no pré-tratamento térmico de uma solução 5% (p/v) de caule do abacaxizeiro seco e moído (entre 0,84 e 0,42mm) em tampão citrato 0,05 M pH 4,8 durante 10 minutos à 100°C. A seguir esta solução foi esfriada até 60°C e adicionada 100 mg (5.000 UI) da enzima amiloglucosidase, deixando-a atuar durante 3,0 horas. Após este período o hidrolisado líquido foi separado por filtração. A eficiência de sacarificação foi determinada pela seguinte fórmula

$$\frac{(\% \text{ Amido inicial} - \% \text{ amido final})}{\% \text{ Amido inicial}} \times 100$$

#### 2.2.3 – Fermentação Alcólica de Hidrolisado Enzimático do Caule de Abacaxizeiro

##### – Preparo do meio de fermentação:

O meio de fermentação foi constituído de: 1% de extrato de levedura, 1% de sulfato de amônio dissolvidos em 100 ml de hidrolisado de caule de abacaxizeiro com 3,3% de açúcares redutores. Posteriormente o conjunto foi autoclavado 15 minutos à 121°C o pH do meio de fermentação estéril e frio ajustado para pH 3,5 com HCl 2N estéril.

##### – Preparo do inóculo:

Uma amostra de 50 ml de meio caldo extrato de malte inoculado com *S. cerevisiae*, foi incubada à 30°C em agitador recíproco (100 cpm) durante 48 horas. Após este tempo e meio foi assepticamente centrifugado a 5.900 x g durante 3 minutos a 5°C e a massa celular assim obtida, foi lavada por centrifugação sob as mesmas condições acima descritas, com 20 ml de solução 0,85% NaCl estéril.

Após a lavagem, a massa celular foi ressuspensa em 10 ml de solução salina esterilizada.

##### – Fermentação alcólica:

Frascos erlenmeyers de 250 ml contendo 100 ml de meio de fermentação descrito acima, foram inoculados com 10 ml de suspensão de *Saccharomyces cerevisiae* obtida de acordo com o item anterior. Os frascos foram incubados em banho maria à 30°C e 50 cpm de agitação. Amostras de 3,0 ml de meio de fermentação foram retiradas assepticamente para determinações periódicas de açúcares redutores, massa celular e concentrações de etanol de acordo com os itens 2.2.4; 2.2.5 e 2.2.6, descritos a seguir.

#### 2.2.4 – Determinação de Açúcares Redutores

Os açúcares redutores foram determinados de acordo com o método de SOMOGYI & NELSON<sup>15</sup>.

A absorbância da solução foi determinada à 540 nm em espectrofotômetro Perkin Elmer Júnior III, Coleman 618.

#### 2.2.5 – Determinação de Massa Celular

As determinações de massa celular foram feitas medindo-se a absorbância de uma suspensão de células lavadas e resuspensas em água salina (0,85% NaCl) a 605 nm em espectrofotômetro Perkin Elmer Júnior III, Coleman 618. Os valores de biomassa em g/l foram calculados através de curvas padrão relacionado absorbância a 605 nm e peso seco.

#### 2.2.6 – Determinações de Etanol

As determinações de etanol foram realizadas de acordo

com o método de KAYE & HAAG<sup>11</sup>. O conteúdo de etanol da amostra foi extrapolada da curva padrão de etanol absoluto (2%).

#### 2.2.7 – Determinação de Amido

As determinações de amido foram realizadas de acordo com o método de hidrólise ácida de AOAC número 3.017<sup>16</sup>.

#### 2.2.8 – Determinação de Celulose

O teor de celulose do caule do abacaxizeiro foi determinado de acordo com o método descrito por UPDEGRAFF<sup>20</sup>. O conteúdo de celulose da amostra foi extrapolada de curva padrão de celulose

#### 2.2.9 – Determinação de Hemicelulose

A determinação de hemicelulose do caule do abacaxizeiro foi feita de acordo com o método de BAILEY<sup>2</sup>.

#### 2.2.10 – Determinação de Lignina

A determinação de lignina foi realizada de acordo com a mesma técnica T 222 m-54 recomendada pela "Technical Association of the Pulp and Paper Industry", TAPPI<sup>19</sup>.

#### 2.2.11 – Determinação de Umidade

Para a determinação de umidade, as amostras foram mantidas em estufa à 105°C até peso constante.

### 3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

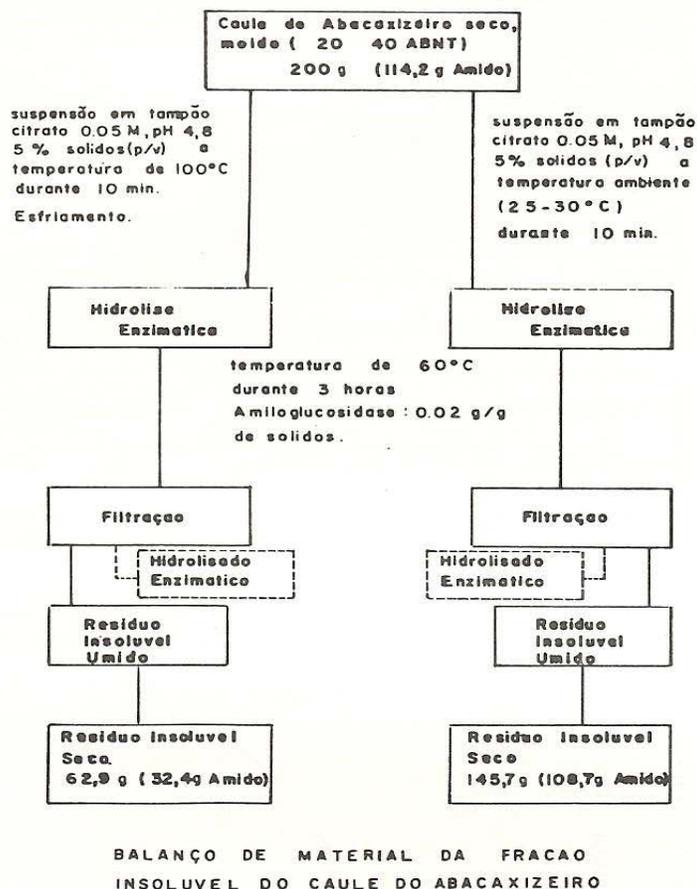
#### 3.1 – Pré-tratamento térmico e sacarificação do caule do abacaxizeiro

O pré-tratamento térmico e sacarificação do caule do abacaxizeiro foi realizado de acordo com o método descrito no item 2.2.2. O fluxograma da Figura 1 ilustra o procedimento adotado e as Figuras 2 e 3 os resultados obtidos.

Pode-se observar na Figura 2 que quando o caule do abacaxizeiro não foi pré-tratado, sua sacarificação foi lenta e de baixa eficiência. Isto fica mais evidente ainda na Figura 1, ao verificar-se que de 114,2 gramas de amido presentes inicialmente no substrato, ficam 108,77 gramas no produto ao final da sacarificação, o que equivale a um rendimento de sacarificação de 5,35%. Por outro lado, e como consequência, do anterior, a perda de peso verificada na Figura 1, foi de 27, 14%. Na Figura 3 pode-se observar o efeito do tempo de aquecimento do substrato na produção de açúcares redutores pela ação subsequente da enzima amiloglucosidase à 60°C e pH 4,8 (Tampão citrato). Note-se que o substrato se faz mais susceptível até 10 minutos de aquecimento, não verificando-se melhoras com tempos maiores de aquecimento. Como mostra a Figura 2, o caule pré-tratado à 100°C por 10 minutos apresenta uma sacarificação bem mais eficiente do que no caso de caule sem aquecimento. Assim de um conteúdo de amido inicial de 114,2 g, ficaram no substrato ao final de três horas de sacarificação, 32,44 g de amido o que significa uma eficiência de 71,59%. Como consequência disto a perda de peso foi de 68,55% (Fig.1). Sabe-se que a gelatinização do amido acontece à temperaturas que variam de acordo com o tipo de amido, o que favorece a hidrólise do mesmo pelas enzimas amilolíticas CRUZ<sup>8</sup>, LEACH<sup>12</sup> & ROSENTHALL<sup>18</sup>. Assim, temperaturas médias acima de 70°C favorecem a sacarificação do amido, fato este demonstrado na Figura 2.

#### 3.2 – Fermentação de hidrolisado do caule do abacaxizeiro

A fermentação do hidrolisado do caule do abacaxizeiro foi realizada de acordo com o item 2.2.3 e os resultados obtidos são apresentados nas Figuras 4, 5 e 6. Os resultados da cinética de fermentação estão ilustrados no Quadro 1.



QUADRO 1 – Valores cinéticos da fermentação do hidrolisado de caule de abacaxizeiro.

CRESCIMENTO CELULAR	PRODUÇÃO DE ETANOL	CONSUMO DE AÇÚCAR REDUTOR
h <sup>-1</sup>	*g x g <sup>-1</sup> x h <sup>-1</sup>	**g x g <sup>-1</sup> x h <sup>-1</sup>
0,0148	0,1897	0,438

\* Gramas de etanol/grama de levedura/hora.  
 \*\* Gramas de substrato/grama de levedura/hora.

Como pode ser observado na Figura 4, houve um consumo lento de açúcares redutores durante as primeiras 2 horas de fermentação com uma taxa específica de consumo de 0.0926 g açúcares redutores x g<sup>-1</sup> de levedura x h<sup>-1</sup>. Após este período houve um aumento desta taxa para 0.3593 g x g<sup>-1</sup> x h<sup>-1</sup>, chegando a um máximo as 4 horas de fermentação, com um valor de 0.438 g x g<sup>-1</sup> x h<sup>-1</sup> e uma velocidade de consumo de 1.485 g x açúcares redutores/hora. Após este período esta taxa específica de consumo começa a diminuir na medida que aumenta a concentração de leveduras no meio de fermentação, chegando a valores de 0.0172 g x g<sup>-1</sup> x h<sup>-1</sup> na trigésima quarta hora da fermentação. Após este período de fermentação verifica-se também um consumo total de 30,42 g de açúcares redutores deixando de serem utilizados 2,92 g de açúcares redutores por litro de meio (8,76% do total) ou seja há um aproveitamento de 91,24% dos açúcares presentes ao início da fermentação.

Na figura 5 pode-se observar que a produção de etanol do hidrolisado enzimático do caule do abacaxizeiro está associado com a velocidade máxima de consumo de substrato. A concentração do etanol atingiu um valor máximo de 13.1 g/l após

26 horas de fermentação, e em seguida apresenta uma tendência a diminuir. Este fenômeno tem sido observado por outros pesquisadores que além de atribuírem esta diminuição na concentração de etanol a um processo de assimilação oxidativa por parte da levedura, sugerem perdas por evaporação do etanol produzido (MALESKA & SCHNEIDER<sup>13</sup>). A maior velocidade de produção de etanol, 0,626 g/h foi verificada no período de 3 à 19 horas de fermentação com uma taxa específica máxima de aproximadamente 0,1897 g de álcool x g<sup>-1</sup> de levedura x h<sup>-1</sup> (às duas horas de fermentação). Esta taxa específica foi mantida com pouca variação até as 6 horas de fermentação onde a taxa foi de 0,1794 g x g<sup>-1</sup> x h<sup>-1</sup>. Considerando a produção de etanol durante 26 horas de fermentação e o consumo de açúcares redutores no mesmo período de 28,74 g as gramas de etanol produzidas por cada grama de açúcar redutor consumido pela levedura correspondeu a 0,456. Assumindo que, o rendimento teórico de transformação de glicose à etanol é de 0,51 g de etanol/g de glicose e considerando-se o consumo de 28,74 g de açúcares redutores nas 26 horas de fermentação onde acontece a máxima concentração de etanol (13,1 g/L), o rendimento de produção de etanol durante a fermentação no hidrolisado do caule foi de 89,37% do valor teórico.

Estes valores são considerados normais e comparáveis aos obtidos por GONG et alii<sup>10</sup> utilizando a *Saccharomyces cerevisiae*. Segundo esses pesquisadores, 90% da glicose foi consumida pela levedura nas primeiras 24 horas de fermentação e a produção de Etanol em meio contendo 6% de glicose, foi de 2.85% (p/v).

A Figura 6 mostra o crescimento celular com a formação de 1.55 g após a trigésima quarta hora de fermentação. A *Saccharomyces cerevisiae* apresentou uma taxa de crescimento específico de 0,0148 h<sup>-1</sup> no início da fermentação, a qual foi caindo lentamente durante as primeiras 6 horas de fermentação quando atingiu uma taxa de 0,0138 h<sup>-1</sup>. Na trigésima quarta hora de fermentação esta taxa foi de 0,00996 h<sup>-1</sup>. Pode-se observar na Figura 6 que o crescimento foi constante, a razão de 0,048 g/h, durante o tempo que durou a fermentação. A formação de massa celular em função do consumo de substrato foi de 0,0509 g de levedura por g de açúcar redutor consumido, o que estaria indicando que o substrato está sendo utilizado principalmente para a produção de etanol. Considerando-se que a célula de levedura apresenta na sua composição entre 45 - 50% de carbono em base seca, verificou-se que 5,8% dos açúcares redutores foi destinado à formação de biomassa e 77% destes açúcares foi destinado para a formação de etanol. O resto não foi utilizado (8.76%) ou foram destinados à formação de outros produtos (8.37%). Para todos os fins, os açúcares presentes no hidrolisado de caule de abacaxizeiro, são considerados como glicose, seja pela especificidade da enzima, seja pela própria composição do caule.

#### 4 – CONCLUSÃO

Com base nestes resultados e tendo-se em conta as restrições experimentais, pode-se concluir que o rendimento de produção de etanol aproveitando o hidrolisado caule do abacaxizeiro como substrato, seria de 282 L de etanol/ton. de caule seco.

Considerando-se que estes resultados correspondem a fase inicial de projetos por nós realizados, cabe ressaltar que outros trabalhos vem sendo elaborados visando melhores condições de sacarificação estudando principalmente as etapas de pré-tratamento do caule do abacaxizeiro.

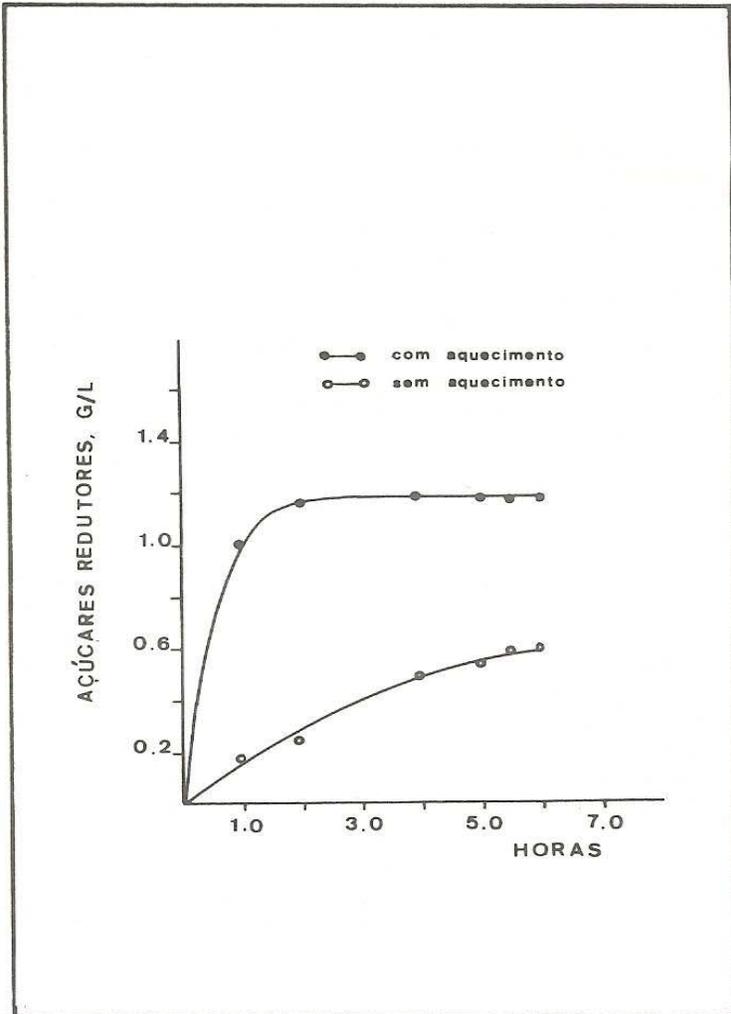


FIGURA 2 – Efeito do tratamento térmico na hidrólise enzimática do caule do abacaxizeiro

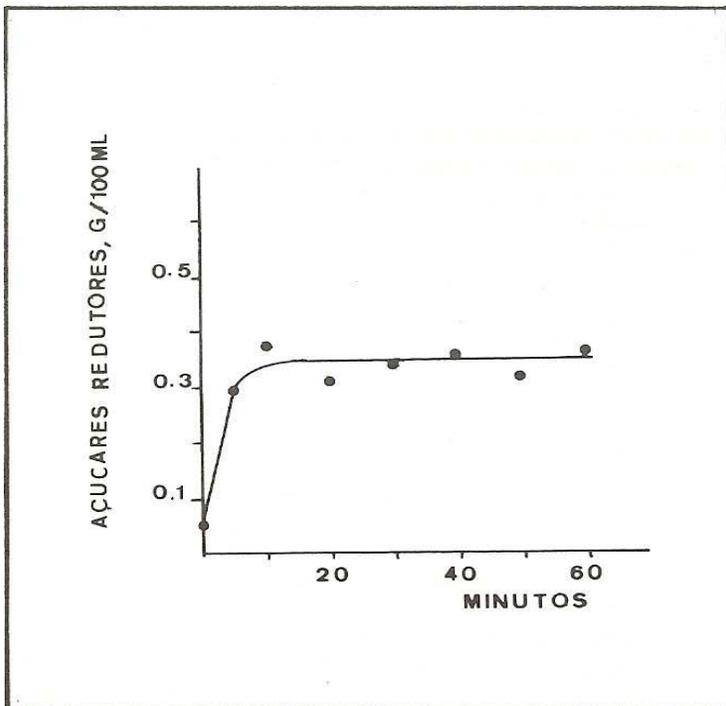


FIGURA 3 – Efeito do tempo de aquecimento a 100°C na hidrólise enzimática do caule do abacaxizeiro

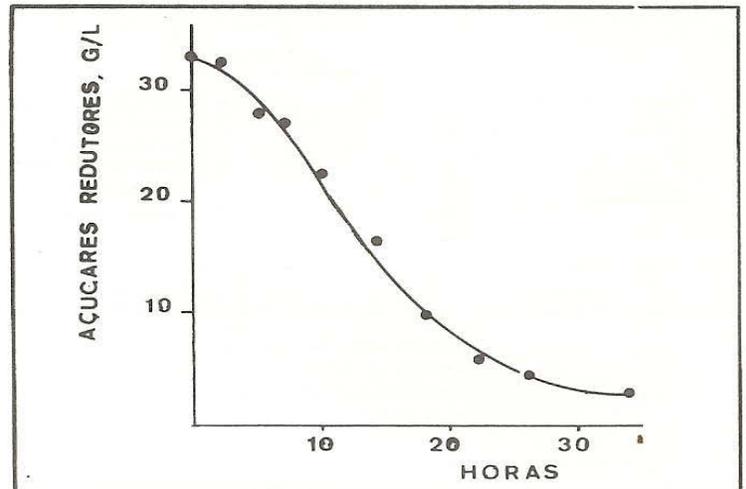


FIGURA 4 – Consumo de açúcares redutores do hidrolisado enzimático do caule de abacaxizeiro durante a fermentação por *Saccharomyces cerevisiae*

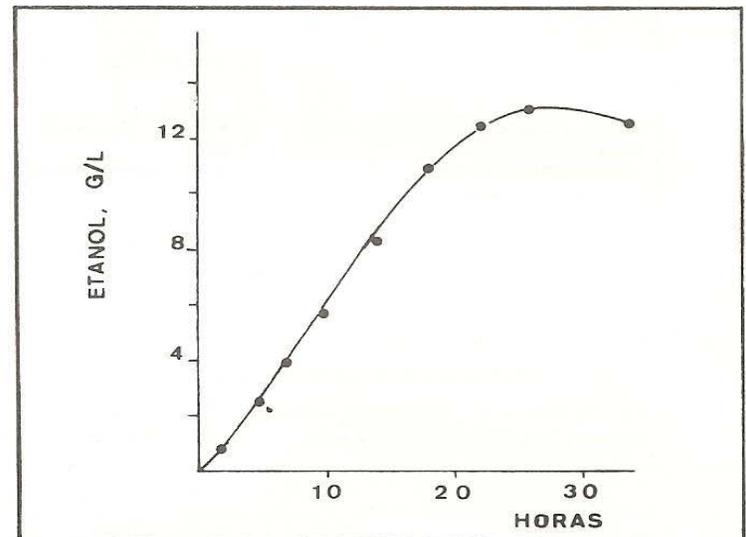


FIGURA 5 – Produção de etanol do hidrolisado enzimático do caule do abacaxizeiro durante a fermentação por *Saccharomyces cerevisiae*

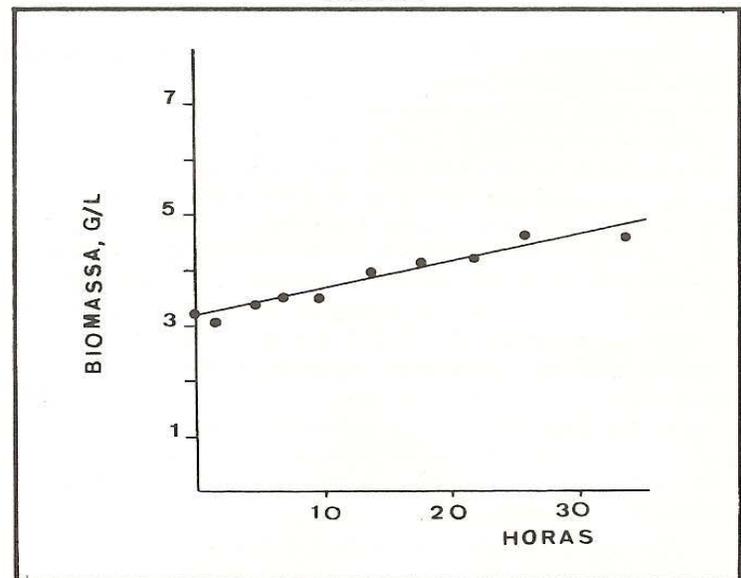


FIGURA 6 – Crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* durante a fermentação do hidrolisado enzimático do caule do abacaxizeiro

## ABSTRACT

The preliminary results obtained in the study on the production of enzymatic hydrolysate from pineapple plant stem and its fermentation to ethanol by the yeast *Saccharomyces cerevisiae* are presented. The dried and milled (40 mesh screen) plant stem was pretreated at 100°C for 10 min. in 1% aqueous solution before its saccharification with amiloglucosidase (50 IU/mg). Starch saccharification yield was 71.77%. The alcoholic fermentation was performed on the hydrolysate (reducing sugar content: 3.3% d.w.) with the addition of 1% yeast extract, 1% ammonium sulphate. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* was able to transform the substrate to ethanol at 30° pH 3.5 and 50 cpm of agitation. For each gram of reduced sugar, 0.431 g of ethanol and 0.0447 g of biomass were produced. The alcoholic yield was 84.46% of the theoretical value. In view of these results, it is concluded that the pineapple plant stem could yield 282 Liters of ethanol/ton.

**Key words:** Ethanol production; Saccharification; Agricultural wastes; *Saccharomyces cerevisiae*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. Rio de Janeiro, IBGE. V. 44, 1983.
- 2 - BAILEY, R. W. Quantitative studies of ruminant digestion. II. Loss of ingested carbohydrates from the reticulo rumen. *J. Agricultural Research, New Zealand*, 10: 15-32, 1967.
- 3 - CARVALHO, V. D. de. Utilização dos resíduos do abacaxizeiro. *Inf. Agropec.*, Belo Horizonte, 11(130):73-76, Out., 1985.
- 4 - CARVALHO, V. D. de.; CUNHA, G. A. P.; PAULA, M. B. de; e CHITARRA, M. I. F. Teores de carboidratos no caule de algumas cultivares de abacaxi. *Pesq. Agropec. Brasil.*, Brasília, 20(2): 197-200, Feb., 1985.
- 5 - CASTRO-GOMEZ, R. J. H. Sacarificação da hemicelulose do bagaço de cana de açúcar e sua fermentação por *Pachysolen tannophilus*. Campinas, 1985. Tese Doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola, Universidade Estadual de Campinas, Campinas - São Paulo.
- 6 - CASTRO-GOMEZ, R. J. H. & PARK, Y. K. Conversion of Cane Bagasse to Compost and its Chemical Characteristics. *J. Ferment Technol.* 61(3): 329-332, 1983.
- 7 - CASTRO-GÓMEZ, R. J. H. & PARK, Y. K. Production of compost with bagasse and vinasses for cane crop in Brasil. *The Sugar Journal*, October, 1982.
- 8 - CRUZ, R. & EL-DASH, A. A. Isolamento e caracterização de Amido de Chuchu. *Revista Ceres*, 31(175): 173-188.
- 9 - ESTANISLAU, M. L. L. Aspectos Econômicos da Abaxicultura. *Inf. Agropec.*, Belo Horizonte, 11(130): 3-8, out. 1985.
- 10 - GONG, C. S.; CHEN, L. F.; FLICKINGER, C.; CHIANG, C. L. and TSAO, G. T. Production of Ethanol from D-xylose by using d-xilose isomerase and yeast. *Appl. Environ. Microbiol.* 41(2): 430-436, Feb., 1981.
- 11 - KAYE, S. & HAAG, H. B. J. Determination of Ethyl Alcohol in Blood. *J. Forensic. Med.*, 1:373, 1954.
- 12 - LEACH, H. W. Gelatinization of Starch. In: *Starch: Chemistry and Technology*, Ed by R. L. Whistler and E. F. Paschall. New York and London, Academic Press, 1965. v.1, p. 296.
- 13 - MALESZKA, R. & SCHNEIDER, H. Concurrent production and consumption of Ethanol by cultures of *Pachysolen tannophilus* growing on b-xylose. *Appl. Environ. Microbiol.*, 44(4): 909-912, Oct., 1982.
- 14 - MARZOLA, D. L. & BARTHOLOMEW, D. P. Photosynthetic Pathway and Biomass energy production. *Science*, 205(10): 555-559, 1979.
- 15 - NELSON, N. A photometric adaptation of Somogyi Method for the Determination of Glucose. *J. Biological. Chemists*, 153:375, 1944.
- 16 - OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS OF THE ASSOCIATION OF ANALYTICAL CHEMISTS. 11<sup>th</sup> Ed. Method. n<sup>o</sup>3.017, Washington, 1970.
- 17 - OLIVEIRA, M. A. de. & COUTO, F. A. A. Uso dos restos culturais do abacaxizeiro na alimentação bovina. *Inf. Agropec.*, Belo Horizonte, 11(130): 76-78, Out., 1985.
- 18 - ROSENTHAL, F. R. T.; OLIVEIRA, S. M. G. de; ARAUJO, V. M. R. H. de. e SERAPIÃO, M. L. de S. Guandu Bean Starch. I. Properties of the Granules and of the Pastes. *An. Acad. Brasil. Ciência*, 42(4): 695-701, 1970.
- 19 - TECHNICAL ASSOCIATION OF THE PULP AND PAPAER INDUSTRY, TAPPI, Lignin in Wood, T 222 m-54.
- 20 - UPDEGRAFF, D. M. Semi-micro determination of Cellulose in Biological Material. *Anal. Biochem.*, 32: 420-424, 1969.