

Produção fermentativa de ácido láctico a partir do melão da cana-de-açúcar por *Lactobacillus casei*

*Lactic acid production by fermentation from sugarcane molasses with *Lactobacillus casei**

Autores | Authors

Roselene Ferreira OLIVEIRA
Mirian SOUSDALEFF

Universidade Tecnológica Federal do
Paraná (UTFPR)
Curso Superior de Tecnologia em Alimentos
e-mail: oliveiraroselene@hotmail.com
mia_sdff@hotmail.com

✉ **Mirela Vanin dos Santos LIMA**

Universidade Tecnológica Federal do
Paraná (UTFPR)
Curso Superior de Tecnologia em
Processamento de Alimentos
Campus Campo Mourão
Av. João Bento, 2353, Centro
CEP: 87300-030
Campo Mourão/PR - Brasil
e-mail: mvanin@utfpr.edu.br

Heron Oliveira dos Santos LIMA

Universidade Tecnológica Federal do
Paraná (UTFPR)
Curso Superior de Tecnologia em
Processamento de Alimentos
e-mail: heronlima@utfpr.edu.br

Resumo

O ácido láctico possui múltiplas aplicações nas indústrias de alimentos; têxtil; de couro; cosmética; química; e farmacêutica. Ainda podemos citar o emprego do ácido láctico para a obtenção do poli(ácido láctico) (PLA), utilizado pela indústria de embalagens e na confecção de artigos médicos biorreabsorvíveis. Devido a esta ampla aplicabilidade, a obtenção do ácido láctico por via fermentativa é um dos processos mais estudados, buscando-se alternativas para o aumento de produtividade e decréscimo do custo de produção. Embasado no panorama apresentado, o presente trabalho teve como objetivo produzir ácido láctico por via fermentativa descontínua, empregando o melão de cana-de-açúcar hidrolisado como meio de cultivo e o microrganismo *Lactobacillus casei*. A etapa de fermentação foi conduzida a partir de uma solução de melão a 10% (m/v) previamente hidrolisada com invertase e suplementada com extrato de levedura e peptona, ambos sempre nas mesmas concentrações de 0, 1 e 2%. O microrganismo *Lactobacillus casei* foi inoculado e as condições de processo foram: pH 6,2; temperatura 37 °C; e agitação 100 rpm; mantidas por 48 h. Os processos fermentativos foram acompanhados através de: avaliação do aumento da concentração de ácido láctico empregando-se o método do cloreto férrico e leituras espectrofotométricas a 425 nm; avaliação do decréscimo de açúcares redutores utilizando-se o método de Somogyi e Nelson com leituras espectrofotométricas a 520 nm; avaliação do aumento da biomassa; avaliação do aumento da viabilidade celular; e avaliação do decréscimo do pH. Analisando-se os resultados pode-se sugerir que o processo fermentativo foi adequado, assim como as metodologias analíticas empregadas. Após as 48 h de fermentação pôde-se observar decréscimo na concentração de açúcares redutores; aumento da concentração de ácido láctico; aumento da biomassa e da atividade celular do microrganismo utilizado; e decréscimo no valor do pH em função do tempo de fermentação e da concentração de suplementação empregada.

Palavras-chave: Fermentação descontínua; Melão de cana-de-açúcar; Ácido láctico; *Lactobacillus casei*; Suplementação.

■ Summary

The lactic acid has multiple applications in the food, textile, leather, cosmetics, chemicals and pharmaceutical industries. We can still mention the use of lactic acid to produce the poly (lactic acid) (PLA), used by the industry of packaging, and the manufacture of medical articles bioresorbable. Due to the wide applicability of obtaining the lactic acid by fermentative via, it is one of the most studied processes, in order to find alternatives to increase productivity and decrease production cost. Based on the panorama presented, this study aimed to produce lactic acid by employing the batch fermentative molasses from sugarcane hydrolyzed as a means of cultivation and the microorganism *Lactobacillus casei*. The stage of batch fermentation was carried out from a solution of molasses to 10% (w/v) previously hydrolyzed with invertase and supplemented with yeast extract and peptone at concentrations of 0, 1 and 2%. The microorganism, *Lactobacillus casei*, was inoculated and the process conditions were: pH 6.2, temperature 37 °C, stirring 100 rpm, maintained for 48 h. The fermentation processes were followed by: evaluation of increased concentration of lactic acid employing the method of ferric chloride and spectrophotometric reading 425 nm; evaluation of the decrease of reducing sugars using the method of Somogyi and Nelson spectrophotometric readings with the 520 nm; assessment of the increase biomass; assessment of the increase in cell viability, and evaluation of the decrease in pH. Analyzing the results obtained it is suggested that the fermentation processes, as well as the analytical methodologies employed were appropriate, once it could be observed, after the 48 h of fermentation, a decrease in the concentration of reducing sugars, an increase in the concentration of acid lactic; an increase in biomass and cellular activity of the microorganism used, and a decrease in the pH value depending on the time of fermentation and the concentration of supplementation employed.

Key words: *Batch fermentation; Sugarcane molasses; Lactic acid; Lactobacillus casei; Supplementation.*

Produção fermentativa de ácido láctico a partir do melaço da cana-de-açúcar por *Lactobacillus casei*

OLIVEIRA, R. F. et al.

1 Introdução

O ácido láctico é um ácido orgânico de alto valor comercial devido à sua ampla aplicabilidade. Atualmente, cerca de 82% da produção mundial é utilizada pela indústria de alimentos (DEMIRCI et al., 1998; EVANGELISTA e NIKOLOV, 1996), com as funções de diminuição de pH; como agente antimicrobiano; adjuvante de sabor; solvente; estabilizador; umectante; emulsificador; plasticizante, além de ser reconhecido como seguro pela "Food and Drug Administration" (FDA) (LITCHFIELD, 1996).

O ácido láctico, ácido 2-hidroxiopropiônico ou ácido α -hidroxiopropiônico, tornou-se comercialmente importante desde 1881 (BARUFFALDI, 1975), tendo aplicação nas indústrias alimentícia, farmacêutica, cosmética, têxtil, de couro e química. Na indústria química é empregado como matéria-prima para produção de plásticos biodegradáveis (DEMIRCI et al., 1998; EVANGELISTA e NIKOLOV, 1996; JAGNOW e DAWID, 1991; MONTELONGO et al., 1993).

A produção do ácido láctico pode ser realizada por síntese química ou bioconversão através da fermentação láctica (CHOUDHURY et al., 1998), sendo esta última mais vantajosa por ser mais econômica. A produção de ácido láctico em escala comercial ainda é feita, em sua maioria, pela fermentação descontínua (SIEBOLD et al. 1995). De acordo com Buchta (1983) os açúcares representam as melhores fontes de carbono para as bactérias lácticas, porém elas são bastante exigentes em relação às condições do meio para crescimento; havendo, portanto, a necessidade de fonte de nitrogênio, vitaminas e sais minerais para o bom desempenho da fermentação láctica.

Diversos subprodutos e matérias-primas da indústria de alimentos e/ou da agroindústria têm sido empregados para o crescimento de microrganismos pela alta disponibilidade e baixo custo. Exemplos: soro de leite, água de maceração de milho, xarope de milho, levedura de destilaria e melaços (MORAES et al., 1991). Dentre estes, os melaços destacam-se como meio de cultivo nos processos fermentativos, em virtude do alto teor de açúcares, nitrogênio e vitaminas.

Cerca de 18 milhões de toneladas de melaço de cana-de-açúcar são produzidos por ano no Brasil pelo setor sucroalcooleiro. Por seu baixo custo, alta disponibilidade e alto teor de açúcares fermentescíveis, esta matéria-prima vem sendo empregada como substrato para diferentes tipos de fermentação. Para se obter um maior rendimento, tanto da produção de biomassa quanto da produção de ácido láctico, vários pesquisadores têm suplementado o meio de cultivo com fontes de nitrogênio (DEMIRCI et al., 1998; PAYOT et al., 1999; AMRANE e PRIGENT, 1998; SELMER-OLSEN e SORHAUG, 1998).

Dentro deste contexto, o objetivo deste trabalho foi produzir ácido láctico através de fermentação descontínua por *L. casei* a partir de uma solução a 10% (m/v) de

melaço de cana-de-açúcar, previamente hidrolisado com invertase e suplementado com concentrações iguais de extrato de levedura e peptona, variando as concentrações em 0, 1 e 2% (m/v).

2 Material e métodos

2.1 Material

2.1.1 Microrganismo

Foi utilizado *Lactobacillus casei* (Instituto Adolfo Lutz).

2.1.2 Meios de cultivo

Meio de manutenção: *L. casei* foi mantido em tubos contendo ágar MRS (Man-Rogosa-Sharpe). As culturas foram repicadas a cada 4 semanas e incubadas durante 24 h a 37 °C. A seguir foram mantidas em câmara fria a 4 °C.

2.1.3 Meios para fermentação

- caldo MRS (Man-Rogosa-Sharpe); e
- melaço de cana-de-açúcar, previamente tratado com invertase, e suplementado com extrato de levedura e peptona, ambos em concentrações iguais, a 0, 1 e 2% (m/v). O melaço de cana-de-açúcar foi fornecido pela empresa Ecoçucar Agroindustrial Ltda.

2.2 Métodos

2.2.1 Preparo do meio de fermentação

O melaço de cana-de-açúcar foi diluído em água destilada obtendo-se uma solução de concentração 10% (m/v). Em seguida, o pH do meio de melaço de cana-de-açúcar foi ajustado para o valor de 4,7 e a enzima invertase foi incubada por 2 h a 37 °C. A enzima com atividade de 54 U.mg⁻¹ foi utilizada na concentração de 2% (v/v). Após incubação, a invertase foi inativada através de fervura durante 5 min. O pH do meio foi então ajustado para o valor 6,2, o meio foi dividido em três partes iguais de 300 mL e transferidas para três Erlenmeyers (1, 2, 3) de 500 mL seguindo-se a suplementação com peptona e extrato de levedura, ambos nas mesmas concentrações. Erlenmeyer 1: suplementação 0% (0% de extrato de levedura e 0% de peptona); Erlenmeyer 2: suplementação 1% (1% de extrato de levedura e 1% de peptona); Erlenmeyer 3: suplementação 2% (2% de extrato de levedura e 2% de peptona).

2.2.2 Fermentação descontínua

L. casei mantido sob refrigeração foi ativado, três vezes antes de ser utilizado no processo fermentativo,

Produção fermentativa de ácido láctico a partir do melaço da cana-de-açúcar por *Lactobacillus casei*

OLIVEIRA, R. F. et al.

através de repiques sucessivos a cada 24 h, depois de ser cultivado a 37 °C em leite em pó desengordurado na concentração de 10% (m/v). A seguir, foi transferido para o meio de fermentação e mantido a 37 °C durante 24 h. Em seguida, alíquotas de 10% (v/v) foram transferidas para os Erlenmeyers de 500 mL, com controle automático de temperatura de 37 °C e agitação de 100 rpm, contendo 300 mL de meio de fermentação.

2.2.3 Análise do processo fermentativo

O processo fermentativo foi analisado quanto aos parâmetros de rendimento do ácido láctico (g/g), produtividade (g.L⁻¹.h) e consumo de açúcar (%) (KWON et al., 1996). O rendimento foi calculado pela relação da concentração de ácido láctico pela concentração de açúcar consumido; a produtividade, pela relação da concentração de ácido láctico pelo tempo de fermentação; e o consumo de açúcar, fazendo-se a relação da diferença (AR_i – AR_f) pela (AR_i x100) onde AR_i = açúcar redutor inicial e AR_f = açúcar redutor final.

2.2.4 Metodologias analíticas

Alíquotas de amostras foram retiradas dos processos fermentativos em períodos pré-determinados para acompanhar a cinética de produção de ácido láctico e do consumo de açúcares redutores (AR). Avaliaram-se também, no início e ao término dos processos fermentativos, o pH, a viabilidade celular e a biomassa.

- Dosagem de ácido láctico: o ácido láctico foi extraído do caldo fermentado utilizando-se BaCl₂.2H₂O 9,88%, NaOH 0,66 N e ZnSO₄.7H₂O, conforme Silva (1981). O padrão utilizado para a curva de referência foi o lactato de lítio 1% (m/v), extraído nas mesmas condições. A determinação espectrofotométrica do ácido láctico foi realizada a 425 nm;
- Determinação de AR: a determinação de açúcares redutores (AR) foi realizada empregando-se a metodologia proposta por Somogyi (1945) e Nelson (1944) com leituras espectrofotométricas a 520 nm;
- Viabilidade celular: a viabilidade celular foi determinada através da técnica de semeadura em profundidade utilizando-se ágar MRS (ZAYED e WINTER, 1995). As placas foram incubadas a 37 °C durante 48 h;
- Determinação da biomassa: a biomassa foi avaliada a partir de 10 mL de meio de fermentação no início e ao término da fermentação. Foram realizados três ciclos de lavagem com água destilada e centrifugação a 3400 rpm, por 30 min. Então a biomassa foi seca em estufa a 60 °C até peso constante (OLIVEIRA, 2006); e

- Determinação do pH: amostras do caldo fermentado foram utilizadas para determinação de pH com potenciômetro Labmeter modelo PHS-3B.

3 Resultados e discussão

O melaço de cana-de-açúcar diluído a 10% (m/v) apresentou 21 g.L⁻¹ de açúcares redutores e após tratamento com 2% (v/v) de invertase (54 U.mg⁻¹), o teor de açúcares redutores do melaço de cana-de-açúcar 10% (m/v) aumentou para 93,25 g.L⁻¹. O tratamento com invertase elevou em 358,3% os açúcares redutores no meio de fermentação. Oliveira et al. (2005) conseguiu um aumento de 226,9% na concentração de açúcares redutores empregando a mesma metodologia de hidrólise, enquanto Martinez-González et al. (1988) trataram melaço de cana-de-açúcar com ácido sulfúrico 10 e 20% sob temperatura de 60 °C e obtiveram 91,2 e 98% de conversão, respectivamente. Apesar de a hidrólise ácida fornecer índices de conversão elevados e ser utilizada industrialmente, a hidrólise enzimática ainda é mais vantajosa e indicada em processos fermentativos por não gerar compostos indesejáveis (COUTINHO et al., 1999). Os processos biotecnológicos como a sacarificação do amido ou a hidrólise da sacarose são mais rentáveis com a ajuda de enzimas microbianas, uma vez que estas reagem com seus substratos de forma livre ou imobilizadas em suportes sólidos (JAGNOW e DAWID, 1991), o que pode facilitar no processo industrial e evitar o aparecimento de produtos indesejáveis. Neste trabalho, pela análise dos resultados podemos sugerir que a hidrólise enzimática é mais vantajosa pelo alto índice de conversão em açúcares redutores quando comparada à hidrólise ácida.

O acompanhamento da cinética de produção de ácido láctico e do consumo de AR utilizando meios fermentativos de melaço a 10% (m/v) hidrolisados e com 0, 1 e 2%, de suplementação (0% de extrato de levedura e 0% de peptona; 1% de extrato de levedura e 1% de peptona; 2% de extrato de levedura e 2% de peptona) podem ser visualizados nas Figuras 1 e 2.

Analisando-se as Figuras 1 e 2 pode-se observar que a suplementação de 2% de extrato de levedura e 2% de peptona, resultou em maior produção de ácido láctico e maior consumo de AR. Através das Figuras 1 e 2 verifica-se ainda que a produção de ácido láctico, assim como o consumo de AR, estabilizou-se em torno de 45 h de fermentação, sugerindo que o período de 48 h de processo empregado foi suficiente para atingir o máximo de produtividade conseguida para cada sistema.

Os resultados das análises de produção de ácido láctico, consumo de açúcares redutores, biomassa, viabilidade celular e pH, no início e ao término do processo de fermentação descontínua da solução de melaço a 10%, com suplementação de 0, 1 e 2% de extrato de levedura e peptona, pelo *L. casei*, são apresentados na Tabela 1.

Produção fermentativa de ácido lático a partir do melaço da cana-de-açúcar por *Lactobacillus casei*

OLIVEIRA, R. F. et al.

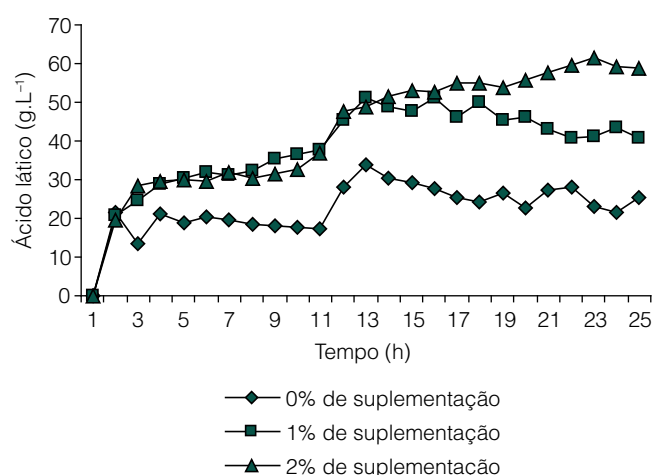


Figura 1. Acompanhamento da cinética de produção de ácido lático utilizando meios fermentativos de melaço a 10% (m/v) hidrolisados e suplementados com: 0% de extrato de levedura e 0% de peptona; 1% de extrato de levedura e 1% de peptona; 2% de extrato de levedura e 2% de peptona.

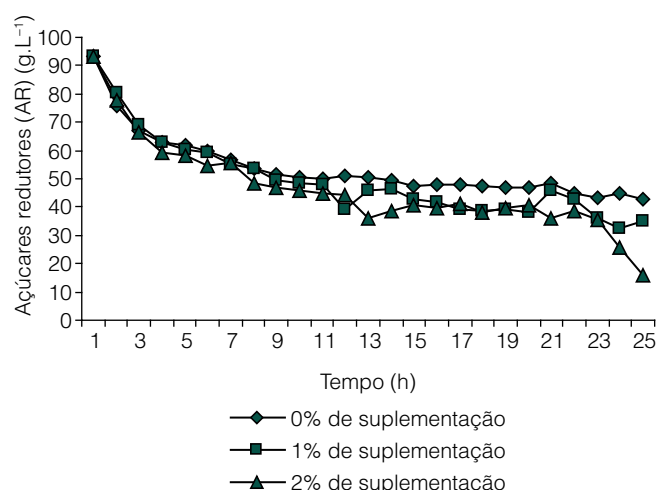


Figura 2. Acompanhamento da cinética de consumo de açúcares redutores (AR) utilizando meios fermentativos de melaço a 10% (m/v) hidrolisados e suplementados com: 0% de extrato de levedura e 0% de peptona; 1% de extrato de levedura e 1% de peptona; 2% de extrato de levedura e 2% de peptona.

Tabela 1. Resultados dos parâmetros analisados no início e ao término da fermentação da solução a 10% (m/v) de melaço de cana-de-açúcar hidrolisado e suplementado com: 0% de extrato de levedura e 0% de peptona; 1% de extrato de levedura e 1% de peptona; 2% de extrato de levedura e 2% de peptona.

Parâmetros analisados	Melaço 0% de suplementação		Melaço 1% de suplementação		Melaço 2% de suplementação	
	Início da fermentação	Final da fermentação	Início da fermentação	Final da fermentação	Início da fermentação	Final da fermentação
pH	6,2	4,1	6,2	3,9	6,2	3,8
AR	93,25 g.L ⁻¹	47,76 g.L ⁻¹	93,25 g.L ⁻¹	35,08 g.L ⁻¹	93,25 g.L ⁻¹	15,81 g.L ⁻¹
Ácido lático	0,00 g.L ⁻¹	25,57 g.L ⁻¹	0,00 g.L ⁻¹	40,65 g.L ⁻¹	0,00 g.L ⁻¹	58,86 g.L ⁻¹
Viabilidade celular	2,01 x 10 ⁴ UFC.mL ⁻¹	3,03 x 10 ⁵ UFC.mL ⁻¹	2,3 x 10 ⁴ UFC.mL ⁻¹	5,08 x 10 ⁴ UFC.mL ⁻¹	2,8 x 10 ⁴ UFC.mL ⁻¹	4,99 x 10 ⁶ UFC.mL ⁻¹
Biomassa	0,007 g.mL ⁻¹	0,03 g.mL ⁻¹	0,008 g.mL ⁻¹	0,04 g.mL ⁻¹	0,009 g.mL ⁻¹	0,06 g.mL ⁻¹

Analisando-se a Tabela 1 observa-se que a produção de ácido lático foi de 25,57; 40,65; e 58,86 g.L⁻¹ para os meios contendo suplementação de 0% de extrato de levedura e 0% de peptona; 1% de extrato de levedura e 1% de peptona; 2% de extrato de levedura e 2% de peptona; respectivamente, mostrando assim que a produção de ácido lático aumenta em função da concentração da suplementação. Neste mesmo sentido observa-se o aumento do decréscimo de AR no meio, o decréscimo do pH e o aumento da biomassa e da viabilidade celular, podendo-se sugerir, portanto, que a suplementação de 2% de extrato de levedura e 2% de peptona; dentre as concentrações estudadas, proporcionou um meio de fermentação mais adequado para o *L. casei* se reproduzir e produzir uma maior quantidade de ácido lático. A importância e a influência positiva da suplementação na produção do ácido lático observada neste trabalho são corroboradas pela literatura consultada, na qual Oliveira et al. (2000) obtiveram 4,7 g.L⁻¹ de ácido lático em melaço a 10% para o *L. curvatus* cultivado em condições similares, porém utilizando melaço de cana-de-açúcar, tratado com invertase, mas sem suplementação. Enquanto que Oliveira et al. (2005), utilizando melaço de cana-de-açúcar a 10% tratado com invertase e suplementado com peptona 4% (m/v) e extrato de levedura 2% (m/v), atingiu um valor de 10,2 g.L⁻¹ de ácido lático, mostrando, assim, claramente a vantagem da suplementação do melaço.

A Tabela 2 apresenta os parâmetros cinéticos avaliados na fermentação descontínua do *Lactobacillus casei* em melaço de cana-de-açúcar a 10% (m/v), previamente tratado com invertase e suplementado com 0% de extrato de levedura e 0% de peptona; 1% de extrato de levedura e 1% de peptona; 2% de extrato de levedura e 2% de peptona.

Avaliando-se a Tabela 2 verifica-se mais claramente a influência da suplementação na produção do ácido lático, sendo que a produtividade calculada foi de 0,53; 0,85 e 1,22 g.L⁻¹.h, para as fermentações com 0% de extrato de levedura e 0% de peptona; 1% de extrato de levedura e 1% de peptona; 2% de extrato de levedura e 2% de peptona.

Produção fermentativa de ácido láctico a partir do melaço da cana-de-açúcar por *Lactobacillus casei*

OLIVEIRA, R. F. et al.

Tabela 2. Parâmetros cinéticos avaliados na fermentação descontínua do *Lactobacillus casei* em melaço de cana-de-açúcar a 10% (m/v), previamente tratado com invertase e suplementado com 0% de extrato de levedura e 0% de peptona; 1% de extrato de levedura e 1% de peptona; 2% de extrato de levedura e 2% de peptona.

Parâmetros cinéticos	Suplementação		
	0%	1%	2%
Rendimento (g/g)	0,56	0,70	0,76
Produtividade (g/L.h)	0,53	0,85	1,22
Consumo de AR %	48,78	62,38	83,04
Tempo de fermentação (h)	48	48	48

2% de peptona; respectivamente. Montelongo et al. (1993) suplementaram melaço de soja 2% (m/v) com extrato de levedura 0,5% (m/v) para produção de ácido láctico por processo descontínuo com *L. salivarius* e obtiveram 5,5 g.L⁻¹ de ácido láctico em 10 h de cultivo, enquanto que em melaço de soja sem suplementação foram obtidos 4,2 g.L⁻¹ em 36 h de cultivo.

4 Conclusões

As metodologias empregadas para a produção do ácido láctico, bem como as metodologias analíticas, se mostraram adequadas para se alcançar o objetivo do trabalho.

O melaço de cana-de-açúcar, previamente tratado com invertase, se mostrou uma alternativa viável como meio de fermentação para a produção de ácido láctico, podendo-se sugerir que a hidrólise da sacarose pela invertase num período de 2 h de tratamento foi capaz de aumentar em 358% a concentração de AR inicial.

O *Lactobacillus casei* se apresentou bastante eficiente para a produção de ácido láctico em meio de fermentação com melaço a 10% (m/v) e suplementação com 2% de extrato de levedura e 2% de peptona, e a concentração de suplementação apresentou grande influência na produtividade do ácido láctico: 0,53 g.L⁻¹.h para fermentação sem suplementação e 1,22 g.L⁻¹.h para 2% de suplementação.

Concluiu-se ainda que 48 h de fermentação foi um período de tempo ótimo para se alcançar a estabilidade do processo fermentativo em termos de produção de ácido láctico e consumo de AR.

Agradecimentos

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR pelo apoio financeiro, e à Ecoçúcar Agroindustrial Ltda. pelo fornecimento do melaço.

Referências

AMRANE, A.; PRIGENT, Y. Influence of yeast extract concentration on batch cultures of *Lactobacillus helveticus*: growth and

production coupling. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 14, n. 4, p. 529-534, 1998.

BARUFFALDI, R. Produção de ácidos por microrganismos. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (Eds.). **Biotechnology: tecnologia das fermentações**. São Paulo: Edgard Blücher, 1975. V. 1, cap. 4, p. 70-87.

BUCHTA, K. Lactic acid. In: REHN, H. J.; REED, G. (Eds.). **Biotechnology**. Florida: Verlag Chemic, 1983. v. 3, cap. 3, p. 409-417.

CHOUDHURY, B.; BASHA, A.; SWAMINATHAN, T. S. Study of lactic acid extraction with higher molecular weight aliphatic amines. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, London, v. 72, n. 2, p. 111-116, 1998.

COUTINHO FILHO, U.; HORI, C. E.; RIBEIRO, E. J. Influence of the reaction products in the inversion of sucrose by invertase. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, São Paulo, v. 16, n. 2, p. 01-08, 1999.

DEMIRCI, A.; POMETTO, A. L.; LEE, B.; HINZ, P. N. Media evaluation of lactic acid repeated-batch fermentation with *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 46, n. 11, p. 4771-4774, 1998.

EVANGELISTA, R. L.; NIKOLOV, Z. L. Recovery and purification of lactic acid from fermentation broth by adsorption. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Berlin, v. 57-58, n. 1, p. 471-480, 1996.

JAGNOW, G.; DAWID, W. **Biotechnology: introducción con experimentos modelo**. Zaragoza: Acibria, 1991.

KWON, Y. J.; KAUL, R.; MATTIASSON, B. Extractive lactic acid fermentation in poly (ethyleneimine)-based aqueous two-phase system. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 50, n. 3, p. 280-290, 1996.

LITCHFIELD, J. H. Microbiological production of lactic acid. In: NEIDLEMAN, S. L.; LASKIN, A. (Eds.). **Advances in Applied Microbiology**. California: Academic Press, 1996. v. 42, cap. 2, p. 45-95.

MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, Y.; QUIROZ-CAMACHO, M. H.; LEDEZMA-PÉREZ, A. S.; JARAMILLO-CORONADO, J. C. Producción de ácido láctico a partir de melaza pretratada utilizando *Lactobacillus delbrueckii*. **Revista Latino-Americana de Microbiologia**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 209-214, 1988.

MONTELONGO, J. L.; CHASSY, B. M.; McCORD, J. D. *Lactobacillus salivarius* for conversion of soy molasses into lactic acid. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 58, n. 4, p. 863-866, 1993.

MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M. F.; MORAES, R. O. Multiplicação de agentes de controle biológico. In: BETTIOL, W. (Ed.). **Controle biológico de doenças de plantas**. Brasília: EMBRAPA, 1991. p. 253-272.

Produção fermentativa de ácido láctico a partir do melaço da cana-de-açúcar por *Lactobacillus casei*

OLIVEIRA, R. F. et al.

NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for determination of glucose. **Biochemistry**, Washington, v. 153, p. 375-380, 1944.

OLIVEIRA, A. R.; BUZATO, J. B.; OLIVEIRA, A. S.; HAULY, M. C. O. Produção de ácido láctico por *Lactobacillus curvatus*, em fermentação contínua, utilizando melaço de cana-de-açúcar previamente tratado com invertase. **Revista Científica da UNOPAR**, Londrina, v. 2, n. 2, p.1-7, 2000.

OLIVEIRA, A. R.; BUZATO, J. HAULY, M. C. O. Produção contínua de ácido láctico por *Lactobacillus curvatus* a partir de melaço de cana-de-açúcar suplementado Semina. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 26, n. 1, p. 53-60, 2005.

OLIVEIRA, M. C. R. **Avaliação do processo de fermentação alcoólica de suco de maçã obtido por liquefação enzimática**. 2006. 92 p. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2006.

PAYOT, T.; CHEMALY, Z.; FICK, M. Lactic acid production by *Bacillus coagulans* - Kinetic studies and optimization of culture medium for batch and continuous fermentations. **Enzyme & Microbial Technology**, New York, v. 24, n. 3-4, p. 191-199, 1999.

SELMER-OLSEN, E.; SORHAUG, T. Comparative studies of the growth of *Lactobacillus plantarum* in whey supplemented with autolysate from brewery yeast biomass or commercial yeast extract. **Milchwissenschaft Milk Science International**, Munchen, v. 53, n. 7, p. 367-370, 1998.

SIEBOLD, M.; FRIELING, P. V.; JOPPIEN, R.; RINDFLEISCH, D.; SCHÈGERL, K.; RÖPER, H. Comparison of the production of lactic acid by three different Lactobacilli and its recovery by extraction and electrodialysis. **Process Biochemistry**, Rickmansworth, v. 30, n. 1, p. 81-95, 1995.

SILVA, D. J. Determinação do pH, da acidez titulável e do ácido láctico da silagem. *Análise de Alimentos: métodos químicos e biológicos*. Viçosa: UFV, 1981. Cap. 14, p. 110-114.

SOMOGYI, M. A. A new reagent for determination of sugar. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 160, n. 1, p. 61-68, 1945.

ZAYED, G.; WINTER, J. Batch and continuous production of lactic acid from salt whey using free and immobilized cultures of Lactobacilli. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 44, n. 3-4, p. 362-366, 1995.