

Produção contínua de ácido láctico por *Lactobacillus curvatus* a partir de melaço de cana-de-açúcar suplementado

Utilization of supplemented sugarcane molasses for continuous production of lactic acid by *Lactobacillus curvatus*

Andréa Rocha de Oliveira¹, João Batista Buzato², Maria Célia de Oliveira Haully^{2*}

Resumo

Melaço é uma matéria prima de baixo custo e rico em nutrientes para a fermentação láctica. O ácido láctico tem aplicação na indústria farmacêutica, cosmética, têxtil, de couro, química e de alimentos, onde são utilizados cerca de 82% de sua produção mundial. Neste trabalho foi avaliada a produção de ácido láctico por *Lactobacillus curvatus* em fermentação contínua de melaço de cana-de-açúcar, previamente tratado com invertase e suplementado com extrato de levedura e peptona. Os valores de taxa de diluição $D=0,05; 0,10$ e $0,15h^{-1}$ foram testados à temperatura de $37^{\circ}C$. As amostras foram coletadas na fase estacionária de crescimento, para medidas de pH, determinação de açúcares redutores, biomassa, produção de ácido láctico e viabilidade celular. Nestas condições, o consumo de açúcares redutores diminuiu de 7,1; 6,4 e 4,8g/L com o aumento respectivo da taxa de diluição. A maior produção de ácido láctico (13,8g/L) foi obtida na taxa de diluição de $0,05h^{-1}$, enquanto que $D=0,10$ e $0,15h^{-1}$ suportaram a produção de 10,2 e 7,1g/L, respectivamente. Os valores mais altos de biomassa (1,98g/L) e viabilidade celular ($2,03 \times 10^9$ UFC/mL) também foram alcançados na menor taxa de diluição ($D=0,05h^{-1}$). A produção de ácido láctico, por *L. curvatus* em melaço, previamente tratado com invertase e suplementado, foi mais adequada na menor taxa de diluição.

Palavras-chave: *Lactobacillus curvatus*, melaço de cana-de-açúcar, suplementação, fermentação contínua, ácido láctico

Abstract

Several by-products and raw-materials of food and agricultural industries have been used as culture medium. It is rich nutrients sources, and it is considered low cost and high availability of molasses as a substrate can be used in lactic fermentation. Lactic acid has traditionally been obtained by chemical process, however, lactic acid production by fermentative process is considered most viable economically. Lactic acid has application in different industries such as pharmaceutical, cosmetic, textiles, leather, chemical and food industries, where about 82% of all world production is used. In this work, lactic acid production by *L. curvatus* under continuous culture on sugarcane molasses supplemented with yeast extract and peptone was evaluated. Dilution rates tested were $0,05; 0,10$ and $0,15h^{-1}$ at $37^{\circ}C$. Samples were taken for pH, reducing sugar, lactic acid, biomass and cellular viability measurements under steady state conditions. When the D was $0,05; 0,10$ and $0,15h^{-1}$, the reducing sugar consumption was 7,1; 6,4 and 4,8g/L, respectively. Highest lactic acid production (13,8g/L) was obtained when $D=0,05h^{-1}$ was used, while at $D=0,10$ and $0,15h^{-1}$, lactic acid production reached 10,2 and 7,1g/L, respectively. The highest values of biomass (1,98g/L) and cell viability ($2,03 \times 10^9$ CFU/mL) were reached at the lowest dilution rate tested ($0,05h^{-1}$). In conclusion, the results showed that under tested conditions, low values of dilution rate were most suitable for continuous lactic acid production by *L. curvatus* in supplemented sugarcane molasses.

Key words: *Lactobacillus curvatus*, sugarcane molasses, supplementation, continuous fermentation, lactic acid

¹ Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos / TAM-UEL

² Docentes do Depto. de Bioquímica e Biotecnologia/UEL Cx. Postal 6001, CEP 86051-970, PR. E-mail: mcoh@uel.br Telefone: 3371-4270 Celular : Fax : 3371- 4611 -(secretaria geral do CCE).

* Autor para correspondência

Introdução

O ácido láctico é um ácido orgânico de alto valor comercial, devido às suas aplicações. Cerca de 82% da produção mundial é utilizada pela indústria de alimentos, sendo o restante utilizado nas indústrias farmacêutica, cosmética, têxtil, de couro e química (DEMIRCI et al., 1998; EVANGELISTA; NIKOLOV, 1996). O ácido láctico pode ser obtido por síntese química ou bioconversão através da fermentação láctica (CHOUDHURY ; BASHA; SWAMINATHAN, 1998), sendo esta mais viável economicamente.

A fermentação láctica pode utilizar diversos glicídeos ou matérias-primas ricas em glicose, sacarose ou lactose. A escolha do carboidrato a ser bioconvertido depende da linhagem selecionada, visto que as cepas diferem quanto ao metabolismo relativo a diferentes fontes de carbono (ROYCHOUDHURY; SRIVASTAVA; SAHAI., 1995). Oliveira (1995) verificou que na fermentação láctica utilizando *L. curvatus* a sacarose não foi a fonte de carbono mais adequada. Desta maneira, substratos ricos em sacarose necessitam de tratamento prévio (ácido ou enzimático) em função da baixa atividade de invertase desse microrganismo.

Diversos produtos e subprodutos da indústria de alimentos e da agroindústria, por serem baratos e abundantes , têm sido empregados como substrato para a produção de substâncias comercialmente importantes como ácidos orgânicos, acetona, etanol e outros (MORAES; CAPALBO; MORAES, 1991). Resíduos e matérias-primas agroindustriais que contém alto teor de carboidratos podem ser utilizados na fermentação láctica, sendo que o soro de leite e melaço são os de maior interesse econômico.

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 fermentáveis, 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 (DEMERCI et al., 1998; PAYOT; CHEMALY; FICK, 1999; AMRANE; PRIGENT, 1998; SELMER-OLSEN; SORHAUG, 1998).

O objetivo deste trabalho foi produzir ácido láctico através de fermentação contínua por *L. curvatus* a partir de melaço de cana-de-açúcar, previamente tratado com invertase e suplementado com extrato de levedura 2% (m/v) e peptona 4% (m/v) , na concentração de 10% (m/v).

Material e Métodos

Melaço de cana-de-açúcar

Foi utilizado melaço de cana-de-açúcar safra 99/00 procedente da Usina de Açúcar e Álcool da COROL (Cooperativa Agropecuária Rolândia Ltda.) localizada na região Norte do Paraná. A matéria-prima continha, em média, 70% de açúcares totais, sendo 54% de sacarose e 16% de açúcares redutores.

Microrganismo

Foi utilizado *Lactobacillus curvatus* isolado de silagem de milho por Oliveira (1995), mantido em ágar MRS , ágar MRS inclinado contendo proteose peptona, extrato de carne, extrato de levedura, glicose, complexo monooleato e sorbitol, citrato de amônio, acetato sódico, sulfato de magnésio, sulfato de manganês, fosfato disódico e ágar. O pH inicial foi 6,5. Após autoclavado, o meio foi mantido sob refrigeração a 4°C (MAN; ROGOSA; SHARPE, 1960).

Meio para fermentação

O melaço de cana-de-açúcar diluído a 10% (m/v) em água destilada ,foi tratado com 2% (v/v) de invertase (14,09 U/mL) a 37°C durante 20 minutos a pH 4,7. Após incubação, a reação foi inibida em água fervente por 5 minutos e o meio foi suplementado com extrato de

levedura (Biobrás) na concentração de 2% (m/v) e peptona (Biobrás) a 4% (m/v) e o pH ajustado para 6,2.

Processo fermentativo

L. curvatus mantido sob refrigeração foi ativado, três vezes antes de ser utilizado no processo fermentativo, através de repiques sucessivos a cada 24 horas, após cultivado a 37°C em leite em pó desengordurado e na concentração de 10% (m/v). A seguir, foi transferido para o meio de fermentação e mantido a 37°C durante 24 horas. Em seguida, uma alíquota de 10% (v/v) foi transferida para um fermentador cilíndrico de 0,5L, com controle automático de temperatura de 37°C e agitação de 150 rpm, contendo 0,3L de meio de fermentação. Após 3 horas, para o cultivo atingir a fase logarítmica, foi ligada a bomba peristáltica, iniciando-se a fermentação contínua. Durante o processo fermentativo, foram testadas as taxas de diluição de 0,05; 0,10 e 0,15h⁻¹. Em cada taxa de diluição avaliada, aguardou-se até que o cultivo atingisse a fase estacionária de crescimento, verificado por valores de biomassa, açúcares redutores e ácido láctico constantes. A partir daí, as amostras foram coletadas, no decorrer da 5ª a 10ª geração do microrganismo.

Análise do processo fermentativo

O processo fermentativo foi analisado quanto aos parâmetros de rendimento do ácido láctico (g/g), produtividade (g/L.h) e consumo de açúcar (%) conforme (KWON; KAUL; MATTIASSON, 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 (ARTi – ARTf) pela (ARTi x 100) onde ARTi = açúcar redutor total inicial e ARTf = açúcar redutor total final.

Determinações analíticas

a) Determinação de biomassa

Amostras do caldo fermentado foram centrifugadas a 2000xg por 10 minutos, reservando-se o sobrenadante para as outras análises. O precipitado foi lavado duas vezes com solução salina estéril e centrifugado. A biomassa foi determinada pela medida da densidade óptica da suspensão celular em 600nm e convertida em peso seco (g/L) usando uma curva de calibração de densidade óptica versus biomassa seca (KWON; KAUL; MATTIASSON, 1996).

b) Determinação da viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada por semeadura em profundidade de diluições apropriadas da amostra em ágar MRS (ZAYED; WINTER, 1995) com incubação a 37°C por 48 horas.

c) Determinação de pH

O pH foi monitorado utilizando-se um potenciômetro digital da marca Hanna modelo HI 9321.

d) Determinação de ácido láctico

O ácido láctico foi extraído do caldo fermentado de acordo com o método descrito por Silva (1981). Foi utilizada uma coluna Aminex HPX – 87H (300mm x 7.8mm Ø), específica para análise de ácidos orgânicos e pré-coluna contendo a mesma resina de exclusão iônica. A fase móvel constituiu-se de H₂SO₄ 5x10⁻³mol L⁻¹ mantida sob fluxo de 0,6mL min⁻¹. A temperatura do sistema foi mantida a 35°C e a pressão foi de 52mmHg. Para injeção no cromatógrafo, o extrato obtido de acordo com Silva (1981) foi filtrado em membrana milipore 0,45µm. O volume de injeção foi de 20µL. Foi utilizado 210nm para o detector UV – VIS. O padrão interno constituiu-se de uma mistura de ácido oxálico, acético, cítrico, málico, succínico e fórmico. Padrões de ácido láctico nas concentrações de 2,08x10⁻²mol L⁻¹; 4,7x10⁻²mol L⁻¹ e 6,25x10⁻²mol L⁻¹ foram utilizados na curva de referência para cálculo da concentração das amostras (ZHENG et al., 1996).

e) Determinação de açúcares redutores

Os açúcares redutores foram determinados pelo método de Somogyi (1945) e Nelson (1944). Para determinação de açúcares redutores totais, realizou-se hidrólise ácida prévia das amostras, seguida de neutralização e finalmente determinação dos açúcares redutores totais pelo método de Somogyi (1945) e Nelson (1944).

Análise Estatística

Os resultados foram analisados pela comparação entre as médias, através do teste de Tukey (GOMEZ, 1985).

Resultados e Discussão

O melaço de cana-de-açúcar “in natura” diluído a 10% (m/v) apresentou 10,4g/L de açúcares redutores e após tratamento com 2% (v/v) de invertase (14,09 U/mL), o teor de açúcares redutores do melaço de cana-de-açúcar 10% (m/v) aumentou para 34,0g/L. O tratamento com invertase elevou em 226,9% os açúcares redutores no meio de fermentação. Martínez-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 da 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 FILHO; HORI, RIBEIRO, 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; DAWID, 1991), o que pode facilitar no processo industrial e evitar o aparecimento de produtos indesejáveis.

A produção de ácido láctico, biomassa e consumo de açúcar redutor pelo *L. curvatus* na fermentação

contínua, utilizando-se como meio de cultivo melaço de cana-de-açúcar tratado com invertase, contendo 70,8g/L de açúcar redutor total, e suplementado com extrato de levedura 2% (m/v) e peptona 4% (m/v) são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Produção de ácido láctico, biomassa e consumo de açúcar redutor pelo *Lactobacillus curvatus* na fermentação contínua de melaço de cana-de-açúcar tratado com invertase e suplementado com extrato de levedura 2% (m/v) e peptona 4% (m/v).

Parâmetros analisados	taxas de diluição (h ⁻¹)		
	0,05	0,10	0,15
pH final	4,04	4,21	4,30
AR _r (g/L)	26,9	27,6	29,2
ART _r (g/L)	31,0	38,0	46,8
Ácido láctico (g/L)	13,8	10,2	7,10
Biomassa (g/L)	1,98	1,74	1,69

Na tabela 1, o teor inicial de açúcar redutor foi de 34,0g/L na fermentação contínua de melaço de cana-de-açúcar 10% (m/v) suplementado. O consumo de açúcares redutores nas diferentes taxas de diluição foi de 7,1; 6,4 e 4,8g/L em D=0,05; 0,10 e 0,15h⁻¹, respectivamente, indicando que o consumo de açúcar diminui com o aumento da taxa de diluição. A quantidade de açúcar redutor residual (AR_r) foi de 26,9; 27,6 e 29,2g/L nas taxas de diluição de 0,05; 0,10 e 0,15h⁻¹, respectivamente, sugerindo que a taxa de diluição menor é a mais adequada para o melhor aproveitamento dos açúcares do meio de cultivo.

A produção de ácido láctico foi de 13,8; 10,2 e 7,10g/L nas taxas de diluição de 0,05; 0,10 e 0,15h⁻¹, respectivamente. O teste de Tukey (GOMEZ, 1985) utilizado para comparação das médias mostrou que os resultados são significativamente diferentes ao nível de 5%. Comparando a produção de ácido láctico, verifica-se que menores valores de D favorecem a produção de ácido láctico por *L. curvatus*. Barcena et al. (1998) também demonstraram que baixas taxas de diluição favorecem a produção de ácido láctico por *L. casei*.

A produção de ácido láctico, biomassa e ART_r em diferentes taxas de diluição é demonstrada na figura 1.

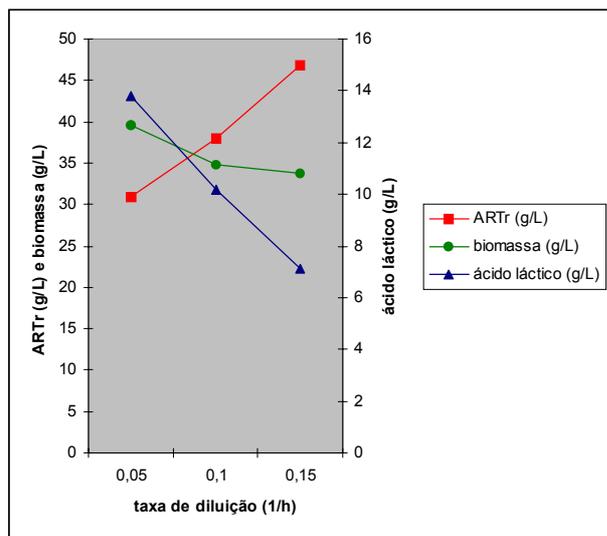


Figura 1. Efeito da taxa de diluição (D) sobre a produção de ácido láctico, produção de biomassa e açúcar redutor total residual (ART_r) na fermentação contínua de *Lactobacillus curvatus* em melaço de cana-de-açúcar suplementado.

A taxa de diluição deve ser considerada na produção de ácido láctico, entretanto a composição do meio de cultivo também é muito relevante. Oliveira et al.(2000) obtiveram 4,7g/L de ácido láctico em $D=0,10h^{-1}$ para o *L. curvatus* cultivado em condições similares, porém utilizando melaço de cana-de-açúcar, tratado com invertase, mas sem suplementação. No presente trabalho, utilizando-se melaço de cana-de-açúcar, tratado com invertase e suplementado com peptona 4% (m/v) e extrato de levedura 2% (m/v), a produção atingiu valor de 10,2 g/L na taxa de diluição de $0,10h^{-1}$, ou seja, um valor maior que o dobro na produção de ácido láctico, mostrando claramente a vantagem da suplementação do melaço. Montelongo, Chassy e McCord (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 5,5g/L de ácido láctico em 10 horas de cultivo, enquanto que em melaço de soja sem suplementação foram obtidos 4,2 g/L em 36 horas de cultivo.

Oliveira et al.(2000) , através de fermentação contínua do *L. curvatus* em melaço de cana-de-açúcar sem suplementação, obtiveram valores de biomassa mais baixos (1,10 e 1,10g/L), respectivamente para as taxas de diluição de 0,10 e $0,15h^{-1}$, que os obtidos neste trabalho (1,74 e 1,69g/L), sugerindo que a suplementação do melaço favoreceu o crescimento do *L. curvatus*.

A viabilidade celular do *L. curvatus* foi de $2,03 \times 10^9$; $1,20 \times 10^9$ e $9,7 \times 10^8$ UFC/mL, nas taxas de 0,05; 0,10 e $0,15h^{-1}$, respectivamente, indicando que a viabilidade celular diminuiu com o aumento de taxa de diluição. Apesar de haver diminuição, pode-se afirmar que a viabilidade celular ainda foi alta, nas diferentes taxas de diluição e não foi afetada pelo baixo pH final da fermentação no meio de melaço suplementado. Cultivos preliminares do *L. curvatus* em meio de melaço diluído a 10% (m/v) sem suplementação, com extrato de levedura e peptona, apresentaram valores de viabilidade celular de $2,0 \times 10^3$ UFC/mL, indicando a necessidade de suplementação do meio de cultivo para melhorar o crescimento celular.

Montelongo, Chassy e McCord (1993) demonstraram baixo crescimento de *Lactobacillus* quando cultivado em melaço de soja , subproduto obtido na preparação de proteína de soja o qual contém α -galactosídeo, sem suplementação. Entretanto, estudando fermentação láctica em melaço de soja suplementado com extrato de levedura, verificaram maior crescimento celular e melhor desempenho do processo fermentativo.

Kotzamanidis, Roukas e Skaracis (2002) estudando fermentação láctica em frascos agitados, verificaram que a substituição de extrato de levedura por outras fontes de proteínas de menor custo, não melhorou a produção de ácido láctico por *L. delbrueckii* NCIMB 8130 cultivado em melaço de beterraba . A utilização de melaço de beterraba também foi avaliada por Bulut, Elibol e Ozer (2004) que afirmaram que a pasteurização do melaço melhora a produção de ácido láctico.

Os resultados referentes aos parâmetros cinéticos de rendimento do ácido láctico, produtividade e consumo de açúcar redutor total obtidos na fermentação láctica contínua do *L. curvatus* em três diferentes taxas de diluição são apresentados na tabela 2.

Na tabela 2, o açúcar consumido (em %) durante o processo fermentativo foi de 56,2; 46,3 e 33,9, fornecendo rendimentos (g/g) de 0,35; 0,31 e 0,30 para as taxas de diluição de 0,05; 0,10 e 0,15h⁻¹, respectivamente. Portanto, o melhor rendimento (0,35g/g) foi obtido na menor taxa de diluição testada.

Tabela 2- Parâmetros cinéticos avaliados na fermentação contínua do *Lactobacillus curvatus* em melaço de cana-de-açúcar a 10% (m/v), previamente tratado com invertase e suplementado com 2% (m/v) de extrato de levedura e 4% (m/v) de peptona.

Parâmetros cinéticos	Taxas de diluição (h ⁻¹)		
	0,05	0,10	0,15
Rendimento (g/g)	0,35	0,31	0,30
Produtividade (g/L/h)	0,12	0,11	0,08
Consumo de açúcar (%)	56,2	46,3	33,9
Tempo de fermentação (h)	116	92	92

Apesar do melaço utilizado apresentar em sua composição uma concentração elevada de carboidratos (70,8g/L), a conversão em ácido láctico não foi satisfatória. Esse melaço é procedente de lavouras que geralmente recebem aplicação de herbicidas e pesticidas, os quais podem aparecer na composição do mesmo, podendo prejudicar o processo fermentativo. Dimmling e Nesemann (1985 apud DROZD, 1987), relataram que melaço geralmente é impuro e contém herbicida, pesticida e resíduos químicos usados no processamento da cana-de-açúcar. Apesar de não acarretar danos toxicológicos para humanos e animais, podem causar problemas em algumas fermentações.

Valores de rendimento de ácido láctico como 0,76g/g foram descritos por Kwon, Kaul e Mattiasson (1996) utilizando meio semi-sintético contendo glicose como fonte de carbono e enriquecido com extrato de levedura e triptona. Ainda que os valores de

rendimento de ácido láctico obtidos no atual trabalho sejam inferiores, a utilização de melaço de cana-de-açúcar suplementado constitui uma alternativa economicamente viável, se considerarmos o baixo custo quando comparado com o preço dos meios semi-sintéticos.

Conclusão

Melaço de cana-de-açúcar, previamente tratado com invertase e suplementado com extrato de levedura e peptona, mostrou ser um meio de cultivo economicamente viável para produção de ácido láctico. Nestas condições, a menor taxa de diluição foi mais adequada para o desenvolvimento da fermentação contínua do *L. curvatus*.

Agradecimentos

À CAPES e CPG-UEL pelo apoio financeiro.

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.
- BARCENA, J.M.; RAGOUT, A.L.; CORDOBA, P.R.; SENERIZ, F. Continuous production of L(+)-lactic acid by *Lactobacillus casei* in two-stage systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Berlin, n.26, p.231-237, 1998.
- BULUT, S.; ELIBOL, M.; OZER, D. Effect of different carbon sources on L(+) lactic acid production by *Rhizopus oryzae*. *Biochemical engineering Journal*, Amsterdam, v.21, n.1, p.33-37, 2004.
- 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, p.111-116, 1998.
- 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, Nov. 1998.

- DROZD, J. W. Hydrocarbons as feedstocks for biotechnology. In: STOWELL, J. D.; BEARDSMORE, A. J.; KEEVIL, C. W.; WOODWARD, J. R. *Carbon substrates in biotechnology*. Washington: IRL Press, 1987. Cap. 7, p. 119-138.
- 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, p. 471-480, 1996.
- 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, Jun. 1999.
- GOMEZ, F. P. *Estatística Experimental*. 11. ed. Piracicaba: Nobel, 1985.
- JAGNOW, G.; DAWID, W. *Biotechnología: introducción con experimentos modelo*. Zaragoza: Acribia, 1991.
- KOTZAMANIDIS, C.; ROUKAS, T.; SKARACIS, G. Optimization of lactic acid production from beet molasses by *Lactobacillus delbrueckii* NCIMB 8130. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, Oxford, v.18, n.5, p.441-448, 2002.
- 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, p.280-290, 1996.
- MAN, J. C.; ROGOSA, M.; SHARPE, M. E. A medium for the cultivation of Lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, Oxford, v.23, p.130-135, 1960.
- MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, Y.; QUIROZ-CAMACHO, M. H.; LEDEZMA-PÉREZ, A. S.; JARAMILLO-CORONADO, J. C. Produção 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. *Controle biológico de doenças de plantas*. Brasília: EMBRAPA, 1991. p. 253-272.
- NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for determination of glucose. *Biochemistry*, New York, 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. S. *Desenvolvimento de Inoculante para Fermentação Láctica de Silagens: utilização de Resíduos Agroindustriais*. Londrina, 1995. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos, Universidade Estadual de Londrina, Londrina.
- 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.
- ROYCHOUDHURY, P. R.; SRIVASTAVA, A.; SAHAI, V. Extractive Bioconversion of Lactic Acid. *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology*, Berlin, v.53, p.61-87, 1995.
- 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.
- SILVA, D. J. Determinação do pH, da acidez titulável e do ácido láctico da silagem. In: SILVA, D. J. *Análise de Alimentos (Métodos Químicos e Biológicos)*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1981. Cap. 14, p.110-114.
- SOMOGYI, M. A. A new reagent for determination of sugar. *Journal Biology Chemistry*, Cambridge, v.160, 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, p.362-366, 1995.
- ZHENG, Y.; DING, X.; CEN, P.; YANG, C. W.; TSAO, G. T. Lactic acid fermentation and adsorption on PVP. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Berlin, v. 57/58, p. 627-633, 1996.