

OBTENÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO POR FERMENTAÇÃO DESCONTÍNUA EMPREGANDO DIFERENTES MEIOS FERMENTATIVOS

Roselene Ferreira Oliveira; Heron Oliveira dos Santos Lima; Mirela Vanin dos Santos Lima*

UTFPR - Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Campo Mourão, PR.

Resumo: O ácido lático possui múltiplas aplicações nas indústrias de alimentos, indústria de derivados de cereais e em indústrias de bebidas, cosmética, química e farmacêutica. Devido a esta ampla aplicabilidade, o processo de obtenção do ácido lático é um dos processos mais estudados. O presente estudo teve como objetivo produzir ácido lático empregando fermentação da farinha de varredura (resíduo que se origina da limpeza das farinheiras) e fécula de mandioca (frações amiláceas de matérias-primas subterrâneas), previamente hidrolisadas e suplementadas. A fermentação da farinha de varredura e da fécula de mandioca foi conduzida a partir de uma solução a 18% (m/v) previamente hidrolisada com as enzimas α -amilase termo estável (Termamyl 120L) e amiloglicosidase (AMG 300L); e suplementada com extrato de levedura e peptona. O microrganismo, *Lactobacillus casei*, foi inoculado e as condições de processo foram: pH 6,4; 37°C e agitação 100 rpm durante 96 horas. O processo foi acompanhado periodicamente para analisar: concentração de ácido lático; concentração de açúcares redutores; pH; biomassa e viabilidade celular. Analisando os resultados pode-se concluir que a farinha de varredura e a fécula de mandioca se apresentam como matérias-primas promissoras para a obtenção de ácido lático por via fermentativa.

Palavras-chave: *Lactobacillus casei*. Espectrofotometria. Fermentação. Amido.

Obtaining lactic acid by discontinuous fermentation using different fermentative media. Lactic acid has multiple uses in several industries such as food, cereal derivatives, beverage, cosmetic, chemical and pharmaceutical. Due to its wide applicability the process to obtain lactic acid is one of the most studied processes. The aim of this study was to produce lactic acid using fermentation of cassava meal (residue from cleaning the flour mill) and cassava starch (amylaceous fractions of tuberous root raw materials) previously hydrolyzed and supplemented. The fermentation of both cassava meal and cassava starch was carried out using a solution at 18% (m/v), previously hydrolyzed with thermostable alpha amylase (Termamyl 120L) and amyloglucosidase (AMG 300L); supplemented with yeast extract and peptone. The microorganism, *Lactobacillus casei*, was inoculated under the following process conditions: pH 6.4; at 37°C and agitation at 100 rpm for 96 hours. The process was periodically surveyed in order to analyze the concentration of lactic acid; concentration of reducing sugars; pH; biomass and cellular feasibility. The analysis of the results permits to conclude that both cassava meal and cassava starch are promising raw materials for obtaining lactic acid by fermentative media.

Keywords: *Lactobacillus casei*. Spectrophotometry. Starch. Fermentation.

1 Introdução

O ácido lático é um ácido orgânico não volátil, sem odor, de sabor suave e de alto valor comercial. Sendo sintetizado por bactérias lácticas capazes de degradar açúcares contidos em meios de cultivo fermentescíveis, a maior parte da produção mundial de ácido lático é utilizada pela indústria de alimentos e o restante em indústrias farmacêutica, têxtil, de couro, cosmética e química (HAULY et al., 2003), utilizado com as funções de diminuição de pH; como agente antimicrobiano; adjuvante de sabor; solvente; estabilizante; umectante; emulsificador; plasticizante, além de ser reconhecido como seguro pela “Food and Drug Administration” (FDA) (LITCHFIELD, 1996).

O processo de obtenção do ácido lático por via fermentativa é um dos processos bioquímicos mais estudados e pesquisados, devido a sua ampla aplicabilidade. Dentre estas aplicações pode-se citar o emprego do ácido lático como matéria-prima para a obtenção de plástico biodegradável, (poli ácido lático - PLA), utilizado pela indústria de embalagens; e na confecção de artigos médicos e odontológicos biorreabsorvíveis (pino, parafusos, etc.); (PRADELLA, 2006).

A matéria principal para a obtenção do ácido lático é uma fonte de carbono renovável, geralmente um carboidrato derivado de plantios comerciais de larga escala como cana-de-açúcar, milho, batata, trigo e mandioca ou um óleo vegetal extraído de soja, girassol, palma ou outra planta oleaginosa (PRADELLA, 2006).

Além da cana-de-açúcar o Brasil é um dos maiores produtores mundiais de mandioca, com produção anual estimada em 27 milhões de toneladas, sendo as maiores produções registradas nos Estados do Paraná, Pará, Bahia, Maranhão e Piauí (PARANÁ, 2003). A indústria farinheira é a principal consumidora das raízes produzidas, utilizando aproximadamente 80% da produção brasileira de mandioca, pois, as raízes da mandioca possuem grande valor energético, apresentando de 20 a 45% de amido e 5% de açúcares redutores (SILVA et al., 2005).

Os resíduos da produção de farinha de mandioca geram subprodutos obtidos durante a limpeza de todo o material perdido no chão e adicionado ao resíduo do lavador, recebendo, a denominação de

*e-mail: mirelavanin@gmail.com

farelo de varredura. Este resíduo supostamente tem composição semelhante à farinha de mandioca, contudo, sua composição e rendimento podem variar muito conforme o tipo de farinha fabricada e o processo de fabricação utilizados. Regionalmente este resíduo também é conhecido como farinha de varredura. Entretanto, não se sabe ao certo a quantidade total de resíduos produzidos no Brasil, sabe-se que cerca de 3 a 5% da mandioca total utilizada na fabricação de farinha é eliminada, na forma de farinha de varredura. No entanto, a cultura é capaz de alcançar produções satisfatórias sob condições adversas de solo e clima (SOUZA; SOUZA e GOMES, 2006).

Dentro deste panorama, o presente estudo teve como objetivo produzir ácido láctico a partir de fontes ricas em carboidratos como, fécula de mandioca e farinha de varredura a fim de se observar o rendimento destes sistemas na obtenção do ácido láctico.

2 Material e métodos

2.1 Material

Microrganismo: Foi utilizado o *Lactobacillus casei* (Instituto Adolfo Lutz).

Enzimas: α -amilase (Termamyl 120 L) e amiloglucosidase (AMG 300) (Novozymes).

Meio de manutenção: ágar MRS (Man-Rogosa-Sharpe) (Difco).

Meios para fermentação: farinha de varredura e fécula de mandioca da Farinheira Pinduca Agroindustrial Ltda., previamente hidrolisado com α -amilase e amiloglucosidase, com 2% de suplementação de extrato de levedura e peptona.

2.2 Métodos

Ativação e manutenção do microrganismo: O microrganismo foi mantido em tubos contendo ágar MRS (Man-Rogosa-Sharpe). As culturas foram repicadas a cada 4 semanas, incubadas por 24 horas a 30°C, e mantidas em câmara fria a 4°C (HAULY et al., 2003).

Preparação do inóculo: O microrganismo foi ativado através de 3 repiques sucessivos em leite em pó desengordurado reconstituído (10% m/v) e estéril. A cada repique, o cultivo foi mantido por 24 horas a 37°C. O inóculo foi preparado cultivando a 3ª geração do microrganismo no meio de fermentação (amido hidrolisado) durante 24 horas a 37°C, e então foi utilizado na concentração de 10% (v/v) para a fermentação descontínua (HAULY et al., 2003; LIMA et al., 1975).

Preparo do meio de fermentação - Hidrólise do amido: O amido foi diluído em água destilada obtendo-se uma solução de concentração 18% (m/v). Em seguida foi adicionado 2mL de cloreto de cálcio preparado a 1% e o pH ajustado para 6,4, com solução hidróxido de sódio 1N. O sistema foi homogeneizado com agitação magnética e então, adicionou-se 0,5mL de enzima α -amilase termoestável (Termamyl 120 L) previamente diluída em 15mL de água destilada. Procedeu-se então o aquecimento do sistema até atingir a temperatura de 90-95°C, mantendo a solução nessa temperatura por 1 hora sob constante agitação. Após a liquidação resfriou-se a solução e abaixou o pH para 4,5 adicionando solução de ácido clorídrico (HCl) a 3%. Acrescentou-se à solução 0,5 mL de

enzima amiloglucosidase (AMG 300) previamente diluída em 15mL de água destilada, a solução foi incubada a 60°C, sob agitação de 100rpm/48horas em incubadora do tipo "Shaker", com objetivo de converter as moléculas de amido em praticamente 100% de unidades de glicose. Após este período seguiu-se a inativação das enzimas através da fervura do sistema por 10 minutos (CEREDA; VILPOX, 2003).

Diluição e posterior suplementação do hidrolisado de amido: Finalizado o processo de hidrólise da solução de farinha de varredura e/ou fécula de mandioca, realizou-se a diluição do hidrolisado, para obtenção de uma solução a 20% (v/v). A solução hidrolisada e diluída de farinha de varredura e/ou fécula de mandioca foi transferida para um erlenmeyer de 250 mL, e teve seu pH ajustado para 6,4, com hidróxido de sódio 1N; a temperatura foi abaixada para 37°C, e fez-se a suplementação com 2% (m/v) de extrato de levedura e 2% (m/v) de peptona e incubou-se o sistema por 24 horas. Finalmente o inóculo preparado foi adicionado no meio fermentativo. O sistema foi mantido nestas condições sob agitação de 100 rpm por 4 dias (96 horas).

2.3 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 (%) (KWON et al., 1996). O rendimento foi calculado através da concentração de ácido láctico pela concentração de açúcar consumido; e cinética 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 x 100) onde AR_i = açúcar redutor inicial e AR_f = açúcar redutor final.

2.4 Metodologias analíticas

Aliquotas 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 fermentativo, 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 0,66N 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 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; WINTER, 1995). As placas foram incubadas a 37°C durante 48 h;

Determinação da biomassa: a biomassa foi avaliada a partir de uma alíquota de 10 mL coletada no início e ao término da fermentação. Foram realizados três ciclos de lavagem com água destilada e centrifugação a 3400 rpm, por 30 min. E ao fim do processo a biomassa foi desidratada em estufa a 60°C até peso constante (OLIVEIRA, 2006); *Determinação do pH:* amostras do caldo fermentado foram

utilizadas para determinação de pH com potenciômetro de Bancada Digital 0/14 Ph 110V – modelo PHS-3B– Phtek calibrado com soluções padrão de pH 4,0 e 7,0.

3 Resultados e discussão

A farinha de varredura e fécula de mandioca diluídas a 18% (m/v) e tratadas com 0,5mL de enzima α -amilase termoestável (Termamyl 120 L) e 0,5mL de enzima amiglicosidase (AMG 300) apresentaram 204,25 g.L⁻¹ e 180,85g.L⁻¹ de açúcares redutores, respectivamente. Portanto a hidrólise, se mostrou extremamente necessária para obtenção dos açúcares redutores contidos no amido, pois 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 suplementação como fonte de nitrogênio, vitaminas e sais minerais para o bom desempenho da fermentação láctica.

A suplementação do meio de cultivo com 2% de extrato de levedura e 2% de peptona foi utilizada, pois em estudo prévio onde se tratou melaço de cana-de-açúcar hidrolisado com 0%, 1% e 2% de extrato de levedura e peptona obteve-se melhores rendimentos de fermentação para o sistema com 2% de suplementação (OLIVEIRA et al., 2009).

Os resultados do acompanhamento da dosagem da concentração de ácido láctico e do consumo de AR durante a fermentação empregando fécula de mandioca e farinha de varredura hidrolisadas e suplementadas com: 2% de extrato de levedura e 2% de peptona são apresentados nas figuras 1 e 2, respectivamente.

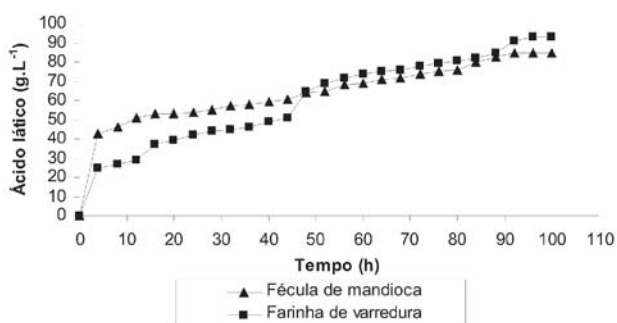


Figura 1: Produção de ácido láctico em função do tempo de fermentação para os meios: farinha de varredura e fécula de mandioca; com suplementação de 2% de extrato de levedura e 2% de peptona.

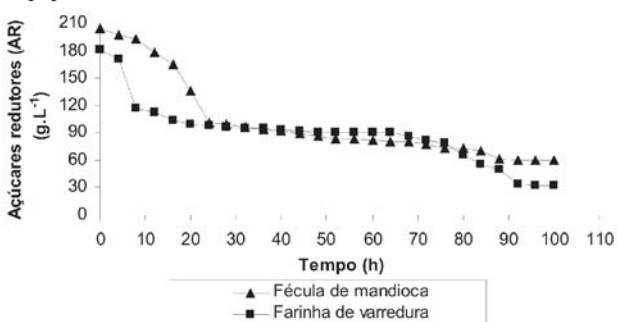


Figura 2: Consumo de açúcares redutores em função do tempo de fermentação para os meios: farinha de varredura e fécula de mandioca com 2% de suplementação de extrato de levedura e 2% de peptona.

Analisando as figuras 1 e 2 observa-se que os dois meios fermentativos apresentaram produção de ácido láctico e consumo de açúcares redutores semelhantes durante as 100 horas de fermentação.

Verifica-se ainda que a produção de ácido láctico e o consumo de AR, estabilizou-se em torno de 96 horas de fermentação, sugerindo que o período de 96 horas de processo foi o tempo de produção máxima para cada sistema. Observa-se também, que a produção de ácido láctico aumentou gradativamente durante as primeiras 24 horas enquanto que o consumo de AR foi mais intenso para o mesmo período. Pode-se observar ainda, que o consumo de AR depois de 24 horas seguiu quase constante e somente no final houve um redução significativa proporcionando maior produção de ácido láctico.

A Tabela 1 apresenta os resultados dos parâmetros avaliados durante a fermentação descontinuada do *Lactobacillus casei* em fécula de mandioca e farinha de varredura hidrolisadas e suplementadas com 2% de extrato de levedura e 2% de peptona.

Tabela 1: Parâmetros analisados no início e término da fermentação da fécula de mandioca e farinha de varredura hidrolisadas e suplementadas com: 2% de extrato de levedura e 2% de peptona.

Parâmetros analisados	Fécula de mandioca com 2% de suplementação		Farinha de varredura com 2% de suplementação	
	Início da fermentação	Fim da fermentação	Início da fermentação	Fim da fermentação
pH	6,4	3,9	6,4	3,7
AR (g.L ⁻¹)	204,25	42,58	180,85	20,19
Ácido Láctico (g.L ⁻¹)	0,00	85	0,00	93
Viabilidade Celular (UFC.ml ⁻¹)	8,52x10 ¹⁰	7,3x10 ¹³	5,14x10 ¹⁰	8,5x10 ¹⁵
Biomassa (g.mL ⁻¹)	0,02	0,05	0,05	0,08

Observando os resultados da Tabela 1, verifica-se que a produção de ácido láctico foi de 85 g.L⁻¹ e 93 g.L⁻¹ para os meios contendo fécula de mandioca e farinha de varredura, respectivamente, sugerindo que os meios de cultivo são adequados para a produção de ácido láctico, podendo esta alta concentração de ácido láctico comparada a resultados de outros pesquisadores estar relacionada a alta concentração de açúcares redutores do tipo glicose no meio, já que a hidrólise do amido fornece apenas este tipo de açúcar redutor (CABELLO, 2006), e de acordo com Lima et al., (1975) o microrganismo *Lactobacillus casei* degrada preferencialmente a glicose. Neste mesmo sentido o amido se torna uma matéria prima adequada para produção de ácido láctico, pois o estudo realizado por Oliveira et al. (2009) que produziu ácido láctico a partir de melaço de cana-de-açúcar conseguiu alcançar uma concentração de 58,86 g.L⁻¹ de ácido láctico o que provavelmente o meio contendo glicose e frutose finaliza o processo em menor tempo de fermentação.

O consumo de AR calculado pela razão (AR_i - AR_f) / (AR_i x 100) foi de 79,15% para a fécula de mandioca e 88,84% para a farinha de varredura, podendo-se sugerir que o consumo de AR foi bastante expressivo. Sendo interessante observar que, Oliveira et al. (2009), conseguiram um consumo de 83,04% na concentração de açúcares redutores empregando açúcares redutores proveniente da sacarose. Neste estudo observou-se que o microrganismo consumiu em torno de 88,84% de açúcares redutores contido na farinha de varredura que é considerado um resíduo, tornando os processos biotecnológico mais rentáveis na produção de ácido láctico por se tratar de um resíduo.

Neste mesmo sentido, observa-se: decréscimo no pH, sendo inicialmente de 6,4 para ambos os sistemas e caindo para 3,9 e 3,7 para fécula de mandioca e farinha de varredura, respectivamente; aumento da biomassa e aumento da viabilidade celular, justificando o alto rendimento na produção de ácido láctico durante a fermentação.

Pode-se sugerir que, mesmo não se observando uma diferença significativa na produção de ácido láctico a partir da fécula de mandioca e farinha de varredura, esta pode ser considerada um substrato potencial para a obtenção de ácido láctico. Pois, esta é um subproduto barato, de composição bastante variada e de baixa pureza quando comparada à fécula de mandioca, corroborando assim as afirmações feitas por Souza, Souza e Gomes (2006), neste sentido.

A Tabela 2 apresenta os parâmetros cinéticos avaliados na fermentação descontínua do *Lactobacillus casei* em fécula de mandioca e farinha de varredura hidrolisadas e suplementadas com 2% de extrato de levedura e 2% de peptona.

Tabela 2: Parâmetros cinéticos avaliados na fermentação descontínua do *Lactobacillus casei* em fécula de mandioca e farinha de varredura hidrolisadas e suplementadas com 2% de extrato de levedura e 2% de peptona.

Parâmetros cinéticos	Fécula de mandioca	Farinha de varredura
Rendimento (g/g)	0,53	0,58
Produtividade (g/L.h)	0,85	0,93
Consumo AR %	79,15	88,83
Tempo de fermentação (h)	100	100

Analisando a Tabela 2 verifica-se que a produtividade de ácido láctico foi de 0,85 g.L⁻¹ e 0,93 g.L⁻¹ e o rendimento de aproximadamente 0,53 g/g e 0,58 g/g (concentração de ácido láctico por concentração de açúcares redutores consumido durante o processo fermentativo), para a fécula de mandioca e farinha de varredura, respectivamente. As diferenças observadas para rendimento, produtividade e consumo de AR, entre a fermentação da fécula de mandioca e da farinha de varredura são muito pequenas não sendo consideradas significativas, assim sugere-se que esta apresenta características como meio de cultivo muito próximas às da fécula de mandioca, concordando com a afirmação de Souza, Souza e Gomes (2006) que diz que a composição da fécula de mandioca e da farinha de varredura é idêntica, podendo obter-se rendimentos semelhantes. De um modo geral o amido pode ser considerado um substrato importante para obtenção de ácido láctico por ser de baixo custo e rico em açúcares fermentescíveis. Portanto, como observado neste trabalho, a fermentação proveniente do amido é um processo lento tornando-se trabalhoso, requerendo assim mais cuidado para que não haja contaminação durante o processo; porém os experimentos apresentaram resultados de produção de ácido láctico muito interessante, podendo-se sugerir esta matéria-prima como promissora na produção deste ácido orgânico.

4 Conclusões

Após a análise dos resultados obtidos na fermentação da fécula de mandioca e farinha de varredura pode-se concluir que o processo fermentativo, assim como, as metodologias analíticas empregadas foram adequadas. Tais resultados sugerem a viabilidade tecnológica do processo já que o

rendimento do processo de fermentação obtido apresentou-se muito próximo das literaturas consultadas (HAULY et al., 2003; SIEBOLD et al., 1995).

Assim pode-se sugerir que, como o metabolismo do microrganismo (*L. casei*) degrada preferencialmente glicose a fermentação do amido para produção de ácido láctico torna-se mais vantajosa e de baixo custo devido ao conteúdo excessivo de glicose obtido ao final da hidrólise do amido, e pelo baixo custo para a obtenção desta matéria-prima.

5 Agradecimentos

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) pelo apoio financeiro; à Universidade Estadual de Maringá (UEM) pelo espaço cedido no laboratório de bioquímica e fisiologia de microrganismo; à Farinheira Pinduca Agroindustrial Ltda., pelo fornecimento da fécula de mandioca e farinha de varredura.

6 Referências

- BUCHTA, K. Lactic acid. In: REHN, H. J.; REED, G. (Eds.). **Biotechnology**. Florida: Verlag Chemic, 1983. v. 3, cap. 3, p. 409-417.
- CABELLO, C. **Determinação da concentração de carboidratos de amido de mandioca por espectroscopia de infravermelho**. v.2, p. 37-45, São Paulo, 2006. Disponível em <www.cerati.unesp.br/revistarat> Acesso em maio de 2009.
- CARVALHO, W. et al. Aditivos alimentares produzidos por via fermentativa parte 1: ácidos orgânicos. Faculdade de Engenharia Química de Lorena, **Revista Analytica**, n. 18, 2005.
- CEREDA, M. P.; VILPOX, O. F. **Culturas de tuberosas amiláceas latino americanas: Tecnologia, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas latino americanas**. São Paulo: Fundação Cargill, v.4, 2003.
- DEMAIN A. L. SMAL, B. The economic power of the microbe. **Biotechnology Advances**. 18, 499-514, 2000.
- DEMIRCI, A. et al. Media evaluation of lactic acid repeated-batch fermentaton with *lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus case subsp. Rhamnosus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 46, n. 11, p. 4771-4774, Nov. 1998.
- HAULY, M. C. O.; OLIVEIRA, A. R.; OLIVEIRA, A. S. Produção de ácido láctico por *Lactobacillus curvatus* em melaço de cana-de-açúcar. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 24, n. 1, p. 133-142, 2003.
- 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.
- LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotechnologia: Tecnologia das fermentações**. Editora Edgard Blucher Ltda., São Paulo, v.1, 286p, 1975.
- LITCHFIELD, J. H. Microbiological production of lactic acid. In: NEIDLEMAN, S. L.; LASKIN, A. **Advances in Applied Microbiology**. California: Academic Press, v.42, p.45-95. 1996.
- NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for determination of glucose. **Biochemistry**, Washington, v. 153, p. 375-380, 1944.
- 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-UEPG. Ponta Grossa (PR), 2006.

OLIVEIRA, R. F. *et al.* Produção fermentativa de ácido láctico a partir do melaço da cana-de-açúcar por *Lactobacillus casei*. **Brazilian Journal Food Technology**, Campinas, VII BMCFB, p. 34-40, junho 2009.

PRADELLA, J. G. C. **Biopolímeros e intermediários químicos**. Relatório Técnico nº 84 396-205. Centro de Tecnologia de Processos e Produtos. Laboratório de Biotecnologia Industrial - LBI/CTPP, São Paulo, 119p, 2006.

PARANÁ - SECRETARIA DA AGRICULTURA. **Acompanhamento da situação agropecuária do Paraná**, Curitiba: SEAB, 113p, 2003.

SILVA, R. R. *et al.* Resíduos de mandioca na alimentação de ruminantes. **Revista Electrónica de Veterinaria REDVET** ISSN 1695-750 v. VI, n. 10, 2005.

SIEBOLD, M. *et al.* Comparison of the production of lactic acid by three different *Lactobacilli* and its recovery by extraction and electro dialysis. **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, Cap. 14, p. 110-114, 1981.

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

SOUZA, L.D.; SOUZA, L.S.; GOMES, J.C. **Exigências edáficas da cultura da mandioca**. In: SOUZA, L.S.; FARIAS, A.R.N.; MATTOS, P.L.P.; FUKUDA, W.M.G. (ed.) **Aspectos socioeconômicos e agrônômicos da mandioca**. Cruz das Almas – BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, p. 170 – 214, 2006.

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.