

OBTENÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO VIA FERMENTAÇÃO DESCONTÍNUA UTILIZANDO MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR, FARINHA DE VARREDURA, FRUTOSE E FÉCULA DE MANDIOCA

Milena Veronezi Silva¹; Odinei Hess Gonçalves²; Mirela Vanin dos Santos Lima^{1,*}; Heron Oliveira dos Santos Lima¹

¹UTFPR – Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Campus Campo Mourão, PR.

²PPGTA – Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, UTFPR – Campus Campo Mourão, PR.

Resumo: O ácido lático apresenta sua maior aplicação na indústria de alimentos. Também é empregado na indústria têxtil, farmacêutica, química, cosmética e indústria de embalagens. Devido a esta ampla aplicabilidade, a obtenção do ácido lático por via fermentativa é um processo muito estudado, buscando alternativas para o aumento de produtividade e decréscimo do custo de produção. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a influência de diferentes meios de cultivo, provenientes da agroindústria, na produção do ácido lático por via fermentativa, utilizando o microrganismo *Lactobacillus casei*. Para tanto, utilizou-se como meios de cultivo, melaço de cana-de-açúcar, farinha de varredura, fécula de mandioca e frutose previamente hidrolisadas, quando necessário, e suplementadas com 2% de extrato de levedura e 2% de peptona. As fermentações foram realizadas à 37°C por 48 horas sob agitação constante. O processo fermentativo foi acompanhado através de análises de: dosagem de ácido lático; decréscimo de açúcares redutores; biomassa; viabilidade celular e pH. Analisando os resultados observou-se maior decréscimo de açúcares redutores e maior produção de ácido lático quando se utilizou o melaço como meio de cultivo. Neste sentido, pode-se sugerir que o melaço hidrolisado se mostrou mais eficiente para promover o crescimento do microrganismo, tal resultado também tem sido observado por outros autores na literatura consultada e pode ser explicado pelo fato de o melaço hidrolisado apresentar em sua composição além de glicose e frutose outros nutrientes capazes de favorecer o crescimento do microrganismo e consequentemente a produção de ácido lático, quando comparado aos demais meios empregados neste trabalho.

Palavras-chave: Fermentação. Ácido lático. *Lactobacillus casei*.

Obtaining lactic acid through discontinuing fermentation using sugarcane molasses, cassava by-product meal, fructose and cassava starch. The lactic acid presents its larger application in the Food Industry. It is also used in the Textile, Pharmaceutical, Chemical, Cosmetic and Packaging Industries. Due to this wide applicability, the acquisition of lactic acid through fermentation is a widely studied process, searching for alternatives for the increase in productivity and the decrease in the production costs. Therefore, this work has the purpose of evaluating the influence of different types of cultivation, proceeding from the agro-industry, regarding the production of lactic acid through fermentation, using *Lactobacillus casei*. In order to do that, it was used as the cultivation media, sugarcane molasses, cassava by-product crumbs, fructose and cassava starch, previously hydrolyzed when necessary and supplemented with 2% yeast extract and 2% peptone. Fermentations were performed at 37° for 48 hours under constant agitation. The fermentation processes were followed by analysis such as: lactic acid dosage; reductive sugar decrease; biomass; cellular viability and pH. When the results were analyzed it was noticed a larger decrease of the reductive sugar and a larger production of lactic acid when the sugarcane molasses were used as cultivation media. Therein it may be suggested that the hydrolyzed sugarcane molasses presented itself more efficient in promoting the microorganism growth. Such result has also been observed by other authors in the researched literature and it can be explained by the fact that the hydrolyzed sugarcane molasses presents in its composition, besides glucose and fructose, other nutrients able to favor the growth of the microorganism and, consequently, the production of the lactic acid when compared to other medias used in this work.

Keywords: Fermentation. Lactic acid. *Lactobacillus casei*.

* E-mail: mirelavanin@gmail.com

1 Introdução

O ácido láctico é a denominação usual do ácido 2-hidróxiopropiônico ($\text{CH}_3\text{—CHOH—COOH}$) (LIMA *et al.*, 1975); sua maior aplicação está na indústria de alimentos, onde é utilizado 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 (OLIVEIRA, 2008).

Também é empregado em curtumes e na indústria têxtil. O lactato de cálcio é utilizado na indústria de panificação, como suplementação em ração animal e em preparações farmacêuticas. O produto é ainda empregado para obtenção de plásticos biodegradáveis; produtos químicos oxigenados; reguladores do crescimento de plantas; solventes não poluentes e intermediários para síntese química (GUILHERME *et al.*, 2009).

Devido à sua estrutura química, o ácido láctico ocorre em duas formas isoméricas: ácido L(+) láctico e ácido D(-) láctico. Ambas as formas isoméricas podem ser utilizadas para a síntese de polímeros com diferentes propriedades. Por outro lado, sob o ponto de vista nutricional, o uso ou a formação (por fermentação) de ácido D(-) láctico em alimentos e bebidas é indesejável uma vez que esta forma isomérica não é facilmente metabolizada por mamíferos, incluindo humanos (CARVALHO *et al.*, 2005).

De acordo com Azevedo (2009), o microrganismo *Lactobacillus casei* tem como metabólito principal o ácido L(+) láctico.

A fermentação descontínua é também conhecida por fermentação por batelada ou processo descontínuo de fermentação; tem a característica principal de no instante inicial, o meio ser inoculado com microrganismos incubado, de modo a permitir que a fermentação ocorra sob condições ótimas. No decorrer do processo fermentativo nada é adicionado (MALTA, 2006).

Graças à vasta biodiversidade encontrada em seu território, o Brasil dispõe de uma grande variedade de resíduos agrícolas e agroindustriais, cujo bioprocessamento é de grande interesse econômico e social (BRINGHENTI *et al.*, 2007). A utilização de substratos alternativos, em processos fermentativos, visa o aproveitamento de matérias-primas agrícolas de baixo custo. Esta prática diminui o custo do meio de cultura utilizado e, conseqüentemente, do produto final (HONORATO *et al.*, 2007).

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de diferentes meios de cultivo (melaço de cana-de-açúcar, farinha de varredura, fécula de mandioca e frutose) na produção de ácido láctico por via fermentativa empregando *Lactobacillus casei*.

2 Material e métodos

2.1 Ativação do microrganismo

Para utilização do microrganismo *Lactobacillus casei*, cepa obtida do Instituto Adolfo Lutz, no processo fermentativo, foi necessário realizar a ativação do mesmo através de 3 repiques sucessivos em tubos de ensaio contendo 10 mL de leite em pó desengordurado (SanCor) reconstituído (10% m/v) e estéril e, posteriormente, incubado por 24 horas a 37°C em estufa de cultura bacteriológica (Quimis Ltda/modelo, 376-14), em aerobiose (HAULY *et al.*, 2003).

2.2 Preparação da pré-fermentação

Foi transferido 6 mL da cultura ativada para 60 mL de meio de pré-fermentação, melaço de cana-de-açúcar, farinha de varredura, fécula de mandioca, previamente hidrolisados, e frutose, todos suplementados com extrato de levedura - Himedia (2% m/v) e peptona - Himedia (2% m/v). Incubando o meio durante 24 horas à 37°C em estufa bacteriológica sem agitação. Em seguida foi utilizada a pré-fermentação na concentração de 10% (v/v) para a fermentação propriamente dita (HAULY *et al.*, 2003).

Em trabalho prévio Oliveira *et al.* (2009), testou diferentes quantidades de suplementação com extrato de levedura e peptona e verificou que, 2% de suplementação de extrato de levedura e 2% de peptona foi capaz de promover maior produtividade ao processo de obtenção de ácido láctico por via fermentativa.

2.3 Preparo do meio de fermentação e processo fermentativo

Melaço de cana-de-açúcar: O melaço de cana-de-açúcar (cedido pela Usina Goioerê) foi diluído em água destilada para a obtenção de uma solução 10% (m/v), e em seguida hidrolisado. Para tanto, o pH da solução foi ajustado para 4,7 com auxílio de um pHmetro (Tecnopon Ltda/modelo, Mpa-210) e utilizando solução tampão acetato de sódio, para promover a hidrólise da sacarose foi adicionado, à solução de melaço, enzima invertase (54Ug/mg - Sigma) preparada a 2% (m/v), então o sistema foi incubado à 55°C por 2 horas. Após este período foi realizada a inativação da enzima através da fervura do sistema em placa aquecedora (GP científica Ltda/modelo, 2000-A) por 5 minutos (HAULY *et al.*, 2003).

O pH foi então ajustado para 6,2 com hidróxido de sódio 1 mol/L e suplementado com extrato de levedura (2% m/v) e peptona (2% m/v). Finalmente a pré-fermentação foi adicionada a um béquer contendo 600 mL de meio de cultivo, na qual as condições foram

mantidas sob agitação de 100 rpm com agitador de pistão (Fisatom 713) e 37°C em banho-maria (Evlab Ltda EV:015) por 48 horas (HAULY *et al.*, 2003).

Farinha de varredura e fécula de mandioca: Para a farinha de varredura e fécula de mandioca (cedida pela Pinduca Agroindustrial LTDA), foi homogeneizado 110g de farinha e 600 mL de água destilada para a obtenção de uma solução a 18,3% (m/v). Em seguida, foi adicionado 2 mL de cloreto de cálcio a 1% e o pH ajustado para 6,2, com solução hidróxido de sódio 1N, o sistema foi homogeneizado com agitador de pistão (Fisatom 713) e então foi adicionado 0,5 mL de enzima α -amilase termo-estável (Termamyl 120L, Novozymes) previamente diluída em 15 mL de água destilada, foi aquecido até a temperatura de 90-95°C em placa aquecedora (GP científica Ltda 2000-A), mantendo a solução nessas condições por 1 hora sob constante agitação até obter uma solução liquidificada.

Após a liquidificação a solução foi resfriada e o pH reduzido para 4,5 adicionando solução de ácido clorídrico 3%. Foi acrescentado 0,5 mL de enzima amiloglucosidase (AMG 300L, Novozymes) previamente diluída em 15 mL de água destilada incubando a solução por 15 horas a 60°C sob agitação de 100 rpm, com objetivo de converter a molécula de amido em praticamente 100% de unidades de glicose. Após este período a inativação das enzimas foi realizada através da fervura do sistema por 10 minutos.

Finalizado o processo de hidrólise, a solução foi diluída para apresentar uma quantidade de açúcares redutores próxima aos outros meios, então para cada 100 mL de meio hidrolisado foi adicionado 100 mL de água destilada. O pH foi ajustado para 6,2, com hidróxido de sódio 1N, e 600 mL do meio foi suplementado com extrato de levedura 2% (m/v) e peptona 2% (m/v) e adicionado o meio de pré-fermentação que se encontrava em total atividade. O sistema foi mantido sob agitação de 100 rpm e a 37°C por 48 horas.

Frutose: A frutose foi diluída em água destilada para obtenção de uma solução 10% (m/v), o pH foi ajustado para 6,2 com solução tampão acetato de sódio, e 600 mL do meio foi suplementado com extrato de levedura 2% (m/v) e peptona 2% (m/v) e adicionado o meio de pré-fermentação. O sistema foi mantido sob agitação de 100 rpm e a 37°C por 48 horas.

2.4 Métodos analíticos

Para acompanhar o processo fermentativo foram coletadas alíquotas de amostras periodicamente durante a fermentação para acompanhar a cinética de produção de ácido lático e o consumo de açúcares redutores. Foi avaliado também, no início e ao término dos processos fermentativos, a biomassa, o pH e a viabilidade celular.

Dosagem de ácido lático: O ácido lático foi extraído do caldo fermentado utilizando-se cloreto de bário 9,88 %; hidróxido de sódio 0,66 N e sulfato de zinco 22,5% conforme Silva (1990). 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 lático foi realizada a 425 nm em espectrofotômetro UV/VIS (PG instruments Ltda T80+).

Análise de açúcares redutores: O decréscimo de açúcares redutores foi determinado empregando a metodologia de Somogyi (1945) e Nelson (1944) com leituras espectrofotométricas a 540nm em espectrofotômetro UV/VIS (PG instruments Ltda/modelo, T80+)

Quantificação da biomassa: A biomassa foi avaliada a partir de 10 mL de meio fermentado no início e fim da fermentação. Foram realizados três ciclos de lavagem com água destilada e centrifugação a 3400 rpm (Centrifuga Edulab Ltda/modelo, 8-2B), por 30 minutos; então a biomassa foi seca em estufa a 60°C até peso constante (OLIVEIRA, 2006).

Análise de pH: A análise de pH foi realizada através de um pHmetro (Tecnopon Ltda Mpa-210) calibrado com soluções padrões de pH 4,0 e 7,0.

Viabilidade celular: A viabilidade celular foi determinada através da técnica de semeadura em profundidade utilizando Agar MRS - Himedia e incubando as placas em estufa de cultura bacteriológica (Quimis Ltda/modelo, 376-14) depois de inoculado o microrganismo a 37°C durante 48 horas (SILVA e JUNQUEIRA, 1997).

3 Resultados e discussão

As Figuras 1 e 2 apresentam os resultados referentes ao decréscimo de açúcares redutores e produção de ácido lático, respectivamente, em função do tempo para os meios: melão de cana-de-açúcar, farinha de varredura, fécula de mandioca e frutose, suplementados com 2% de extrato de levedura e 2% de peptona.

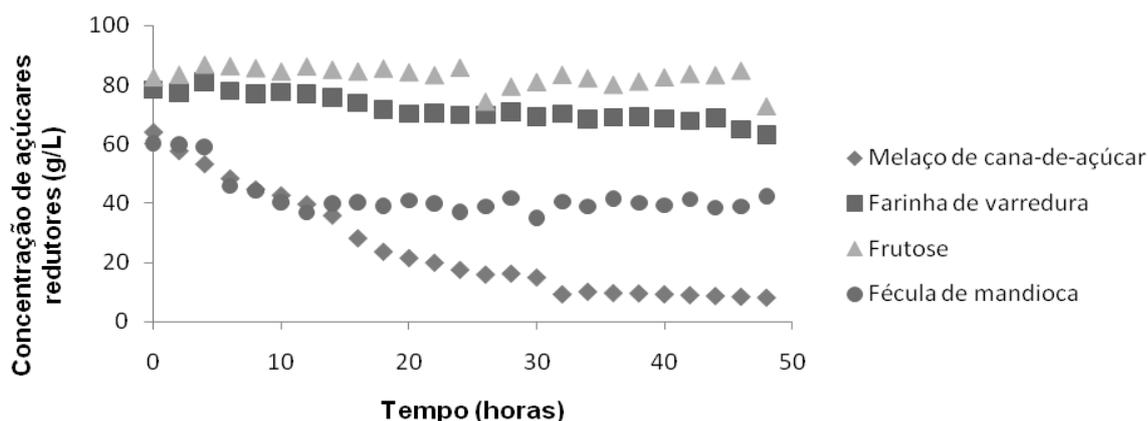


Figura 1: Concentração de açúcares redutores consumidos em função do tempo de fermentação para os meios: melão de cana-de-açúcar, farinha de varredura, frutose e fécula de mandioca.

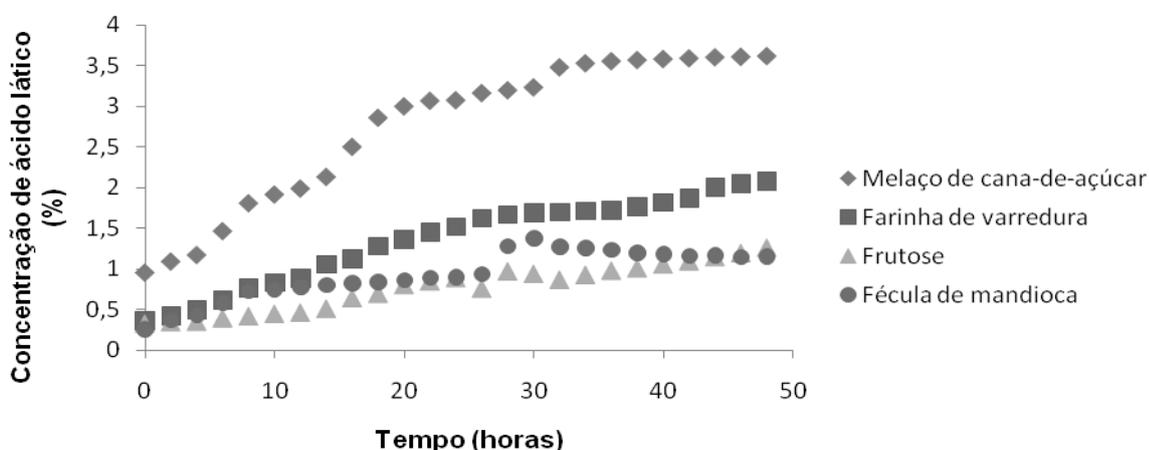


Figura 2: Concentração de ácido láctico produzido em função do tempo de fermentação para os meios: melão de cana-de-açúcar, farinha de varredura, frutose e fécula de mandioca.

Analisando as figuras 1 e 2, observa-se que o meio fermentativo com melão apresentou maior produção de ácido láctico e maior consumo de açúcares redutores. Segundo Rodrigues (2005), o melão é rico em elementos nutrientes, ideal para o crescimento de microrganismos. De acordo com Costa *et al.* (2000) e Bringhenti *et al.* (2007), o melão, além de açúcares, contém proteínas, vitaminas, precursores, oligoelementos e minerais, dentre eles (Ca, Mg, Fe, Na, K, Se, Br, Cr, Se). Então, o meio com melão, além da suplementação, contém elementos que podem ter influenciado a atividade dos microrganismos, consequentemente havendo maior produção de ácido láctico e maior consumo de açúcares.

Para os meios de cultivo, farinha de varredura, frutose e fécula de mandioca, a produção de ácido e consumo de açúcar redutor foi menor que para o melão, sugerindo assim que o microrganismo tem melhor desempenho em meios que contenham mais de uma fonte de carbono, neste caso glicose e frutose. Resultados semelhantes foram observados por Haully *et*

al. (2003), que testaram os efeitos de diferentes concentrações de glicose e lactose como meio de cultivo, utilizando uma cultura mista de *L. curvatus*, *L. plantarum*, *P. acidilactici* e *E. faecium*. Os meios que continham as duas fontes de carbono apresentaram maior produção de ácido láctico em relação aos meios que continham somente uma fonte. Neste trabalho os autores apresentam que a melhor condição de cultivo foi, 4,5% de glicose (m/v), 0,5% de lactose (m/v), que proporcionou uma produção de 4,78% de ácido láctico.

Hofvendahl e Hahn-hagerdal (1999) também mostraram em seu trabalho que a utilização simultânea de glicose e frutose na fermentação com *L. delbrueckii* foi mais eficaz do que só a utilização de glicose.

A Tabela 1 apresenta os resultados de biomassa, viabilidade celular, pH, concentração de ácido láctico e de açúcares redutores (AR) analisados no início e no fim da fermentação do melão de cana-de-açúcar, da farinha de varredura, frutose e fécula de mandioca.

Tabela 1: Resultados dos parâmetros analisados no início e fim da fermentação para os meios, melaço de cana-de-açúcar, farinha de varredura, frutose e fécula de mandioca.

| Parâmetros analisados durante a Fermentação | Melaço | | Farinha de Varredura | | Frutose | | Fécula de mandioca | |
|---|---------------------|---------------------|----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | Início | Fim | Início | Fim | Início | Fim | Início | Fim |
| AR (g/L) | 64,1 | 8 | 78,3 | 63 | 82,4 | 72,6 | 60,2 | 42,2 |
| AR consumido (%) | 87,5 | | 19,5 | | 11,9 | | 29,9 | |
| Ácido lático (g/L) | 9,5 | 36,2 | 3,6 | 20,7 | 3,2 | 12,6 | 2,5 | 11,5 |
| pH | 6,2 | 4,0 | 6,2 | 3,5 | 6,2 | 3,8 | 6,2 | 3,7 |
| Viabilidade Celular (UFC/mL) | 5,4x10 ⁶ | 4,8x10 ⁸ | 6,0x10 ⁶ | 1,1x10 ⁸ | 5,6x10 ⁶ | 3,9x10 ⁷ | 5,0x10 ⁶ | 4,9x10 ⁷ |
| Biomassa (g/mL) | 0,01 | 0,03 | 0,14 | 0,16 | 0,014 | 0,016 | 0,015 | 0,017 |

AR:açúcar redutor; UFC/mL: unidades formadoras de colônias por mililitro.

Observando a Tabela 1, pode-se notar novamente um maior desempenho para o melaço, além da maior produção de ácido lático, 36,2 g/L, e maior consumo de açúcar redutor, 87,5%, apresentando também maior aumento de viabilidade celular e biomassa, concordando com Oliveira *et al.* (2009) e confirmando a sugestão de que seus nutrientes influenciam positivamente na atuação das bactérias.

As diferenças de produção de ácido lático concordam com Oliveira *et al.* (2009), onde os meios farinha de varredura e fécula de mandioca produziram menos ácido lático em relação ao melaço.

Analisando o decréscimo de açúcares redutores, para a farinha de varredura, frutose e fécula de mandioca verifica-se 19,5%, 11,9% e 29,9% respectivamente. Já o melaço apresentou um consumo de 87,5%, sendo um indicativo para a menor produção de ácido lático, para os meios, farinha, frutose e fécula.

Os valores de pH se mostraram coerentes, já que houve produção de ácido lático em todos os meios. De acordo com Oliveira *et al.* (2009), as bactérias lácticas iniciam seu crescimento em pH neutros ou alcalinos e continuam crescendo através da fermentação resistindo até mesmo ao pH ácido. Esta capacidade das bactérias de produzir e tolerar uma concentração relativamente alta de ácido lático é também de grande valor seletivo, já que as capacita a eliminar a competição da maioria das outras bactérias em ambientes ricos em nutrientes como é o caso do melaço de cana-de-açúcar.

Os valores de biomassa também se mostraram coerentes, pois em todos os meios analisados houve um aumento de viabilidade celular.

O valor de biomassa da farinha de varredura se mostrou alto em relação aos demais meios de cultivo, pois, além da biomassa microbiana presente, a farinha

contém fibras e impurezas, já que a farinha de varredura consiste na farinha de mandioca que cai no chão da fábrica e após cada turno é varrida e armazenada.

4 Conclusão

O melaço de cana-de-açúcar se mostrou como uma alternativa viável, pois, além de açúcar, possui elementos que podem influenciar a atividade do microrganismo, o que proporcionou uma maior produção de ácido lático.

O amido é considerado um substrato importante para obtenção de ácido lático por ser de baixo custo e rico em açúcar fermentescível, porém, neste trabalho não se obteve um bom desempenho do microrganismo, nos meios, fécula de mandioca e farinha de varredura comparado com o melaço de cana-de-açúcar, pode-se sugerir então que o uso de uma suplementação mais adequada possa aumentar a produção de ácido lático.

A frutose não se mostrou uma alternativa viável, pois, além de não apresentar uma boa produção de ácido lático, torna o processo mais caro, por não ser um subproduto, como é o caso da farinha de varredura e do melaço.

Analisando os resultados e comparando com as literaturas consultadas, sugere-se que o microrganismo tem melhor desempenho em meios que contenham mais de uma fonte de carbono para produção de ácido lático e que a composição do meio é essencial para o bom desenvolvimento do microrganismo, como observado para o melaço de cana-de-açúcar.

5 Referências

- AZEVEDO, A. C. **Liberação das enzimas LHD e PepX e evolução da maturação de queijo Parmesão adicionado de culturas autolíticas de *Lactobacillus helveticus***. 2009. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciências de Alimentos) – Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Universidade Estadual Paulista, 2009. Disponível em: <http://www.athena.biblioteca.unesp.br/exlibris/bd/brp/33004153070P3/2009/azevedo_ac_me_sjrp.pdf>. Acesso em: 8 fev. 2010.
- BRINGHENTI, L; CABELLO, C; URBANO, L. H. Fermentação alcoólica de substrato amiláceo e hidrolisado enriquecido com melaço de cana. **Ciênc. Agrotec**, v.31, n.2, p. 429-432, 2007.
- CARVALHO, W. et al. Aditivos alimentares produzidos por via fermentativa. Parte I: ácidos orgânicos. **Revista Analytica**, v. 3, n. 18, p. 70-76, 2005.
- COSTA, M. J. C. C. et al. Avaliação da eficácia da suplementação com melaço na dieta de ratos normais e depletados. **ALAN**, v.50, n.4, p.341-345, 2000.
- GUILHERME, A. A; PINTO, G. A. S; RODRIGUES, S. Avaliação da produção de ácido lático por *Leuconostoc mesenteroides* B512F em xarope de caju. **Ciênc. Tecnol. Aliment**, v.29, n.4, p. 738-747, 2009.
- HAULY, M. C. O; OLIVEIRA, A. R.; OLIVEIRA, A. S. Produção de ácido lático por *Lactobacillus curvatus* em melaço de cana-de-açúcar. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 24, n. 1, p. 133-142, 2003.
- HOFVENDAHL, K; HAHN-HAGERDAL, B. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. **Enzyme and microbial technology**, v. 26, p. 87-107, 1999
- HONORATO, T. L. et al. Produção de ácido lático e dextrana utilizando suco de caju como substrato. **Ciênc. Tecnol. Aliment**, v. 27, n. 2, p. 254-258, 2007
- LIMA, U. A; AQUARONE, E; BORZANI, W. **Biotecnologia: Tecnologia das fermentações**. São Paulo: Edgard Blucher Ltda, 1975.
- MALTA, H. L. **Estudos de parâmetros de propagação de fermento (*Saccharomyces cerevisiae*) para produção de cachaça de alambique**. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciência de alimentos) – Pós-graduação em Ciência de Alimentos, Universidade Federal de Minas Gerais, 2006. Disponível em: <http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/1843/MBSA6XWFAD/1/diss_versao_final.pdf>. Acesso em: 5 março 2010.
- NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogy method for determination of glucose. **Biochemistry**, v. 84, p. 375-380, 1944.
- OLIVEIRA, A. M. **Diagnóstico dos resíduos sólidos gerados por uma indústria química de produção de ácido orgânico como suporte para otimização de um programa de gerenciamento de resíduos**. 2008. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Pós-graduação em Engenharia Ambiental, Centro Federal de Educação Tecnológica de Campos, 2008. Disponível em: www.ppea.cefetcampos.br/.../Alessandro%20Oliveira.pdf. Acesso em: 8 fev. 2010.
- OLIVEIRA, M. C. **Avaliação do processo de fermentação alcoólica de suco de maçã obtido por liquefação enzimática**. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2006. Disponível em: <http://www.uepg.br/mestrados/mescta/Arquivos/Dissertacoes/OLIVEIRA,MCS.pdf>. Acesso em: 26 fev. 2010.
- OLIVEIRA, R. F. et al. Produção fermentativa de ácido lático a partir do melaço da cana-de-açúcar por *Lactobacillus casei*. **Braz. J. Food Technol**, v. 12, p. 34-40, 2009.
- RODRIGUES, A. D. **Estudo da produção de polihidroxibutirato por *Cupriavidus nicator* em fermentação no estado sólido**. 2005. Tese (Mestrado em Ciências em Engenharia Química) – Pós-Graduação de Engenharia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2005. Disponível em: <http://teses.ufrj.br/COPPE_M/AlexandreDantasRodrigues.pdf>. Acesso em: 20 fev. 2010.
- SILVA, D. J. **Análise de alimentos (métodos químicos e biológicos)**. Viçosa: UFV, 1990.
- SILVA, N; JUNQUEIRA, V. C. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, 1997.
- SOMOGYI, M. A. A new reagent for determination of sugar, **Journal Biology Chemistry, Cambridge**, v. 160, n.1, p.61-68, 1945.