

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
BACHARELADO EM ENGENHARIA QUÍMICA

LUÍS FELIPE GROCHOLSKI

**PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO A PARTIR DO MELAÇO DE CANA-
DE-AÇÚCAR**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

PONTA GROSSA

2019

LUÍS FELIPE GROCHOLSKI

**PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO A PARTIR DO MELAÇO DE CANA-
DE-AÇÚCAR**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Engenharia Química do Departamento de Engenharia Química, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Bittencourt Sydney

PONTA GROSSA

2019



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Ponta Grossa
Curso de Engenharia Química



TERMO DE APROVAÇÃO

Produção de ácido láctico a partir do melaço de cana-de-açúcar

por

Luís Felipe Grocholski

Monografia apresentada no dia 19 de novembro de 2019 ao Curso de Engenharia Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Ponta Grossa. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado com restrições.

Profa. Dra. Sabrina Ávila Rodrigues
(UTFPR)

Prof. Me. Luis Alberto Chavez Ayala
(UTFPR)

Prof. Dr. Eduardo Bittencourt Sydney
(UTFPR)
Orientador

Profa. Dra. Juliana de Paula Martins
Responsável pelo TCC do Curso de Engenharia Química

A folha de aprovação assinada encontra-se na coordenação do curso.

AGRADECIMENTOS

Aos meus familiares, pelo apoio, amor e palavras de carinho em momentos difíceis.

À UTFPR-PG, seu corpo docente, administrativo e direção pela oportunidade de ampliação dos conhecimentos e crescimento pessoal e profissional.

Ao meu orientador, Eduardo Bittencourt Sydney, pelo suporte que me deu em todos os momentos que precisei, por suas correções e ensinamentos nesse período.

Aos meus amigos, que participaram da minha trajetória por todos esses anos, sempre me dando suporte quando necessário.

À empresa Raízen (Unidade Costa Pinto - SP), pelo fornecimento do melaço de cana-de-açúcar.

E a todos que de alguma forma, seja direta ou indiretamente, participaram da minha formação, meu muito obrigado.

RESUMO

GROCHOLSKI, Luís Felipe. **Produção de ácido láctico a partir do melaço de cana-de-açúcar**. 2019. 44p. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado Engenharia Química) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Ponta Grossa, 2019.

O ácido láctico é um composto com vasta aplicação na indústria, principalmente nos setores de alimentos, químico, farmacêutico e têxtil. Como destaque nos últimos anos pode-se citar o ácido poli-láctico (PLA), utilizado na área de embalagens e para confecção de itens médicos com biorreabsorção. Devido sua aplicabilidade e a preocupação ambiental, o ácido láctico produzido por vias fermentativas utilizando resíduos industriais é um processo com bastante foco em pesquisas, visando a viabilidade e produtividade. O presente trabalho teve como objetivo produzir ácido láctico através de processo fermentativo empregando como meio de cultivo melaço de cana-de-açúcar 10% (m/v) suplementado com diferentes fontes de nitrogênio: ureia 2% (m/v), extrato de levedura 2% (m/v) e permeado do soro de leite 2% (m/v). O meio foi inoculado com o *Lactobacillus johnsonii* e o *Lactobacillus helveticus* e a condição que apresentou melhor resultado de biomassa, considerando custo x benefício, foi escalonada para o reator. No reator as condições de fermentação foram: pH $5,7 \pm 0,2$; temperatura 37 °C; agitação em 100 rpm; mantidos por 48 h. Os processos foram acompanhados através de: produção de biomassa; avaliação do aumento de concentração de ácido láctico utilizando HPLC com comprimento de onda 210 nm, fluxo de 0,3 mL/min e fase móvel Na₂SO₄ 40mM; avaliação do consumo de açúcares totais utilizando-se do método Fenol-Sulfúrico com leituras espectrofotométricas a 490 nm; avaliação da viabilidade da utilização do permeado do soro de leite. Notou-se que após 2 h de fermentação foi alcançada a estabilidade da produção. O processo de produção de ácido láctico com as dadas condições mostrou-se viável, alcançando uma redução de custo de 8 vezes em relação à utilização do extrato de levedura e produzindo cerca de 4,04 g/Lh. O rendimento de produto sobre substrato foi de 5,13 g/g, demonstrando um pequeno consumo do substrato para a produção do ácido láctico. Contudo, para trabalhos futuros recomenda-se a redução do tempo de fermentação com retirada de amostras em intervalos menores.

PALAVRAS-CHAVE: Permeado do soro de leite. Ácido láctico. Fermentação.

ABSTRACT

GROCHOLSKI, Luís Felipe. **Lactic acid production from sugarcane molasses.** 2019. 44p. Undergraduate final project (Chemical Engineering) – Federal Technological University of Paraná. Ponta Grossa, 2019.

Lactic acid is a compound with extensive application in the industry, mainly in the food, chemical, pharmaceutical and textile sectors. As a highlight in recent years, polylactic acid (PLA) can be mentioned, used in the packaging area and for the manufacture of medical items with bio resorption. Due to its applicability and environmental concern, lactic acid produced by fermentation using industrial waste is a process with a lot of focus on research, aiming at viability and productivity. The present work aimed to produce lactic acid through fermentation process using sugar cane molasses 10% (m/v) as a culture medium supplemented with different nitrogen sources: urea 2% (m/v), yeast extract 2% (m/v) and permeated whey 2% (m/v). The culture medium was inoculated with *Lactobacillus johnsonii* and *Lactobacillus helveticus* and the condition that presented the best biomass result, considering cost x benefit, was staggered into the reactor. In the reactor the fermentation conditions were: pH 5.7 ± 0.2 ; temperature 37 °C; agitation at 100 rpm; maintained for 48 h. The processes were monitored through: biomass production; evaluation of the increase in lactic acid concentration using HPLC with wavelength 210 nm, flow of 0.3 mL/min and mobile phase Na₂SO₄ 40mM; evaluation of the consumption of total sugars using the Phenol-Sulfuric method with spectrophotometric readings at 490 nm; viability of using milk permeated whey. It was noticed that after 2 h of fermentation the stability of production was achieved. The process of producing lactic acid with the given conditions proved feasible, achieving a cost reduction of 8 times in relation to the use of yeast extract and producing about 4.04 g/Lh. The product/ substrate yield was 5.13 g/g, demonstrating a small consumption of the substrate for the production of lactic acid. However, for future work it is recommended to reduce fermentation time with removal of samples at shorter intervals.

KEYWORDS: Permeated whey. Lactic acid. Fermentation.

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 Características gerais do ácido láctico.	13
Tabela 3.2 Propriedades físicas e termodinâmicas do ácido láctico.	15
Tabela 3.3 Composição físico-química do melaço de cana-de-açúcar bruto.	20
Tabela 3.4 Composição genérica do soro de leite.	21
Tabela 3.5 Composição química da ureia comercial.	22
Tabela 5.1 Valores de pH antes e depois da fermentação e quantidade de massa seca de fermentado.	31
Tabela 5.2 Custo x benefício em relação a massa seca de soro de leite x extrato de levedura para obtenção de ácido láctico via fermentativa.	32
Tabela 5.3 Valores da área obtidos em HPLC a partir dos padrões de ácido láctico conhecidos.	33
Tabela 5.4 Concentração de ácido láctico (g/L) em amostras de fermentado à base de cana-de-açúcar obtido em biorreator.	34
Tabela 5.5 Valores de média de concentração e desvio padrão de ácido láctico das amostras fermentadas à base de cana-de-açúcar em biorreator com análises feitas em duplicata no HPLC.	35
Tabela 5.6 Custo x benefício da utilização do permeado do soro de leite para produção de ácido láctico considerando a produtividade obtida nesse trabalho e no trabalho de Oliveira <i>et al.</i> (2009).	37

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 Formas isoméricas do Ácido Lático.....	14
Figura 3.2 Síntese química do ácido láctico através de hidrólise da lactonitrila.....	16
Figura 3.3 Principais vias de fermentação da glicose em bactérias lácticas.....	18
Figura 4.1 Meio de cultura contendo melaço de cana-de-açúcar 10% com pH 2,51.25	
Figura 4.2 Análise das amostras ao término da fermentação no microscópio.	26
Figura 4.3 Amostra de melaço de cana-de-açúcar suplementada com extrato de levedura 2% no fim da fermentação.....	26
Figura 4.4 Centrífuga de Tubos Falcon utilizada.....	27
Figura 4.5 Biorreator TECNAL com volume de 2,5 L, equipado com sistema de controle de pH, agitação, aeração, espuma e temperatura.....	28
Figura 4.6 Configuração do biorreator para a fermentação.....	29
Figura 5.1 Produção de massa seca utilizando diferentes fontes de nitrogênio em meio de cultivo a base de cana-de-açúcar para obtenção de ácido láctico.	31
Figura 5.2 Curva padrão de ácido láctico obtida via HPLC utilizando concentrações conhecidas de ácido láctico: 0 g/L, 0,5 g/L, 0,75 g/L, 1 g/L e 1,5 g/L.....	33
Figura 5.3 Concentração de ácido láctico (g/L) em amostras de fermentado à base de cana-de-açúcar obtido em biorreator ao longo da fermentação.	34
Figura 5.4 Média da concentração de ácido láctico ao longo da fermentação considerando o desvio padrão.	35
Figura 5.5 Acompanhamento da cinética de produção de ácido láctico 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.....	36
Figura 5.6 Consumo de açúcares redutores ao longo da fermentação.....	38

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	12
2.1. OBJETIVO GERAL:	12
2.2. OBJETIVO ESPECÍFICO:.....	12
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3.1. Ácido Lático.....	13
3.1.1. Aspectos gerais sobre o ácido lático	13
3.1.2. Aplicações do ácido lático	15
3.1.3. Síntese química e processo fermentativo.....	16
3.2. Bactérias lácticas	17
3.3. Melaço de cana-de-açúcar.....	18
3.4. Fontes de nitrogênio.....	20
3.4.1. Extrato de levedura.....	20
3.4.2. Permeado do soro de leite.....	21
3.4.3. Ureia	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1. Microrganismo.....	24
4.2. Meio de cultura.....	24
4.3. Fermentação batelada	25
4.3.1. Análise do processo fermentativo.....	29
4.4. Açúcares totais.....	30
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1. Determinação de produção de massa seca	31
5.2. Produção de ácido lático utilizando o biorreator.....	32
5.3. Açúcares totais.....	37
6. CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS	39

REFERÊNCIAS.....	40
------------------	----

1. INTRODUÇÃO

A preocupação com o meio ambiente e a alta produção de rejeitos industriais têm aumentado de forma significativa o interesse pela utilização de fontes renováveis nos processos fermentativos (HAHN-HAGERDAL e HOFVENDAHL, 2000). Alguns desses resíduos industriais como bagaços de cana-de-açúcar e de mandioca e melaços de cana-de-açúcar e de beterraba têm chamado atenção como matéria prima para processos fermentativos devido às suas boas produtividades, baixos custos e por serem benéficos ambientalmente (JOHN; NAMPOOTHIRI; PANDEY, 2007).

O ácido láctico é um composto com vasta aplicação na indústria, ganhando destaque nos últimos anos por poder ser polimerizado para ácido poli-láctico (PLA) (HAHN-HAGERDAL e HOFVENDAHL, 2000), possuindo a vantagem de ser biodegradável. Após seu descarte, o PLA desaparece em poucos dias sem deixar resíduos, sendo uma ótima maneira de substituir embalagens provenientes do petróleo (TASHIBANA e SHINDO, 2004; IDRIS e SUZANA, 2006). O ácido láctico existe na forma de dois isômeros ópticos, o L-ácido láctico e o D-ácido láctico, em que se diferenciam em algumas propriedades (RASHID, 2008). A síntese química do ácido láctico é baseada na lactonitrila e produz uma mistura racêmica de D e L ácido láctico, sendo menos utilizada por não ser economicamente viável (JOHN, NAMPOOTHIRI, PANDEY, 2007).

Já a produção através do processo fermentativo permite obter-se um isômero puro (D ou L-ácido láctico), além de apresentar vantagens como utilização de recursos renováveis e menor custo de produção (HAHN-HAGERDAL e HOFVENDAHL, 2000). A fermentação pode ser homoláctica ou heteroláctica, produzindo apenas ácido láctico ou, além do ácido láctico, CO₂, etanol e/ou acetato (JOHN, NAMPOOTHIRI, PANDEY, 2007; HAHN-HAGERDAL e HOFVENDAHL, 2000). Como neste trabalho desejava-se obter apenas o ácido láctico, foram utilizados os *Lactobacillus johnsonii* e o *Lactobacillus helveticus* (bactérias lácticas homofermentativas). A suplementação do meio de cultivo com fontes de nitrogênio é uma estratégia para se obter altos rendimento e produtividade, pois altera a relação C/N do meio de cultivo. Neste trabalho foi avaliado o efeito da suplementação de extrato de levedura, permeado de soro do leite e ureia, em diferentes concentrações, na produção de biomassa e produção do ácido láctico.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL:

- Produzir ácido láctico a partir do processo fermentativo do melaço de cana-de-açúcar por *Lactobacillus johnsonii* e *Lactobacillus helveticus*.

2.2. OBJETIVO ESPECÍFICO:

- Analisar o efeito da adição de diferentes fontes de nitrogênio para a produção de biomassa;
- Otimizar a produção de ácido considerando diferentes concentrações de melaço e da fonte de nitrogênio selecionada;
- Utilizar ferramenta estatística para otimização das condições de produção;
- Realizar análises de ácido láctico por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Ácido Lático

3.1.1. Aspectos gerais sobre o ácido lático

O ácido lático (ácido 2-hidroxiopropiônico), $C_3H_6O_3$, é o ácido hidroxicarboxílico com a maior ocorrência na natureza, tendo privilégios por ser versátil em utilizações na indústria de alimentos, produtos farmacêuticos, têxtil e químicas (JOHN; NAMPOOTHIRI; PANDEY, 2007). Foi isolado a primeira vez do leite coalhado por Carl Wilhem Scheele, um Químico Sueco, em 1780 (JOHN; NAMPOOTHIRI; PANDEY, 2007).

O ácido lático puro é um sólido cristalino de coloração branca, cujo ponto de fusão está em torno de 53 °C. Pode apresentar coloração transparente a pouco amarelada após a dissolução na água. Possui sabor azedo, é inodoro e solúvel em água, álcool e éter, porém não é solúvel em clorofórmio (RASHID, 2008) (Tabela 3.1).

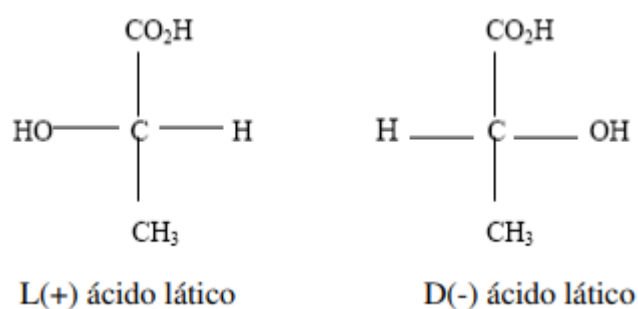
Tabela 3.1 Características gerais do ácido lático.

Propriedade	Características
Atividade Óptica	L(+), D(-) e mistura racêmica
Cristalização	Formação de cristais quando altamente puro
Cor	Transparente ou pouco amarelado
Odor	Não possui
Solubilidade	Solúvel em água, álcool e éter Insolúvel em clorofórmio
Miscibilidade	Miscível em água, álcool, glicerol e furfural
Higroscopicidade	Higroscópico
Volatilidade	Baixa
Reatividade	Versátil, exemplo: ácido orgânico ou álcool

Fonte: Martin, 1996.

Por possuir um carbono assimétrico, há duas diferentes atividades ópticas do ácido láctico, L(+) e D(-), como pode ser observado na Figura 3.1:

Figura 3.1 Formas isoméricas do Ácido Láctico.



Fonte: Rashid, 2008.

A forma óptica ativa do ácido láctico é uma mistura das formas L(+) e D(-), sendo denominada como mistura racêmica ou DL-ácido láctico. Segundo Rashid (2008) as propriedades físicas em geral não são afetadas, com exceção do ponto de fusão.

O isômero L(+) ácido láctico é muito utilizado nas indústrias alimentícias e farmacêuticas devido sua segurança para a saúde humana, já que se trata de um intermediário do metabolismo dos mamíferos em geral (ZHANG *et al.*, 2008). O isômero D(-) ácido láctico tem como uma das aplicações a produção de plásticos biodegradáveis (HAHN-HAGERDAL e HOFVENDAHL, 2000; JOHN, NAMPOOTHIRI e PANDEY, 2007)

A Tabela 3.2 apresenta algumas propriedades físicas e termodinâmicas nos diferentes isômeros do ácido láctico.

Tabela 3.2 Propriedades físicas e termodinâmicas do ácido láctico.

Propriedade	Valor	Isômero
Massa molecular, g	90,08	D, L, DL
Ponto de fusão, °C	52,8	D
	53,0	L
	16,8	DL
Ponto de ebulição (para 0,5mmHg, °C)	82,0	DL
	(para 14mmHg, °C)	122,0
Constante de dissociação (K_a a 25 °C)	3,83	D
	3,79	L
Calor de combustão (ΔH_c), cal/kg	3615	DL
Calor específico (C_p a 20C), J/mol. °C	190	DL

Fonte: Holten, 1971.

Holten (1971) também relatou que há diferenças nas solubilidades dos isômeros. Enquanto o isômero D(-) é solúvel em água, álcool, acetona, éter etílico e glicerol, a mistura racêmica (DL) é solúvel em água, álcool e furfural.

3.1.2. Aplicações do ácido láctico

Aplicações na área alimentícia representam 85% da demanda de ácido láctico. Por décadas ele tem sido usado como conservante e acidulante em alimentos e no setor de bebidas por ser considerado seguro para uso em alimentos pela *Food and Drug Administration* (FDA) (JOHN; NAMPOOTHIRI; PANDEY, 2007).

O ácido láctico também é utilizado em formulações na área farmacêutica, como loções e pomada, assim como na produção de polímeros biodegradáveis para utilizações na medicina como suturas cirúrgicas e próteses (WEE et al., 2006).

A demanda por ácido láctico tem aumentado consideravelmente, devido às promissoras aplicações de seu polímero, o poli-ácido láctico (PLA), como uma alternativa aos plásticos derivados de petroquímicos. O poli-ácido láctico tem recebido atenção considerável como precursor da síntese de plástico biodegradável

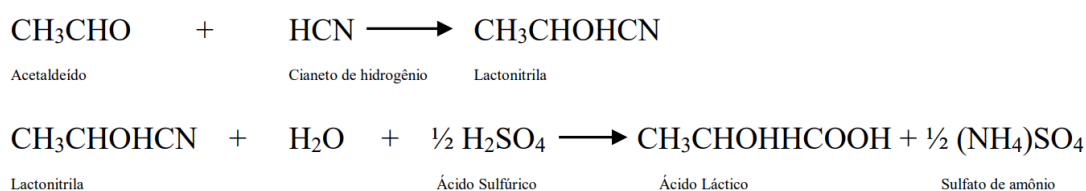
(SENTHURAN et al. 1997). A utilização do PLA é uma alternativa viável ecologicamente, pois plásticos provenientes do petróleo demoram anos para se decompor e são provenientes de matéria-prima não renovável.

3.1.3. Síntese química e processo fermentativo

A produção de ácido láctico se dá por duas diferentes vias: por síntese química ou por processo fermentativo. Cada um possui vantagens e desvantagens, sendo o processo fermentativo mais empregado, utilizando matérias-primas renováveis.

A fabricação do ácido láctico por síntese química teve início em 1963 no Japão e nos Estados Unidos (RASHID, 2008). O processo é baseado na lactonitrila e produz uma mistura racêmica de D e L ácido láctico, além de apresentar um custo elevado (JOHN, NAMPOOTHIRI, PANDEY, 2007, SRIVASTAVA, NARAYANAN e ROYCHOUDHURY, 2004; HAHN-HAGERDAL e HOFVENDAHL, 2000). A produção de ácido láctico pela via química está apresentada na Figura 3.2.

Figura 3.2 Síntese química do ácido láctico através de hidrólise da lactonitrila.



Fonte: Leite, 2006.

A fermentação é caracterizada pela degradação do substrato através de microrganismos em metabólitos, como o etanol e o ácido láctico. Em fermentação tipo batelada todos os nutrientes são adicionados ao início do processo, enquanto em batelada alimentada eles são adicionados conforme a necessidade (MAHER *et al.*, 1995). A produção através do processo fermentativo tem vários pontos positivos em relação a via química. A possibilidade de obter-se uma forma isomérica isolada (D ou L-ácido láctico), dependendo das condições de cultivo e da espécie do microrganismo

(LIU, 2003), a utilização de recursos renováveis e a economia obtida nesse processo são as principais vantagens (HAHN-HAGERDAL e HOFVENDAHL, 2000).

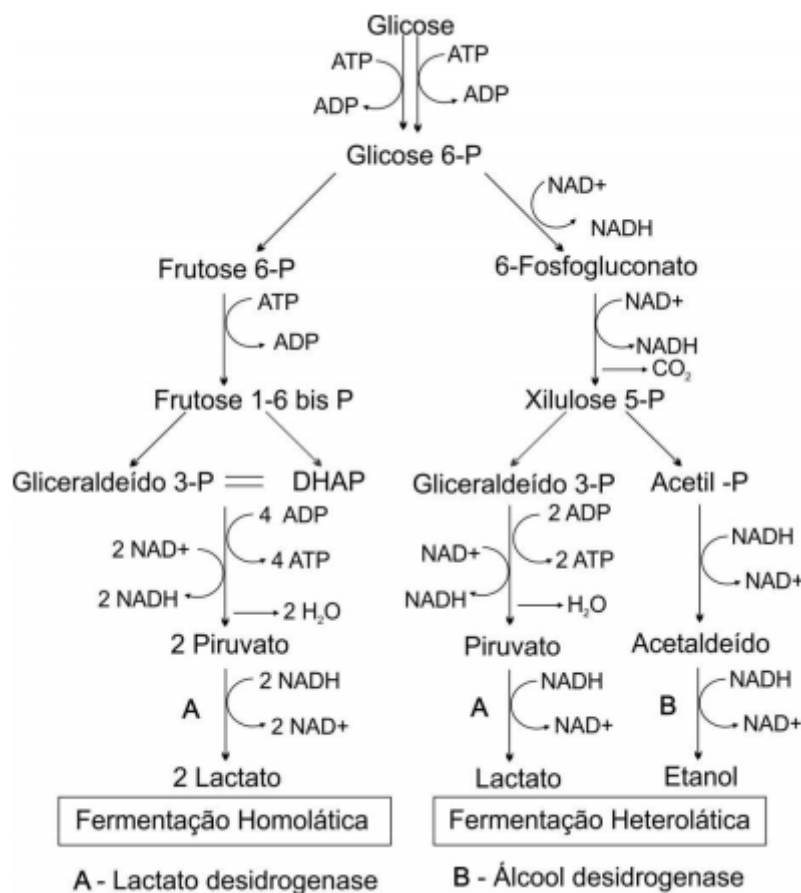
3.2. Bactérias lácticas

As principais bactérias lácticas utilizadas para a produção do ácido láctico são: *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella* e *Carnobacterium* (LIU, 2003). A temperatura de crescimento ideal das bactérias lácticas varia entre 20 e 45 °C e o pH fica entre 5,5 e 6,0, sendo o controle de pH normalmente realizado pela adição de carbonato de cálcio ou hidróxido de amônio (KASCAK *et al.*, 1996).

As bactérias lácticas não possuem a capacidade de sintetizar o ATP (Trifosfato de adenosina) por meio da respiração, a maioria é anaeróbica e utiliza o ácido pirúvico para conversão em lactato. A fermentação pode ser homoláctica, com a produção apenas de ácido láctico, ou heteroláctica, produzindo, além do ácido láctico, CO₂, etanol e/ou acetato, dependendo da bactéria utilizada em combinação como a fonte de carbono (JOHN, NAMPOOTHIRI, PANDEY, 2007; HAHN-HAGERDAL e HOFVENDAHL, 2000).

Na homofermentação o ácido láctico é obtido no final do metabolismo da glicose pela via glicolítica ou via Embden-Meyerhof-Parnas, em que através da ação da enzima lactato desidrogenase, o ácido pirúvico é convertido em ácido láctico. Nesse processo um mol de glicose gera dois mols de ácido láctico. Na heterofermentação, a glicose por via de oxidação das pentoses (fosfoquinase) produz quantidades equimolares de ácido láctico, CO₂ e etanol ou acetato, sendo que o piruvato e o acetaldeído são intermediários nessa via. A proporção de etanol e acetato formados são altamente dependentes do potencial redox, em que diferentes condições de crescimento podem alterar a formação final de produtos. Essas alterações podem ser provenientes da utilização de oxigênio tanto em respirações aeróbias ou anaeróbias ou o uso de diferentes compostos orgânicos (AXELSSON, 2004; HAHN-HAGERDAL e HOFVENDAHL, 2000; REDDY *et al.*, 2008). Na figura 3.3 podem ser observadas as duas vias de fermentação mencionadas.

Figura 3.3 Principais vias de fermentação da glicose em bactérias lácticas.



Fonte: Adaptado de Reddy et al., 2008.

3.3. Melaço de cana-de-açúcar

Uma grande variedade de substratos tem sido utilizada para a produção do ácido láctico pela via fermentativa. O produto considerado mais puro é produzido através da utilização do açúcar puro, porém devido ao seu custo, e pelo fato de que o ácido láctico é um produto consideravelmente barato, torna-se inviável para o processo. Uma alternativa é utilizar produtos de origem agroindustrial, pois além da alta quantidade de carboidratos que poderão ser metabolizados pelos microrganismos, ocorre redução no custo de produção e ainda se contribui com o meio ambiente (HAHN-HAGERDAL e HOFVENDAHL, 2000).

O melaço de cana-de-açúcar é o licor resultante da cristalização do açúcar em sua etapa final, quando não é possível extrair mais sacarose. Os principais componentes do melaço são a água e carboidratos, em que aproximadamente 60% dos sólidos são compostos de glicose, frutose e sacarose (ICIDCA, 1999) (Tabela 3.3). Devido sua rica composição de açúcares fermentescíveis (LIMA; AQUARONE; BORZANI, 1975), sua alta disponibilidade em território nacional e seu baixo preço, o melaço de cana-de-açúcar é cada vez mais sugerido para redução de custos na produção do ácido láctico.

O Brasil além de ser o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, é também o maior produtor de açúcar e etanol. Responsável pela maior quantidade de açúcar comercializado mundialmente, até 2019 deve produzir 47,34 milhões de toneladas de açúcar, correspondendo a um aumento de 14,6 milhões de toneladas em relação a 2007/2008. Em relação à exportação, para 2019 a quantidade prevista é de 32,6 milhões de toneladas (KITAMURA, 2013 apud MAPA, 2013). Os melaços têm alto destaque em processos de fermentação como meio de cultivo, devido ao alto teor de nitrogênio, vitaminas e açúcares. No Brasil durante a fabricação do açúcar, cerca de 17,9 milhões de toneladas de melaço de cana-de-açúcar são gerados.

O substrato deve atender as necessidades tanto energéticas como nutricionais do microrganismo para que ocorra seu crescimento, sendo elas quantidades balanceadas de carbono, nitrogênio, oxigênio e hidrogênio (FELTRIN *et al.*, 1998). Por este motivo, frequentemente faz-se necessário adicionar algum nutriente para tornar o balanço de nutrientes mais favorável.

Tabela 3.3 Composição físico-química do melaço de cana-de-açúcar bruto.

Composição	Concentração	(g/%)
Nitrogênio	0,58	p/v
Fósforo	0,015	p/v
Potássio	1,63	p/v
Umidade	9,10	p/p
Cinzas	9,98	p/p
Glicídios redutores em glicose	14,72	p/p
Glicídios não redutores em sacarose	33,78	p/p

Fonte: Feltrin *et al.*, 1998.

3.4. Fontes de nitrogênio

3.4.1. Extrato de levedura

O extrato de levedura é um concentrado da parte solúvel da levedura, possui uma grande faixa de variação da concentração de ribonucleotídeos e nucleosídeos, além de ser amplamente usado como agente flavorizante e gerador de sabor na carne processada (MAHADEVAN e FARMER, 2006).

Os extratos de levedura autolisada são adicionados, em grande frequência, a alimentos processados com o intuito de aumentar a quantidade de proteína e de vitaminas, assim como aumentar seu sabor e aroma (OTERO *et al.*, 1996). Na produção de salame tem substituído o extrato de carne, o qual possuía o mesmo objetivo (ZAMBONELLI *et al.*, 2000). Por ser uma fonte rica em nutrientes, o extrato de levedura é muito utilizado em meios de cultivo de microrganismos, pois estes são muito exigentes nutricionalmente. Segundo vários autores o extrato de levedura é a melhor fonte de nutrientes para bactérias lácteas (ARASARATNAM *et al.*, 1996; GÖKSUNGUR e GÜVENÇ, 1997; NANCIB *et al.*, 2005).

No entanto, devido ao seu alto custo (99,00 USD/kg segundo RPICorp) e variabilidade de composição dependendo do fornecedor e/ou lotes de produto, o

extrato de levedura pode inviabilizar o processo industrial, sendo assim, outras fontes de nutrientes têm obtido lugar no cultivo utilizando bactérias lácteas.

3.4.2. Permeado do soro de leite

A produção diária de soro de leite é muito elevada e seu descarte gera imensos problemas ambientais (THORNE; TANSEY.; POLLOCK, 1998). Ela é proporcional à quantidade de queijo produzido, em que um quilograma de queijo produz nove quilogramas de soro (KOSIKOWSKI, 1979). Como alternativa, o soro do leite pode ser utilizado em vários processos industriais por se tratar de um meio rico e de fácil obtenção, além do seu preço não ser elevado (0,68 USD/kg) (CLAL, 2019).

Segundo Carvalho (2013), o soro do leite é composto basicamente de água, lactose, proteínas, gorduras, sais minerais, a maioria das vitaminas presentes no leite, além de ácido lático e cítrico e compostos nitrogenados não proteicos, como ureia e ácido úrico. A composição química genérica do soro de leite está representada na Tabela 3.4.

Tabela 3.4 Composição genérica do soro de leite.

Componentes	Concentração (%m/v)
Proteínas	0,9
Gordura	0,04
Cinzas	0,7
Lactose	4,9
Sólidos Totais	6,35
Umidade	93,5

Fonte: Adaptado de Pinto, 2010.

Dentre esses componentes, os que possuem maior valor para a indústria são as proteínas e a lactose. A lactose é uma espécie de carboidrato, com um poder adoçante baixo, muito utilizado na indústria alimentícia e como nutriente para vários processos biotecnológicos (SILVA; BOLINI; ANTUNES, 2004).

Para a obtenção do permeado, assim como outros componentes, é utilizada a técnica de ultrafiltração com membranas poliméricas. Esta vem sendo usada no setor alimentício, principalmente para a recuperação das proteínas do soro (CARMINATTI, 2001). O permeado do soro de leite contém alto teor de lactose e sais minerais (SMITH, 2008), possibilitando uma grande abrangência na sua utilização, como alimentação de animais, produção de lactose, galactose, glicose, álcool, ácido láctico, substrato de fermentações entre outros (DOMINGUES et al., 1999).

3.4.3. Ureia

A ureia é um composto do grupo funcional amida, do qual é um grupo orgânico derivado na amônia (MARTIN e HINE, 2008). HALLIBURTON e MORGAN (1989) salientam que o composto possui fórmula química $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ e é considerada um composto nitrogenado não-proteico (NNP). As principais características físicas da ureia são: estado sólido, quando em temperatura ambiente (25 °C); ponto de fusão entre 132 °C e 135 °C, em que a coloração branca é para a ureia produzida industrialmente e a incolor é produzida no organismo (LERNER e LERNER, 2003).

A composição química da ureia comercial está representada na Tabela 3.5.

Tabela 3.5 Composição química da ureia comercial.

Composto	Proporção (%)
Nitrogênio	46,4
Biureto	0,55
Água	0,25
Amônio Livre	0,008
Cinza	0,003
Ferro + Chumbo	0,003

Fonte: Santos, 2001.

Pelo seu baixo preço (0,23 USD/kg) (INDEX MUNDI, 2018), a ureia é vastamente utilizada como fertilizante e fonte de nutrientes em processos biotecnológicos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

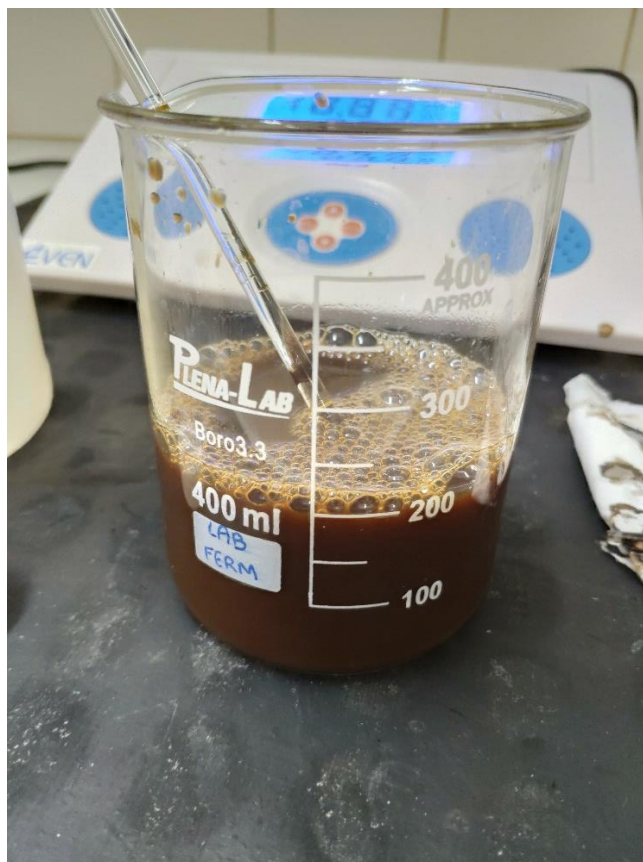
4.1. Microrganismo

Os microrganismos utilizados no processo foram o *Lactobacillus johnsonii* e o *Lactobacillus helveticus*, provenientes de um produto lácteo fermentado adquirido em supermercado da região.

4.2. Meio de cultura

O meio de cultura para fermentação e manutenção do microrganismo foi composto por melaço de cana-de-açúcar com concentração de 10% e pH ajustado para 2,51 com ácido sulfúrico. O melaço de cana-de-açúcar foi cedido pela empresa Raízen (Unidade Costa Pinto - SP).

Figura 4.1 Meio de cultura contendo melaço de cana-de-açúcar 10% com pH 2,51.



Fonte: Autoria própria, 2019.

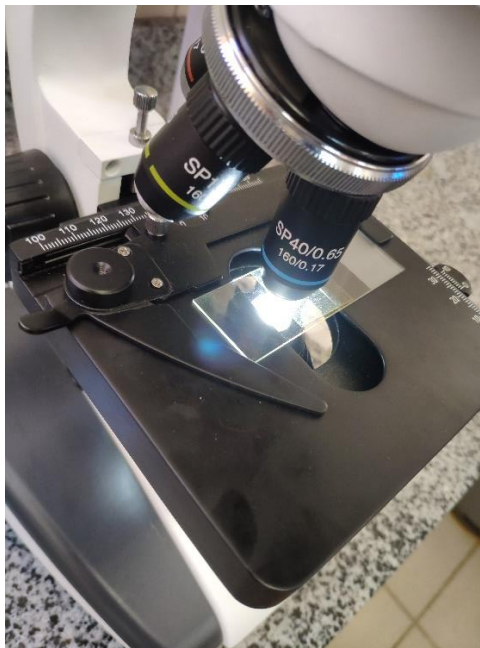
Foram preparadas 6 amostras de 100 mL cada em Erlenmeyers de 250 mL, sendo realizadas em duplicata e suplementadas com diferentes fontes de nitrogênio (extrato de levedura, permeado de soro de leite ou ureia) com concentração de 2%. Após as amostras estarem suplementadas, elas foram auto clavadas por 30 minutos e medido o pH de cada solução.

4.3. Fermentação batelada

Foram adicionados 10 mL da bebida láctea contendo o *Lactobacillus johnsonii* e o *Lactobacillus helveticus* às soluções de melaço de cana-de-açúcar previamente suplementadas. Logo após, os Erlenmeyers foram colocados na estufa, mantendo-os à 37 °C durante o período de 48 horas. Ao término da fermentação foi medido novamente o pH das soluções e, em seguida, foram analisadas no microscópio a fim de verificar a quantidade de microrganismos em cada amostra. A maior quantidade

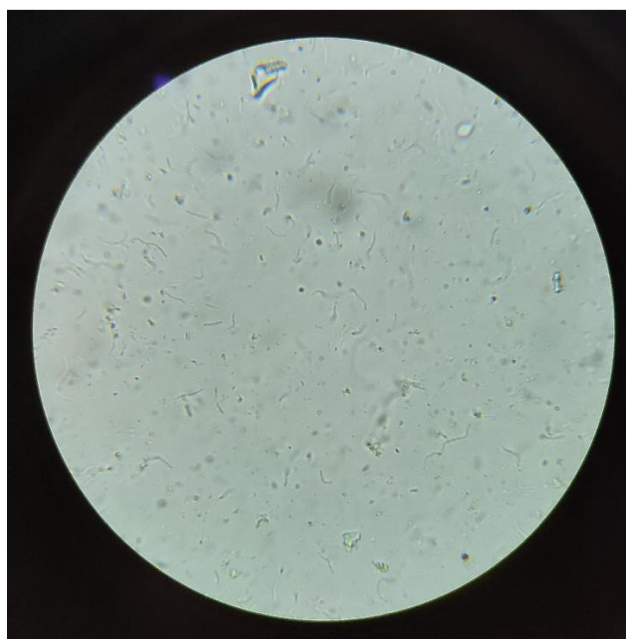
de *Lactobacillus* foi observada nas amostras suplementadas com o extrato de levedura.

Figura 4.2 Análise das amostras ao término da fermentação no microscópio.



Fonte: Autoria própria, 2019.

Figura 4.3 Amostra de melão de cana-de-açúcar suplementada com extrato de levedura 2% no fim da fermentação.



Fonte: Autoria própria, 2019.

Foram retiradas alíquotas de 20 mL de cada amostra e colocadas em tubos Falcon previamente pesados. Os tubos foram centrifugados por 30 minutos à 3755g para separação da parte sólida e do sobrenadante. Após o término da centrifugação, os sobrenadantes foram descartados e os tubos com a parte sólidas foram armazenados na estufa à 80 °C por um período de 24 horas.

Figura 4.4 Centrifuga de Tubos Falcon utilizada.

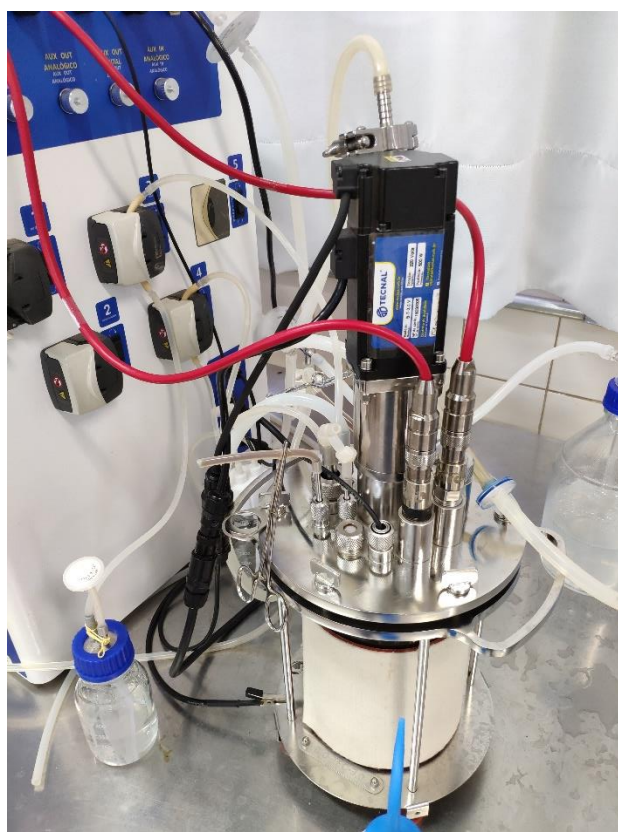


Fonte: Autoria própria, 2019.

Foram realizadas as pesagens da massa seca das amostras após 24 horas na estufa à 80 °C, analisados os resultados, levando em consideração custo x benefício das fontes de nitrogênio, a condição que apresentou melhor resultado foi escalonada para o biorreator (TECNAL, com volume total de 2,5 L e equipado com sistema de controle de pH, agitação, aeração, espuma e temperatura).

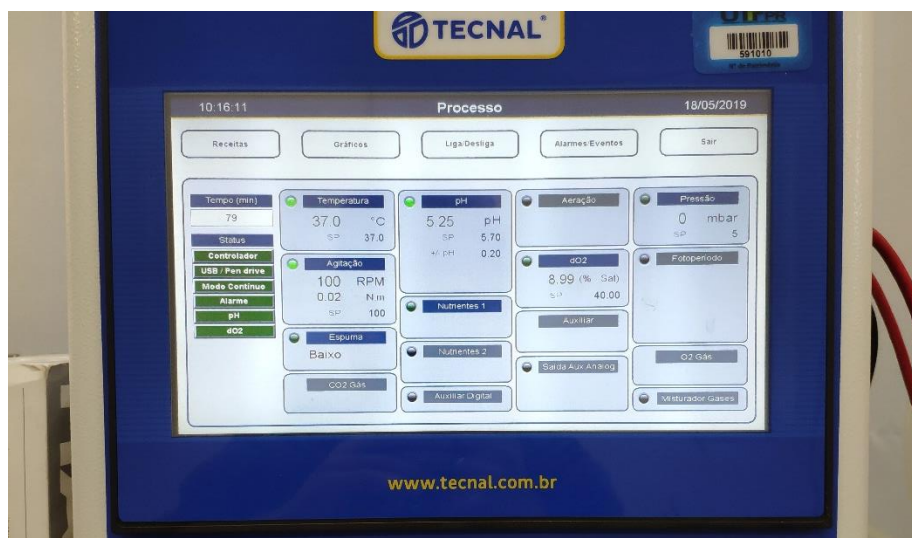
Para a utilização do biorreator, foi preparado 150 mL (10% melaço + 2% permeado de soro de leite) de inóculo, que foi adicionado a 2 L de meio de cultivo. A temperatura foi ajustada em 37 °C, o pH em 5,70 com variação de $\pm 0,20$ e agitação em 100 rpm.

Figura 4.5 Biorreator TECNAL com volume de 2,5 L, equipado com sistema de controle de pH, agitação, aeração, espuma e temperatura.



Fonte: Autoria própria, 2019.

Figura 4.6 Configuração do biorreator para a fermentação.



Fonte: Autoria própria, 2019.

O biorreator operou por um período de 48 horas, sendo periodicamente retiradas amostras. As amostras retiradas foram centrifugadas e o sobrenadante congelado. A fração sólida foi seca até peso constante em estufa de 80 °C para obtenção de peso seco da biomassa.

4.3.1. Análise do processo fermentativo

O processo fermentativo foi analisado quanto a produtividade de ácido láctico (g/L.h) e consumo de açúcar (%) (KWON *et al.*, 1996). A produção do ácido láctico foi monitorada em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) utilizando-se coluna Acclaim AO 5um 4x150 mm, fase móvel 40mM Na₂SO₄ pH 2,68, temperatura de 30°C, fluxo de 0,3 mL/min e detecção a 210 nm. A fase móvel foi preparada a partir de uma solução de Na₂SO₄ 1M, em que foi feita a diluição do mesmo para 40mM e o pH corrigido para 2,68 com ácido fosfórico, totalizando 1L de fase móvel.

Foram utilizados padrões de ácido láctico em diferentes concentrações: 2 g/L, 1,5 g/L, 1 g/L, 0,75 g/L e 0,5 g/L, todos preparados a partir de uma solução de ácido láctico com pureza de 85% e d = 1,209 g/mL. As soluções retiradas do biorreator foram diluídas na proporção de 1:10 para que a visualização dos resultados fosse melhor.

Após ligado o HPLC, foi esperado até a sua estabilização para poder injetar as amostras. Primeiramente foi injetado o branco para eliminação nos resultados de qualquer interferência não presente na amostra, em seguida foram adicionadas as soluções padrões de ácido láctico em diferentes concentrações. Por fim, as soluções resultantes do reator foram injetadas, começando do tempo 0 h e avançando até a conclusão das 48 horas de reação. Cada amostra teve um tempo de duração de análise por volta dos 35 minutos.

4.4. Açúcares totais

Os açúcares totais foram quantificados pelo método de Fenol-Sulfúrico (DUBOIS, 1956). As amostras foram diluídas em uma proporção de 1:1000, adicionando 0,1 mL de amostra em um balão volumétrico de 100 mL e completando com água destilada. Foram utilizados 11 tubos de ensaio, sendo 10 de amostra e 1 de branco, contendo 0,5 mL de conteúdo em cada tubo. Foram adicionados 0,5 mL de fenol 5% e em seguida 2,5 mL de ácido sulfúrico PA, seguindo o método Fenol-Sulfúrico proposto por Dubois (1956).

As soluções foram homogeneizadas e aguardado seu resfriamento para serem analisadas no espectrofotômetro com comprimento de onda 490 nm. Após a análise e utilizando seguinte curva para cálculo, obteve-se a quantidade presente de açúcares totais nas amostras:

$$Abs = 0,0113. [] - 0,0351$$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Determinação de produção de massa seca

Na tabela 5.1 estão representadas as quantidades de massa seca de cada amostra, assim como o pH das mesmas e a seguir o gráfico dos resultados da quantidade de massa seca.

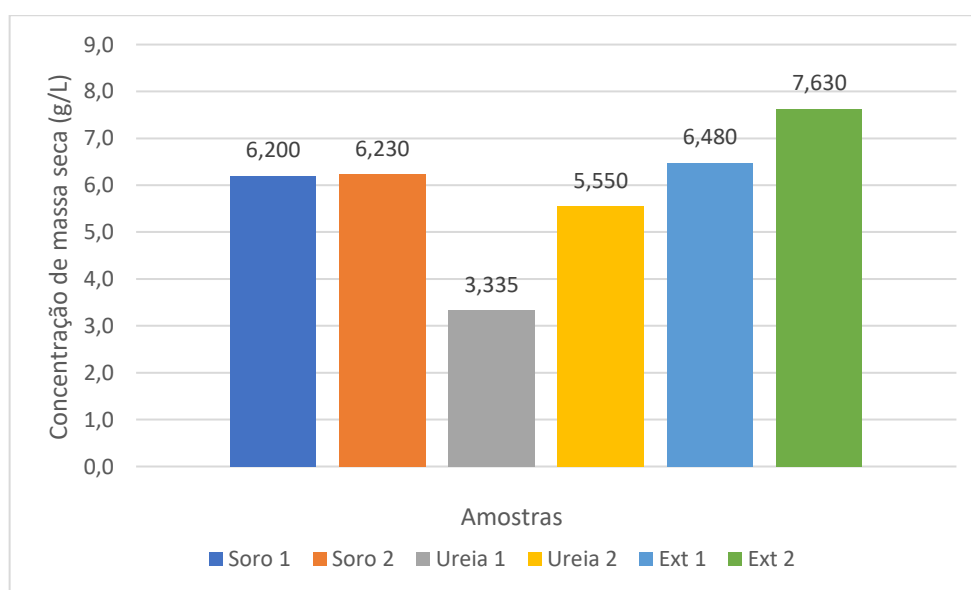
Tabela 5.1 Valores de pH antes e depois da fermentação e quantidade de massa seca de fermentado.

	pH		Tubo Falcon		Produção de massa seca	
	Antes*	Depois*	Antes (g)	Depois (g)	Total (g/20ml)	Total (g/L)
Soro 1	2,70	3,08	7,9556	8,0796	0,1240	6,200
Soro 2	2,70	3,08	7,9885	8,1131	0,1246	6,230
Ureia 1	2,78	8,18	8,8660	8,9327	0,0667	3,335
Ureia 2	2,76	7,87	8,9799	9,0909	0,1110	5,550
Extrato 1	3,98	4,00	7,8550	7,9846	0,1296	6,480
Extrato 2	3,83	3,85	8,2846	8,4372	0,1526	7,630

Fonte: Autoria própria, 2019.

*Valores referentes a antes e depois de ocorrer a fermentação.

Figura 5.1 Produção de massa seca utilizando diferentes fontes de nitrogênio em meio de cultivo a base de cana-de-açúcar para obtenção de ácido láctico.



Fonte: Autoria própria, 2019.

Analisando os resultados, observa-se a relação da variação do pH com a quantidade de massa seca, em que amostras cujo pH ficou menor houve maior produção de massa seca, evidenciando a produção do ácido lático.

Nota-se que a quantidade de massa seca nas amostras de permeado de soro de leite se assemelha a quantidade produzida com extrato de levedura, sendo inferior apenas a uma das amostras. Levando em consideração que o permeado de soro de leite é mais barato que o extrato de levedura, foi realizado um comparativo de custo x benefício para que assim fosse determinada qual fonte de nitrogênio iria para o reator. Os resultados obtidos estão representados na tabela 5.2:

Tabela 5.2 Custo x benefício em relação a massa seca de soro de leite x extrato de levedura para obtenção de ácido lático via fermentativa.

	Preço/L	Preço 20mL	Produção (g/L)	Custo de produção (100g de biomassa)
Soro	R\$ 27,50	R\$ 0,55	6,215	R\$ 8,85
Extrato	R\$ 540,00	R\$ 10,80	7,055	R\$ 153,08

Fonte: Autoria própria, 2019.

Os resultados mostraram que o custo utilizando o permeado de soro de leite é 17,3 vezes menor do que o extrato de levedura, sendo um indício de vantagem na utilização do soro para produção de ácido lático, mesmo que este resultado seja para a produção de massa seca, e não efetivamente do ácido lático.

5.2. Produção de ácido lático utilizando o biorreator

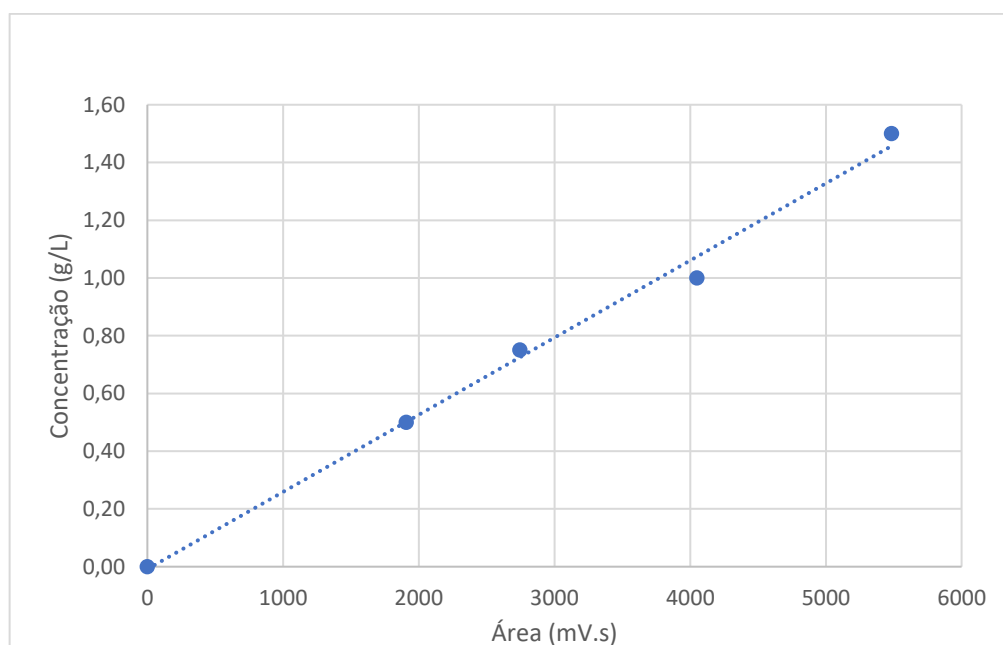
Durante a fermentação em biorreator, foram retiradas amostras em diferentes tempos de fermentação para análise da produtividade de ácido lático. Antes de analisar as amostras foi injetado o branco e em seguida padrões conhecidos de ácido lático com diferentes concentrações, a fim de obter uma curva padrão para o cálculo das concentrações de ácido lático nas amostras. Os valores obtidos através do HPLC e a curva padrão estão representados na Tabela 5.3 e na Figura 5.2.

Tabela 5.3 Valores da área obtidos em HPLC a partir dos padrões de ácido lático conhecidos.

Padrão	Área (mV.s)	Concentração (g/L)
1	5484,303	1,50
2	4050,059	1,00
3	2745,786	0,75
4	1909,639	0,50
0	0,000	0,00

Fonte: A autoria própria, 2019.

Figura 5.2 Curva padrão de ácido lático obtida via HPLC utilizando concentrações conhecidas de ácido lático: 0 g/L, 0,5 g/L, 0,75 g/L, 1 g/L e 1,5 g/L.



Fonte: A autoria própria, 2019.

Através dos valores obtidos na Tabela 5.3, foi plotado o gráfico de curva padrão para obtenção de uma equação de reta para utilizar nos resultados das análises das amostras. Foi obtido um R^2 de 0,9936 e a seguinte equação:

$$y = 0,0003x - 0,0083$$

Após determinado o valor da equação, foram realizadas as análises nas amostras previamente retiradas do biorreator, que se encontravam congeladas. Após

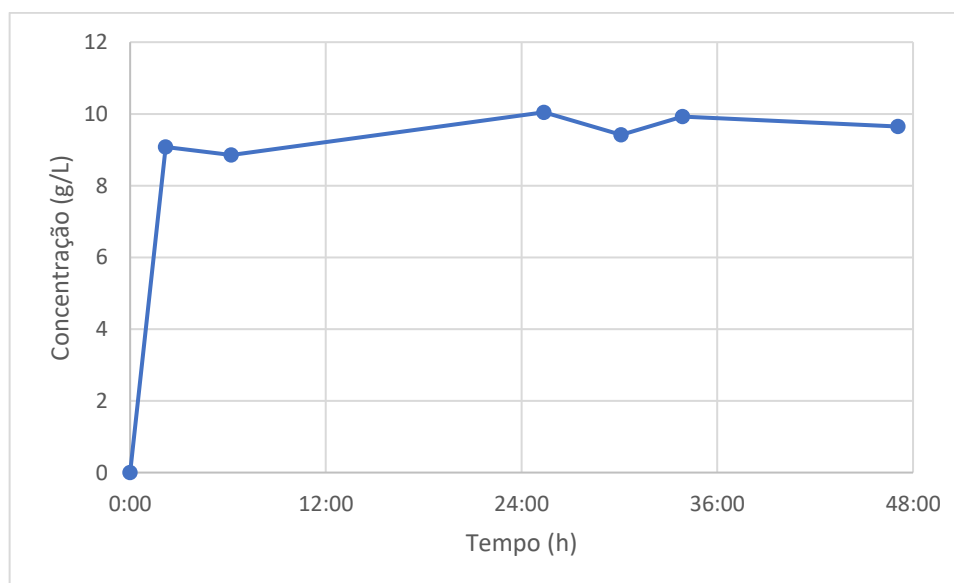
o completo descongelamento, as amostras foram diluídas na proporção de 1:10, pois mesmo sendo centrifugadas, as amostras por conter melaço de cana-de-açúcar são altamente turvas, impossibilitando a análise, logo a diluição foi necessária para os resultados ficarem mais visíveis. Os resultados obtidos foram plotados em gráfico para a melhor análise dos resultados, como pode ser evidenciado na Tabela 5.4 e na Figura 5.3.

Tabela 5.4 Concentração de ácido láctico (g/L) em amostras de fermentado à base de cana-de-açúcar obtido em biorreator.

Amostra	Tempo de fermentação	Concentração (g/L)	Área (mV.s)
1	0:00	0	0
2	2:11	9,08	3053,69
3	6:12	8,85	2978,56
4	25:22	10,04	3375,96
5	30:06	9,42	3166,70
6	33:52	9,93	3336,78
7	47:05	9,65	3242,69

Fonte: Autoria própria, 2019.

Figura 5.3 Concentração de ácido láctico (g/L) em amostras de fermentado à base de cana-de-açúcar obtido em biorreator ao longo da fermentação.



Fonte: Autoria própria, 2019.

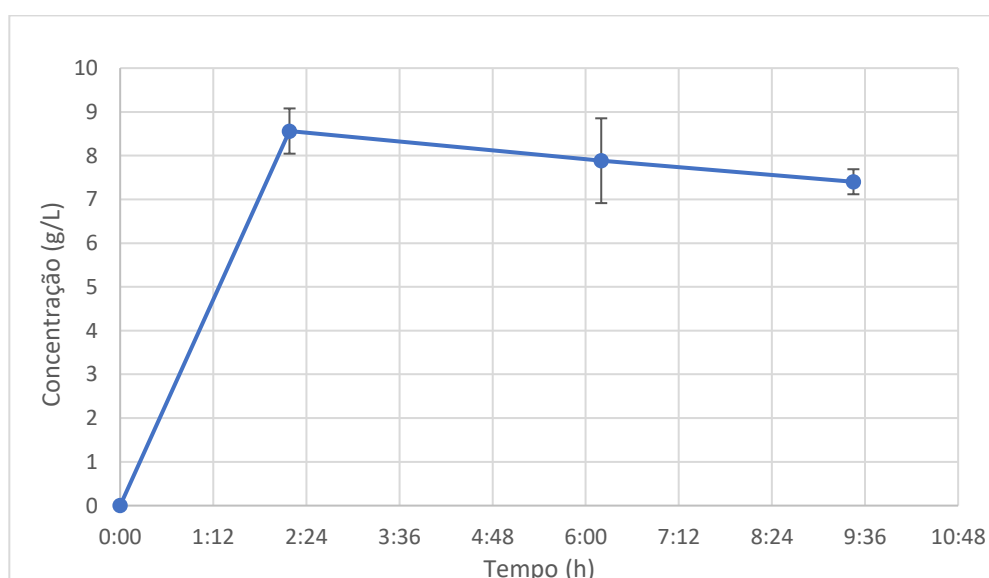
A produção de ácido láctico foi um pouco menor em relação a outros trabalhos que utilizam situações parecidas para a produção do ácido láctico, porém todos utilizam fontes de nitrogênio caras, logo a concentração de ácido láctico nas amostras está dentro do esperado. As análises foram feitas em duplicata, no entanto os resultados da segunda vez se diferiram em torno de 1000 mVs de área, provavelmente devido ao grande tempo em que as amostras estavam congeladas (em torno de 5 meses). Devido a esses resultados, eles não foram utilizados como base comparativa com outros trabalhos, mas estão presentes a seguir a média da concentração obtida em duplicata, assim como seus respectivos desvios padrão:

Tabela 5.5 Valores de média de concentração e desvio padrão de ácido láctico das amostras fermentadas à base de cana-de-açúcar em biorreator com análises feitas em duplicata no HPLC.

Amostra	Tempo de fermentação	Média Conc. (g/L)	Desvio Padrão
1	0:00	0	0
2	2:11	8,56	0,52
3	6:12	7,88	0,97
4	9:27	7,40	0,29

Fonte: Autoria própria, 2019.

Figura 5.4 Média da concentração de ácido láctico ao longo da fermentação considerando o desvio padrão.

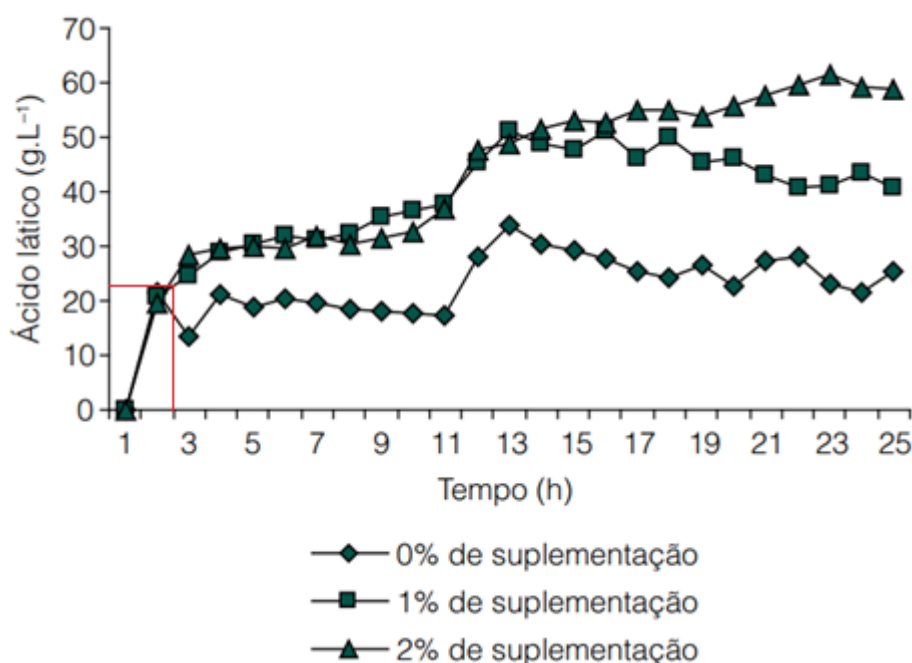


Fonte: Autoria própria, 2019.

Através da Figura 5.3, tem-se que o pico de produção de ácido láctico foi atingido em apenas 2 horas. Ao restante das horas de fermentação no reator, a produção se manteve praticamente constante, logo foi considerado o momento de 2 horas como base dos cálculos. Para este tempo de fermentação foi obtida uma produtividade de 4,04 g/Lh.

Oliveira *et al.* (2009) produziu ácido láctico a partir do melaço de cana-de-açúcar por *Lactobacillus casei*, com apenas alguns fatores diferindo do presente trabalho: o melaço foi tratado com a enzima invertase e como fonte de nitrogênio foram utilizados extrato de levedura + peptona. Em seu trabalho, a reação ocorreu durante 48 horas, porém é notável a fase exponencial em torno de 2 horas de fermentação, se assemelhando ao que foi obtido nesta análise (Figura 5.3). A Figura 5.5 representa a produção de ácido láctico obtida por Oliveira *et al.* (2009).

Figura 5.5 Acompanhamento da cinética de produção de ácido láctico 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.



Fonte: Adaptado de Oliveira *et al.*, 2009.

Em 2 horas de fermentação, *Oliveira et al. (2009)* obteve, utilizando 1% de extrato de levedura e 1% de peptona, totalizando 2% de fonte de nitrogênio, em torno de 22,6 g/L de produção. Isso faz com que, utilizando a mesma base de cálculo, a produtividade seja 11,3 g/Lh. Em comparação, *Oliveira et al.* obteve uma produtividade de 2,8 vezes maior, porém foi utilizado fontes de nitrogênio mais caras em relação ao permeado do soro do leite, além de tratamento do meio de cultivo com enzima que também encareceria o processo. Foi feito, então, uma tabela de custo x benefício da produção de ácido láctico com as diferentes fontes de nitrogênio, representada na Tabela 5.6. Nos custos estão sendo analisadas apenas as fontes de nitrogênio, considerando que em todo o resto do processo foi utilizado quantidades iguais de todos os outros elementos presentes.

Tabela 5.6 Custo x benefício da utilização do permeado do soro de leite para produção de ácido láctico considerando a produtividade obtida nesse trabalho e no trabalho do *Oliveira et al. (2009)*.

	Preço/L	Preço total de 20mL	Produtividade (g/Lh)	Custo de produção (100g de biomassa)	Custo x benefício (permeado do soro)
Soro	R\$ 27,50	R\$ 0,55	4,04	R\$ 13,61	
Peptona	R\$ 700,00*	R\$ 7,00			8,06
Extrato	R\$ 540,00	R\$ 5,40	11,3	R\$ 109,73	

Fonte: Autoria própria, 2019.

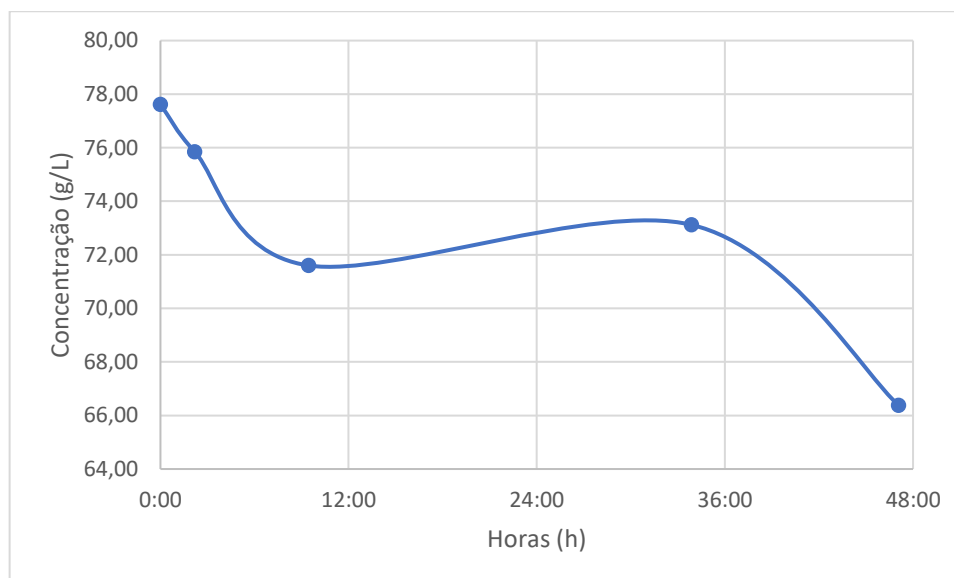
*Preço estimado através do ForLabExpress.

Analisando a Figura 5.6 observa-se que apesar de a produtividade ser 2,8 vezes menor utilizando o permeado do soro de leite, o seu preço bem inferior às outras fontes de nitrogênio o torna atrativo para a produção de ácido láctico, pois em relação ao custo x benefício o soro se sobressai em 8 vezes. Devido à menor produtividade, a quantidade de efluentes será maior, logo o tratamento dos efluentes terá um custo a ser considerado, podendo ser estimado através de um balanço econômico.

5.3. Açúcares totais

Após a análise dos açúcares totais utilizando o espectrofotômetro a 490 nm, foram obtidos alguns dados que foram plotados na Figura 5.6.

Figura 5.6 Consumo de açúcares redutores ao longo da fermentação.



Fonte: Autoria própria, 2019.

Observa-se uma redução na quantidade de açúcares ao longo da fermentação, em que inicialmente estava em uma concentração de 77,62 g/L e ao final da fermentação o valor obtido foi de 66,38 g/L, resultando em um consumo de 14,48% de açúcares redutores. Esses são valores bem menores em relação a outros autores, que obtiveram em torno de 45-60% de consumo (OLIVEIRA *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Nas primeiras 2 horas, quando foram produzidos 9,08 g/L de ácido láctico, apenas 1,77 g/L de açúcares redutores foram consumidos, representando 2,28% da quantidade total. Realizando o cálculo do $Y_{p/s}$, utilizando a seguinte fórmula, obteve-se um valor de 5,13 g/g, evidenciando uma produção elevada em relação à quantidade de açúcar consumido.

$$Y_{\frac{p}{s}} = \frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{(9,08 - 0)}{(77,62 - 75,85)} = 5,13 g_p/g_s$$

Em relação ao $Y_{p/s}$ obtido por Oliveira (2009), com valor de 0,98 g/g, o resultado obtido neste trabalho se apresenta satisfatório, permitindo uma maior conversão de substrato em produto.

6. CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

As metodologias empregadas, tanto para produção como para análise do ácido láctico, se mostraram adequadas para a realização dos objetivos do trabalho. Os resultados obtidos mostraram que é possível produzir ácido láctico utilizando melaço de cana-de-açúcar 10% suplementado com 2% de permeado de soro de leite, inoculado com *Lactobacillus johnsonii* e o *Lactobacillus helveticus* e mantido em biorreator à pH 5,7, 37 °C e rotação de 100 rpm.

A utilização do permeado do soro de leite mostrou-se uma alternativa viável para a produção de ácido láctico, sendo que a relação custo x benefício desta fonte de nitrogênio foi de aproximadamente 8 vezes à utilização de fontes de nitrogênio com valor maior (e geralmente utilizadas em outros trabalhos). Por outro lado, observou-se que a produtividade obtida foi de até 2.8x menor quando comparada com a literatura científica. Tendo em vista que em empresas à procura por um equilíbrio entre produtividade e custo é um ponto de suma importância, podemos dizer que a utilização do permeado de soro de leite pode ser interessante.

REFERÊNCIAS

ARASARATNAM, V; SENTHURAN, A; BALASUBRAMANIAN, K. Supplementation of whey with glucose and different nitrogen sources for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, p. 482-286, 1996.

AXELSSON, L. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In: SALMINEN, S; WRIGHT, A; OUWEHAND, A. **Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects**. 3 ed, p. 19-85, 2004.

CARMINATTI, C. A. **Ensaio de hidrólise enzimática da lactose em reator a membrana utilizando beta-galactosidase *Kluyveromyces lactis***. 2001. 79 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, 2001.

CARVALHO, K. D. **Utilização de soro de leite doce na fabricação de sorvete de massa**. 2012. 195 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Sustentável e Qualidade de Vida) - Centro Universitário das Faculdades Associadas de Ensino – FAE, São João da Boa Vista, 2013.

CLAL. **Whey and by-products Prices Overview**. Disponível em: <https://www.clal.it/en/?section=grafici_siero>. Acesso em: 08 nov. 2019.

DATTA, R; TSAI, S; BONSIGNORE, P; MOON, S; FRANK, J. R. Technological and economic potencial of poly (lactic acid) and lactic acid derivates. **Microbiology Reviews**, v.16, p. 221-231, 1995.

DOMINGUES, L.; LIMA, N.; TEIXEIRA, J. A. “**Novas metodologias para a fermentação alcoólica do soro de queijo**”. In: CONFERÊNCIA NACIONAL SOBRE A QUALIDADE DO AMBIENTE, 6, Lisboa, 1999 - "Actas da 6.^a Conferência Nacional sobre a Qualidade do Ambiente". Lisboa: Universidade Nova de Lisboa, 1999. vol. 3, p. 271-280

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric Method form Determination of Sugars and Related Substances. **Nature**, v. 28, n. 3, p. 350 — 356, 1956.

FELTRIN, V. P.; SANT'ANNA, E. S.; PORTO, C. S.; TORRES, C. O. Produção de *Lactobacillus plantarum* em Melaço de Cana-de-açúcar. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 43, 1998.

FORLABEXPRESS: Peptona Bacteriológica. [S. l.], 4 nov. 2019. Disponível em: <<https://www.forlabexpress.com.br/peptona-bacteriologica-kasvi-frasco-500g>>.

Acesso em: 4 nov. 2019.

GÖKSUNGUR, Y; GÜVENÇ, U. Batch and Continuous Production of Lactic Acid from Beet Molasses by *Lactobacillus delbrueckii* IFO 3202. **Chemical Technology and Biotechnology**, v. 69, p. 399-404, 1997.

HAHN-HAGËRDAL, B; HOFVENDAHL, K. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 87-1007, 2000.

HALIBURTON, J. C.; MORGAN, S. E. Nonprotein nitrogen-induced ammonia toxicosis and ammoniated feed toxicity syndrome. **Vet Clin North Am Food Anim Pract**, v. 5, n.2, p. 237-249, 1989.

HOLTEN, C.H. **Lactic Acid properties and chemistry of lactic acid and derivatives**. Verlag Chemie, Germany, 1971.

ICIDCA. Instituto Cubano de Pesquisa dos Derivados da Cana-de-açúcar. **Manual dos derivados da cana-de-açúcar: diversificação, matérias-primas, derivados do bagaço, derivados do melaço, outros derivados, resíduos, energia**. Brasília: ABIPTI, p. 49-55, 267-271, 297-301, 1999.

IDRIS, A; SUZANA, W. Effect of sodium alginate concentration, bead diameter, inicial pH and temperature on lactic acid production from pineapple waste using immobilized *Lactobacillus delbrueckii*. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1117-1123, 2006.

INDEX MUNDI. **Urea Monthly Price**. Disponível em: <<https://www.indexmundi.com/commodities/?commodity=urea>>. Acesso em: 08 nov. 2019.

JOHN, R. P; NAMPOOTHIRI, K. M; PANDEY, A. Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 74, p. 524-534, 2007.

KASCAK, J. S.; KOMINEK, J.; ROEHR, M. Lactic acid. In: REHM H. J.; REED, G. Biotechnology. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 2nd ed., 293-306, 1996.

KITAMURA, D. H. **Produção de biomassa probiótica e enriquecida com selênio de *Saccharomyces boulardii* utilizando melão de cana-de-açúcar.** 2013. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

KOSIKOWSKI, F. V. Whey utilization and whey products. **Journal of Dairy Science**, v. 62, n. 7, p. 1149-1160, 1979.

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.

LEITE, M. T. **Otimização da produção do ácido láctico através da fermentação do soro de queijo por *Lactobacillus helveticus*.** Tese de doutorado. 179p. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, MG, 2006.

LERNER, K. L.; LERNER, B. W. **The Gale Encyclopedia of Science.** 4. ed. [S.I.]: Gale Cengage, 2007.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia: tecnologia das fermentações.** São Paulo: Edgard Blücher, v.1, 1975.

LIU, S. Q. **Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations.** International Journal of Food Microbiology.83, 115-131, 2003.

MAHADEVAN, K.; FARMER, L. Key odor impact compounds in three yeast extract pastes. **Journal Agricultural Food Chemistry**, Washington, v. 54, n. 19, p. 242-7250, 2006.

MARTIN, E.; HINE, R. **Oxford Dictionary of Biology.** 6. ed. USA: Oxford University Press, 2008.

NANCIB, N; NANCIB, A; BOUDJELAL, A; BENSLIMANE, C; BLANCHARD, F; BOUDRANT, J. The effect of supplementation by different nitrogen sources on the production of lactic acid from date juice by *Lactobacillus casei* subsp. *ramnosus*. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 63-67, 2005.

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, Roselene Ferreira et al. Produção fermentativa de ácido láctico a partir do melaço da cana-de-açúcar por *Lactobacillus casei*. **Brazilian Journal of food technology**, VII BMCFB, p. 34-40, jun. 2009.

OTERO, M. A.; VASALLO, M. del C.; VERDECIA, O.; FERNANDEZ, V.; BETANCOURT, D. A process for the complete fractionation of baker's yeast. **Journal of Chemistry Technology and Biotechnology**, Osney Mead, v. 67, n. 1, p. 67-71, 1996.

PINTO, F. A. **Metodologia da espectroscopia no infravermelho para análise dos soros provenientes da fabricação de queijos Minas padrão e prato**. 45 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizontes, 2010.

RASHID, R. **Optimization and modeling of lactic acid production from pineapples wastes**. 2008. 238f. Faculdade de Química e Engenharia de Recursos Naturais. Universidade Tecnológica da Malásia, 2008.

REDDY, G.; ALTAF, M.; NAVEENA, B. J.; VENKATESHWAR, M.; KUMAR, E. V. Amylolytic bacterial lactic acid fermentation. **Biotechnology Advances**, v.26, p. 22-34, 2008.

RPICORP. **Yeast Extract, Powder, 1 Kilogram**. Disponível em: <<https://www.rpicorp.com/products/biochemicals/growth-media/yeast-extract-powder-1-kg.html>>. Acesso em: 08 nov. 2019.

SANTOS, G. T. Recentes Avanços em Nitrogênio não Proteico na Nutrição de Vacas Leiteiras. In: Simpósio Internacional em Bovinocultura de Leite: Novos conceitos em Nutrição, 2., 2001, Maringá. **Tópico Temático**. Maringá, UEM, p. 2-9, 2001.

SENTHURAN A; SENTHURAN V; MATTIASSON B; KAUL R. Lactic acid fermentation in a recycle batch reactor using immobilized *Lactobacillus casei*. **Biotechnology and Bioengineering**, v.55, p.841-853, 1997.

SILVA, K.; BOLINI, H. M. A.; ANTUNES, A. J. Soro de leite bovino em sorvete. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 15, n. 2, p. 187-196, 2004.

SMITH, K. **Dried dairy ingredients**. Madison, 2008. 60 p.

SRIVASTAVA, A; NARAYANAN, N; ROYCHOUDHURY, P. K. L(+) lactic acid fermentation and its product polymerization. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 7, p. 168-179, 2004.

TASHIBANA, T; SHINDO, S. Production of L-lactic acid from spent grain, a by-product of beer production. **Journal of Institute of Brewing**, v. 110, p. 347-351, 2004.

THORNE, L; TANSEY, L.; POLLOCK, T.J. Direct utilization of lactose in clarified cheese whey for xanthan gum synthesis by *Xanthomonas campestris*. **Journal of Industrial Microbiology**, v.3, n.5, p.321-328, 1988.

WEE Y. J; KIM J. N; RYU H. W. Biotechnological production of lactic acid and its recent applications. **Food Technology and Biotechnoly**, v.44, p.163–172, 2006.

ZAMBONELLI, C.; RAINIERI, S.; CHIAVARI, C.; MONTANARI, G.; BENEVELLI, M.; GRAZIA, L. Autolysis of yeasts and bacteria in fermented foods. **Italian Journal of Food Science**, Perugia, v. 12, n. 1, p. 9-21, 2000.

ZHANG, S; XU, G; CHU, J; ZHAUNG, Y; WANG, Y. Effects of vitamins on the lactic acid biosynthesis of *Lactobacillus paracasei* NERCB 0401. **Biochemical Engineering Journal**, v. 38, p. 189-197, 2008.