UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

JUAN DANIEL RIVALDI CHAVEZ

Crescimento e caracterização enzimática de bactérias
probióticas em meio contendo glicerol e seu encapsulamento
em matriz polimérica natural

LORENA
2012

JUAN DANIEL RIVALDI CHAVEZ

Crescimento e caracterização enzimática de bactérias
probióticas em meio contendo glicerol e seu encapsulamento
em matriz polimérica natural

Tese apresentada à Escola de Engenharia de
Lorena da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências do
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
Industrial na área de Microbiologia Aplicada

Orientador: Prof. Dr. Ismael Maciel de Mancilha

Co-orientador: Profa. Dra. Maria das Graças de
Almeida Felipe

Edição reimpressa e corrigida

LORENA
Novembro, 2012

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo na Publicação
Biblioteca “Cel. Luiz Sylvio Teixeira Leite”
Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

Rivaldi Chavez, Juan Daniel

Crescimento e caracterização enzimática de bactérias probióticas em meio contendo glicerol e seu encapsulamento em matriz polimérica natural. / Juan Daniel Rivaldi Chavez.–ed. reimpr., corr.– 2012.

170 p. : il.

Tese (Doutor em Ciências – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2012.

Orientador: Ismael Maciel de Mancilha

Co-orientador: Maria das Graças de Almeida Felipe

1. Glicerol de biodiesel 2. Probióticos 3. *Lactobacillus* 4. Glicerol quinase 5. Biomassa 6. Amido de banana verde 7. Microencapsulado. I. Título. II. Mancilha, Ismael Maciel de, orient. III. Felipe, Maria das Graças de Almeida, co-orient.

579.864 - CDU

“Scientia potentia est”

*Dedico esta tese aos meus pais, Isabel e
Genaro Luis, exemplos de carinho e trabalho, e a
meus irmãos, Ana Isabel e César Andrés, pelo apoio
e presença constante*

AGRADECIMENTOS

A nosso Deus, pai e criador

Ao Departamento de Biotecnologia da Escola de Engenharia de Lorena, pela oportunidade de realização de esta tese de doutorado

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão da bolsa de doutorado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa

Ao Prof. Dr. Ismael Maciel de Mancilha, pela orientação, confiança, paciência, profissionalismo e amizade demonstrada ao longo destes quatro anos de trabalho. Muito obrigado por ter contribuído neste meu caminho de evolução como pessoa, acadêmico e profissional.

À Profa. Dra. Maria das Graças de Almeida Felipe pela orientação, confiança, amizade e incentivo no decorrer da realização desta pesquisa

Aos doutores Luis. C. Duarte e Florbela Carvalheiro da Unidade de Bioenergia do Laboratório Nacional de Energia e Geologia (LNEG, Portugal), pela oportunidade de formar parte do seu grupo de pesquisa, pela orientação e amizade

Aos professores doutores Ana Ponces Freire, Marta Silva Sousa, Carlos Cordeiro e Antonio Ferreira, do Grupo de Enzimologia do Centro de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, pela amizade, oportunidade e orientação durante a elucidação das enzimas envolvidas na assimilação de glicerol.

Aos professores doutores António José das Neves Almeida e Lídia Maria Diogo Gonçalves, do Nanomedicine and Drug Delivery Systems Group, Research Institute for Medicines and Pharmaceutical Sciences (iMed.UL) da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, pelo carinho, oportunidade e orientação durante os estudos de encapsulamento de bactérias probióticas.

Ao Prof. Dr. Rogério Hein da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" pela cordialidade e paciência na obtenção de microfotografias.

A Sandra, Maria Aparecida e Ana Beatriz, pelos conselhos e ajuda incondicional em momentos difíceis, pelos momentos de alegria nas tardes da EEL e amizade

A Dra. Rita, Cibele, Barbara e Nicanor pela ajuda e amizade

À Tatiane Coutinho por espalhar alegria e força durante estes anos de trabalho juntos no Laboratório de Probióticos

Especial apreço e agradecimentos aos amigos Flávio, Cláudio Donato e Aline Francisca pela ajuda, amizade e por ter contribuído para o meu crescimento pessoal

Aos amigos do LOT (DEBIQ), João Paulo, Priscila, Dani, Livia, Ariela de Paula, Rafael, Thales Henrique e Bruno, pela solidariedade e amizade

A Talita, Marcelo, Raquel, Ana Pestana, Ivone, Patrícia Moniz, Diana, Pedro, Joana Pereira, Joana Marto, Alexandra, Susana e Carla Eleuterio, pela ajuda e carinho durante minha estada em Portugal.

A Ovidio e Rosa pela amizade e apoio ao longo destes anos

Aos sobrinhos Matias, Sofia, Victor, Renato e Andrea pelas alegrias

A todos aqueles que, embora não citados, ajudaram a alcançar este objetivo

Muito obrigado!

BIOGRAFIA

JUAN DANIEL RIVALDI CHAVEZ, filho de Isabel Chávez e Genaro Luis Rivaldi, nasceu em Assunção-Paraguai, em 29 de dezembro de 1974.

Em 1998, graduou-se em Engenharia Química pela Universidade Nacional de Asunción. Nesse mesmo ano, atuou como sub-gerente de produção da planta de papel reciclado da empresa Corrugadora Paraguaya S.A

Em 2000 realizou curso de aperfeiçoamento em Industrial Biotechnology no National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST) na cidade de Tsukuba, Japão.

Em 2002, foi contratado pela Universidad Nacional de Asunción como Chefe de trabalhos práticos na área de Microbiologia Industrial.

Em 2004, concluiu o curso de especialização em Didática Universitária na Universidad Nacional de Asunción e foi aprovado em concurso para Professor Assistente na Facultad de Ciencias Químicas da mesma universidade para lecionar Análise Microbiológica Industrial.

Em 2008, obteve o título de Mestre em Biotecnologia Industrial pela Universidade de São Paulo. Nesse mesmo ano, iniciou o curso de Doutorado em Ciências na Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, na área de concentração Microbiologia Aplicada.

RESUMO

RIVALDI, J.D. **Crescimento e caracterização enzimática de bactérias probióticas em meio contendo glicerol e seu encapsulamento em matriz polimérica natural.** 2012. 170p. Tese (Doutorado em Ciências). Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2012

O aproveitamento biotecnológico do glicerol representa uma alternativa para a redução dos problemas ambientais derivados do acúmulo de glicerol originado do processo de produção de biodiesel. O glicerol bruto (70,6% p/p) resultante do processo de transesterificação do óleo de soja e metanol foi submetido a tratamento com ácidos inorgânicos, com o objetivo de remover impurezas e reduzir a alcalinidade resultante do excesso de catalisador (KOH). A fração glicerínica resultante foi caracterizada quanto à concentração de glicerol, ésteres e íons metálicos; e empregada como fonte de carbono e energia para crescimento de bactérias probióticas. Os probióticos são organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro. Quinze estirpes de *Lactobacillus*, com características probióticas, foram avaliadas quanto à capacidade de crescimento em meio contendo glicerol de biodiesel tratado (20 g/L) como principal fonte de carbono, sob condições de $\text{pH}_{\text{inicial}}=6,0$ e 37 °C. Os resultados demonstraram a eficácia do ácido fosfórico para remoção de impurezas do glicerol bruto, o que permitiu a obtenção de uma fração contendo 900 a 964 g/L de glicerol. A avaliação de formulações de meios de cultivo contendo glicerol tratado revelou que treze estirpes de *Lactobacillus* mostraram capacidade de crescimento em glicerol de biodiesel, sendo os maiores rendimentos ($Y_{X/S}$) de 0,34, 0,28 e 0,26 g/g para as estirpes *L. delbrueckii* UFV-H2b20, *L. acidophilus* ATCC 4356 e *L. plantarum* ATCC 8014, respectivamente. A cinética de crescimento das estirpes selecionadas foi estudada em meio MRS modificado (ausência de glicose) contendo glicerol (10 g/L) suplementado ou não com citrato de amônio (2 g/L) e acetato de sódio (5,0 g/L), pH 6,0; 37 °C e 150 rpm. Os maiores rendimentos foram alcançados quando se utilizou meio MRS modificado contendo citrato de amônio e acetato de sódio; gerando valores de rendimentos correspondentes a 0,46, 0,38 e 0,46 g/g para *L. delbrueckii* UFV-H2b20, *L. acidophilus* ATCC 4356 e *L. plantarum* ATCC 8014, respectivamente. No tocante a atividade das enzimas envolvidas na assimilação de glicerol, glicerol quinase (EC. 2.7.1.30) e glicerol desidrogenase (EC.1.1.1.72), os resultados mostraram que, nos extratos livres de células de *L. plantarum* ATCC 8014, *L. delbrueckii* UFV-H2b20 e *L. acidophilus* ATCC 4356, os valores de atividade específica de glicerol quinase após 24 h de cultivo foram 91,1; 232,5 e 228,7 U/mg, respectivamente. Os valores da constante de Michaelis-Menten (K_m) foram de 3,7; 1,2 e 2,5 mM para glicerol quinase e 19,2; 12,8; 33,3 e mM para glicerol desidrogenase de *L. plantarum* ATCC 8014, *L. delbrueckii* UFV-H2b20 e *L. acidophilus* ATCC 4356, respectivamente. Os valores de velocidades máximas ($V_{\text{máx}}$) da reação foram de 46,4; 115,1 e 119,4 $\mu\text{M}/\text{min}$ para glicerol quinase e 1,23; 1,03 e 2,7 $\mu\text{M}/\text{min}$ para glicerol desidrogenase de *L. plantarum* ATCC 8014, *L. delbrueckii* UFV-H2b20 e *L. acidophilus* ATCC 4356, respectivamente. A avaliação da técnica de encapsulamento de células de *Lactobacillus* probióticos em alginato-amido de banana verde (2%/2%) pela técnica de emulsificação em óleo vegetal e gelificação ionotrópica, permitiu a sobrevivência das células encapsuladas superior a 65%, na presença de fluido gástrico simulado, bem como sob condições de armazenagem a 4 °C. Os resultados do presente trabalho revelaram a potencialidade da utilização de glicerol de biodiesel como fonte de carbono e energia para o crescimento de bactérias lácticas que apresentam propriedades probióticas, visando a obtenção de um produto microencapsulado em matriz polimérica natural.

Palavras-chave: Glicerol de biodiesel, *Lactobacillus*, Probióticos, Glicerol quinase, Biomassa; Amido de banana verde, Microencapsulamento

ABSTRACT

RIVALDI, J.D. **Growth and enzymatic characterization of probiotic bacteria in medium containing glycerol and their encapsulation in natural polymer matrix.** 2012. 170p. Thesis (Doctoral of Science). Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2012

Biotechnological utilization of biodiesel-derived glycerol represents an alternative for the reduction of the environment concerns associated with the accumulation of this byproduct. Crude glycerol (70.6% w/w), obtained from the transesterification process of soybean oil and methanol; was treated with inorganic acids in order to remove impurities and decrease the alkalinity derived from the excess of catalyst (KOH). The glycerine fraction obtained was characterized regarding the final glycerol concentration, esters and metallic ions; and it was utilized as source of carbon and energy for growth of probiotic bacteria. Probiotics are live microorganisms that, when administered in adequate amounts, confer a health benefit on the host. Fifteen probiotic bacterial strains were screened to evaluate their capabilities to assimilate treated-glycerol (20 g/L) as main carbon source, at pH=6.0 and 37 °C. The results showed the effectiveness of the phosphoric acid for the removal of impurities from crude glycerol; allowing to attain a glycerol fraction containing 964 g/L. The evaluation of media containing treated glycerol revealed that thirteen strains of *Lactobacillus* showed capability to grow in biodiesel-derived glycerol, with yields ($Y_{x/s}$) of glycerol conversion of 0.34, 0.28 and 0.26 g/g for *L. delbrueckii* UFV-H2b20, *L. acidophilus* ATCC 4356 and *L. plantarum* ATCC 8014, respectively. Kinetics of growth of the selected strains was studied in modified MRS medium containing glycerol (10 g/L) supplemented with or in the absence of ammonium citrate (2 g/L) and sodium acetate (5 g/L), pH 6.0; 37 °C and 150 rpm. The highest yields were attained in modified MRS containing ammonium citrate and sodium acetate; with 0.46, 0.38 and 0.46 g/g for *L. delbrueckii* UFV-H2b20, *L. acidophilus* ATCC 4356 and *L. plantarum* ATCC 8014, respectively. The free-cell extract of *L. plantarum* ATCC 8014, *L. delbrueckii* UFV-H2b20 and *L. acidophilus* ATCC 4356 showed activity for glycerol kinase (EC.2.7.1.30) and glycerol dehydrogenase (EC1.1.1.72). The maximal glycerol kinase activity was attained at the late exponential phase of growth, with 91.1; 232.5 and 228.7 U/mg for *L. plantarum* ATCC 8014, *L. delbrueckii* UFV-H2b20 and *L. acidophilus* ATCC 4356, respectively. The Michaelis-Menten (K_m) values were 3.7; 1.2 and 2.5 mM for glycerol kinase and 19.2; 12.4 and 33.2 mM for glycerol dehydrogenase of *L. plantarum* ATCC 8014; *L. delbrueckii* UFV-H2b20 and *L. acidophilus* ATCC 4356, respectively. The maximum reaction rates (V_{max}) were 46.5; 115.1 and 119.4 μ M/min for glycerol kinase and 1.23; 1.03 and 270 μ M/min for glycerol dehydrogenase of *L. plantarum* ATCC 8014; *L. delbrueckii* UFV-H2b20 and *L. acidophilus* ATCC 4356, respectively. Furthermore, the results of the evaluation of probiotic *Lactobacillus* cell encapsulation in alginate-unripe banana starch (2%/2%) obtained by emulsification in soybean oil and ionotropic gelification with calcium chloride, showed a cell survival rate higher than 65%, regarding the initial cell concentration in simulated gastric fluid, and during 28 days stored at 4 °C. The results revealed that, glycerol from biodiesel production process represents a potential carbon and energy source for the growth of probiotic bacteria.

Keywords: Biodiesel-derived glycerol, *Lactobacillus*, Probiotics, Glycerol kinase, Biomass; Green banana starch, Microencapsulation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Reação global (a) e reações consecutivas de transesterificação de triglicerídeos (b) R1, R2, R3 e R representam grupos alquilas.....	30
Figura 2 –	Formação de água (a) e formação de sabão (b) durante a produção de biodiesel (MYINT, EL-HALWAGI, 2009).....	31
Figura 3 –	Fluxograma do processo de produção de biodiesel e tratamento do glicerol bruto.....	31
Figura 4 –	Assimilação aeróbia e anaeróbia de glicerol por bactérias. Adaptado de KEEG (KANEHISA; GOTO, 2000).....	42
Figura 5 –	Via metabólica de produção de lactato e acetato em <i>L. plantarum</i> . CoA, co-enzima A; X, aceptor de elétrons (Adaptado de LORQUET et al., 2004).....	44
Figura 6 –	Principais enzimas envolvidas na assimilação de glicerol em micro-organismos em condições de aerobiose Adaptado de KEEG (KANEHISA; GOTO, 2000) e LORQUET et al. (2004).....	52
Figura 7 –	Unidade estrutural de alginato de Laminaria hyperborea. (M) ácido – D-manurônico; (G) ácido-L-gulurônico (CHAPLIN, 2011).....	60
Figura 8 –	Esquema de obtenção de microcápsulas de alginato contendo probiótico por emulsificação e extrusão (baseado em KRASAEKOOPT; BHANDARI; DEETH, 2003).....	67
Figura 9 –	Métodos de encapsulamento por extrusão controlada (prilling). Eletroestático (a); agulha vibratória (b); jet cutter (c); atomização por disco gieratório (d). Modificado de Teunou e Poncelet (2005).....	69
Figura 10 –	Características da mistura de glicero e ácidos graxos submetidas a tratamento com ácido fosfórico concentrado(a) mistura pH 7,0 (glicerol G7); (b) mistura a pH4,0 (glicerol G4).....	90
Figura 11 –	Aspecto de amostras de glicerol após tratamento com ácido concentrado; (a) ácido fosfórico 85%, (b) ácido fosfórico 85%, ácido clorídrico 37% e (ácido sulfúrico 98%	91
Figura 12 –	Espectros de absorção FTIR de glicerol bruto, glicerol tratado com H ₃ PO ₄ e substâncias puras.....	94
Figura 13 –	Produção de biomassa após 48 h de cultivo das estirpes selecionadas em diferentes meios contendo glicerol tratado com ácidos concentrados. G _p : glicerol puro; G+SAL: glicerol tratado + solução salina; G + MRS: glicerol tratado + meio MRS sem glicose; G+EFA: glicerol tratado + extrato de farelo de arroz (30%, v/v).	100

Figura 14 –	Valores de $Y_{x/s}$ após 48 h de cultivo das estirpes selecionadas em meios contendo glicerol tratado com ácidos concentrados. G_p : glicerol; G+sal: glicerol tratado + solução salina; G+MRS: glicerol tratado + meio MRS sem glicose; G+EFA: glicerol tratado + extrato de farelo de arroz (30%, v/v).....	101
Figura 15 –	Perfil de crescimento de estirpes de <i>Lactobacillus</i> em meio MRS modificado contendo 10 g/L glicerol sem agitação. <i>L. delbrueckii</i> UFV-H2b20 (■); <i>L. plantarum</i> ATCC 8014 (●); e <i>L. acidophilus</i> ATCC 4356 (▲). Perfil de biomassa (a); consumo de glicerol (b); perfil de pH (c) e $\ln A/A_0$ (d). As siglas A e A_0 significam absorbância final e absorbância inicial, respectivamente.....	103
Figura 16 –	Perfil de crescimento de estirpes de <i>Lactobacillus</i> em MRS modificado contendo 10 g/L glicerol na ausência de citrato de amônio e acetato de sódio, sob agitação de 150 rpm. <i>L. delbrueckii</i> UFV-H2b20 (■); <i>L. plantarum</i> ATCC 8014 (●); e <i>L. acidophilus</i> ATCC 4356 (▲). Perfil de biomassa (a); consumo de glicerol (b); perfil de pH (c) e $\ln A/A_0$ (d). As siglas A e A_0 significam absorbância final e absorbância inicial, respectivamente.....	105
Figura 17 –	Perfil de crescimento de estirpes de <i>Lactobacillus</i> sob agitação de 150 rpm em meio MRS modificado contendo 10 g/L glicerol. <i>L. delbrueckii</i> UFV-H2b20 (■); <i>L. plantarum</i> ATCC 8014 (●); e <i>L. acidophilus</i> ATCC 4356 (▲). Perfil de biomassa (a); consumo de glicerol (b); perfil de pH (c) e $\ln A/A_0$ (d). As siglas A e A_0 significam absorbância final e absorbância inicial, respectivamente.....	107
Figura 18 –	Atividade de glicerol quinase de <i>L. plantarum</i> ATCC 8014; <i>L. delbrueckii</i> UFV-H2b20 e <i>L. acidophilus</i> ATCC 4356 em função do tempo de cultivo. (A) Atividade, $\mu\text{M}/\text{min}$ (B) Atividade específica (U/mg proteína).....	113
Figura 19 –	Cinética de Michaelis-Menten para glicerol quinase de <i>L. plantarum</i> ATCC 8014 (A), <i>L. delbrueckii</i> UFV-H2b20 (B) e <i>L. acidophilus</i> ATCC 4356 (C) em função da concentração de glicerol.....	114
Figura 20 –	Regressão dupla-recíproca de Lineweaver-Burk (I), Hanes (II) e Eadie-Hofstee (III) para determinação da constante de Michaelis-Menten (K_m) e velocidade máxima ($V_{\text{máx}}$) da enzima glicerol quinase de <i>L. plantarum</i> ATCC 8014 (A), <i>L. delbrueckii</i> UFV-H2b20 (B) e <i>L. acidophilus</i> ATCC 4356 (C).....	115
Figura 21 –	Cinética de Michaelis-Menten para glicerol desidrogenase (NADPH dependente) de <i>L. plantarum</i> ATCC 8014 (A), <i>L. delbrueckii</i> UFV-H2b20 (B) e <i>L. acidophilus</i> ATCC 4356 (C) em função da concentração de DL-gliceraldeído.....	117

Figura 22 –	Regressão dupla-recíproca de Lineweaver-Burk (I), Hanes (II) e Eadie-Hofstee (III) para determinação da constante Michaelis-Menten (K_m) e velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$) da enzima glicerol desidrogenase (NADP dependente) de <i>L. plantarum</i> ATCC 8014 (A), <i>L. delbrueckii</i> UFV-H2b20 (B) e <i>L. acidophilus</i> ATCC 4356 (C).....	118
Figura 23 –	Espectros de transmitância FTIR de amidos, alginatos e misturas poliméricas. A: alginato; ABV: amido de banana verde.....	121
Figura 24 –	Morfologia das micropartículas em co-matriz de alginato de cálcio-amido de banana verde; (a) cristais de amido de banana verde; (b,c) Microcápsulas esféricas; (d) microcápsulas em forma de gota; (e) deformação e fragmentação de partículas; (f) microcápsulas contendo <i>L. acidophilus</i> ; (g) superfície de microcápsulas aumento 1000x e (h, i) aumento 1500x.....	122
Figura 25 –	Distribuição de tamanhos de partículas de alginato de cálcio-ABV. Curva unimodal (A); curva bimodal (B).....	124
Figura 26 –	População de estirpes de <i>Lactobacillus</i> armazenadas a temperatura de refrigeração (4 °C). Células microencapsuladas em alginato de cálcio – amido de banana verde (símbolo cheio), células livres (símbolo vazio). <i>L.acidophilus</i> ATCC 4356 (●,○); <i>L. plantarum</i> ATCC 8014 (■,□,); <i>L. delbrueckii</i> UFV-H2b20 (▲,△).....	131

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Resultados de trabalhos recentes referentes a fermentação de glicerol.....	47
Tabela 2 –	Principais bioprodutos resultante do metabolismo de glicerol por estirpes de <i>Lactobacillus</i>	50
Tabela 3 –	Principais estudos de caracterização cinética de glicerol quinase em micro-organismos.....	53
Tabela 4 –	Principais estudos de caracterização cinética de glicerol desidrogenase em micro-organismos.....	56
Tabela 5 –	Composição de meio de fermentação.....	74
Tabela 6 –	Características do glicerol bruto.....	88
Tabela 7 –	Concentração de glicerol após tratamento com ácidos concentrados...	89
Tabela 7.1 –	Análise de Variância (ANOVA).....	92
Tabela 7.2 –	Análise de variância (ANOVA) para as médias de concentração de glicerol após tratamento do glicerol bruto com ácidos inorgânicos.....	92
Tabela 8 –	Elementos metálicos, nitrogênio e fósforo presentes no glicerol bruto e glicerol tratado (pH 4,0).....	95
Tabela 9 –	Produção de biomassa por diferentes espécies de <i>Lactobacillus</i> em meio contendo glicerol tratado após 24 h cultivo.....	97
Tabela 10 –	Parâmetros fermentativos obtidos com 24 h de cultivo de estirpes de <i>Lactobacillus</i> probióticos em meio MRS contendo glicerol de biodiesel sem agitação.....	104
Tabela 11 –	Parâmetros fermentativos com 24 h de cultivo de estirpes de <i>Lactobacillus</i> probióticos em meio MRS modificado contendo glicerol e sem citrato de amônio e acetato de sódio, sob agitação.....	106
Tabela 12 –	Parâmetros fermentativos com 24 h de cultivo de estirpes de <i>Lactobacillus</i> probióticos em meio MRS contendo glicerol de biodiesel como fonte principal de carbono e energia, citrato de amônio e acetato de sódio, sob agitação.....	108
Tabela 13 –	Parâmetros fermentativos do cultivo de <i>Lactobacillus</i> sob diferentes condições em meio contendo glicerol de biodiesel.....	110

Tabela 14 –	Concentração de proteínas obtidas por diferentes métodos de extração.....	111
Tabela 15 –	Valores de K_m e V_{max} de glicerol quinase (EC. 2.7.1.30) obtidos por diferentes métodos de linearização	115
Tabela 16 –	Valores de K_m e V_{max} de glicerol desidrogenase (EC1.1.1.72) obtidos por diferentes métodos de linearização	119
Tabela 17 –	Distribuição de tamanho de partículas (μm) de alginato de cálcio-ABV em função da concentração de polímeros e surfactante.....	125
Tabela 18 –	Eficiência de encapsulamento e viabilidade de diferentes estirpes de <i>Lactobacillus</i> em matriz de amido de banana verde e alginato.....	127
Tabela 19 –	População de células de <i>Lactobacillus</i> microencapsuladas e livres incubadas a 37 °C em fluido gástrico simulado (FGS) em diferentes tempos de incubação.....	129

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	27
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	29
2.1 Glicerol	29
2.2 Bactérias lácticas e suas propriedades probióticas.....	34
2.3 Metabolismo do glicerol	41
2.3.1 Glicerol quinase e glicerol desidrogenase	51
2.4 Microencapsulação de bactérias.....	57
2.4.1 Materiais de encapsulamento	59
2.4.1.1 Alginato.....	59
2.4.1.2 Amido de banana verde	62
2.4.2 Métodos de encapsulamento	66
2.4.2.1 Emulsificação.....	66
2.4.2.2 Extrusão.....	69
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	71
3.1 Obtenção e tratamento da fração glicerol.....	71
3.2 Micro-organismos	72
3.3 Seleção de estirpes de lactobacilos em meio contendo glicerol.....	73
3.4 Avaliação do desempenho das estirpes de <i>Lactobacillus</i> em meio formulado a base de glicerol tratado com diferentes ácidos inorgânicos	73
3.5 Cinética de crescimento de lactobacilos em meio contendo glicerol	74
3.6 Enzimas envolvidas na assimilação de glicerol.....	75
3.6.1 Obtenção do extrato enzimático.....	75
3.6.1.1 Detergente iônico.....	75
3.6.1.2 Ruptura celular por ação mecânica com esferas de vidro	75
3.6.1.3 Ruptura celular por sonda de ultrassom.....	76
3.6.1.4 Ruptura celular por banho de ultrassom	76
3.6.2 Determinação da atividade enzimática.....	76
3.6.2.1 Determinação da atividade glicerol quinase	77
3.6.2.2 Determinação da atividade glicerol desidrogenase-NAD dependente	78
3.6.2.3 Determinação da atividade glicerol desidrogenase-NADP dependente.....	78
3.6.2.4 Determinação da atividade glicerol desidrogenase-NADPH dependente	79
3.7 Microencapsulamento das estirpes pré-selecionadas em matriz polimérica de alginato de cálcio-amido de banana verde	79

3.7.1 Matéria prima e extração de amido	79
3.7.2 Preparação de microcápsulas	80
3.7.3 Caracterização morfológica das microcápsulas	80
3.7.4 Eficiência de encapsulamento	81
3.7.5 Avaliação <i>in vitro</i> da sobrevivência de <i>Lactobacillus</i> em fluido gástrico simulado ...	81
3.7.6 Estabilidade das bactérias encapsuladas durante armazenagem a 4 °C	82
3.8 Métodos analíticos	82
3.8.1 Determinação de ácidos graxos e ésteres de ácidos graxos	82
3.8.2 Determinação de elementos metálicos, nitrogênio, enxofre e fósforo	83
3.8.3 Determinação da concentração celular	83
3.8.4 Dosagem de glicerol	83
3.8.5 Determinação de proteína	84
3.8.6 Interação química na matriz polimérica de alginato de cálcio-amido de banana verde na obtenção de microcápsulas	84
3.8.7 Determinação do tamanho de partícula	84
3.8.8 Determinação de parâmetros fermentativos	85
3.8.8.1 Fator de conversão de glicerol em biomassa ($Y_{x/s}$)	85
3.8.8.2 Produtividade em biomassa (Q_x)	85
3.8.8.3 Velocidade de consumo de substrato (Q_s)	86
3.8.8.4 Velocidade específica de crescimento máxima (μ_{max})	86
3.8.9 Cálculo das atividades enzimáticas	86
3.8.10 Cálculo de K_m e V_{max}	87
3.9 Análise estatística	87
4. RESULTADOS	88
4.1 Tratamento e caracterização do glicerol	88
4.2 Avaliação do desempenho de lactobacilos em meio contendo glicerol tratado	96
4.3 Avaliação do desempenho das estirpes de <i>Lactobacillus</i> em meio formulado a base de glicerol tratado com diferentes ácidos inorgânicos	98
4.4 Cinética de crescimento de lactobacilos em meio contendo glicerol tratado	102
4.5 Enzimas envolvidas na assimilação de glicerol	111
4.5.1 Obtenção de extrato enzimático	111
4.5.2 Determinação da atividade enzimática e parâmetros cinéticos	112
4.5.2.1 Glicerol quinase	112
4.5.2.2 Glicerol desidrogenase	117
4.7 Microencapsulamento de bactérias probióticas	120
4.7.1 Interação química na matriz polimérica de alginato de cálcio-amido de banana verde	
4.7.3 Eficiência de encapsulamento	120

4.7.4 Avaliação <i>in vitro</i> da sobrevivência de <i>Lactobacillus</i> microencapsulado em fluido gástrico simulado (FGS)	128
4.7.5 Estabilidade das bactérias encapsuladas e armazenadas a 4°C	130
5 CONCLUSÕES.....	133
6 Sugestões.....	134
Referências	135
Apêndice.....	163

LISTA DE SIGLAS E SIMBOLOS

ABV	Amido de Banana Verde
ACK	Acetato quinase
ADP	Adenosina Difosfato
ANP	Agência Nacional de Petróleo
ATP	Adenosina Trifosfato
EFA	Extrato de Farelo de Arroz
FGS	Fluído Gástrico Simulado
Lox	Lactato oxidase
MRS	Man, Rogosa, Sharpe
NAD	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (reduzido)
NADP	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
NADPH	Fosfato Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato (reduzido)
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
PDH	Piruvato desidrogenase
PNPB	Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel
POX	Piruvato oxidase
PTS	Fosfotransferase
$\mu_{\max}$	Velocidade específica de crescimento máxima
$Y_{x/s}$	Fator de conversão de substrato em biomassa
Q_x	Produtividade em biomassa

1 INTRODUÇÃO

Os combustíveis fósseis, principalmente o petróleo e seus derivados, sustentaram o crescimento industrial e econômico do século XX. O caráter não renovável desta fonte de energia, as perspectivas de esgotamento das reservas de petróleo frente ao crescimento contínuo da demanda, e a necessidade da redução das emissões de carbono responsáveis pelo aquecimento global, constituem alguns dos fatores que estimularam o surgimento e configuração do mercado de biocombustíveis.

Os biocombustíveis, como o biodiesel, constituem uma das prioridades de países emergentes como o Brasil, devido à importância e valorização crescente das condições ambientais, econômicas, sociais e estratégicas. No Brasil, a produção de biodiesel tem sido considerada de interesse estratégico para a matriz energética nacional, culminando com a implementação do Programa Nacional para a Produção e Uso de Biodiesel (PNPB) no ano 2005. Este fato, associado à obrigatoriedade da adição de 5% de biodiesel ao combustível de petróleo, estabelecido pela Lei Federal nº 11097/2005, tem estimulado o crescimento da indústria de biodiesel no Brasil.

O glicerol é o principal co-produto gerado no processo de transesterificação, por via química ou enzimática para a produção de biodiesel, correspondendo a aproximadamente 10% do volume total de biodiesel produzido. Neste contexto, é válido mencionar que o volume de glicerol co-produzido no ano 2009, no Brasil, foi de 200 milhões de litros, como consequência da produção de 2 bilhões de litros de biodiesel (ANP, 2012). Estima-se uma produção de biodiesel no Brasil da ordem de 40 bilhões de litros para o ano 2030, o que representa aproximadamente 4 bilhões de litros de glicerol a ser co-produzidos (GAZZONI, 2011). Entretanto, a demanda comercial de glicerol no Brasil é de apenas 40 mil toneladas por ano, ocasionando assim um crescimento significativo no volume de glicerol excedente.

Considerando este cenário é importante ressaltar a necessidade do desenvolvimento de tecnologias que empregam o glicerol como matéria prima.

Assim, a utilização do glicerol como fonte de carbono e energia para cultivo de células microbianas e produção de metabólitos poderá tornar-se vantajosa quando comparado com outros resíduos tradicionalmente utilizados como fonte de carbono para a obtenção de bioprodutos.

Desta forma, a conversão biotecnológica de glicerol em biomassa de micro-organismos que apresentam propriedades probióticas ou moléculas de interesse industrial, é uma alternativa relevante para a redução do impacto ambiental negativo resultante do acúmulo de glicerol. Neste sentido, várias espécies de bactérias ácido lácticas do gênero *Lactobacillus* apresentam capacidade de assimilar glicerol e produzir compostos intermediários como gliceraldeído-3-fosfato e dihidroxiacetona fosfato, que são empregados para a síntese de moléculas de maior valor agregado.

As principais enzimas responsáveis pela assimilação de glicerol em micro-organismos são glicerol quinase (ATP dependente), glicerol desidrogenase (NAD⁺ dependente) e glicerol desidratase, que têm sido estudadas em bactérias, leveduras e fungos. Entretanto, poucos estudos têm demonstrado a presença destas enzimas em espécies de lactobacilos, sendo necessário avançar na elucidação dos mecanismos de assimilação de glicerol, visando sua utilização como substrato em processos biotecnológicos.

As pesquisas para utilização de glicerol por lactobacilos encontram-se em fase preliminar, sendo necessária a otimização e avaliação de meios complexos formulados a base de glicerol de biodiesel visando a obtenção de bioprodutos, incluindo biomassa microbiana. Neste contexto, é relevante mencionar que algumas espécies de *Lactobacillus* apresentam propriedades probióticas e são importantes na obtenção de alimentos funcionais. O crescente interesse por esses alimentos se deve a suas propriedades terapêuticas, que conferem benefícios aos seres humanos e animais.

Por outro lado, muitas espécies de *Lactobacillus* presentes nos produtos probióticos perdem a viabilidade celular, reduzindo a sua vida de prateleira, mesmo a baixas temperaturas e durante a passagem através do trato gastrointestinal. Desta forma, torna-se necessário o desenvolvimento de

tecnologias que permitam manter um número suficiente de células viáveis ao longo do período de validade destes produtos, para que seja garantido o seu valor terapêutico. Uma das alternativas empregadas para este fim é o encapsulamento das células em polímero natural. No entanto, é necessário estudar novos materiais encapsulantes visando aumentar a sobrevivência das bactérias.

Diante do exposto, considerando a necessidade de se encontrar alternativas para a utilização do glicerol excedente; a capacidade de algumas estirpes de *Lactobacillus* de metabolizarem o glicerol como fonte de carbono e energia, bem como a necessidade de tecnologias para melhorar o desempenho destas espécies, o presente trabalho estabeleceu como estratégia a utilização deste co-produto. Para tanto, avaliaram-se métodos de tratamento do glicerol bruto, bem como a formulação de meios de cultivo contendo glicerol tratado, que foram empregados para estudar o desempenho de estirpes de *Lactobacillus* probióticos. Assim, determinou-se a atividade das principais enzimas envolvidas na assimilação de glicerol e posteriormente estudou-se o emprego de polímeros naturais na formação de uma matriz polimérica para o encapsulamento das espécies selecionadas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Glicerol

Glicerol é o nome comum do composto orgânico 1,2,3-propanotriol, descoberto por Carl W. Scheele, em 1779, durante a separação de uma mistura aquecida de PbO preparada com óleo de oliva. Os seus sinônimos são glicerina, trihidroxipropano, glicil álcool, gliceril e 1,2,3-trihidroxipropano (OECD-SIDS, 2002).

Na natureza, este polihidroxiálcool está presente em vegetais (soja, mamona, babaçu, girassol, palma, algodão, coco, dendê) e animais, em formas

combinadas de glicerina com ácidos graxos (THOMPSON; HE, 2006). O glicerol é também uma molécula considerada fundamental dentro do sistema metabólico de micro-organismos; onde atua como precursor de numerosos compostos, e como regulador de vários mecanismos bioquímicos intracelulares (BRISSON et al. 2001; MOAT; FOSTER; SPECTOR, 2002). Em micro-organismos eucarióticos, o glicerol constitui o principal composto formado para regular as variações de atividade de água em ambientes altamente osmofílicos (BRISSON et al., 2001).

O glicerol pode ser obtido mediante reação de saponificação de ácidos graxos (óleos, azeites ou sebo) com hidróxido de sódio ou hidróxido de potássio na obtenção de sabões, como co-produto da fabricação de biodiesel e em menor proporção, mediante síntese microbiana (FUKUDA; KONDO; NODA, 2001). Dentro deste contexto, o glicerol constitui o principal co-produto gerado no processo de produção do biodiesel via esterificação de ácidos graxos vegetais ou gordura animal com álcool (metanol ou etanol) para produzir ésteres na presença de catalisadores (KOH ou NaOH).

A equação global de transesterificação é apresentada na Figura 1, onde são necessários três moles de álcool por cada mol de triglicerídeo utilizado.

Figura 1 – Reação global (A) e reações consecutivas de transesterificação de triglicerídeos (B). R1, R2, R3 e R representam grupos alquilas.

No Brasil, o biodiesel é produzido principalmente a partir de sementes de oleaginosas, sendo que 80% das indústrias de biodiesel utilizam como matéria

prima óleo de soja, 15% gordura animal e 5% outras oleaginosas. Na sua composição, o óleo de soja contém ácido linoléico (49 – 53%), ácido oléico (22 – 31%), ácido mirístico, ácido palmítico e ácido linolênico em proporção de 2 a 10% (MYINT; EL-HALWAGI, 2009).

Durante o processo de transesterificação para a produção de biodiesel, ácidos graxos livres e triglicerídeos reagem com o catalisador para formar ésteres de potássio ou sódio. Este processo é estimulado pela presença de água proveniente da reação de metanol com o catalisador (Figura 2a). A presença do íon OH^- (água) promove a reação de potássio com triglicerídeos, permitindo a formação de ésteres de ácidos graxos (Figura 2b).

Figura 2 – Formação de água (a) e formação de sabão (b) durante a produção de biodiesel (MYINT; EL-HALWAGI, 2009).

Da mesma forma, os ácidos graxos livres na matéria prima reagem com o catalisador para formar sabão e água. A formação de água promove a ulterior saponificação dos triglicerídeos (Figura 2b). Para a remoção do sabão gerado, recomenda-se conduzir a reação de transesterificação com matérias primas (triglicerídeos) com baixo conteúdo em ácidos graxos livres e água, assim como diminuir a quantidade de catalisador empregado (FUKUDA; KONDO; NODA, 2001; YONG et al, 2001).

A formação de ésteres de ácidos graxos (sabão) diminui a concentração de triglicerídeos e de catalisador necessários para o processo de transesterificação, consequentemente, diminui o rendimento em biodiesel, assim como aumenta os custos de purificação do glicerol, devido à alta miscibilidade dos ésteres com glicerol (MYINT; EL-HALWAGI, 2009; VICENTE; MARTINEZ, 2004, YONG et al., 2001).

A aparência viscosa e escura do glicerol bruto encontra-se estreitamente relacionado ao conteúdo de sabão e sólidos presentes no óleo de soja, monoacilglicerol, diacilglicerol, oligômeros de glicerol, polímeros e água (YONG et al., 2001). A porcentagem de glicerol na mistura varia entre 40 a 70% (p/p), sendo a maior parte das impurezas constituída por ésteres metálicos (FUKUDA; KONDO; NODA, 2001; MYINT; EL-HALWAGI, 2009; OOI et al., 2004).

A utilização de glicerol proveniente da fabricação de biodiesel em processos fermentativos é uma alternativa de grande importância. Entretanto, o principal problema para sua utilização está relacionado à alta concentração de ésteres de íons metálicos e ácidos graxos livres, sendo um fator limitante para o crescimento de micro-organismos (ASAD-UR-REHMAN et al., 2008, JENKINS; COURTNEY, 2003; LANDS; SACKS; SAUTER, 1979).

A ligação dos ácidos graxos insaturados aos componentes da parede celular de bactérias pode afetar o crescimento via alteração da permeabilidade da membrana e variação da tensão superficial, o que impossibilitaria entrada de nutrientes essenciais e a divisão celular, promovendo inclusive a excreção de nutrientes para o meio (LANDS; SACKS; SAUTER, 1979; KODICEK; WORDEN, 1945).

Estudos dos efeitos de ácido linolénico, ácido linoléico, ácido oléico, e seus sais de sódio, e éster metílico, sobre o crescimento de *Lactobacillus helveticus* e outras bactérias Gram-positivo mostraram que, concentrações superiores a 4,0 µg/mL promovem a completa inibição do crescimento bacteriano (KODICEK ; WORDEN, 1945).

Para reduzir as impurezas, o glicerol bruto pode ser submetido a tratamento com ácido inorgânico concentrado, para neutralizar o excesso de base

proveniente do catalisador e posteriormente, para reagir com a base presente no éster com a conseqüente liberação de ácidos graxos livres (MYINT; EL-HALWAGI, 2009, OOI et al., 2004; YONG et al, 2001).

A Figura 3 apresenta o fluxograma simplificado da produção de biodiesel e tratamento do glicerol bruto.

Figura 3 – Fluxograma do processo de produção de biodiesel e tratamento do glicerol bruto.

O glicerol bruto contém elementos como fósforo, enxofre, magnésio, cálcio, nitrogênio e potássio (dependendo do catalisador utilizado), passíveis de serem utilizados por micro-organismos para o seu crescimento (FUKUDA; KONDO; NODA, 2001; OOI et al., 2004; THOMPSON; HE, 2006; YONG et al, 2001). Por outro lado, a combinação de palatabilidade e componentes nutricionais fazem do glicerol de biodiesel potencial material para suplemento alimentício de animais

ruminantes (THOMPSON; HE, 2006). Desta forma, o glicerol de biodiesel apresenta potencialidade como substrato para fermentações, sendo necessário o tratamento prévio para a eliminação de componentes indesejáveis que poderiam afetar o metabolismo microbiano.

2.2 Bactérias lácticas e suas propriedades probióticas

As bactérias ácido-láticas (BAL) são micro-organismos Gram-positivo, não esporulados, cocos ou bacilos, anaeróbios, aerotolerantes, ácido tolerantes, desprovido de citocromo, motilidade negativa, geralmente catalase-negativo e produtores de ácido láctico como produto principal durante fermentação de carboidratos (STILES, HOLZAPFEL, 1997). Algumas espécies de bactérias lácticas, de extensiva utilização como suplemento alimentar, derivam do trato digestivo de animais e humanos, onde desempenham um papel preponderante no equilíbrio da flora intestinal (GILLILAND, 1990, LIN; YEN, 1999; LIN; CHANG, 2000).

O grupo das bactérias lácticas está constituído por aproximadamente 20 gêneros, sendo os principais o gênero *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Streptococcus*.

Em condição não limitante de substrato e de fatores de crescimento (vitaminas, aminoácidos, ácidos nucleicos) e baixa concentração de oxigênio, as bactérias lácticas catabolizam glicose mediante duas vias metabólicas (MOAT, FOSTER, 2002). A via Embden-Meyerhof-Parnas (Via glicolítica), cujo principal produto de fermentação é o ácido láctico (fermentação homolática) e a via dos 6-fosfogluconato, que gera ácido láctico e concentrações variáveis de outros produtos como etanol, acetato e monóxido de carbono (fermentação heterolática) (SAKAMOTO; KOMAGATA, 1996).

As condições de crescimento como pH, temperatura e utilização de meio complexo, podem dar lugar a balanços de fermentação e formação de produtos

finais diferentes dos observados em bactérias láticas homofermentativas e heterofermentativas. Esta modificação do metabolismo se deve a alterações no metabolismo do ácido pirúvico, e pela utilização de oxigênio como aceptor externo de elétrons (AXELSSON, 2004). Bactérias láticas homofermentativas ou heterofermentativas produzem grande quantidade de ácido acético sob aerobiose, com diminuição da produção de ácido láctico ou etanol no meio de cultura (SAKAMOTO, KOMAGATA, 1996).

O principal grupo de bactérias láticas está representado por espécies do gênero *Lactobacillus* (80 espécies). Os lactobacilos se encontram amplamente distribuídos na natureza, em vários “habitats” como cavidade oral, trato gastrointestinal de humanos e animais, em plantas e resíduos de origem vegetal, assim como em fermentações láticas espontâneas de alimentos e ensilagem (AXELSSON, 2004; BERNARDEU et al., 2008; MUNDT, 1986).

Os *Lactobacillus* correspondem a um grupo de bactérias altamente heterogêneo, cuja diversidade entre espécies se deve principalmente à ampla diferença no conteúdo de guanina–citosina, que varia de 32 a 55 mol% (DELLAGLIO; FELIS; GERMOND, 2004; EL-OSTA; HILLIER; DOBOS, 2005; VANDAMME et al., 1996). Por outro lado, foram publicadas as sequências do genoma completo de seis espécies de *Lactobacillus*, incluindo *L. acidophilus*, *L. johnsonii*, *L. sakei*, *L. salivarius*, *L. plantarum* e *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, fundamental para o estudo de novas propriedades e potencialidades deste gênero na obtenção de bioprodutos (KLEEREBEZEM et al., 2003).

Na indústria, este grupo de bactérias atua como agente contaminante de alimentos ou como agente de fermentação para a obtenção de vários produtos fermentados como queijos, iogurte, bebidas fermentadas, conservas, chucrute, entre outros (BERNARDEAU et al., 2008, SAAD, 2006). Nesse sentido, aproximadamente 60 a 70% do mercado total de alimentos funcionais correspondem a alimentos contendo bactérias láticas, especificamente produtos probióticos (AXELSSON, 2004). São considerados alimentos funcionais aqueles que, além de fornecer a nutrição básica, promovem a saúde (OLIVEIRA et al., 2002).

Uma característica importante das bactérias lácticas, principalmente *Lactobacillus*, é a sua alta capacidade de regular o pH intracelular, o que permite a tolerância a condições de pH entre 2 e 3 (KASHKET, 1987). Células incapazes de manter o pH intracelular próximo a pH 7,0 podem perder viabilidade e atividade celular durante o crescimento ou armazenamento a baixo pH. A faixa de pH externo limite para o crescimento de bactérias do gênero *Lactobacillus* é de 4.5 a 7.7 (HUTKINS; NANNEN, 1993).

O aumento dos gastos com saúde, o constante aumento na expectativa de vida e o desejo de alcançar melhor qualidade de vida tem estimulado pesquisas e o desenvolvimento de tecnologias na área de alimentos funcionais (OLIVEIRA, 2006; SANDERS, 2003; SANDERS, 1998).

O termo probiótico foi utilizado pela primeira vez para designar substâncias secretadas por micro-organismos, capazes de estimular o desenvolvimento de outros micro-organismos (LILLY; STILLWELL, 1965). Atualmente existem várias definições, a grande maioria indica a propriedade profilática ou terapêutica desses micro-organismos e as substâncias que produzem. A Organização Mundial de Saúde define probióticos como organismos vivos que, administrados em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002).

Os probióticos são utilizados como complemento alimentar para humanos e animais, permitindo o aumento da resposta imune, redução de colesterol e intolerância à lactose, prevenção ou redução dos efeitos da dermatite atópica, diarreia, constipação e infecção do trato urinário (REID, 1999). Outros benefícios potenciais das bactérias lácticas na saúde humana e animal incluem o melhoramento do balanço redox fisiológico, ação anticancerígena e efeito antioxidante (COELHO, 2010; LIN; CHANG, 2000; SANDERS, 1993).

Os efeitos fisiológicos benéficos para a saúde, promovidos por bactérias probióticas, depende da capacidade de se aderir à mucosa intestinal; multiplicar-se e excluir de forma competitiva bactérias patogênicas; sintetizar substâncias antimicrobianas (bacteriocinas) e produzir moléculas benéficas, como os ácidos graxos de cadeia curta e proteínas; que são parcialmente absorvidos e utilizados

pelo hospedeiro (CASULA; CUTTING, 2002; SEQUEIRA; RIBEIRO; GOMES, 2008).

Vários estudos realizados *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado a capacidade de micro-organismos probióticos de exercerem ação protetora contra a aderência, reprodução e efeitos nocivos de espécies de bactérias patogênicas, como *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sp.*, *Campylobacter sp.* e *Helicobacter pylori* (NOMOTO, 2005; POPPI, 2005, SUMITA, 2007).

Os probióticos incluem estirpes ácido-láticas dos gêneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Sporolactobacillus*; *Streptococcus*; *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* e *Propionibacterium freudenreichii*; e leveduras como *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces boulardii* (GILLILAND, 1990; HOLZAPFEL et al., 2001; LIN; YEN, 1999; LIN; CHANG, 2000).

No entanto, no âmbito do mercado mundial, as estirpes mais comercializadas em forma de alimentos probióticos são as bactérias ácido-láticas, destacando-se *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. buchnerii*, *L. delbrueckii*, *L. reuteri*, *B. bifidum*, *B. infantis* e *Lactococcus lactis* (REID, 1999; REID, 2008; SAAD, 2006).

Espécies de *Lactobacillus* representam um grupo altamente diverso de bactérias Gram-positivo, anaeróbias facultativas ou microaerofílicas que morfologicamente se apresentam na forma de bacilos ou cocobacilos não formadores de esporos (KANDLER; WEISS, 1986). Estirpes do gênero *Lactobacillus*, vêm sendo utilizadas como agentes de fermentação na produção de alimentos ou como suplementos com propriedades probióticas frente a bactérias patogênicas (LIN; YEN, 1999).

A inibição do crescimento de bactérias patogênicas por bactérias ácido-láticas se baseia na capacidade de produzir ácido láctico, peróxido de hidrogênio, bacteriocinas e etanol (ROSSLAND et al., 2005). Estudos *in vitro* do efeito antagônico de bactérias probióticas sobre o crescimento *Staphylococcus aureus*, principal responsável pela mastite bovina; mostraram que a estirpe *L. plantarum*

ATCC 8014 promoveu a redução de 87% do número total de células viáveis (SOLEIMANI et al., 2010). Lash et al. (2005) observaram a inibição de crescimento de células de *Escherichia coli*, *Listeria innocua*, *Serratia marcescens*, *Shigella sp.*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella typhimurium*, por compostos presentes no extrato livre de células de *L. plantarum*. Os autores identificaram uma bacteriocina (122 KDa) de amplo efeito inibitório sobre bactérias Gram-negativo, sendo esta de grande interesse industrial, considerando que o efeito inibitório de bactérias Gram-positivo sobre bactérias Gram-negativo é menos prevalente (LASH; MYSLIWIEC; GOURAMA, 2005).

Lactobacillus acidophilus ATCC 4356 apresenta capacidade de inibir o desenvolvimento de bactérias patogênicas como *Helicobacter pylori*, *Salmonella enteritidis* e *Escherichia coli* (GODERSKA; CZARNECKI, 2007). Por outro lado, polissacarídeos solúveis presentes em extratos celulares de *L. acidophilus*, apresentam capacidade de reduzir a viabilidade de células cancerígenas, prevenir o desenvolvimento de tumores e inibir o efeito de citotoxicidade celular gerado por radicais livres (CHOI et al., 2006). Outros estudos indicam que células de *L. acidophilus* apresentam efeito anticolesterolêmico, promovido pela produção de ácidos orgânicos de cadeia curta que hidrolizam as sais biliares responsáveis pela absorção de colesterol externo no intestino (HUANG; ZHENG, 2010; HUANG et al., 1997; LIN; CHEN, 2000).

Lactobacillus delbrueckii UFV-H2b20 foi isolado de fezes de lactantes alimentados com leite materno e identificado por métodos fenotípicos como *Lactobacillus acidophilus* por Santos (1984). O estudo de filogenia baseado em sequência de DNA recombinante (rDNA) mostrou que esse micro-organismo foi agrupado entre as sub espécies de *Lactobacillus delbrueckii* UFV-H2b20 (FLORESTA, 2003). Esta bactéria apresentou características promissoras para sua aplicação como probiótico devido à sua resistência *in vitro* a condições semelhantes às do trato gastrointestinal, como altas concentrações de sais biliares, ácido clorídrico e presença de lisozima, assim como produção de peróxido de hidrogênio em concentrações inibitórias para micro-organismos patogênicos (AGOSTINHO, 1988; COUTINHO, 2008; FERREIRA, 2006; NEUMANN, 1998; RIBEIRO, 1995; SANTOS, 1984; SUMITA, 2007).

Desta forma, *Lactobacillus delbrueckii* UFV-H2b20 apresenta propriedades promissoras para sua aplicação como agente probiótico em alimentos como leite fermentado e queijo tipo cottage (ARAÚJO et al., 2007), sorvete (LEANDRO et al., 2006), cultura *starter* (CARMO, 2006) e desenvolvimento de queijo tipo quark simbiótico (GONÇALVES, 2009). A formulação de produtos alimentícios contendo células de *Lactobacillus delbrueckii* UFV-H2b20 foi bem sucedida, obtendo-se produtos com células vivas para uso imediato ou produtos estáveis com prazos de validade longos (NEUMANN et al., 1998).

Recentemente, Coutinho (2008) avaliou a efetividade de uma preparação probiótica contendo *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 e *Lactobacillus delbrueckii* UFV-H2b20 no tratamento de criptosporidiose em camundongos. A administração diária de um *pool* destas estirpes de *Lactobacillus* promoveu a eliminação total de oocistos de *Cryptosporidium parvum* (parasito intracelular obrigatório) nas fezes de camundongos imunossuprimidos e ao mesmo tempo, permitiu o aumento de peso superior a aqueles indivíduos não tratados com probióticos. Em outros estudos, Coelho (2010) demonstrou o efeito positivo do preparado probiótico contendo *L. delbrueckii* UFV-H2b20, *L. acidophilus* ATCC 4356 e *L. plantarum* ATCC 8014 na redução de 88% de ovos de Ancylostomidae em fezes de cães naturalmente infectados e aumento da concentração de imunoglobulina.

Lactobacillus plantarum é uma bactéria láctica facultativa heterofermentativa que se encontra em uma grande variedade de ambientes, incluindo laticínios, carne e vegetais fermentados. Esta bactéria se caracteriza pela alta variabilidade fenotípica e genoma extenso que explica, em parte, sua ampla distribuição e diversidade dentro da espécie (PISANO et al., 2010). A elucidação da seqüência do genoma completo da estirpe *L. plantarum* WCFS1, isolada de saliva humana, facilitou a identificação de genes importantes por homologia com outras espécies de bactérias (KLEEREBEZEM et al., 2003).

Por homologia com genomas de outros micro-organismos, confirmou-se que a estirpe *Lactobacillus plantarum* possui genes para assimilação de peptídeos, formação de aminoácidos e catabolismo de várias moléculas orgânicas. Também, foram identificados genes que codificam a síntese de proteínas de ancoragem a

superfícies e proteínas de função regulatória que permitem o crescimento e sobrevivência em diversos tipos de ambientes (VRIES et al., 2006).

Para o desenvolvimento de diferentes espécies de bactérias, fatores de crescimento como vitaminas, aminoácidos, ácidos graxos, micronutrientes, nucleosídeos e nucleotídeos são requeridos em pequenas quantidades para reações metabólicas e síntese de compostos estruturais das células (MOAT; FOSTER; SPECTOR, 2002).

Os lactobacilos são considerados micro-organismos extremamente fastidiosos, adaptados a substratos orgânicos complexos, sendo necessário para o desenvolvimento celular compostos como nucleotídeos, aminoácidos, ácido pantotênico e vitaminas (KANDLER; WEISS, 1986).

O desafio atual para a utilização de espécies de *Lactobacillus* no desenvolvimento de alimentos funcionais reside na adequada definição da composição de meios de cultura e na redução dos custos da fonte de carbono e nitrogênio utilizados, que permitam a viabilização de processos biotecnológicos em escala industrial.

O farelo de arroz (*Oryza sativa*), principal subproduto gerado do polimento do grão de arroz, constitui uma fonte rica em proteínas, lipídeos, minerais e antioxidantes, passível de ser utilizado como matéria prima para a formulação de meios de fermentação e preparação de alimentos funcionais (CANETTIERI; ALMEIDA E SILVA; FELIPE, 2001; PARRADO et al., 2006). Este subproduto apresenta concentrações variadas de água (10,5 - 12,0%), proteína (14 - 20,9%), lipídeos (1,5 - 2,0%), amido (15,3 - 16,8%), fibra total (25,2 - 25,8%), fenóis totais (2,0 - 2,5%), ácido fítico (1,73 - 2,28%) e cinzas (9,0 - 10,4%) (TBCAUSP, 2010). O extrato de farelo de arroz, obtida por tratamento termico, é uma substância complexa, relativamente de baixo custo, rica em nutrientes, vitaminas do complexo B e E, e minerais para o crescimento celular e produção de biomoléculas em processos biotecnológicos (CANETTIERI; SILVA E ALMEIDA; FELIPE, 2001; PARRADO et al., 2006).

2.3 Metabolismo do glicerol

O glicerol é um precursor de compostos celulares e regulador de várias vias metabólicas, essencial para a síntese de lipídeos e reciclagem de fosfato inorgânico, regulação do potencial redox e fonte de carbono assimilável por várias espécies de bactérias e leveduras (ANSELL et al., 1997; DILLIS et al., 1980; LAGES; SILVA-GRAÇA; LUCAS, 1999; NEVOIGT; STAHL, 1997; YAMADA et al., 1982).

Diversos estudos têm sido desenvolvidos visando à utilização de glicerol como fonte de carbono por micro-organismos, especialmente por bactérias e leveduras. Muitos destes destacam principalmente os mecanismos de assimilação de glicerol para a produção de compostos intermediários para obtenção de polímeros, resinas e aditivos para combustíveis (CHENG et al., 2007; ITO et al., 2005; PAPANIKOLAOU et al., 2008; ZHAO; CHEN; YAO, 2006).

A assimilação de glicerol por parte dos micro-organismos envolve o transporte passivo e transporte ativo (SILVA-GRAÇA; LUCAS, 1999; VOEGELE; SWEET; BOOS, 1993) através da membrana plasmática. O transporte passivo inclui a difusão simples (permeação não específica) e a difusão facilitada mediada por proteínas localizadas nas camadas mais internas da membrana plasmática (MIP), as permeases. A difusão simples, sendo ATP não dependente, requer um gradiente de concentração para o transporte do substrato através da membrana constituindo uma desvantagem para o crescimento de organismos sem mecanismos de assimilação alternativos (MOAT; FOSTER; SPECTOR, 2002).

Diferente de outros compostos orgânicos, o glicerol é um dos poucos substratos que atravessa a membrana celular por difusão facilitada nas células procarióticas. Em bactérias como *Escherichia coli*, a proteína do tipo poro-canal-G1pF atua por sensibilidade mecânica sem gasto energético na presença de glicerol. Este facilitador permite a assimilação, além de glicerol, de pequenas moléculas de polihidroxiálcoois, uréia e glicina (LUYTEN et al., 1995; MOAT; FOSTER; SPECTOR, 2002). Por outro lado, mecanismos de transporte ativo simporte glicerol/H⁺ e simporte glicerol/Na⁺ (dependentes de ATP) foram descritos

em leveduras e bactérias (LAGES; SILVA-GRAÇA; LUCAS, 1999; LUYTEN et al, 1995; MOAT; FOSTER; SPECTOR, 2002).

Em bactérias, o glicerol pode ser utilizado como única fonte de carbono e energia. Neste sentido, as bactérias ácido-láticas como *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchnerii* e *Lactobacillus reuteri*, apresentam capacidade de assimilar glicerol via proteínas específicas (ALVAREZ et al., 2004; PASTERIS; STRASSER DE SAAD, 2009; TALARICO; DOBROSZ, 1990).

Na Figura 4 se apresentam as principais vias de assimilação de glicerol em bactérias.

Figura 4 – Assimilação aeróbia e anaeróbia de glicerol por bactérias. Adaptado de KEGG (KANEHISA; GOTO, 2000).

A principal via para a assimilação de glicerol por micro-organismos consiste na fosforilação do glicerol pela enzima glicerol quinase para formar glicerol-3-fosfato (Figura 4), que é convertido a diidroxiacetona fosfato pela

enzima glicerol fosfo-ubiquinona oxidoreductase dependente de FAD, presente na membrana citoplasmática de bactérias (ALVAREZ et al., 2004).

Outra possível via catabólica corresponde à oxidação de glicerol e consequente formação de dihidroxiacetona pela enzima glicerol desidrogenase que logo após, é fosforilada a dihidroxiacetona fosfato pela enzima dihidroxiacetona quinase dependente de ATP (Figura 4).

A dihidroxiacetona fosfato é considerada uma importante molécula intermediária para a gliconeogênese, assim como para a obtenção de vários compostos por meio das vias oxidativas (BARBIRATO et al., 1996; PASTERIS, STRASSER DE SAAD, 2009).

A capacidade potencial para respirar e incrementar o rendimento celular na presença de oxigênio foi demonstrado para várias espécies de bactérias lácticas (LORQUET et al., 2004; STEVENS et al., 2008).

A resposta de *L. plantarum* a condições de crescimento aeróbio e ao estresse oxidativo são aspectos relevantes para grande variedade de condições de processos industriais na obtenção de biomassa (STEVENS et al., 2008). Esta estirpe de lactobacilo apresenta capacidade de utilização de oxigênio sob certas condições, incluindo limitação de substrato e ausência de reações catalisadas por dismutase superóxido (BROOIJMANS et al., 2007).

Nesse sentido, os co-fatores (NAD^+ ; NADH^+ ; NADHP^+ ; coenzima A) desempenham papel preponderante em várias reações bioquímicas conduzidas em condições aeróbias, sendo possível sua manipulação por parte dos micro-organismos na busca do equilíbrio óxido-redutivo. A nicotina adenina dinucleotídeo (NAD) atua com cofator em 300 reações de oxido-redução, sendo que o NAD^+ atua em reações de oxidação de fontes de carbono como glicose e glicerol, produzindo equivalente reduzido na forma de NADH. Para que a célula continue seu metabolismo e dê lugar à formação de produtos é importante que o NADH reduzido seja oxidado a NAD^+ a fim de atingir o equilíbrio redox, mediante a redução de intermediários metabólicos (SAN et al., 2002). Coenzima A (CoA), outro importante cofator no equilíbrio oxido-redução, e seu composto derivado, acetil-CoA; desempenham fator preponderante em reações enzimáticas para a

obtenção de compostos de interesse comercial como ésteres e lipídeos, assim como nas vias metabólicas de obtenção de energia (SAN et al., 2002).

Sendo uma bactéria facultativa heterofermentativa, *L. plantarum* produz lactato como principal produto de fermentação sob condições anaeróbias e excesso de glicose (KANDLER; WEISS, 1986). A glicose é transportada através da membrana mediante um sistema de fosfotransferase e utilizada pela via Embden-Meyerhof-Parnas para produzir piruvato, gerar energia e utilizar NAD^+ (Figura 5).

Figura 5 – Via metabólica de produção de Lactato e Acetato em *L. plantarum*. CoA; co-enzima A; X, acceptor de elétrons (Adaptado de LORQUET et al, 2004).

Em seguida o piruvato é convertido a L-lactato e D-lactato pelas enzimas lactato desidrogenases (LDH) esteroespecíficas (NAD-dependentes), LdhL e LdhD, que regenera NAD^+ e mantêm o balanço redox do sistema (FERAIN; SCHANCK; DELCOUR, 1993).

A enzima LDH, presente em *Lactobacillus cassei*, *Lactobacillus plantarum* e várias estirpes de lactococos requerem, de forma absoluta e específica; de frutose-1,6-difosfato para operar. Na ausência deste intermediário, a enzima LDH apresenta baixa atividade, desviando o catabolismo para a formação de outros produtos. Desse modo, outras vias de degradação de piruvato são ativadas, originando acetato, succinato, etanol, 2,3-butanodiol e manitol como produto final de fermentação (FERAIN; SCHANCK; DELCOUR, 1993). O acetato constitui o segundo maior produto de degradação do piruvato na estirpe *L. plantarum* (SEDEWITZ; SCHEIFER; GOTZ, 1984). Várias vias de obtenção de acetato por metabolismo de piruvato foram descritas nesta espécie (LORQUET et al., 2004; SEDEWITZ; SCHEIFER; GOTZ, 1984) (Figura 5). O piruvato pode ser metabolizado a acetato sob condições de anaerobiose via piruvato formato liase, fosfo-transacetilase (fosfotransferase) e acetato quinase (ACK) (Figura 5).

Outra possível via para a produção de acetato envolve o complexo piruvato desidrogenase (PDH), fosfo-transacetilase e ACK (Figura 5). Esta via é particularmente ativa sob condições aeróbias, sendo o complexo PDH inibido sob anaerobiose devido aos altos níveis de NADH no interior da célula (LORQUET et al., 2004). Mesmo que identificado o gene *pdh* na sequência genômica, existem estudos que indicam que *L. plantarum* não apresenta atividade detectável de PDH sob várias condições de crescimento (KLEEREBEZEM et al., 2003; HICKEY; HILLIER; JAGO, 1983).

Pesquisas sobre a fisiologia de *L. plantarum* indicaram que a produção de acetato deriva da degradação de lactato e que esta é máxima sob condições aeróbias de cultivo e baixas concentrações de glicose (LORQUET et al., 2004; HICKEY; HILLIER; JAGO, 1983). A conversão de lactato a acetato ocorre via lactato oxidases esteroespecíficas (LoxL-levógiro e LoxD-dextrógiro), piruvato oxidase (POX) e ACK (Figura 5). A enzima POX, considerada chave na formação de acetato, utiliza oxigênio para converter piruvato em acetilfosfato, levando à formação de CO₂ e H₂O₂, podendo esta última ser degradada pela enzima NADH peroxidase (CONDON, 1987; LORQUET et al., 2004). A atividade POX em *L. plantarum* é induzida por oxigênio ou peróxido de hidrogênio e reprimida por glicose (GOTZ; SEDEWITZ; ELSTNER, 1980). Estes efeitos foram observados

em nível de proteína e em estudos *in vitro*, sem elucidação dos mecanismos fisiológicos de regulação na célula (LORQUET et al., 2004).

A produção de acetato via acetato quinase em *L. plantarum* é acompanhada pela produção simultânea de ATP. Foi observado que o crescimento sob condições aeróbias favorece a produção de biomassa de *L. plantarum*, se comparado com a produção de biomassa em anaerobiose, o que poderia indicar que a produção adicional de ATP gerado via ACK contribui para a produção de biomassa (CONDON, 1987; LORQUET et al., 2004).

O acetato é um importante componente do aroma de produtos fermentados além de atuar como agente regulador do acoplamento de membrana a baixo pH, inibindo o crescimento de micro-organismos competidores (LORQUET et al., 2004; SEDEWITZ; SCHEIFER; GOTZ, 1984).

Em espécies de bactérias como *Clostridium pasteurianum*, *Citrobacter freundii*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchnerii* e *Bacillus welchii* (BARBIRATO et al., 1996; DABROCK et al., 1992; GONZÁLEZ-PAJUELO et al., 2005; NAKAMURA et al., 2000); sob condições de anaerobiose, o glicerol sofre desidratação pela enzima glicerol desidratase para produzir 3-dihidroxi propionaldeído. Posteriormente, este intermediário é transformado pela enzima 1,3-propanodiol oxido-reductase NADH dependente em 1,3-propanodiol, principal intermediário para produção de polímeros, resinas e aditivos de importantes aplicações industriais (GONZÁLEZ-PAJUELO et al., 2005; YAZDANI; GONZALEZ, 2007).

A via não oxidativa representa um mecanismo efetivo para a utilização de glicerol comoceptor externo de hidrogênio em algumas espécies do gênero *Lactobacillus*, como *L. reuteri*, *L. collinoides*, *L. brevis* e *L. buchneri* (ALVAREZ et al., 2004; PASTERIS; STRASSER DE SAAD, 2009).

Os principais resultados, recentemente publicados, referentes à fermentação de glicerol por bactérias e leveduras são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Resultados de trabalhos recentes referentes a fermentação de glicerol.

Micro-organismos	Meio	Bioproduto	Referência
<i>Thamnidium elegans</i> CCF 1465	Glicerol biodiesel bruto 30 g/L	Lipídeos, 2,9 (42%p.s) Ácido acético , 29,2; g/L	Chatzifragkou et al., 2011
<i>Yarrowia lipolytica</i>	90 g/L	Manitol, 19, 4 g/L Ácido cítrico, 9,4 g/L	
<i>Rhodoturula glutinis</i> TISTR 5159	Glicerol biodiesel bruto 95 g/L	Lipídeos, 6,1 g/L Carotenoides, 135 mg/L	Saenge et al., 2011
<i>Schizochytrium limacinum</i> SR21	Glicerol biodiesel tratado 90 g/L	Ácido docosahexanóico, 1,65 g/L (0,52 g/L.dia)	Ethier et al., 2011
<i>Aspergillus niger</i> NRRL 364 <i>Aspergillus niger</i> LFMB 1 <i>Lentinula edodes</i> AMRL 119 <i>Lentinula edodes</i> AMRL 121	Glicerol biodiesel bruto, 60 g/L	Ácido oxálico, 20-21 g/L Lipídeos, 3,1 – 3,4 g/L	André et al., 2010
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> YPH499 (modificada)	Glicerol puro, 20 g/L	Etanol, 2,5 g/L; 0,14 g/g	Yu, Kim, Han, 2010
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Glicerol biodiesel tratado, 105 g/L	Biomassa, 0,46 g/g Lipídeos, 0,25 g/g Acido cítrico, 0,10 g/g	Makri et al., 2010
<i>Escherichia coli</i> HW2	Glicerol, 10 g/L	Hidrogênio, 0,68 mmol/L/h	Hu, Wood, 2010
<i>Acetobacter</i> sp. V6	Glicerol, 30 g/L	Celulose bact., 4,98 g/L	Jung et al., 2010
<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>Israelensis</i>	Glicerol biodiesel tratado, 10 g/L	Endotoxinas (BT), 0,295 mg/L	Barbosa, 2009
<i>Cupriavidus necator</i> DSM 545	Glicerol biodiesel, 171 g/L	Poli(3-hidroxi butirato), 51,2 g/L; 0,34 g PHB/g glycerol	Cavalheiro et al., 2009
<i>Propionibacterium</i> <i>acidipropionici</i> ACK-Tet	Glicerol biodiesel	Ácido propiónico, 0,71 g/g	Zhang, Yang, 2009
<i>Pichia pastoris</i>	Glicerol biodiesel bruto	Fitase, 1125 U/mL	Tang et al., 2009

As estirpes *L. buchneri*, *L. brevis* e *L. reuteri* utilizam glicerol em co-fermentação com hexose, devido à falta de enzimas envolvidas na via redutiva que permitam a recuperação de NAD oxidado (ALVAREZ et al, 2004; VEIGA DA CUNHA; FOSTER, 1992). Assim, em co-fermentação com glicose, o co-fator NADH é gerado como consequência do metabolismo da hexose, e re-oxidado a NAD⁺ pela redução de 3-hidroxi propionaldeído, favorecendo a conversão em 1,3 propanodiol. A redução de 3-hidroxi propionaldeído constitui um mecanismo fisiologicamente importante e necessário para a detoxificação celular (CLAISSE; LONVAUD-FUNEL, 2000, SUN et al, 2003).

O metabolismo homofermentativo e heterofermentativo de glicerol por *L. casei*, *L. brevis* e *L. bulgaricus* para a produção de ácidos orgânicos foi descrito inicialmente por Cantoni e Molnar, em 1967. Estes estudos demonstraram a capacidade de produção de ácido capróico, láctico, pirúvico, glioxálico, β -hidroxipropiónico, succínico, oxálico, acético e ácido isovalérico pelas espécies estudadas.

A síntese de peróxido de hidrogênio, 3-hidroxi propionaldeído e bacteriocina são características de algumas espécies de bactérias probióticas. A propriedade probiótica apresentada por *L. reuteri* se encontra associada com a reuterina, um composto intermediário da fermentação de glicerol, que consiste em uma mistura em equilíbrio de monômeros, monômeros hidratados e dímeros cíclicos de β -hidroxipropionadeído que atua inibindo a síntese de DNA em micro-organismos patogênicos Gram-positivo e Gram-negativo, leveduras e fungos filamentosos (AXELSSON et al., 1989, TALARICO; DOBROGOSZ, 1989; TALARICO et al., 1988).

Lüthi-Peng et al. (2002) estudaram a síntese de reuterina por *Lactobacillus reuteri* utilizando glicerol (200 mM) como fonte principal de carbono sob condições anaeróbias. Os autores observaram que a adição de glicose no meio contendo glicerol acelera o consumo de glicerol, devido principalmente ao aumento da concentração de NADH. Por outro lado, os autores mostraram que a adição de 20 mM de lactato favorece a utilização de glicerol, promovendo o acúmulo de 3-hidroxi propionaldeído, provavelmente devido à conversão de lactato em piruvato, com a subsequente geração de NADH.

Kask et al. (2003) estudaram a assimilação de glicerol, crescimento e características fisiológicas gerais de estirpes de lactobacilos isoladas de queijo da Estônia. As estirpes identificadas como *L. paracasei*, *L. danicus* e *L. curvatus* apresentaram capacidade de crescimento em meio contendo 10% (m/v) de glicerol ($a_w=0,96$). Os autores observaram que o incremento da concentração de glicerol para 20% (m/v) ($a_w=0,93$) afetou a velocidade de crescimento de *L. danicus*, inibindo o crescimento de *L. curvatus*. No entanto, *Lactobacillus paracasei* demonstrou capacidade de crescimento a concentrações de glicerol superiores a 30% (m/v). A velocidade específica de crescimento máxima (μ_{max}) observada em meio contendo glicerol (10%) foi de 0,38, 0,29 e 0,38 h⁻¹ para *L. paracasei*, *L. danicus* e *L. curvatus*, respectivamente. Para concentrações de glicerol acima de 20% (m/v), foram observadas significantes modificações na morfologia celular para todas as espécies estudadas, apresentando maior alongamento em relação às estirpes originais (KASK et al., 2003).

Em experimentos conduzidos sob agitação, em meio contendo glicerol (42,6 mM), peptona, triptona e extrato de levedura, Alvarez et al. (2004) reportaram que 60% do glicerol foi consumido por *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469, produzindo moléculas aromáticas, como 2,3-butanodiol/acetoína (2,6 mM), acetato (11,0 mM) e DL-lactato (7,1 mM). Os autores demonstraram que a adição de glicose no meio de cultivo aumenta o consumo de glicerol em aproximadamente 20%, sendo lactato (9,8 mM), acetato (21,3 mM) e diacetil (1,5 mM) os principais compostos produzidos. Estes experimentos demonstram que o glicerol representa uma importante fonte de carbono para a produção de aromas e outros bioprodutos.

Pasteris e Strasser de Saad (2009) estudaram o catabolismo do glicerol por *Lactobacillus hilgardii* X₁B sob condições de anaerobiose e micro-aerobiose, na presença de glicose e frutose em concentrações limitadas. Neste estudo, o consumo de glicerol ocorreu simultaneamente com o consumo de glicose e frutose, detectando-se atividades enzimáticas de glicerol quinase e glicerol desidratase em ambas as condições de cultivo. Em anaerobiose, os principais produtos obtidos foram lactato, acetato, etanol, 3-hidroxipropionaldeído e CO₂, sendo que em condições micro-aeróbias, observou-se a produção de

3-hidroxipropionaldeído e 1,3-propanodiol em menor proporção que lactato, acetato e etanol (PASTERIS; STRASSER DE SAAD, 2009).

As pesquisas mais importantes sobre a assimilação de glicerol por espécies de lactobacilos são direcionadas à obtenção de bioprodutos sob anaerobiose, como bacteriocinas, 2,3-butanodiol, lactato, 3-hidroxipropionaldeído, acetatos (aromas) e 1,3-propanodiol, conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 – Principais bioprodutos resultantes do metabolismo de glicerol por estirpes de *Lactobacillus*.

Bactéria	Meio	Bioproduto	Referência
<i>L. hilgardii</i> X1B	MRS + Glicerol puro (micro-aeróbio)	Lactato, 1,3-propanodiol, acetato, etanol, 3-HPA	Pasteris, Strasser de Saad, 2009
<i>L. plantarum</i> AMA-K	MRS + Glicerol puro (anaeróbio)	Bacteriocina	Torodov, 2008
<i>L. rhamnosus</i> ATCC 7469	LAPT + Glicerol puro (aeróbio)	Diacetil, acetato, lactato, acetoína, 2,3-butanodiol	Alvarez et al., 2004
<i>L. reuteri</i> ATCC 53608	MRS + Glicerol puro (anaeróbio)	3-HPA, 1,3-propanodiol	Luthi-Peng, Dileme, Puhan, 2002
<i>L. collinoides</i> IOEB 9527	Glicerol puro + Glicose (anaeróbio)	1,3-propanodiol	Claisse, Lonvaud-Funel, 2000
<i>L. buchneri</i> B190 <i>L. brevis</i> B22	Glicerol puro + Glicose	1,3-propanodiol	Veiga da Cunha, Foster, 1992
<i>L. reuteri</i> 1063	MRS + Glicerol puro (anaeróbio)	Reuterina	Talarico et al., 1988
<i>L. reuteri</i> JCM 1112T	MRS + Glicerol puro (anaeróbio)	Reuterina Cobalamina	Morita et al., 2008

3-HPA: 3-hidroxipropionaldeído

Não obstante, os estudos de assimilação de glicerol por lactobacilos se encontram em fase laboratorial e sob condições não otimizadas, sendo que muitos dos estudos se encontram associados à produção de compostos que afetam a qualidade de alimentos e bebidas (ALVAREZ et al., 2004). Dessa forma,

é necessária a otimização e avaliação de meios complexos formulados a base de glicerol de biodiesel para a obtenção de biomassa microbiana (probióticos), bacteriocinas e outras moléculas intermediárias empregadas como insumos na indústria química, como 3-hidroxipropionaldeído e 2,3-butanodiol (YAZDANI; GONZALEZ, 2007).

2.3.1 Glicerol quinase e glicerol desidrogenase

O catabolismo aeróbio do glicerol em bactérias (Figura 6) pode ocorrer mediante a fosforilação do glicerol pela enzima glicerol quinase (EC 2.7.1.30; ATP: glicerol-3-fosfotransferase) para formar glicerol-3-fosfato; ou dihidroxiacetona pela enzima glicerol desidrogenase (EC 1.1.1.6, NAD dependente) (ALVAREZ et al., 2004).

Em outra via, o glicerol é degradado a gliceraldeído pela enzima glicerol desidrogenase (EC. 1.1.1.72, NADP dependente), observada em fungos filamentosos como *Neurospora crassa*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus nidulans* (SCHUURINK et al. 1990; VISWANATH-REDDY; PYLE; HOWE, 1978).

A enzima glicerol quinase catalisa a fosforilação (dependente de Mg-ATP) de glicerol para glicerol-3-fosfato (G3P). Em bactérias, o produto da reação catalisada pela enzima glicerol quinase é metabolizado na via glicolítica, ao nível das trioses fosfato, atuando ao mesmo tempo como indutor da expressão do gene regulador *glpK* que codifica a síntese de glicerol quinase (LIU et al., 1994).

A reação catalisada por esta enzima atua como etapa limitante da velocidade de conversão de glicerol, sendo sua atividade regulada por nucleotídeos de adenina na forma de co-fatores ligados a sua estrutura (PETTIGREW et al., 1988) e por interação com componentes do sistema fosfo-transferase bacteriano como frutose-1,6-difosfato e fosfoenolpiruvato (ZWAIG; KISTLER; LIN, 1970).

Figura 6 – Principais enzimas envolvidas na assimilação de glicerol em micro-organismos em condições de aerobiose. Adaptado de KEGG (KANEHISA; GOTO, 2000) e LORQUET et al. (2004).

Esta enzima cumpre uma importante função fisiológica na formação de glicerol-3-fosfato para a síntese de fosfolipídeos. Industrialmente importante, é útil para a determinação do nível de triglicerídeos no sangue em combinação com a lipase, glicerol-3-fosfato oxidase e peroxidase (FUSSATI; PRINCIPE, 1982; SAKESASEWA et al., 2001).

Na Tabela 3 são apresentados os principais estudos cinéticos de glicerol quinase em bactérias e fungos.

Tabela 3 – Principais estudos de caracterização cinética de glicerol quinase em micro-organismos.

Organismo	Atividade (U/mg)	K _m (μM)	V _{max} (U/mg)	Referência
<i>Candida mycoderma</i>	-	65	-	Grunnet, Lundquist, 1967
<i>Escherichia coli</i> K-7	3.2 ^b	1,3	100	Hayashi, Lin, 1967
<i>Escherichia coli</i> K-10	32 ^b - 1004 ^c	10	-	Thorner, Paulus, 1972
<i>Streptococcus faecalis</i>	-	900	-	Deutscher, Sauerwald, 1986
<i>Debaromyces hansenii</i>	177	5000	-	Nilsson et. al., 1989
<i>Escherichia coli</i>	-	4,9	15,7	Pettigrew et al., 1990
<i>Escherichia coli</i> ^a	-	27	3,9	Voegelé et al., 1993
<i>Escherichia coli</i> ^a	-	126	12,7	Pettigrew et al., 1996
<i>Thermus flavus</i> DSM674	0,71 ^b -56,7 ^c	38	-	Huang et al., 1997
<i>Pediococcus pentosaceus</i> N5p	-	110	108	Pasteris, Strasser de Saad, 1998
<i>Flavobacterium meningosepticum</i>	0,45 ^b - 75,5 ^c	-	-	Sakasegawa et al., 1998
<i>Escherichia coli</i> ^e	3.26 ^b	88	-	Sakasegawa et al., 1998
<i>Escherichia coli</i> ^a	173,7	169	206	Steinborn et al., 2000
<i>Escherichia coli</i> ^f	-	140	226	Králová et al., 2000
<i>Escherichia coli</i>	-	5	15	Holtman et al., 2001
<i>Escherichia coli</i> ^a	-	6	13	Holtman et al., 2001
<i>Flavobacterium meningosepticum</i>	-	249	-	Sakasegawa et al., 2001
<i>Escherichia coli</i> ^e	-	521	-	Sakasegawa et al., 2001
<i>L. rhamnosus</i> ATCC 7469	2,59	-	-	Alvarez et al., 2004
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	2000	1,15 ^d	Aragon et al., 2008
<i>Lactobacillus hilgardii</i> X1B	22,14	-	-	Pasteris, Strasser de Saad, 2009

^aorganismo geneticamente modificado, ^b extrato bruto; ^c enzima pura; ^d U/mL; ^e mutante de *Flavobacterium meningosepticum*; ^f mutante de *Trypanosoma.brucei*

Em bactérias Gram-positivo e Gram-negativo, a repressão da síntese de enzimas específicas para assimilação e metabolismo de glicerol depende de um

sistema de fosfotransferase (PTS) (DEUTSCHER; SAUERWALD, 1986; HOLTMAN et al., 2001).

Em bactérias Gram-positivo como *Enterococcus*, *Bacillus* e *Streptococcus*, a enzima glicerol quinase é fosforilada em uma unidade de histidina, promovendo atividades 10 a 15 vezes superiores às observadas em outros organismos cujas proteínas não são fosforiladas (DEUTSCHER; SAUERWALD, 1986; HOLMBERG et al., 1990; ORMO; BYSTROM; REMINGTON, 1998; YEH et al., 2004). Tanto em bactérias Gram-positivo quanto em Gram-negativo, a inibição da atividade é promovida por frutose-1,6-difosfato que se liga na região que corresponde ao sítio de fosforilação da enzima, ativando o sinal positivo da disponibilidade de glicose e prevenindo a expressão de proteínas para assimilação de glicerol, mediante o bloqueio dos efetores para a síntese (ORMO, BYSTROM, REMINGTON, 1998; YEH et al., 2004).

A enzima glicerol desidrogenase é encontrada em fungos, leveduras, bactérias e tecidos de mamíferos (VISWANATH-REDDY; PYLE; HOWE, 1978; YAMADA et al., 1982; LIEPINS et al., 2006), assim como em alguns gêneros de bactérias Gram-positivo e fungos filamentosos (YAMADA et al., 1982; LIEPINS et al., 2006).

Independente da fonte, a enzima glicerol desidrogenase catalisa reações de três tipos (Equações 1 a 3), considerando o produto final e o aceptor de elétrons da reação enzimática.

O primeiro grupo (EC 1.1.1.6) catalisa a oxidação de glicerol em diidroxiacetona na presença de NAD^+ (Equação 1). O segundo grupo, glicerol desidrogenase (EC 1.1.1.72) oxida glicerol a gliceraldeído utilizando NADP^+ como co-fator (Equação 2). O terceiro grupo (EC 1.1.1.156), denominado também

dihidroxiacetona redutase; oxida glicerol a dihidroxiacetona na presença do co-fator NADP⁺ (Equação 3) (YAMADA et al., 1982; RUZHEINIKOV et al., 2001).

O interesse na enzima glicerol desidrogenase se fundamenta principalmente no seu uso para produção de dihidroxiacetona (DHA), base para obtenção de cosméticos (bronzeador) obtido pela fermentação de glicerol por *Gluconobacter oxydans* e *Acetobacter suboxydans* desde 1950 (CLARET; BORIES; SOUCAILLE, 1992), e como ferramenta para análise de lipídeos em soro sanguíneo (YAMADA et al., 1982).

A enzima glicerol desidrogenase (EC 1.1.1.72) de *Neurospora crassa*, de massa molar estimada em 160.000 daltons, conta com uma subunidade molecular de 43.000 daltons. Esta enzima mostrou-se específica para glicerol, sendo o pH ótimo de 9,5 para a reação direta de glicerol para D-gliceraldeído. Por outro lado, a reação reversa ocorre a pH ótimo de 6,5, sendo máxima a velocidade de reação, quando utilizado D-gliceraldeído como substrato. Os valores de K_m para glicerol e D-gliceraldeído correspondem a 0,143 mM e 0,0115 mM, respectivamente (VISWANATH-REDDY; PYLE; HOWE, 1978).

O mecanismo de regulação, localização e função dos genes que codificam a síntese das enzimas-chave para a assimilação e catabolismo do glicerol, em varias estirpes de bactérias, foi estudado em *Escherichia coli*, *Flavobacterium meningosepticum*, *Lactobacillus rhamnosus* e *Citrobacter freundii*, entre outros (ALVAREZ et al., 2004; DANIEL et al., 1995; PETTIGREW et al., 1988; SAKASESAWA et al., 1998).

Na Tabela 4 são apresentados os principais estudos de parâmetros cinéticos da enzima glicerol desidrogenase em micro-organismos.

A sequência que codifica a síntese de glicerol quinase em outros micro-organismos, incluindo *Lactobacillus*, foi identificada por homologia com genomas das bactérias *E.coli* e *Bacillus* sp., nas quais as atividades enzimáticas para a assimilação de glicerol foi confirmada. A identificação por homologia da sequência do gene *glpk*, que codifica a enzima glicerol quinase (EC.2.7.1. 30) foi reportada para *L. reuteri* DSM 20016, *L. sakei* subsp. *sakei* 23K, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. salivarius* subsp. *salivarius* UCC118, *L. delbrueckii* subsp. *lactis*,

L. casei BL23, *L. rhamnosus*. Nestes casos, não foi reportada a presença de proteínas, exceto para a estirpe *L. rhamnosus* (ALVAREZ, 2004). O gene regulador da enzima glicerol desidrogenase (EC.1.1.1.6) foi identificado por homologia para *L. salivarius subsp. salivarius* UCC118 (BRENDA, 2009; UNIPROT, 2010).

Tabela 4 – Principais estudos de caracterização cinética de glicerol desidrogenase em micro-organismos.

Organismo	Co-fator utilizado	Atividade (U/mg)	K _m (μM)	V _{max}	Referência
<i>Neurospora crassa</i>	NADP ⁺	-	1,43 10 ⁵	2,20 10 ⁴	Viswanath-Reddy et al., 1978
<i>Neurospora crassa</i>	NADPH	-	1,15 10 ⁴	2,63 10 ⁴	Viswanath-Reddy et al., 1978
<i>Escherichia coli</i> 424 ^a	NAD ⁺	4,6 ^b -69 ^c	1400	81 U/mg	Tang et al., 1979
<i>Klebsiella aerogenes</i> IFO 3318	NAD ⁺	0,102	-	-	Yamada et al., 1982
<i>Arthrobacter ureafaciens</i> IFO 12140	NAD ⁺	0,138	-	-	Yamada et al., 1982
<i>Aeromonas liquefaciens</i> IFO 12978	NAD ⁺	0,0657	-	-	Yamada et al., 1982
<i>Aspergillus oryzae</i> AKU 3301	NADP ⁺	0,0307	-	-	Yamada et al., 1982
<i>Penicillium notatum</i> IFO 4640	NADP ⁺	0,0139	-	-	Yamada et al., 1982
<i>Penicillium expansum</i> IFO 6096	NADP ⁺	0,0107	-	-	Yamada et al., 1982
<i>Cellulomonas sp.</i> NT 3060	NAD ⁺	0,183	-	-	Yamada et al., 1982
<i>Cellulomonas sp.</i>	NAD ⁺	90	9000	-	Lee, Whitesides, 1986
<i>Enterobacter aerogenes</i>	NAD ⁺	5	9000	-	Lee, Whitesides, 1986
<i>Citrobacter freundii</i> DSM 30040	NAD ⁺	2,2 ^b -65,5 ^c	1270	-	Daniel et al., 1995
<i>Bacillus stearothermophilus</i> DSM 2334	NAD ⁺	-	3,8	-	Ruzheinikov et al., 2001

^aorganismo geneticamente modificado; ^b extrato bruto; ^c enzima pura

Identificar as enzimas envolvidas na assimilação de glicerol por parte de bactérias probióticas, assim como os fatores que afetam sua produção, é de fundamental importância para estabelecer as condições para uma maior produção de biomassa celular a partir deste substrato.

2.4 Microencapsulação de bactérias

A preocupação com a saúde humana e animal vem estimulando o mercado de produtos probióticos. Diversos estudos demonstraram que existem produtos comerciais contendo células livres de bactérias probióticas com baixa estabilidade após longos períodos de armazenamento, apontando ainda, questionamentos sobre a alteração das características sensoriais e a sobrevivência destas bactérias no sistema gastrointestinal de humanos e animais (CHAMPAGNE; FUSTIER, 2007; KILASAPATHY, 2002; SHAH, 2000).

A proteção de bactérias e leveduras ocorre de forma natural, quando o próprio micro-organismo cresce e produz secreções poliméricas (exopolissacarídeos) que atuam como estrutura de proteção (cápsula), reduzindo a permeabilidade e a exposição a fatores ambientais adversos (VIDHYALAKSHMI; BHAKYARAJ; SUBHASREE, 2009).

A proteção celular mediante microencapsulação vem sendo estudada de forma extensiva nos últimos anos (IYER; KILASAPATHY, 2005; HOMAYOUNI et al., 2008; SANDOVAL-CASTILLA et al., 2010; de VOS et al., 2010).

Define-se a microencapsulação como a tecnologia empregada para envolver materiais sólidos, líquidos ou gasosos em pequenas cápsulas capazes de liberar o conteúdo sob velocidade controlada durante períodos de tempo prolongados (CHAMPAGNE; FUSTIER, 2007). Esta tecnologia é utilizada para a obtenção de diversos ingredientes funcionais na indústria de alimentos, assim como para a liberação controlada de drogas e vacinas na indústria farmacêutica. Nos últimos anos, os termos encapsulação e imobilização vêm sendo empregados indistintamente, no entanto, estes termos foram introduzidos para indicar tecnologias diferentes. O encapsulamento corresponde à tecnologia que

permite cobrir ou envolver em uma matriz o microrganismo ou ingrediente funcional, sem exposição superficial ao meio externo; por sua vez, a imobilização refere-se à retenção do organismo dentro ou na superfície de uma matriz, podendo existir exposição superficial ao meio externo (CHAMPAGNE; FUSTIER, 2007).

A microencapsulação tem sido efetiva na proteção de bactérias sensíveis a fatores ambientais desfavoráveis como variação de pH (incluindo a pós-acidificação de produtos fermentados), toxicidade do oxigênio durante o processamento, condições de armazenamento de alimentos, acidez elevada e altas concentrações de sais biliares; estendendo a viabilidade celular e permitindo a liberação controlada do conteúdo (KAILASAPATHY, 2002; MUTHUKU MARASAMY; HOLLEY, 2007; SHAH, 2000). A viabilidade de bactérias também é afetada por estresse mecânico e térmico resultantes das operações de agitação e secagem durante o processamento de alimentos e armazenamento a frio. Muitas indústrias incluíram bactérias com propriedades probióticas em produtos sólidos submetidos a secagem e resfriamento, valendo-se do microencapsulamento polimérico como forma de manter tanto a viabilidade celular quanto a funcionalidade dos micro-organismos (KAILASAPATHY; SHAN, 2000; de VOS et al., 2010).

As microcápsulas são sistemas constituídos por uma membrana polimérica semipermeável, de espessura variável e resistente; que envolve um núcleo sólido ou líquido (substância ativa) e cujo diâmetro varia de 1 μm a 1 mm (ANAL; SINGH, 2007). A estrutura formada pelo agente de microencapsulação em volta do microrganismo se denomina parede capsular. Dependendo do tipo de material empregado, a parede permite a passagem de pequenas moléculas (nutrientes e metabolitos), proporcionando liberação controlada do conteúdo sob diferentes condições (VIDHYALAKSHMI; BHAKYARAJ; SUBHASREE, 2009). A liberação do probiótico ou composto químico depende do tipo de material empregado e de mecanismos como a ruptura mecânica, dissolução ou fusão da parede capsular (CHAMPAGNE; FUSTIER, 2007; MUTHUKUMARASAMY, HOLLEY, 2007).

A microencapsulação encontra aplicação na indústria de alimentos, na proteção e estabilização de substâncias químicas e proteção de células de micro-

organismos; permitindo a liberação controlada do material encapsulado; aumentando a vida-útil do alimento e protegendo os componentes nutricionais (FÁVARO-TRINDADE; GROSSO, 2002; OLIVEIRA, 2006; SULTANA et al., 2000).

Alguns fatores que devem ser considerados no desenvolvimento de sistemas microencapsulados, incluem a natureza e características do polímero; tipo de agente de coesão (aglutinante); natureza e estabilidade do núcleo; processo de encapsulamento e características do produto final desejado (FÁVARO-TRINDADE; GROSSO, 2002; OLIVEIRA, 2006).

2.4.1 Materiais de encapsulamento

O material empregado no processo de encapsulamento de micro-organismos probióticos pode derivar de polissacarídeos naturais de origem vegetal (amido resistente, goma arábica, dextrina, derivados de celulose), algas marinhas (alginato, K-carragenana), bactérias (xantana) e animais (quitosana); assim como de polipeptídeos de origem animal como caseinato de cálcio e gelatina (AINSLEY et al., 2005; IYER; KILASAPATHY, 2005; SANDOVAL-CASTILLA et al., 2010).

2.4.1.1 Alginato

O encapsulamento de células em hidrogel é geralmente conduzido pela mistura de polímeros solúvel em água e subsequente gelificação por agregado de agentes ligantes (VIDHYALAKSHMI; BHAKYARAJ; SUBHASREE, 2009). Dentre os biomateriais poliméricos mais usados e investigados para encapsulamento de células e drogas encontra-se o alginato (Figura 7). O alginato é um polissacarídeo aniônico natural, obtido principalmente da parede celular de algas marrons (*Macrocystis pyriferae*, *Ascophyllum nodosum*), e tem sido utilizado para encapsular diferentes tipos de produtos na indústria de alimentos e

farmacêutica (DING; SHAH, 2009; KRASAEKOOPT et al., 2003). O ácido algínico ou alginato é um polímero não ramificado contendo ligações β -(1 – 4) de ácido-D-manurônico (M) e resíduos de ácido-L-gulurônico (G) unidos por ligações α (1 – 4), conforme apresentado na Figura 7.

Figura 7 – Unidade estrutural de alginato de *Laminaria hyperborea*. (M) ácido-D-manurônico; (G) ácido-L-gulurônico (CHAPLIN, 2011).

As propriedades mecânicas dos géis de alginato de cálcio dependem do número de ácido D-manurônico e L-gulurônico no polímero, assim como do massa molar e polidispersibilidade (grau de homogeneidade de massas) (DING; SHAH, 2009; KRASAEKOOPT et al., 2003).

A estrutura molecular de alginato de algas se apresenta em forma de blocos de resíduos similares e estritamente alternados (MMMMMM, GGGGGG e GMGMGM), cada um dos quais apresentando diferentes comportamentos e conformação (DONATI et. al., 2005).

A razão ácido-D-manurônico e ácido-L-gulurônico em alginato de *Macrocystis pyriferae* de aproximadamente 1,6; enquanto que na espécie *Laminaria hyperborea* é de 0,45. As matrizes poliméricas obtidas a partir de alginato rico em ácido gulurônico (G) são elásticas e resistentes ao congelamento, enquanto aqueles de alginato rico em ácido manurônico (M) são maleáveis, sendo que a maior resistência mecânica e ao calor são alcançadas com alginatos ricos em ácido glucorônico (DONATI et al., 2005).

A gelificação do alginato é induzida pela adição de cátions como cálcio ou estrôncio (gelificação ionotrópica), que instantaneamente formam uma rede tridimensional do tipo “caixa de ovo” entre o cátion multivalente e o grupo

carboxila do ácido gulurônico, retendo células ou moléculas de interesse dentro da estrutura tridimensional formada (DONATI et al., 2005; THU; SMIDSROD; SKJAK-BRAEK, 1996).

As vantagens da utilização do alginato como polímero para encapsulamento se deve à biocompatibilidade e aceitação como aditivo alimentar, rápida gelificação na presença de íons de cálcio, ligações por ponte de hidrogênio que favorecem a estabilidade das microcápsulas formadas, baixo custo e facilidade de preparo de cápsulas em condições de temperatura, pH e pressão osmótica brandas (SANDOVAL-CASTILLA et al, 2010).

O principal problema da utilização de alginato de cálcio como agente de encapsulamento se deve à sua rápida solubilização por agentes quelantes do íon cálcio, como citrato, lactato, fosfato e EDTA; ou pela presença no meio de sódio e magnésio, sódio e potássio, que são capazes de deslocar o cálcio (THU; SMIDSROD; SKJAK-BRAEK, 1996; VOO et al., 2011). A remoção de fosfato do meio de fermentação ou adição de cloreto de cálcio no mesmo, melhora a estabilidade da matriz de encapsulamento (IVANOVA; CHIPEVA; IVANOVA, 2000). Em muitos casos é necessário aplicar solução de polímeros como quitosana e poli-L-licina, visando proporcionar resistência e estabilidade às microcápsulas por períodos prolongados (VIDHYALAKSHMI; BHAKYARAJ; SUBHASREE, 2009; VOO et al., 2011).

Várias pesquisas têm demonstrado que o microencapsulado de probióticos em hidrogel de alginato melhora a viabilidade do organismo em condições de acidez e concentrações de sais biliares elevadas (DING; SHAH, 2009; FÁVARO-TRINDADE; GROSSO, 2000; KRASAEKOOPT et al., 2003).

O encapsulamento de *L. acidophilus* e *B. lactis* em alginato-amido, e posterior adição em iogurte, resultaram na redução da velocidade de acidificação do produto e no aumento da sobrevivência de células entre 1 e 2 log (UFC/g) durante o período de 7 semanas de armazenamento (KAILASAPATHY, 2006). Em sorvete, a sobrevivência de células de *L. casei* e *B. lactis* encapsuladas em alginato de cálcio foi 30% superior ao observado com células livres. A microencapsulação protege as células do estresse mecânico produzido pelas

condições de processo ou pela formação de cristais durante a produção de sorvetes (HOMAYOUNI et al., 2008).

Annan et al. (2008) produziram microesferas de alginato-gelatina para encapsular *Bifidobacterium adolescentis*, com objetivo de aumentar a sobrevivência das células durante exposição às condições adversas do trato gastrointestinal. A gelatina foi combinada com genipina para permitir o entrecruzamento com o polímero de alginato- Ca^{2+} , que por sua vez, agiu como protetor das microesferas da gelatina ante a degradação induzida por pepsina em condições simuladas do líquido gástrico (ANNAN et. al, 2008).

Ivanova et al. (2000) investigaram a produção de bacteriocina por células de *Enterococcus faecium* encapsuladas em esferas de 0,8 a 1,0 mm de diâmetro de alginato de cálcio. A microencapsulação promoveu estabilidade celular à bactéria para a produção de bacteriocina, obtendo-se concentrações 50% superiores às observadas em meios de cultivo com células livres. Por outro lado, os autores observaram a estabilidade das microesferas após re-utilização em três processos de fermentação consecutivos (IVANOVA; CHIPETA; IVANOVA, 2000).

2.4.1.2 Amido de banana verde

Banana (*Musa* spp.), fruto de alto valor nutricional que proporciona alimento básico para milhões de pessoas, representa uma fonte de renda importante em vários países das regiões tropical e subtropical (SILVA; GUIMARÃES, 2011). Na safra nacional de 2010, a quantidade de banana produzida foi de 7,1 milhões de toneladas com um rendimento médio de 14,1 toneladas por hectare (IBGE, 2011). A rápida perecibilidade do fruto e processo de pos-colheita deficiente gera perdas equivalentes a 1/5 do total produzido (MEDINA; PEREIRA, 2004). Uma alternativa para o processamento da banana consiste na extração do amido da banana verde (ABV) e sua utilização como ingrediente na indústria de alimentos (CORDENUNSI; LAJOLO, 1995). A polpa de

banana verde apresenta conteúdo de amido de 70 a 85%, sendo o teor de amido resistente presente em diferentes variedades de banana de 10,4 a 40,25% (RAMOS; LEONEL; LEONEL, 2009).

O conteúdo total de amido na banana verde da variedade “terra” (*Musa paradisiaca*) é de 94,8%, sendo o teor de amilose e amido resistente de 35,0 e 50,3%, respectivamente. O elevado conteúdo em amilose afeta as propriedades físico-químicas e funcionais do amido, produzindo géis opacos e resistentes que poderiam melhorar a textura de certos preparados alimentícios e ser utilizado como matéria prima para obtenção de embalagens comestíveis. A quantidade de amido resistente na farinha e amido de banana verde depende da variedade da banana e do tipo de processamento para sua extração e separação por crivagem, que pode eliminar grande quantidade de fibra (PELISSARI et al., 2012; PINGYI-ZHANG et al., 2005).

A banana verde é rica em flavonóides, que atuam como protetores da mucosa gástrica; e amido resistente, que age no organismo como fibra alimentar (RODRÍGUEZ-AMBRIZ et al., 2008).

A digestibilidade dos amidos naturais depende de fatores como a fonte de amido, tamanho do grânulo, conteúdo de amilose: amilopectina, grau de cristalinidade, comprimento da cadeia de amilose e presença de complexos de amilose-lipídeos (CUMMINGS; ENGLYST, 1991).

O amido de banana verde (ABV) apresenta alta resistência à hidrólise enzimática (CUMMINGS, ENGLYST, 1991; PINGYI-ZHANG et al., 2005). Observações em microscópio mostraram que o amido de banana apresenta grânulos irregulares com superfícies lisas e densas. Estudos de microscopia eletrônica revelaram que os grânulos possuem uma camada externa fina (vários μm) de blocos (blocklet) constituído de zonas cristalinas resultantes da interação de amilose e amilopectina. Esta estrutura poderia explicar parcialmente sua resistência à ação das enzimas e redução da taxa de hidrólise ácida.

O amido resistente é constituído por três tipos de amidos, o tipo 1, constituído principalmente de grânulo de amido contendo proteínas que diminuem a acessibilidade das enzimas digestivas; o tipo 2 refere-se aos grânulos de amido

nativo (do interior da célula vegetal) caracterizado pela digestibilidade lenta devido à natureza cristalina dos seus grânulos; e o tipo 3, constituído por polímeros de amido retrogradado (cristalino) (ENGLYST; KINGMAN; CUMMINGS, 1992; LOBO; LEMOS-SILVA, 2003). O processo de retrogradação ou recristalização após gelatinização e esfriamento do amido, consiste na agregação das cadeias de amilose, mais rapidamente que as de amilopectina; por formação de duplas hélices cristalinas estabilizadas por pontes de hidrogênio. Este processo origina um amido estruturalmente resistente à hidrólise enzimática (LOBO; LEMOS-SILVA, 2003). A amilose é uma macromolécula constituída por unidades de D-glucopiranosose unidas por ligação α -(1 – 4), resistente à enzima pancreática α -amilase, mas hidrolisável por enzimas produzidas por bactérias do cólon (ENGLYST; KINGMAN; CUMMINGS, 1992; FUENTES-ZARAGOZA et al., 2011; MACFARLANE; ENGLYST, 1986).

Estudos *in vivo* em ratas e humanos mostram que 75 - 84% dos grânulos de amido de banana verde ingeridos alcançam o íleon terminal (FAISANT et al, 1995a). A fração de amido denominado amido resistente é fermentado no intestino grosso pela microbiota intestinal natural humana ou animal, atuando dessa forma como prebiótico (LOBO; LEMOS-SILVA, 2003; TOPPING; CLIFTON, 2001). A fermentação do amido resistente no cólon gera ácidos graxos de cadeia curta (ácido acético, propiônico e butírico), que reduz o pH gerando um ambiente favorável para a estabilização e proliferação de células do cólon, reduzindo o risco de formação de tumores (FAISANT et al., 1995b; FUENTES-ZARAGOZA et al., 2011). Vários estudos indicam que o consumo de banana verde confere efeitos benéficos à saúde, fator geralmente associado com o alto conteúdo de amido resistente (ASP; AMELSVOORT; HAUSTVAST, 1996; JUAREZ-GARCIA et al., 2006).

O amido resistente permite a redução da glicose pós-prandial e resposta insulínica em indivíduos saudáveis, podendo ter implicações benéficas no controle da diabetes. O consumo de amido resistente está associado à diminuição do nível de colesterol e triglicerídeos no sangue, aumento do bolo fecal e redução da constipação e hemorróidas, assim como também, diminuição do nível de amônia e pH do cólon, prevenindo a formação de compostos mutagênicos (FUENTES-ZARAGOZA et al., 2011).

O amido natural ou modificado é utilizado para o encapsulamento de diversos produtos, incluindo pesticidas, aromas, óleos vegetais, enzimas e probióticos (CHATTOPADHYAYA et al., 1998; DOANE, 1992; ONGEN et al., 2002; SULTANA et al., 2000; YILMAZ et al., 2001). O baixo custo, disponibilidade e facilidade de manipulação fazem do amido resistente (AR) à hidrólise ácida e enzimática, um material promissor para o encapsulamento de micro-organismos probióticos (de VOS et al., 2010).

Jankowski et al. (1997) avaliaram as propriedades de cápsulas de amido catiônico e alginato para a preservação da viabilidade celular de *L. acidophilus* utilizado em três ciclos durante a fermentação de leite. Os autores relataram crescimento celular da bactéria encapsulada, mesmo após aumento da acidez do leite durante as subseqüentes fermentações, confirmando o efeito protetor da mistura polimérica frente às variações de pH.

Diferentes concentrações de amido resistente e alginato (2%, m/v) foram utilizadas em procedimentos de encapsulamento de *L. casei* visando a proteção da bactéria em condições de pH de 2,0 a 4,0 (SULTANA et al., 2000). Os autores observaram que a adição de amido em uma mistura polimérica com alginato, permitiu o aumento no número de colônias de *L. casei* de 4.10^8 UFC/ g de cápsula (ausência de amido) para 3.10^{11} UFC/g de cápsula (2% amido). Os autores relataram ainda que, concentrações de amido superiores a 4% (m/m) não melhoraram a eficiência de encapsulação da bactéria. Por outro lado, a matriz amido-alginato-glicerol, permitiu o aumento na sobrevivência de *L. casei* sob condições de congelamento de -20 °C, confirmando o efeito crioprotetor do encapsulamento (SULTANA et al., 2000).

O amido representa um polímero com habilidade para o aprisionamento de moléculas em tecnologias de liberação controlada de substâncias bioativas. Esta habilidade encontrada neste carboidrato ocorre devido à sua fração amilose, que é capaz de formar estruturas helicoidais e, com isso, complexos muito estáveis. Entretanto, devido à sua natureza hidrofílica, o amido e seus hidrolisados não oferecem propriedades emulsificantes quanto aos ingredientes aprisionados em sistemas de liberação controlada, a não ser pelo aumento da viscosidade (SHAHIDI; HAN, 1993).

2.4.2 Métodos de encapsulamento

Várias técnicas são utilizadas para a obtenção de microcápsulas de materiais poliméricos, entre as quais se incluem emulsificação, extrusão e secagem (*spray-dring*), formação de gel e secagem em leito fluidizado.

2.4.2.1 Emulsificação

Denomina-se emulsificação o processo de dispersão de um líquido em outro líquido imiscível, em que um deles, a fase dispersa ou descontínua, encontra-se na forma de glóbulos finos, formando uma mistura estável com a fase contínua. No processo de emulsificação, a diferença de densidade entre a fase aquosa e a fase oleosa afeta a taxa de separação e, conseqüentemente a estabilidade da emulsão. A energia para a formação das gotas (velocidade do rotor) e a velocidade de difusão das mesmas na fase contínua é influenciada pela viscosidade das fases, afetando a coalescência entre as gotas e o tamanho final das mesmas. Quanto maior a intensidade e tempo de agitação, menor será o tamanho das partículas, sendo o limite o diâmetro assintótico (SALAGER, 1993).

Por inclusão do material bioativo (núcleo) no líquido de dispersão (polímero) é possível criar partículas de encapsulamento que permitam estabilizar e proteger o conteúdo de condições ambientais adversas (de VOS et al., 2010).

Esta técnica foi desenvolvida por Nilsson et al.(1983) como método seguro de imobilização de células de micro-organismos. A Figura 8 apresenta o esquema do processo de encapsulamento de probióticos em alginato pelo método de dispersão em óleo vegetal e extrusão.

A metodologia consiste na dispersão de um pequeno volume de uma solução polimérica contendo células microbianas (fase descontínua) em um volume maior de óleo de soja, sésamo, canola, girassol ou milho (fase contínua), seguido da mistura vigorosa dos dois componentes até a obtenção de uma emulsão do tipo água e óleo. Após formação da emulsão, o polímero solúvel é

interligado com outras unidades poliméricas por gelificação ionotrópica ou outro tipo de agente de coesão. Este método consiste na reticulação iônica de grupos funcionais do polímero (alginato de sódio) com íons multivalentes (geralmente Ca^{2+}), originando microcápsulas de gel que comportam os probióticos (KRASAEKOOPT; BHANDARI; DEETH, 2003; de VOS et al., 2010).

Figura 8 – Esquema de obtenção de microcápsulas de alginato contendo probiótico por emulsificação e extrusão (Baseado em KRASAEKOOPT; BHANDARI, DEETH, 2003).

A distribuição de tamanhos de partículas formadas por processos de emulsificação é determinada por fatores físico-químicos como concentração e estrutura molecular do polímero (relação de ácidos gulurônico/manurônico no alginato), presença de surfactantes, tipo e concentração do agente gelificante, pH do meio, potência mecânica dispersiva e tempo de emulsificação. Estes fatores afetam a viscosidade da fase descontínua, a tensão interfacial e as forças de dispersividade; determina a velocidade de dispersão e processos de coalescência na emulsão e, finalmente, o tamanho e a forma das partículas (PONCELET et al., 1999; SACCHETIN et al., 2010).

O processo de emulsificação permite obter tamanho de partículas entre 25 μm e 2 mm de diâmetro, sendo possível alterar a dimensão das esferas por modificação da velocidade de agitação, volume e viscosidade da fase descontínua (polímero solubilizado com probióticos) e por adição de surfactantes. Quanto menor a concentração da partícula (polímero) emulsificada, menor será o tamanho final das microesferas (KRASAEKOOP; BHANDARI; DEETH, 2003). Para produzir tamanho de partículas inferiores a 100 μm a partir de uma mistura de polímero-núcleo altamente viscosa, é necessária a utilização de homogeneizador de alta pressão (Ultra-Turrax®). Entretanto, o uso de alta velocidade e pressão, assim como o tipo de rotor pode afetar de forma significativa a viabilidade celular durante o processo, principalmente devido à presença de forças de cisalhamento que geram estresse nas células a encapsular (CAPELA et al., 2007; SACCHETIN et al., 2010).

A técnica de microencapsulamento por emulsificação vem sendo empregada com êxito no encapsulamento de organismos probióticos, devido a sua operação a baixa temperatura e aplicabilidade em nível industrial (ADHIKARI et al., 2000; DIANAWATI; SHAH, 2011; DING; SHAH, 2007; SHEU; MARSHALL, 1993). No entanto, o óleo remanescente do processo de lavagem das microcápsulas pode afetar a textura e as características sensoriais do produto contendo os probióticos encapsulados, o que poderia representar uma desvantagem no momento de sua utilização na fabricação de certos alimentos contendo baixo teor de gordura (KAILASAPATHY, 2002).

2.4.2.2 Extrusão

A microencapsulação por extrusão consiste na projeção forçada de uma emulsão de probiótico (núcleo) e material de revestimento (polímero), através de uma agulha ou dispositivo com orifício, para a obtenção de microesferas da emulsão (KAILASAPATHY, 2002). As gotas formadas são coletadas em uma solução contendo um agente de coesão de cadeias poliméricas (Figura 8). O tamanho das cápsulas depende do diâmetro da agulha ou boquilha de extrusão, sendo este menor, quanto menor o orifício de passagem da solução polimérica; da distância percorrida na caída livre até a solução do agente de coesão; da concentração do agente de coesão e da viscosidade da mistura polímero-núcleo, (KRASAEKOOPT; BHANDARI; DEETH, 2003; de VOS et al., 2010).

Quando a formação das esferas ou agregados poliméricos ocorre de maneira controlada (vazão controlada, ângulo do orifício de 60°), se obtém partículas de tamanho uniforme entre 0,2 e 1,5 mm. Esta técnica, conhecida como *prilling* (pelotização), utiliza pulsação controlada do ejetor (extrusor) ou vibração da agulha para obtenção de microcápsulas de tamanho e forma homogêneos (KAILASAPATHY, 2002). A Figura 9 apresenta os diferentes métodos de encapsulamento controlado (*prilling*).

Figura 9 – Métodos de encapsulação por extrusão controlada (*prilling*). Eletroestático (A); Agulha vibratória (B); Jet cutter (C); Atomização por disco giratório (D). Modificado de Teunou e Poncelet (2005).

Uma das técnicas de encapsulamento controlado (*prilling*) compreende a extrusão eletrostática, que utiliza um gerador para criar um potencial eletrostático entre a agulha e a solução de coesão (entrecruzamento polimérico) que favorece

a diminuição de tamanho das cápsulas, mediante redução da tensão superficial da gota (Figura 9-A).

A obtenção de microesferas por ressonância ou vibração de agulha (Figura 9-B), se fundamenta na teoria de produção de microcápsulas de Weber, que explica que a ruptura de um jato contínuo de fluído em gotas é função do comprimento de onda da perturbação aplicada e do diâmetro do jato. Esta teoria sugere que a frequência ótima para a geração de gotas, dado um determinado diâmetro de agulha, depende da velocidade de fluxo e das propriedades físico-químicas do fluído (MAZZITELLI et al., 2007). O sistema é composto de um depósito da solução polimérica conectado a uma agulha (seringa), que por sua vez, encontra-se integrado a um gerador de frequência vibracional. Para análise e registro da velocidade do jato e tamanho das gotas é utilizado um estroboscópio. A solução polimérica é bombeada através da agulha mediante uma seringa de precisão com vazão máxima de 2 L/h, obtendo-se tamanho de esferas entre 100 e 1000 μm (TEUNOU ; PONCELET, 2005; MAZZITELLI et al., 2007).

O método de *jet cutter* (Figura 9-C) permite obter partículas de diâmetro inferior a 1 mm a partir de soluções poliméricas viscosas. A solução é projetada através de uma agulha em forma de jato e cortada em segmentos cilíndricos uniformes mediante um dispositivo rotacional com fios de corte, formando esferas por agregação promovida pela tensão superficial a medida que são coletadas em solução. O diâmetro das partículas ou microesferas depende da velocidade de rotação do disco de corte e o fluxo mássico através da agulha, dependentes do diâmetro da agulha e da velocidade de fluxo (PRÜSSE et al., 1998).

O método de atomização por disco giratório ou *spinning disk atomization* (Figura 9-D) se fundamenta na desintegração de um jato de solução polimérica, dentro de um disco; e consequente formação de gotas do polímero. Quando o líquido entra em contato com a superfície do disco giratório, este é acelerado a alta velocidade pela força centrífuga e distribuído como uma película fina sobre o disco. Dependendo da velocidade do fluxo de alimentação, as gotas são formadas e liberadas pela força centrífuga através dos extremos dentados do disco (TEUNOU; PONCELET, 2005). O tamanho das partículas depende principalmente da velocidade de rotação do disco (SENUMA et al., 2000).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os estudos de tratamento e caracterização do glicerol de biodiesel e a seleção das bactérias com capacidade de crescimento em glicerol foram conduzidos na Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. As atividades de determinação e caracterização das enzimas envolvidas na assimilação de glicerol foram realizadas junto à Unidade de Bioenergia do Laboratório Nacional de Energia e Geologia (LNEG, Portugal) e o Enzymology Group do Centro de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. Por outro lado, as atividades de encapsulamento das estirpes pre-selecionadas foram desenvolvidas junto ao Research Institute for Medicines and Pharmaceutical Sciences (iMed-UL) – Nanomedicines and Drug Delivery Systems Group da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa.

3.1 Obtenção e tratamento da fração glicerol

O glicerol bruto gerado do processo da produção de biodiesel a partir da transesterificação de óleo de soja com metanol foi gentilmente fornecido pela empresa Bioverde Indústria e Comércio de Biocombustíveis Ltda, Taubaté – SP. O glicerol bruto, obtido diretamente da fase inferior do processo de decantação do biodiesel e denominado glicerol classe G8, foi submetido a tratamento por acidificação para neutralização do excesso de base utilizado como catalisador no processo de produção de biodiesel; bem como para separação de ésteres de potássio na forma de linoleato de potássio e oleato de potássio, e outras impurezas. Nesta etapa foi avaliado o emprego de três diferentes ácidos concentrados (HCl 36%, H₂SO₄ 98% e H₃PO₄ 85 %), sendo que para cada 250 mL de glicerol bruto contido em um béquer de 500 mL foi adicionado, de forma progressiva, 0,1 mL de ácido concentrado sob agitação constante de 200 rpm (agitador magnético, barra 4 cm) e aquecimento a 75 °C por 30 min, até atingir pH 7,0; 6,0; 5,0; 4,0 e 2,0, para obtenção de glicerol classe G7, G6, G5, G4 e G2, respectivamente. O aquecimento a 75 °C, durante a adição de ácidos

concentrados, foi realizado com o objetivo de reduzir a viscosidade do glicerol bruto e evaporar o metanol presente na amostra, uma vez que este pode afetar o crescimento de micro-organismos (ASAD-UR-REHMAN et al., 2008).

Em seguida, cada mistura (glicerol bruto + ácido inorgânico) foi submetida a processo de separação em funil de decantação para a obtenção da fase glicerínica (composta principalmente por glicerol) e fase de ácidos graxos (ácidos graxos + impurezas sólidas). Após repouso por 24 horas, a fase glicerínica foi separada e analisada quanto ao pH, concentração final de glicerol, presença de ácidos graxos e ésteres de ácidos graxos.

O glicerol assim obtido foi utilizado como fonte de carbono e energia na formulação de meios de cultivo para espécies de micro-organismos probióticos.

3.2 Micro-organismos

As espécies de bactérias avaliadas neste trabalho compreendem *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, e *Lactobacillus delbrueckii* UFV-H2b20, cedidas pelo Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa-Viçosa-MG. Estas estirpes têm sido objeto de estudos e têm se mostrado promissoras quanto às suas propriedades probióticas. Estas estirpes foram mantidas a 4 °C e repicadas periodicamente em Agar Man-Rogosa-Sharp (MRS). Também foi avaliada a capacidade de crescimento em meio contendo glicerol de 12 estirpes de *Lactobacillus* isoladas de fezes de crianças recém nascidas: *L. fermentum* LAC 01, *L. casei* LAC 04, *L. plantarum* LAC 06, *L. fermentum* LAC 07, *L. fermentum* LAC 09, *L. plantarum* LAC 19, *L. plantarum* LAC 23, *L. plantarum* LAC 30, *L. plantarum* LAC 38, *L. plantarum* LAC 40, *L. paracasei* LAC-PC1, *L. paracasei* e LAC-PC2, cedidas pelo Centro Universitário Geraldo Di Biasi – Volta Redonda – RJ, e que apresentam propriedades probióticas (COUTINHO, 2008; SUMITA, 2007).

3.3 Seleção de estirpes de lactobacilos em meio contendo glicerol

As quinze estirpes de *Lactobacillus*, disponibilizadas por diferentes instituições de pesquisa, foram avaliadas quanto a sua capacidade de crescimento e produção de biomassa em meio contendo glicerol como principal fonte de carbono.

Os ensaios foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio MRS modificado contendo glicerol tratado com ácido fosfórico concentrado, 20 g/L; peptona, 10 g/L; extrato de carne, 10 g/L; extrato de levedura, 5 g/L; fosfato dissódico, 2 g/L; sulfato de magnésio, 0,1 g/L; sulfato de manganês, 0,05 g/L e Tween 80, 0,1 g/L, a pH 5,5. Os frascos, previamente esterilizados, foram inoculados com 0,05 g/L de células e incubados a 37 °C por 24 h. O inóculo foi obtido pelo cultivo das respectivas estirpes em caldo MRS a 37 °C por 16 h. Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.4 Avaliação do desempenho das estirpes de *Lactobacillus* em meio formulado a base de glicerol tratado com diferentes ácidos inorgânicos

Nesta etapa, as estirpes que apresentaram melhor desempenho sob as condições descritas no item 3.3 tiveram o seu desenvolvimento avaliado em meio formulado com glicerol bruto submetido a tratamento com diferentes ácidos inorgânicos. Para tanto, as fermentações foram conduzidas em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio semi-sintético cuja composição encontra-se apresentada na Tabela 5.

Os frascos foram inoculados com uma suspensão contendo 0,05 g/L de células e incubados a temperatura de 37 °C a 80 rpm. Amostras foram coletadas após 48 h de cultivo. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Tabela 5 – Composição de meios de fermentação

Meio	Composição
Glicerol puro (controle)	glicerol, 25 g/L
Glicerol tratado+ Sais	glicerol, 25 g/L + solução salina*
Glicerol tratado + MRS modificado	glicerol, 25 g/L + caldo MRS modificado
Glicerol tratado + EFA + Sais	glicerol, 25 g/L + extrato de farelo de arroz (30%, v/v) + solução salina*

* solução salina: fosfato dissódico, 2 g/L; sulfato de magnésio, 0,1 g/L; sulfato de manganês, 0,05 g/L e Tween 80, 0,1 g/L. Caldo MRS modificado: sem glicose

O extrato de farelo de arroz (EFA) foi preparado utilizando-se uma suspensão contendo 100 g de farelo de arroz por cada litro de água destilada, autoclavada a 0,5 atm por 15 min. Após resfriamento, o sobrenadante foi separado por centrifugação a 2230 x g por 30 min e utilizado na formulação dos respectivos meios de fermentação em substituição ao extrato de levedura e outras fontes de nitrogênio utilizadas tradicionalmente na formulação de meios de cultivo para bactérias.

3.5 Cinética de crescimento de lactobacilos em meio contendo glicerol

Os cultivos das estirpes foram realizados isoladamente em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de meio MRS modificado contendo glicerol (tratado previamente com ácido fosfórico) 10 g/L como fonte de carbono principal. O pH do meio de cultivo foi ajustado a 6.0 mediante adição de KOH 2M. Os frascos, previamente esterilizados, foram inoculados com 0,05 g/L de células e incubados a 37 °C por 48 h.

Foi avaliado o efeito sobre o crescimento da adição de citrato de amônio, 2 g/L e acetato de sódio, 5 g/L ao meio de cultivo sob agitação de 150 rpm. Amostras foram obtidas nos tempos, inicial, 3, 6, 12, 24, 36 e 48 h de cultivo, para determinação dos parâmetros fermentativos.

3.6 Enzimas envolvidas na assimilação de glicerol

3.6.1 Obtenção do extrato enzimático

Nesta fase, foram avaliados os métodos de ruptura celular por detergente iônico, esferas de vidro, banho de ultra-som e sonda de ultra-som para obtenção de extratos enzimáticos de células das estirpes pre-selecionadas. As células foram cultivadas em meio MRS modificado a 37 °C sob agitação de 150 rpm. Após 24 h de cultivo, as células foram coletadas por centrifugação e lavadas duas vezes com água destilada estéril. O critério de seleção do método de ruptura celular baseou-se na maior concentração de proteína obtida por biomassa produzida.

3.6.1.1 Detergente iônico

As células coletadas foram submetidas à ruptura celular mediante a adição de Y-PER® (Yeast protein extraction reagent, THERMO SCIENTIFIC, USA), detergente iônico utilizado para a extração de proteína solúvel de leveduras e bactérias. Para tanto, preparou-se uma suspensão homogênea contendo 100 mg de células (peso úmido) em 250 µL de detergente iônico. Após 45 min de tratamento a 25 °C, a mistura foi centrifugada a 10000 x *g* por 30 min a 4 °C. O extrato livre de células foi mantido em gelo e caracterizado quanto à concentração de proteínas.

3.6.1.2 Ruptura celular por ação mecânica com esferas de vidro

As células coletadas foram submetidas a ruptura celular mediante a preparação de uma mistura na proporção 1:1 de 100 mg de células úmida e

esferas de vidro, seguida de agitação em vortex por 5 ciclos de 1 min de duração cada, seguido de resfriamento em banho de gelo por 1 min entre os ciclos. Os resíduos celulares foram separados por centrifugação a 10000 x *g* por 30 min a 4 °C, sendo o extrato livre de células mantido conforme descrito no item 3.6.1.1.

3.6.1.3 Ruptura celular por sonda de ultrassom

As células lavadas e centrifugadas foram ressuspensas em tampão fosfato 0,1 M a pH 7,5 para uma concentração de 30% (m/v). A ruptura celular foi conduzida em banho de gelo, utilizando-se uma sonda HIELSCHER UP200S (Dr. Hielscher GmbH, Alemanha) na amplitude de onda de 70%, 0,5 ciclo e 24 khz. Cada suspensão celular foi submetida a 10 sequências de tratamento de ultrassom por 30 segundos cada, com intervalos de 15 segundos de esfriamento em banho de gelo. Os resíduos celulares foram separados por centrifugação e o extrato livre de células mantido como descrito no item 3.6.1.1.

3.6.1.4 Ruptura celular por banho de ultrassom

Uma suspensão de células em tampão 0,1 M TRIS-HCl de 30% (m/v) foi submetida a banho em ultrassom Clifton UM-14 (Nickel Electro – Clifton, Inglaterra) sob as mesmas condições como descrito no item 3.6.1.3.

3.6.2 Determinação da atividade enzimática

Os ensaios para a determinação da atividade enzimática dos extratos livres de células foram realizados imediatamente após a obtenção do extrato celular por ruptura mediante sonda de ultrassom. Para tanto, amostras foram coletadas após 12, 24 e 48 h de cultivo e centrifugadas em centrífuga Beckman Coulter (Modelo

AVANTI J26XPI, USA) a 10000 x g por 30 min a 4 °C, lavadas duas vezes com solução tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5 e ressuspendidas em 1/3 do volume inicial com a mesma solução tampão. Esta suspensão foi mantida congelada a -20 °C para posterior ruptura celular.

Os processos de oxido-redução dos co-fatores (NAD⁺/NADH; NADP⁺/NADPH) utilizados nas reações enzimáticas foram acompanhados mediante variação de absorbância a 340 nm em espectrofotômetro (Beckman Modelo DU-7400, USA) equipado com controle de temperatura da cubeta de reação e agitador magnético. As leituras de absorbância foram realizadas a cada 20 segundos, até 900 segundos; de forma a se obter curvas representativas da variação da absorbância em função do tempo de reação. Uma unidade enzimática (U) foi definida como μ moles de co-enzima oxidada ou reduzida por minuto sob as condições de análise.

3.6.2.1 Determinação da atividade glicerol quinase

A determinação da atividade de glicerol quinase (GK) foi realizada segundo técnica de acoplamento enzimático proposto por Pasteris e Strasser de Saad (2009) com modificações, conforme reações abaixo.

Para um volume total de reação enzimática de 2 mL, foi adicionado tampão TRIS-HCl; 50 mM a pH 7,5, MgCl₂; 3,2 mM, ATP; 1mM, PEP; 2mM, L-lactato desidrogenase; 4 U/mL, piruvato quinase; 4 U/mL, NADH 0,30mM e 100 μ L de

extrato livre de células. Após 5 min de incubação a 25 °C a reação foi iniciada mediante adição de glicerol para atingir uma concentração final de 100 mM.

3.6.2.2 Determinação da atividade glicerol desidrogenase-NAD dependente

A atividade da enzima glicerol desidrogenase (glicerol: NAD⁺ oxido-reductase EC 1.1.1.6) foi determinada diretamente mediante o procedimento descrito por Lin e Magasanik (1960), que se baseia na redução de NAD acompanhado da variação da absorbância a 340 nm.

Para um volume total de 1,5 mL de mistura reacional, foi adicionado tampão carbonato/bicarbonato; 100 mM a pH 10, 3,3 mM NAD⁺, sulfato de amônio 33,3 mM e 100 µL de extrato livre de células. Após 5 min de incubação a 25 °C a reação foi iniciada mediante adição de glicerol para atingir uma concentração final de 100 mM.

3.6.2.3 Determinação da atividade glicerol desidrogenase-NADP dependente

A atividade glicerol desidrogenase (glicerol: NADP⁺ oxido-reductase; EC 1.1.1.72) foi determinada mediante aumento da absorbância a 340 nm. A mistura da reação de oxidação de glicerol a D-gliceraldeído continha tampão bicarbonato 50 mM pH 10, 0,25 mM NADP⁺, 50 µL de extrato livre de células, 100 mM glicerol e água deionizada para 2 mL de reação. Após 5 min de incubação a 25 °C, a reação foi iniciada mediante adição de glicerol (substrato).

3.6.2.4 Determinação da atividade glicerol desidrogenase-NADPH dependente

A mistura para a reação inversa continha 50 mM de tampão ácido-2-(N-morfolino) etano sulfônico (MES) pH 6,5, 100 mM de DL-gliceraldeído, 0,25mM NADPH, 50 uL de extrato livre de células e água deionizada para 2 mL de mistura. A oxidação do NADPH foi acompanhada mediante redução da absorbância a 340 nm.

3.7 Microencapsulamento das estirpes pré-selecionadas em matriz polimérica de alginato de cálcio-amido de banana verde

3.7.1 Matéria prima e extração de amido

A extração do amido de banana verde (ABV) foi realizada de acordo com o método proposto por Bobbio e Bobbio (2003). Os frutos de banana verde, obtidos do comércio local (Feira de Charneca, Lisboa), foram lavados, a casca retirada manualmente e cortados em rodela com 0,5 cm de espessura e imersas em solução de metabissulfito de sódio 0,3% para evitar o escurecimento enzimático. A banana verde foi desintegrada em liquidificador a baixa velocidade e a pasta formada foi prensada de forma manual em tecido de poliéster até a obtenção de filtrado esbranquiçado. A pasta residual foi homogeneizada na mesma solução por duas vezes para a extração da máxima quantidade de amido. A suspensão foi deixada em repouso por 2 h a 4 °C, sendo o líquido sobrenadante descartado por 2 vezes. O amido foi secado em estufa a 105 °C por 48 h e utilizado para a preparação das microcápsulas.

3.7.2 Preparação de microcápsulas

As microcápsulas foram produzidas pelo método de emulsificação (Figura 8) em óleo de soja e gelificação ionotrópica do alginato com cloreto de cálcio e amido de banana verde. Todos os materiais utilizados foram esterilizados a 121 °C por 15 min.

Uma suspensão de polímeros contendo diferentes concentrações de alginato (2,0 e 3,5%, m/v) e amido de banana verde (2,0; 3,5; 4,0 e 6,0%, m/v), previamente solubilizados a 70 °C; foi utilizada para a obtenção das micropartículas. Uma aliquota de 5,0 mL da suspensão foi gotejada em óleo de soja comestível contendo Tween 80 (0,02; 0,1 e 1,0%, m/v), sendo a relação suspensão polimérica e volume de óleo de 1:10. A mistura foi agitada a 2000 rpm com agitador mecânico com rotor tipo impelidor naval por 5 min até formação de uma emulsão. Volume de 25 mL de solução de CaCl_2 (2,0%, m/v) foi adicionada rapidamente, pela parede do frasco; e a emulsão foi transferida para balão de decantação onde permaneceu em repouso por 20 min para separação das microcápsulas de alginato de cálcio-amido de banana verde. A fase oleosa foi drenada e as micropartículas lavadas com solução de NaCl 1,0% contendo glicerol, 10% (v/v).

A preparação de microcápsulas contendo bactérias probióticas foi realizada mediante adição de 0,25% (m/m) de células úmidas à suspensão polimérica antes da preparação da emulsão em óleo. As células foram obtidas por cultivo em caldo MRS modificado contendo glicerol de biodiesel como fonte de carbono principal, à temperatura de 37 °C e agitação de 150 rpm por 24h.

3.7.3 Caracterização morfológica das microcápsulas

A morfologia externa das microcápsulas (esfericidade) foi determinada mediante microscopia óptica em microscópio Olympus (Tóquio, Japão) com câmara acoplada (Carl Zeiss AG, Alemanha), sendo as imagens processadas

mediante programa AxioVision LE. A superfície das microcapsulas foi analisada por microscopia eletrônica de varredura ambiental Zeiss EVO LS-1

3.7.4 Eficiência de encapsulamento

A eficiência da retenção das bactérias probióticas nas microcápsulas foi avaliada pela razão entre as células viáveis efetivamente encapsuladas e a quantidade inicial presente na massa polimérica utilizada para o encapsulamento. Para tanto, 0,1 g de microcápsulas úmidas foi solubilizado em tubos contendo 10 mL de citrato de sódio 0,1M, submetidos a agitação em vortex por 5 ciclos de 1 min com intervalos de 1 min entre ciclos.

Aliquotas de 100 µL foram diluídas para concentrações apropriadas e inoculadas em agar MRS pelo método de *pour plate*. As placas foram incubadas a 37 °C por 48 h e a população de bactérias expressa em UFC/g. A eficiência de encapsulamento demonstra a eficácia de retenção e viabilidade celular nas microcápsulas, sendo calculada como:

$$E = (N/N_0) \times 100\%$$

N: UFC/g liberado de 0,1 g de microcápsula

N₀: UFC/g em 0,1 g de mistura polimérica antes do encapsulamento

3.7.5 Avaliação *in vitro* da sobrevivência de *Lactobacillus* em fluido gástrico simulado

A sobrevivência de bactérias probióticas na forma livre e encapsulada em solução de fluido gástrico simulado (FGS) foi avaliada de acordo com o procedimento descrito por Chavarri et al.(2010). Para tanto, 0,2g de microcápsulas ou 0,2mL de suspensão contendo células livres foi homogeneizado de forma independente em 10 mL de FGS, constituído de 2,0 g/L de cloreto de sódio e 3,2 g/L de pepsina purificada (≥ 400 U/mg, P-7125-SIGMA-ALDRICH), completando-se o volume para 1000 mL com solução de ácido clorídrico pH 2,0. A suspensão foi incubada a 37 °C sob agitação orbital de 100 rpm. Amostras foram

coletadas nos tempos inicial, 30, 60, 90 e 120 min de reação, para determinação da contagem das células por cultivo em agar MRS pela técnica de *pour plate*.

3.7.6 Estabilidade das bactérias encapsuladas durante armazenagem a 4 °C

As cápsulas contendo as bactérias probióticas foram conservadas a temperatura de refrigeração (4 °C) em sacolas plásticas esterilizadas e seladas. Amostras de 0,2 g de microcápsulas foram coletadas a cada 7 dias por um período de 30 dias, solubilizadas em solução de citrato de sódio 0,1M e avaliadas quanto a contagem celular.

3.8 Métodos analíticos

3.8.1 Determinação de ácidos graxos e ésteres de ácidos graxos

A presença de ácidos graxos e ésteres metálicos derivados de ácidos graxos, nas amostras de glicerol bruto e tratado, foi determinada mediante espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), em espectrômetro FTIR Spectrum GX (Perkin Elmer,USA), equipado com placa suporte de amostra de cristal de seleneto de zinco com alta reflectância total atenuada (HATR). As amostras foram submetidas à sequência de 50 varreduras de feixes de luz no comprimento de onda de 400 a 4000 cm^{-1} . Os espectros foram analisados mediante programa Minelt – Know It All Informatics Systems e interpretados por comparação com espectros de absorção disponíveis na literatura para glicerol puro, oleato de potássio, linoleato de potássio e óleo de soja (PACHLER, 1988; KELLER, 1986).

3.8.2 Determinação de elementos metálicos, nitrogênio, enxofre e fósforo

As concentrações de íons metálicos Ni, Cu, Fe, Cd, As, Al, Ca, Mg, Na e K presentes nas amostras de glicerol bruto e glicerol tratado foram determinadas por espectrometria de absorção atômica em equipamento AANALYST 800 (Perkin Elmer, USA) equipado com sistema de chama e forno de grafite integrado. Os espectros foram obtidos no comprimento de onda de 185 a 870 nm com grilha de difração de 1800 linhas/mm utilizando detector em estado sólido. As amostras foram submetidas a digestão parcial em meio ácido (HCl/HNO₃) e peróxido para digestão total da matéria orgânica.

As concentrações de nitrogênio e fósforo foram determinadas por espectrofotometria conforme descrito por Izário Filho (1999).

3.8.3 Determinação da concentração celular

A concentração de células expressa em g/L foi calculada a partir de uma curva de calibração que correlaciona a absorbância (600 nm) e a massa seca das células obtidas após 16 h de cultivo em caldo MRS contendo glicerol a 37 °C. Para auxiliar a análise dos resultados, estabeleceu-se uma correlação entre UFC/mL e a leitura de absorbância a 600 nm. Para tanto, procedeu-se ao cultivo das suspensões celulares, previamente diluídas; em meio MRS pela técnica de *pour plate*, a 37 °C por 48h.

3.8.4 Dosagem de glicerol

A concentração de glicerol foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência, em cromatógrafo Waters (EUA) equipado com detector de índice de refração RID 6A e coluna "BIO-RAD Aminex" HP X-87H (300 x 7,8 mm) a temperatura de 35 °C, utilizando-se ácido sulfúrico 0,01 N como eluente, a um

fluxo de 0,60 mL/min e um volume de injeção de 20 μ L de amostra. Todas as amostras foram previamente diluídas e filtradas em filtro “Sep Pack” C18 (MILLIPORE, EUA).

3.8.5 Determinação de proteína

O teor de proteína foi determinado pelo método Bradford utilizando-se albumina de soro bovino (BSA) como padrão (BRADFORD, 1976).

3.8.6 Interação química na matriz polimérica de alginato de cálcio-amido de banana verde na obtenção de microcápsulas

A interação dos radicais $-OH$ do amido de banana verde e COO^- do alginato (ácido gulucurônico e ácido manurônico) por meio de pontes de hidrogênio foi determinada em amostras liofilizadas de microcápsulas de alginato de cálcio –amido de banana verde e polímeros puros, mediante comparação de espectros obtidos por espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), em espectrômetro IRAffinity-1 Shimadzu, acoplado a um microprocessador com programa IR solution Shimadzu. As amostras foram preparadas conforme a técnica de pastilha de brometo de potássio (KBr) na relação 1:2. As amostras foram submetidas à sequência de 30 varreduras de feixes de luz no comprimento de onda de 400 a 4000 cm^{-1} e resolução de 4 cm^{-1}

3.8.7 Determinação do tamanho de partícula

A determinação da distribuição dos tamanhos de partículas foi realizada mediante analisador de tamanho de partículas por difração a laser Mastersizer

2000 (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Inglaterra), equipado com fonte de luz Laser Ne-He no comprimento de onda 430 nm (azul) e 632,8 nm (vermelha), limite de detecção de tamanho de 0,02 a 2000 μm , utilizando-se água como dispersante e poliestireno latex como padrão. Um dispositivo de ultrassom acoplado ao equipamento foi utilizado durante a análise para aumentar a dispersibilidade das microcápsulas. Foram realizadas 5 determinações por amostra. O diâmetro médio foi determinado com base no diâmetro médio de uma esfera de mesmo volume (diâmetro de Brouckere, $D[4,3]$), que indica o ponto central em torno do qual gira a distribuição de frequência de tamanhos de partícula.

3.8.8 Determinação de parâmetros fermentativos

3.8.8.1 Fator de conversão de glicerol em biomassa ($Y_{X/S}$)

Foi determinado pela razão entre a quantidade de biomassa produzida e a correspondente variação da concentração de glicerol no intervalo de tempo considerado.

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{(X_f - X_i)}{(S_i - S_f)}$$

$Y_{X/S}$ = (g/g); X_f = concentração final de biomassa (g/L);

X_i = concentração inicial de biomassa (g/L); S_f = concentração final de glicerol (g/L); S_i = concentração inicial de glicerol (g/L).

3.8.8.2 Produtividade em biomassa (Q_x)

Foi determinada pela razão entre a quantidade de biomassa produzida e o intervalo do tempo correspondente.

$$Q_p = \frac{(X_f - X_i)}{\Delta t}$$

Q_x = produtividade volumétrica em biomassa (g/L.h); X_f = concentração final de biomassa (g/L); X_i = concentração inicial de biomassa (g/L); Δt = intervalo de tempo considerado (h).

3.8.8.3 Velocidade de consumo de substrato (Q_s)

Foi determinada pela razão entre a quantidade de glicerol consumido e o intervalo do tempo correspondente

$$Q_s = \frac{(S_i - S_f)}{\Delta t}$$

Q_s = velocidade volumétrica de consumo de substrato (g/L.h); S_f = concentração final de glicerol (g/L); S_i = concentração inicial de glicerol (g/L); Δt = intervalo de tempo considerado (h).

3.8.8.4 Velocidade específica de crescimento máxima (μ_{max})

A velocidade específica de crescimento máxima (μ_{max}) foi obtida da inclinação da reta resultante do gráfico de $\ln A/A_0$ em função do tempo de cultivo, sendo A = absorvância no intervalo de tempo considerado (h) e A_0 = absorvância no tempo inicial de cultivo (CARVALHEIRO, et al., 2010).

3.8.9 Cálculo das atividades enzimáticas

As atividades de glicerol quinase e glicerol desidrogenase foram calculadas como:

$$A(\mu\text{M}/\text{min}) = \frac{(\Delta A/\text{min auto-oxidação}) - (\Delta A/\text{min redução/oxidação do co-fator}) \times \text{fator de diluição}}{\epsilon}$$

$\Delta A/\text{min}$: variação da absorvância por minuto

ϵ : coeficiente de extinção de co-fator = 6,22 mM

3.8.10 Cálculo de K_m e V_{max}

A velocidade inicial (v) da reação catalisada pela enzima se encontra relacionada, mediante regressão hiperbólica, com a concentração de substrato ($[S]$) de acordo com a equação de Michaelis-Menten ($v = V_{max} \cdot [S] / (K_m + [S])$). A regressão hiperbólica foi obtida pelo método de mínimos quadrados mediante programa HYPERFIT 1.0. A determinação dos valores de K_m e V_{max} foi realizada por três métodos, para efeito de comparação entre eles: Lineweaver-Burk ($1/v$ versus $1/[S]$), Hanes-Woolf ($[S]/v$ versus $[S]$) e Eadie-Hofstee (v versus $v/[S]$).

3.9 Análise estatística

Para comparação das concentrações médias de glicerol final após tratamento com ácidos e dentro de um mesmo grupo de ácido inorgânico, foi aplicada a análise de variância (ANOVA) e o teste multivariado (Teste de Fisher).

Todos os experimentos foram realizados, ao menos; em duplicata. De igual modo, foi determinada a significância dos valores (ANOVA) de parâmetros fermentativos das estirpes selecionadas no *screening* de bactérias probióticas com capacidade de crescimento em meio contendo glicerol de biodiesel.

Os cálculos estatísticos foram realizados em programa Statgraphics Plus Versão 2.1 (Statistical Graphics Corp, 1996-USA).

4 RESULTADOS

4.1 Tratamento e caracterização do glicerol

O glicerol bruto utilizado neste trabalho foi obtido por decantação na etapa final do processo de produção de biodiesel de óleo de soja na presença de hidróxido de potássio como catalisador. O glicerol bruto foi submetido a tratamento de acidificação para separação de ésteres resultantes da saponificação de ácidos graxos com o potássio do catalisador empregado na transesterificação, assim como pigmentos, sólidos e outras impurezas. Para tanto, foi avaliada a adição de três diferentes ácidos concentrados (H_3PO_4 , HCl , H_2SO_4) para a neutralização do excesso de catalisador (KOH) e separação por decantação de ácidos graxos livres (fase apolar) e da fração de sabão encontrados no glicerol bruto (MYINT; EL-HALWAGI, 2009).

A Tabela 6 apresenta as características físico-químicas do glicerol bruto em conformidade com o laudo de análise fornecido pela empresa Bioverde Indústria e Comércio de Biocombustíveis Ltda.

Tabela 6 – Características do glicerol bruto

	Unidade	Valor
Glicerol	(%, m/m)	70,61
Água	(%, m/m)	1,70
Voláteis	(%, m/m)	5,02
Outros (sabões, sais, álcalis)	(%, m/m)	23,37
pH (50 °C)	-	8,0
Densidade (25/4 °C)	g/cm^3	1,19
Aspecto	-	Viscoso, escuro

O glicerol bruto (pH 8,0) foi obtido diretamente do processo de transesterificação sem nenhum tratamento e nomeado como glicerol classe G8. O glicerol G8 foi submetido a tratamento, com volumes variáveis de H_3PO_4 (85%, m/m), HCl (37%, m/m) e H_2SO_4 (98%, m/m) até a obtenção de uma mistura glicerínica de pH 7,0 (G7); pH 6,0 (G6); pH 5,0 (G5); pH 4,0 (G4) e pH 2,0 (G2) pela adição de diferentes volumes dos respectivos ácidos inorgânicos, cujos resultados encontram-se apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 – Concentração de glicerol após tratamento com ácidos concentrados

Amostra	pH	Tratamento					
		H_3PO_4 (85%)		HCl (37%)		H_2SO_4 (95%)	
		Glicerol ^c (g/L)	Volume (mL)	Glicerol ^c (g/L)	Volume (mL)	Glicerol ^c (g/L)	Volume (mL)
G8	8,0 ^a	706	0	706	0	706	0
G7	7,0 ^b	750	3,5	747	3,0	715	2,0
G6	6,0 ^b	830	7,5	815	6,5	831	2,8
G5	5,0 ^b	894	10,5	860	9,5	879	3,8
G4	4,0 ^b	964	15,5	908	12,5	900	4,5
G2	2,0 ^b	962	26,5	910	24,5	901	6,0

^apH da amostra de glicerol bruto, ^bpH final de glicerol tratado, ^cconcentração final de glicerol, ^dvolume de ácido para 250 mL de glicerol bruto. Todas as amostras foram submetidas a agitação de 200 rpm, e tratamento térmico a 75 °C por 30 min.

Verifica-se que o ajuste a pH 7,0 permitiu a separação de parte das impurezas contidas no glicerol bruto, obtendo-se um aumento de 6,2 e 5,8% na concentração de glicerol após o tratamento com ácido fosfórico e ácido clorídrico, respectivamente. Este valor foi inferior (1,3%) quando empregado ácido sulfúrico concentrado.

A Figura 10-A mostra o aspecto da mistura (G7) tratada com ácido fosfórico concentrado. A simples neutralização do excesso de base (KOH) contido no glicerol bruto (G8) não permitiu a separação dos ácidos graxos que formam sabão, sendo necessária a adição de excesso de ácido para a separação dos ácidos graxos combinados na forma de ésteres de potássio, inicialmente solúveis

no glicerol (Figura 10-B). A adição de ácidos concentrados até atingir pH 4,0 permitiu obter concentrações de glicerol de 964, 908 e 900 g/L, representando um aumento de 36, 29 e 27% em relação ao glicerol bruto, quando comparado aos outros tratamentos (Tabela 7).

A máxima concentração de glicerol (964 g/L) foi obtida a pH 4,0 quando o glicerol bruto foi submetido a tratamento com ácido fosfórico, sendo a diferença máxima na concentração final de glicerol, para os tratamentos com ácidos concentrados, de 64 g/L.

O tratamento de acidificação até pH 2,0 (G2), comparado com o tratamento G4, não mostrou aumento considerável na concentração final de glicerol, indicando que a maior parte das impurezas foi removida no tratamento anterior.

Figura 10 – Características da mistura de glicerol e ácidos graxos submetidas a tratamento com ácido fosfórico concentrado. (A) pH 7,0 (glicerol G7); (B) pH 4,0 (glicerol G4)

Barbosa (2009) obteve concentrações de glicerol de 922 g/L após acidificação de glicerol bruto de gordura animal com ácido fosfórico concentrado até pH 4,0. Por outro lado, Asad-ur-Rehman et al.(2008) trataram glicerol bruto, proveniente da produção de biodiesel com óleo de girassol, com ácido fosfórico concentrado, obtendo concentrações de glicerol superiores a 1080 g/L após tratamento ácido seguido de adição de hexanol para remoção de ácidos graxos remanescentes.

A Figura 11-A apresenta as características de amostras de glicerol após tratamento com ácido fosfórico 85% (m/m). Observa-se a redução na cor das amostras, devido à remoção de sólidos, pigmentos do óleo vegetal e sabão que acompanham o glicerol bruto.

Nota-se (Figura 11B) que o glicerol tratado com ácido clorídrico apresentou menor turbidez comparado com os tratamentos com ácido fosfórico e ácido sulfúrico. A maior turbidez do glicerol (G4) após do tratamento com ácido fosfórico aparentemente está relacionada com a menor solubilidade dos sais formados e micro-partículas de sólidos não decantados.

Figura 11– Aspecto de amostras de glicerol após tratamento com ácido concentrado; (a) ácido fosfórico 85% (b) ácido fosfórico 85%, ácido clorídrico 37% e ácido sulfúrico 98%, a pH 4,0.

A significância dos resultados obtidos após tratamento com ácidos inorgânicos foi analisada ao nível de confiança de 95%. A Tabela 7.1 mostra a análise de variância (ANOVA) das concentrações finais de glicerol de dois componentes: diferença de concentrações de glicerol entre diferentes ácidos inorgânicos; e diferença de concentrações de glicerol obtidas após diferentes tratamentos com um ácido inorgânico. O valor de $p < 0,05$ indica que existe diferença significativa entre os valores médios obtidos para a concentração de glicerol, tanto entre os diferentes ácidos inorgânicos, quanto nos tratamentos com o mesmo ácido inorgânico.

Tabela 7.1- Análise de variância (ANOVA).

Tratamento	SQ	Graus de liberdade	MQ	F-ratio	p-value
Diferencias entre grupos	185,398	20	9,2699	53,18	0,0000
Diferencias dentro de um grupo	3,66068	21	0,174318		
Total (corr.)	189,059	41		n/a	n/a

n/a = não se aplica. SQ: soma de quadrados; MQ: média quadrática

A Tabela 7.2 apresenta a distribuição das concentrações de glicerol após os diferentes tratamentos com ácidos inorgânicos.

Tabela 7.2 - Análise de variância (ANOVA) para as médias de concentração de glicerol após tratamento do glicerol bruto com ácidos inorgânicos.

Tratamento	^a Volume (%V _{acid} /V _{glicerol})	pH Final	^b Glicerol** (g/L)	Grupos homogêneos	
*G8-bruto	0,00	HCl (pH 8)	706		
*G8-bruto	0,00	H ₃ PO ₄ (pH 8)	706		
*G8-bruto	0,00	H ₂ SO ₄ (pH 8)	706		
G7-S	0,80	H ₂ SO ₄ (pH 7)	715		
G7-Cl	1,20	HCl (pH 7)	747		
G7-P	1,40	H ₃ PO ₄ (pH 7)	750		
G6-Cl	2,60	HCl (pH 6)	815		
G6-P	3,00	H ₃ PO ₄ (pH 6)	830		
G6-S	1,12	H ₂ SO ₄ (pH 6)	831		
G5-Cl	3,80	HCl (pH 5)	860		
G5-S	1,52	H ₂ SO ₄ (pH 5)	879		
G5-P	4,20	H ₃ PO ₄ (pH 5)	894		
G4-S	1,80	H ₂ SO ₄ (pH 4)	900		
G2-S	2,40	H ₂ SO ₄ (pH 2)	901		
G4-Cl	5,00	HCl (pH 4)	908		
G2-Cl	9,80	HCl (pH 2)	910		
G2-P	10,60	H ₃ PO ₄ (pH 2)	962		
G4-P	6,20	H ₃ PO ₄ - pH 4	964		

*G₈=glicerol bruto, G7, G6, G5, G4, G2: glicerol pH 7,0; 6,0; 5,0; 4,0; 2,0, respectivamente; S: ácido sulfúrico; Cl: ácido clorídrico; P: ácido fosfórico; ^a volume final de ácido concentrado utilizado durante o tratamento do glicerol bruto; ^b concentração final de glicerol,. **Valores médios de experimentos em duplicata. Células na mesma coluna indicam que não existe diferença significativa ao nível de confiança de 95%.

As células marcadas que se encontram em colunas diferentes mostram diferença significativa ao nível de 95% nos valores de glicerol final. A análise de variância mostra que não existe diferença significativa entre as concentrações finais de glicerol para os tratamentos G4 e G2 se utilizando um mesmo tipo de ácido inorgânico. Observa-se ainda, na Tabela 7.2, que para o tratamento G4, existe diferença significativa ($p < 0,05$) na concentração final de glicerol para os tratamentos com ácido fosfórico (963,78 g/L) e os demais ácidos inorgânicos, com 900,01 e 908,18 g/L para G4-Cl e G4-S, respectivamente.

A presença de ácidos graxos e ésteres metálicos de ácidos graxos (sabão) podem inibir o crescimento de bactérias, mediante alteração da permeabilidade da membrana celular (JENKINS; COURTNEY, 2003). Para confirmar a remoção destes compostos na amostra de glicerol tratado (pH 4,0), a mesma foi submetida a análise de absorbância pela técnica de espectroscopia no infravermelho médio (FTIR). Esta técnica permite a identificação de vários grupos funcionais por meio da identificação de diferentes ligações covalentes presentes nos compostos em amostras sólidas e líquidas de alta densidade (ZAGONEL; PERALTA-ZAMORA; RAMOS, 2004). Desta forma, com a análise dos espectros de absorção dos grupos funcionais obtidos experimentalmente e aqueles disponíveis na literatura é possível identificar os compostos químicos presentes em uma amostra (PACHLER, 1988; KELLER, 1986).

Os espectros resultantes da análise de FTIR para o glicerol puro, glicerol bruto, glicerol tratado com ácido fosfórico (G4), oleato de potássio (sabão) e óleo de soja são apresentados na Figura 12.

A presença do grupo carboxila ($-\text{COOH}$) no espectro relativo ao óleo de soja é indicada pelo pico localizado no comprimento de onda de 1740 cm^{-1} . O pico de absorção em 3250 cm^{-1} corresponde a grupos hidroxila presentes nas amostras de glicerol, com absorções carbono-oxigênio características para alcoóis primários e secundários em 1040 e 1112 cm^{-1} , respectivamente. Os picos assimétricos observados na banda 2924 a 2880 cm^{-1} representam grupos CH_2 presentes nas amostras de glicerol e ácidos graxos (GREHK; BERGER; BEXEL, 2008; ZAGONEL; PERALTA-ZAMORA; RAMOS, 2004; PACHLER, 1988; KELLER, 1986).

Ao se comparar os espectros referentes a oleato de potássio, linoleato de potássio e glicerol bruto (G8) (Figura 12), observa-se um pico em 1550 cm^{-1} , o que sugere a presença de grupo éster, provavelmente combinado na forma de éster metálico (sabão) (PACHLER, 1988). De forma similar, observa-se também a presença do grupo (C=O) na amostra de glicerol bruto, evidenciado pelo pico na banda de absorbância de 1744 cm^{-1} , correspondente à presença de ácido graxo livre (KELLER, 1986).

Figura 12 – Espectros de absorção FTIR de glicerol bruto, glicerol tratado com H_3PO_4 (pH 4,0) e substâncias puras.

Kodicek e Worden (1945) estudaram o efeito de inibição de ácido linolênico, ácido linoléico, ácido oléico, e seus sais de sódio, e éster metílico, sobre o crescimento de *Lactobacillus helveticus* e outras bactérias Gram-positivo, observando que concentrações de 4 a 16 µg/mL promovem a completa inibição do crescimento bacteriano. A ausência de picos característicos para grupos carboxilas e ésteres na amostra de glicerol tratado (G4) demonstra a eficácia do tratamento com ácido fosfórico na remoção destes compostos.

Os resultados da análise de elementos metálicos, fósforo e nitrogênio presentes no glicerol bruto (G8) e glicerol tratado (G4) obtidos por absorção atômica e espectrofotometria são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 – Elementos metálicos, nitrogênio e fósforo presentes no glicerol bruto e glicerol tratado (pH 4,0).

Amostra	Elementos (ppm)											
	Ni	Cu	Fe	Cd	As	Al	Ca	Mg	Na	K	N	P
G8 ^a	0,38	1,88	53,8	<0,01	<0,01	243	27,3	64,5	0,05	187	49,6	34,3
G4 ^b H ₃ PO ₄ (85%)	0,40	1,10	50,8	<	<	16,8	3,03	33,3	<	50	63,9	397
G4 ^b HCl (37%)	0,41	1,08	42,2	<	<	73,2	2,86	65,3	<	178	94,5	28,7
G4 ^b H ₂ SO ₄ (98%)	0,47	1,46	48,4	<	<	20,2	1,85	7,81	<	120	50,1	28,1

^a glicerol bruto, ^b glicerol tratado, pH 4,0; <: concentração inferior ao limite de detecção

Observa-se que o glicerol tratado contém elementos importantes para o crescimento de micro-organismos como potássio, magnésio, nitrogênio e fósforo. O tratamento do glicerol bruto (G8) com ácido fosfórico, para a remoção de sais de ácidos graxos (sabões), incrementou a concentração de fósforo em 11,5 vezes, fornecendo dessa forma um elemento necessário para o desenvolvimento de micro-organismos (THOMPSON; HE, 2006).

O glicerol bruto pode conter sódio e metais pesados que podem interferir no crescimento celular, mediante inibição de enzimas responsáveis pelo catabolismo do glicerol (ASAD-UR-RAHMAN et al., 2008). Observa-se ainda que as maiores concentrações dos íons Cu, Fe, Cd, As, Al, Ca e Na se encontram presentes no glicerol não tratado. Os metais pesados como arsênio e cádmio podem derivar dos equipamentos utilizados durante o processo de produção de biodiesel (THOMPSON; HE, 2006).

Nas amostras de glicerol tratado não foram detectados elementos metálicos como As, Cd e Na. A ausência destes íons representa um fator importante, uma vez que os metais pesados exercem impacto negativo no crescimento e viabilidade de micro-organismos, podendo inviabilizar a utilização de glicerol de biodiesel como substrato para a formulação de meio de cultivo e produção de alimentos (FAO/WHO, 2010).

Por outro lado, observa-se a presença de íons metálicos como ferro (42,2 – 53,8 mg/L), cobre (1,10 – 1,88 mg/L) e níquel (0,40 – 0,47 mg/L), considerados elementos essenciais para formação de complexos enzimáticos de vias metabólicas e sistemas de regulação em células bacterianas (MOAT; FOSTER; SPECTOR, 2002).

Estes resultados sugerem que o tratamento com ácido fosfórico concentrado foi eficaz na remoção de impurezas do glicerol bruto, gerando uma fração glicerínica com 964 g/L de glicerol, bem como pela formação de fosfato de potássio, sal que fornece fósforo ao meio de cultivo.

4.2 Avaliação do desempenho de lactobacilos em meio contendo glicerol tratado

A seleção de estirpes de bactérias probióticas com capacidade de crescimento em meio contendo glicerol foi avaliada.

A Tabela 9 apresenta os principais parâmetros fermentativos do cultivo de estirpes de *Lactobacillus* em meio formulado com glicerol de biodiesel.

Verifica-se que o maior valor referente à concentração de biomassa (0,82 g/L) foi obtido com a estirpe *Lactobacillus delbrueckii* UFV-H2b20, seguido pelas estirpes *L. acidophilus* ATCC 4356 e *L. plantarum* ATCC 8014, que alcançaram valores de concentração de biomassa correspondentes a 0,73 e 0,72 g/L, respectivamente.

Tabela 9 – Produção de biomassa por diferentes espécies de *Lactobacillus* em meio contendo glicerol tratado após 24 h cultivo.

Espécies		^a Biomassa (g/L)	^b UFC/mL	Y _{X/S} (g/g)	Q _X (g.L/h)	Consumo (%)
<i>L. fermentum</i>	LAC 01	0,59	1,77. 10 ⁸	0,14	0,025	20
<i>L. casei</i>	LAC 04	0,38	1,47. 10 ⁸	0,08	0,016	23
<i>L. plantarum</i>	LAC 06	0,40	1,56. 10 ⁸	0,10	0,017	19
<i>L. fermentum</i>	LAC 07	0,56	1,64. 10 ⁸	0,17	0,023	16
<i>L. fermentum</i>	LAC 09	0,45	1,82. 10 ⁸	0,16	0,019	14
<i>L. plantarum</i>	LAC 19	0,47	1,71. 10 ⁸	0,15	0,019	15
<i>L. plantarum</i>	LAC 23	0,33	1,24. 10 ⁸	0,10	0,014	17
<i>L. plantarum</i>	LAC 30	0,40	1,55. 10 ⁸	0,17	0,017	11
<i>L. fermentum</i>	LAC 38	0,41	1,63. 10 ⁸	0,18	0,017	11
<i>L. plantarum</i>	LAC 40	0,54	2,05. 10 ⁸	0,12	0,023	22
<i>L. paracasei</i>	LAC PC1	-	-	-	-	0
<i>L. paracasei</i>	LAC PC2	-	-	-	-	0
<i>L. delbrueckii</i>	UFV-H2b20	0,82	2,82. 10 ⁸	0,34	0,034	12
<i>L. acidophilus</i>	ATCC 4356	0,73	2,43. 10 ⁸	0,28	0,031	13
<i>L. plantarum</i>	ATCC 8014	0,72	2,35. 10 ⁸	0,26	0,030	13

^aCultivo de lactobacilos em meio MRS modificado contendo glicerol tratado com H₃PO₄ (20 g/L) a 37 °C por 24 h, experimentos realizados em triplicata. ^b Amostra de 1 mL diluída e cultivada em agar MRS pelo método de pour plate a 37 °C por 72 h. Y_{X/S}: fator de conversão de glicerol em células.

As demais estirpes apresentaram crescimento celular inferior, com valores de biomassa variando entre 0,33 e 0,59 g/L. Quanto aos valores referentes a contagem de células viáveis expressas em UFC/mL, observa-se que os maiores valores foram de 2,8.10⁸, 2,43.10⁸ e 2,35.10⁸ UFC/mL, para as estirpes *L. delbrueckii* UFV-H2b20, *L. acidophilus* ATCC 4356 e *L. plantarum* ATCC 8014, respectivamente.

Observa-se ainda que os valores de conversão de glicerol em biomassa ($Y_{X/S}$) obtidos para as estirpes avaliadas apresentam grandes variações entre si. Os maiores valores observados foram 0,34; 0,28 e 0,26 g/g para as estirpes *Lactobacillus delbrueckii* UFV-H2b20, *L. acidophilus* ATCC 4356 e *L. plantarum* ATCC 8014, respectivamente. Entretanto, verificou-se que as demais estirpes apresentaram valores de $Y_{X/S}$ inferiores a 0,19 g/g.

Da mesma forma, para valores de produtividade volumétrica em biomassa (Q_X) se destacam as estirpes *L. delbrueckii* UFV-H2b20, *L. acidophilus* ATCC 4356 e *L. plantarum* ATCC 8014, com valores de 0,034; 0,031 e 0,030 g/L.h, respectivamente. Estes resultados permitiram selecionar as estirpes *L. delbrueckii* UFV-H2b20, *L. acidophilus* ATCC 4356 e *L. plantarum* ATCC 8014 para dar continuidade aos estudos.

Na literatura consultada não foram encontradas referências para $Y_{X/S}$ e Q_X para cultivos das estirpes estudadas em meio contendo glicerol como fonte de carbono e energia.

4.3 Avaliação do desempenho das estirpes de *Lactobacillus* em meio formulado a base de glicerol tratado com diferentes ácidos inorgânicos

Fontes de nitrogênio de baixo custo são requeridas para aplicação no desenvolvimento de processos fermentativos em escala industrial. Por esta razão, no presente trabalho foram realizados ensaios para se avaliar a influência do extrato de farelo de arroz (EFA) no crescimento das estirpes de lactobacilos previamente selecionadas. Após seleção das estirpes de lactobacilos que apresentaram melhor desempenho em meio contendo glicerol tratado (G), foi realizada uma avaliação do crescimento das respectivas estirpes em meio constituído de glicerol tratado com os diferentes ácidos, cujos resultados encontram-se apresentados na Figura 13. Observa-se que, em meios de cultivo contendo glicerol puro (G_P), na ausência de sais minerais e fontes de nitrogênio, houve crescimento celular inferior a 0,1 g/L ou ausência de crescimento das estirpes estudadas. Da mesma forma, meios suplementados apenas com sais

minerais (G+SAL) resultaram concentrações celulares inferiores a 0,3 g/L. No entanto, foram superiores aos observados com glicerol puro (G_P), sugerindo que o glicerol de biodiesel fornece alguns micronutrientes (minerais) necessários para o desenvolvimento microbiano (THOMPSON; HE, 2006).

A adição de extrato de farelo de arroz (EFA) na concentração de 30% (v/v), assim como peptona, extrato de carne e extrato de levedura (MRS) em meios formulados com glicerol tratado e glicerol puro, resultou no aumento da concentração celular das espécies estudadas (Figura 13). Esta observação demonstra a necessidade da adição de nutrientes, na forma de proteínas, aminoácidos e vitaminas, que serão essenciais para a síntese das enzimas envolvidas no catabolismo de glicerol, conforme também demonstrado por ITO et al. (2005).

As maiores concentrações celulares (1,9 e 1,6 g/L) foram observadas para *L. delbrueckii* UFV-H2b20 em meio MRS e de extrato de farelo de arroz (EFA) contendo glicerol tratado com ácido fosfórico. No entanto, estes valores são 35 a 59% inferiores aos observados para esta estirpe em meio MRS, respectivamente. Em geral, *L. delbrueckii* UFV-H2b20 apresentou melhor desempenho nos meios suplementados com sais e fontes de nitrogênio (Figura 13).

Verifica-se que a estirpe *L. acidophilus* ATCC 4356 apresentou concentrações celulares próximas às aquelas observadas para *L. delbrueckii* UFV-H2b20 em meios formulados com MRS contendo glicerol puro ou tratado (1,5 a 1,7 g/L). Por outro lado, para cultivos conduzidos com *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014, verifica-se concentrações celulares 1,7 a 2,4 vezes inferiores às observadas para a estirpe *L. delbrueckii* UFV-H2b20 em meio MRS e meio suplementado com EFA (Figura 13). De forma geral, a estirpe de *L. plantarum* ATCC 8014 apresentou menor desempenho em todos os meios formulados a base de glicerol, sendo menor em glicerol tratado com ácido clorídrico. Isto sugere a maior exigência nutricional desta espécie quando comparado com *L. delbrueckii* UFV-H2b20 e *L. acidophilus* ATCC 4356.

FIGURA 13 – Produção de biomassa após 48 h de cultivo das estirpes seleccionadas em diferentes meios contendo glicerol tratado com ácidos concentrados. G_p: glicerol puro; G+SAL: glicerol tratado + solução salina; G + MRS: glicerol tratado + meio MRS sem glicose; G+EFA: glicerol tratado + extrato de farelo de arroz (30%, v/v).

Figura 14 – Valores de $Y_{X/S}$ após 48 h de cultivo das estirpes selecionadas em meios contendo glicerol tratado com ácidos concentrados. G_P: glicerol puro; G+SAL: glicerol tratado + solução salina; G+MRS: glicerol tratado + meio MRS sem glicose; G+EFA: glicerol tratado + extrato de farelo de arroz (30%, v/v).

Em relação ao desempenho das estirpes estudadas em meio MRS e EFA, de modo geral, o meio MRS proporcionou melhor desempenho celular quando comparado com meio suplementado com EFA. No entanto, constata-se a potencialidade do extrato de farelo de arroz como fonte de nitrogênio orgânico para o desenvolvimento de lactobacilos em meio contendo glicerol de biodiesel como fonte de carbono e energia.

No que se refere aos valores de $Y_{X/S}$, apresentados na Figura 14, observa-se que estes apresentaram grandes variações entre os meios de cultivo avaliados. Os maiores valores de $Y_{X/S}$ foram observados em meio MRS formulado com glicerol tratado (H_3PO_4), correspondendo a 0,35 g/g e 0,30 g/g para as estirpes *L. delbrueckii* UFV-H2b20 e *L. acidophilus* ATCC 4356, respectivamente.

Estes resultados são de 14 a 36% inferiores aos obtidos em meio MRS não modificado, utilizando glicose como principal fonte de carbono (Figura 14). Entretanto, verificou-se que *L. plantarum* ATCC 8014 apresentou o menor desempenho para todos os meios contendo glicerol, com valores de $Y_{X/S}$ inferiores a 0,26 g/g, sendo 38% inferior ao observado em meio MRS não modificado (0,35 g/g).

Os valores de produtividade volumétrica em biomassa (Q_X) para as estirpes estudadas em meio MRS não modificado corresponderam a 0,05 g/L.h. Entretanto, em meio contendo glicerol tratado, os valores de Q_X foram inferiores a 0,04 g/L.h para todas as estirpes de *Lactobacillus*, após 48 h de cultivo.

A análise destes resultados mostra melhor desempenho de *L. delbrueckii* UFV-H2b20 e *L. acidophilus* ATCC 4356, considerando os parâmetros concentração de biomassa, $Y_{X/S}$ e Q_X em meio formulado a base de glicerol de biodiesel tratado com ácido fosfórico.

Na literatura consultada não foram encontrados valores de $Y_{X/S}$ e Q_X para cultivos das bactérias láticas em meio contendo glicerol como fonte de carbono e energia.

4.4 Cinética de crescimento de lactobacilos em meio contendo glicerol tratado

Nesta etapa do trabalho, foram avaliados os parâmetros cinéticos de cultivo de lactobacilos em meio contendo glicerol tratado eo efeito da adição decitrato de amônio e acetato de sódio; bem como o crescimento bacteriano sob condiçõesde agitação. Os resultados se encontram representados nas Figuras 15, 16 e 17, e Tabelas 10, 11, 12 e 13.

Figura 15 – Perfil de crescimento de estirpes de *Lactobacillus* em meio MRS modificado contendo 10 g/L glicerol sem agitação. *L. delbrueckii* UFV-H2b20 (■); *L. plantarum* ATCC 8014 (●); e *L. acidophilus* ATCC 4356 (▲). Perfil de biomassa (a); consumo de glicerol (b); perfil de pH (c) e $\ln A/A_0$ (d). As siglas A e A_0 significam absorbância final e absorbância inicial, respectivamente.

Na Figura 15, nota-se que as estirpes *L. delbrueckii* UFV-H2b20 e *L. acidophilus* ATCC 4356 apresentaram a maior produção de biomassa (0,91 g/L), e

no tocante ao consumo de glicerol, mostraram comportamento similar a *L. plantarum* ATCC 8014, com assimilação da ordem de 30% do glicerol inicial. Os valores de rendimento ($Y_{X/S}$) foram 0,28; 0,22 e 0,27 g/g para *L. delbrueckii* UFV-H2b20, *L. plantarum* ATCC 8014 e *L. acidophilus* ATCC 4356, respectivamente. As produtividades volumétricas, relacionadas à produção celular com 24 h de cultivo, variaram de 0,028 a 0,038 g/L.h. Por outro lado, os valores de velocidade específica de crescimento máxima ($\mu_{\max}$), foram 0,131; 0,120 e 0,135 h⁻¹ para *L. delbrueckii* UFV-H2b20, *L. plantarum* ATCC 8014 e *L. acidophilus* ATCC 4356, respectivamente (Tabela 10). Observa-se ainda que, o final da fase exponencial de crescimento coincide com a diminuição dos valores de pH em uma unidade (Figura 15). Provavelmente, a formação de ácido acético exerceu efeito negativo no crescimento celular. Uma possível explicação está relacionada com pH de crescimento ótimo de lactobacilos que se encontra em torno de 6,0, exceto para espécies de *L. delbrueckii*, capazes de crescer a pH 5,5 (HUTKINS, NANNEN, 1993).

Tabela 10 – Parâmetros fermentativos obtidos após 24 h de cultivo de estirpes de *Lactobacillus* probióticos em meio MRS contendo glicerol de biodiesel sem agitação

	<i>L. delbrueckii</i> UFV-H2b20	<i>L. plantarum</i> ATCC 8014	<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356
Biomassa (g/L)	0,91 ± 0,02	0,67 ± 0,09	0,91 ± 0,04
Glicerol*(g/L), (%)	3,30 ± 0,04 (33)	3,01 ± 0,03(30)	3,40 ± 0,05 (34)
$Y_{X/S}$ (g/g)	0,28 ± 0,01	0,22 ± 0,03	0,27 ± 0,02
Q_X (g/L/h)	0,038 ± 0,003	0,028 ± 0,005	0,038 ± 0,004
Q_S (g/L/h)	0,14 ± 0,01	0,13 ± 0,02	0,14 ± 0,02
$\mu_{X \max}$ (1/h), r^2	0,131 ± 0,002 (0,96)	0,120 ± 0,010 (0,97)	0,135 ± 0,009 (0,96)
td (h)	5,3 ± 0,1	5,8 ± 0,2	5,1 ± 0,4

*Consumo de glicerol, r^2 : coeficiente de regressão; td: tempo de geração. $Y_{X/S}$: fator de conversão de glicerol em biomassa; Q_X : produtividade em biomassa; Q_S : velocidade de consumo de substrato.

Por outro lado, foram determinados os parâmetros de crescimento das estirpes de lactobacilos em frascos agitados contendo meio MRS não suplementado com citrato de amônio e acetato de sódio (Figura 16).

Observa-se que os maiores valores referentes à concentração de biomassa, em torno a 1,72 g/L, foram obtidos com a estirpe *L. delbrueckii* UFV-

H2b20 e *L. acidophilus* ATCC 4356, após 24 h de cultivo, seguido por e *L. plantarum* ATCC 8014 que alcançou valor de concentração de biomassa igual a 1,05 g/L. O crescimento celular atinge a fase estacionária de crescimento após 24 h de cultivo para todas as estirpes estudadas, ao mesmo tempo em que os valores de pH são reduzidos em 1,3 unidade em relação ao pH inicial (Figura 16).

Figura 16 – Perfil de crescimento de estirpes de *Lactobacillus* em MRS modificado contendo 10 g/L glicerol na ausência de citrato de amônio e acetato de sódio, sob agitação de 150 rpm. *L. delbrueckii* UFV-H2b20 (■); *L. plantarum* ATCC 8014 (●); e *L. acidophilus* ATCC 4356 (▲). Perfil de biomassa (a); consumo de glicerol (b); perfil de pH (c) e $\ln A/A_0$ (d). As siglas A e A_0 significam absorbância final e absorbância inicial, respectivamente.

Nota-se ainda, que a assimilação de glicerol foi cerca de 40% nas primeiras 24 h de cultivo para as três estirpes estudadas. Aparentemente, a conversão de glicerol em biomassa celular foi limitada pelas condições adversas de pH, o que pode estar relacionado às condições de pH interno ótimo para as reações de assimilação de glicerol (YAMADA et al., 1982). Lorca et al. (1998) observaram que

cultivos de *Lactobacillus* em meio MRS, sob condições não controladas de pH, acelera o início da fase estacionária, limitando a produção de biomassa. Neste sentido, o estresse ácido, gerado pela redução de 1 a 2 unidades do valor de pH inicial, interfere na síntese de moléculas importantes no organismo, direcionando o metabolismo para a produção de proteínas componentes do sistema homeostático que permite a tolerância a acidez na fase estacionária de crescimento (LORCA; VALDEZ, 2000; DE ANGELIS et al, 2001).

Na Tabela 11, encontram-se apresentados os parâmetros fermentativos referentes ao cultivo de estirpes de *Lactobacillus* em meio MRS modificado contendo glicerol de biodiesel sob agitação.

Tabela 11 – Parâmetros fermentativos após 24 h de cultivo de estirpes de *Lactobacillus* probióticos em meio MRS modificado contendo glicerol e sem citrato de amônio e acetato de sódio, sob agitação.

	<i>L. delbrueckii</i> UFV-H2b20	<i>L. plantarum</i> ATCC 8014	<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356
Biomassa (g/L)	1,73 ± 0,02	1,05 ± 0,05	1,71 ± 0,01
Glicerol*(g/L), (%)	4,18 ± 0,03 (42)	3,68 ± 0,02 (37)	4,30 ± 0,06 (43)
$Y_{X/S}$ (g/g)	0,41 ± 0,01	0,27 ± 0,02	0,40 ± 0,03
Q_X (g/L/h)	0,07 ± 0,02	0,04 ± 0,05	0,07 ± 0,01
Q_S (g/L/h)	0,17 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,18 ± 0,02
$\mu_{X \text{ máx}}$ (1/h), r^2	0,260 ± 0,003 (0,97)	0,161 ± 0,002 (0,99)	0,240 ± 0,009 (0,98)
td (h)	2,6 ± 0,2	4,3 ± 0,1	2,8 ± 0,02

Cultivo em meio MRS modificado contendo 10 g/L glicerol, sob agitação de 150 rpm. *Consumo de glicerol, r^2 : regressão linear; td: tempo de geração. $Y_{X/S}$: fator de conversão de glicerol em biomassa; Q_X : produtividade em biomassa; Q_S : velocidade de consumo de substrato.

A análise dos fatores de conversão de glicerol em biomassa ($Y_{X/S}$) para as estirpes estudadas revelou que os maiores valores corresponderam a 0,41 e 0,40 g/g para as estirpes *L. delbrueckii* UFV-H2b20 e *L. acidophilus* ATCC 4356, respectivamente, sendo estes valores 34% superiores ao alcançado por *L. plantarum* ATCC 8014 (Tabela 11). Quanto a velocidade específica de crescimento máxima (μ_{max}), os maiores valores obtidos corresponderam 0,26 e 0,24 h⁻¹ para as estirpes *L. delbrueckii* UFV-H2b20 e *L. acidophilus* ATCC 4356, respectivamente. Em relação aos valores de produtividade volumétrica em biomassa (Q_X) destacam-se as estirpes *L. delbrueckii* UFV-H2b20 e *L. acidophilus*

ATCC 4356, com valores de 0,07 g/L/h. Por outro lado, os valores médios de velocidade de consumo de glicerol (Q_s) e porcentagem de consumo de glicerol foram de 0,17 g/L.h e 40%, respectivamente, para as estirpes avaliadas (Tabela 11). Observa-se que a agitação promoveu um incremento entre 50 e 60% nos valores de formação de biomassa, rendimento e produtividade em biomassa, assim como na velocidade específica de crescimento máxima. Esta observação demonstra o efeito positivo da agitação sobre os parâmetros cinéticos, sendo necessária a avaliação do crescimento das estirpes probióticas sob condições constantes de aeração.

Na Figura 17, encontram-se apresentadas as curvas de crescimento celular, consumo de glicerol e perfil de pH durante o cultivo das bactérias probióticas sob agitação em meio MRS modificado

Figura 17– Perfil de crescimento de estirpes de *Lactobacillus* sob agitação de 150 rpm em meio MRS modificado contendo 10 g/L glicerol. *L. delbrueckii* UFV-H2b20 (■); *L. plantarum* ATCC 8014 (●); e *L. acidophilus* ATCC 4356 (▲). Perfil de biomassa (a); consumo de glicerol (b); perfil de pH (c) e $\ln A/A_0$ (d). As siglas A e A_0 significam absorbância final e absorbância inicial, respectivamente.

Conforme observado nas etapas anteriores, verifica-se que não existem diferenças importantes no tocante à produção de células entre *L. delbrueckii* UFV-H2b20 e *L. acidophilus* ATCC 4356 com 24h de cultivo, sendo os valores de biomassa correspondentes a 2,06 e 2,11 g/L, respectivamente. A biomassa produzida por *L. plantarum* ATCC 8014 corresponde a 1,50 g/L, valor este 35% inferior ao observado com as outras estirpes. Na Tabela 12, apresentam-se os parâmetros fermentativos do cultivo de estirpes de *Lactobacillus* sob agitação em meio MRS modificado contendo glicerol de biodiesel como fonte de carbono e energia.

De modo semelhante às etapas anteriores, aparentemente, a conversão de glicerol em biomassa celular foi limitada pelas condições adversas de pH ($\text{pH} < 5,0$). Esta limitação pode estar relacionada com os valores pH de atividades das enzimas glicerol quinase e glicerol desidrogenase, envolvidas na assimilação de glicerol por bactérias, e cujos valores de pH ótimo variam entre 5,5 e 9,5 (YAMADA et al., 1982). Ainda na Figura 17, observa-se que a queda do pH antecipa o início da fase estacionária limitando a produção de biomassa (LORCA; VADEZ, 2000; DE ANGELIS et al, 2001).

Tabela 12 – Parâmetros fermentativos após 24 h de cultivo de estirpes de *Lactobacillus* probióticos em meio MRS contendo glicerol de biodiesel como fonte principal de carbono e energia, citrato de amônio e acetato de sódio, sob agitação.

	<i>L. delbrueckii</i> UFV-H2b20	<i>L. plantarum</i> ATCC 8014	<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356
Biomassa (g/L)	2,06 ± 0,01	1,36 ± 0,02	2,11 ± 0,10
Glicerol*(g/L), (%)	4,50 ± 0,03(47)	3,64 ± 0,02(38)	4,57 ± 0,09(48)
$Y_{X/S}$ (g/g)	0,46 ± 0,02	0,37 ± 0,04	0,46 ± 0,01
Q_X (g/L/h)	0,08 ± 0,01	0,06 ± 0,02	0,09 ± 0,02
Q_S (g/L/h)	0,18 ± 0,05	0,15 ± 0,03	0,19 ± 0,04
$\mu_{X \text{ máx}}$ (1/h), r^2	0,330 ± 0,010(0,95)	0,260 ± 0,012(0,98)	0,316 ± 0,020(0,96)
td (h)	2,10 ± 0,03	2,60 ± 0,01	2,31 ± 0,03

Cultivo em meio MRS modificado contendo 10 g/L glicerol, citrato de amônio (2 g/L) e acetato de sódio (5 g/L) sob agitação de 150 rpm.*Consumo de glicerol; r^2 : regressão linear; td: tempo de geração; $Y_{X/S}$: fator de conversão de glicerol em biomassa; Q_X : produtividade em biomassa; Q_S : velocidade de consumo de substrato.

Verifica-se ainda na Figura 17 que, em relação à assimilação de glicerol, esta só ocorre consideravelmente nas primeiras 24 h de cultivo, tendo-se

observado o consumo deste substrato de 4,50; 4,57 e 3,64 g/L para *L. delbrueckii* UFV-H2b20, *L. acidophilus* ATCC 4356 e *L. plantarum* ATCC 8014, correspondendo a 47,0; 38,0 e 48,0% da concentração inicial de glicerol, respectivamente (Tabela 12). A análise dos fatores de conversão de glicerol em biomassa ($Y_{X/S}$) para as estirpes estudadas revelou que *L. delbrueckii* UFV-H2b20 e *L. acidophilus* ATCC 4356 apresentaram melhor desempenho em meio MRS contendo glicerol de biodiesel, sendo este valor 24% superior ao alcançado por *L. plantarum* ATCC 8014. Em relação aos valores de produtividade volumétrica em biomassa (Q_X) destacam-se as estirpes *L. delbrueckii* UFV-H2b20 e *L. acidophilus* ATCC 4356, com valores de 0,08 e 0,09 g./L.h, respectivamente (Tabela 12). Salienta-se que na literatura consultada, não foram encontrados valores de $Y_{X/S}$ e Q_X para cultivos de lactobacilos em meio contendo glicerol.

Na Tabela 13 encontram-se apresentados os parâmetros fermentativos referentes aos cultivos de *Lactobacillus* em meio MRS modificado, sob diferentes condições. De forma geral, observa-se que os cultivos realizados em meio MRS modificado contendo glicerol, sob condições de agitação; apresentaram maiores rendimentos em biomassa ($Y_{X/S}$), quando comparados com cultivos não agitados, para as estirpes estudadas. Nota-se também o aumento da velocidade de consumo de substrato (Q_s), aumento da porcentagem de consumo de substrato, produtividade (Q_X) e velocidade de crescimento específica máxima (μ_{max}).

Em relação ao efeito de citrato de amônio e acetato de sódio sobre o desempenho das respectivas estirpes, nota-se aumento na produção de biomassa na presença dos sais, devido provavelmente, ao efeito tamponante destes componentes, o que promoveu o aumento do consumo de glicerol em até 5%.

Ressalta-se ainda que *L. delbrueckii* UFV-H2b20 e *L. acidophilus* ATCC 4356 demonstraram os melhores desempenhos em meios formulados com glicerol de biodiesel sob as diferentes condições estudadas.

Considerando que a produção de biomassa foi maior em meio MRS modificado contendo citrato de amônio e acetato de sódio em cultivos agitados, estabeleceram-se estas condições para a obtenção de células e preparação dos extratos celulares para a determinação das enzimas envolvidas na assimilação de glicerol.

Tabela 13 – Parâmetros fermentativos do cultivo de *Lactobacillus* sob diferentes condições em meio contendo glicerol de biodiesel

	<i>L. debruekii</i> UFV-H2b20			<i>L. plantarum</i> ATCC 8014			<i>L.acidophilus</i> ATCC 4356		
Parâmetros	A	B	C	A	B	C	A	B	C
Biomassa (g/L)	0,92	1,73	2,06	0,67	1,05	1,36	0,91	1,71	2,11
Glicerol*(g/L), (%)	3,30 (33)	4,18 (43)	4,50 (47)	3,01 (30)	3,68 (37)	3,64 (38)	3,40 (33)	4,30 (43)	4,57 (48)
$Y_{X/S}$ (g/L.h)	0,28	0,41	0,46	0,22	0,27	0,37	0,27	0,40	0,46
Q_X (g/L.h)	0,04	0,07	0,08	0,08	0,04	0,06	0,03	0,07	0,09
Q_S (g/L.h)	0,14	0,17	0,18	0,13	0,15	0,14	0,14	0,18	0,19
μ_{max} (h ⁻¹), r ²	0,13 (0,96)	0,26 (0,97)	0,33 (0,95)	0,12 (0,97)	0,16 (0,99)	0,26 (0,98)	0,13 (0,96)	0,24 (0,98)	0,32 (0,96)
td (h)	2,30	2,60	2,11	5,80	4,30	2,60	5,10	2,80	2,3

A: MRS modificado; glicerol ,10 g/L; cultivo não agitado

B: MRS modificado; glicerol, 10 g/L; ausência de citrato de amônio e acetato de sódio; agitado

C: MRS modificado; glicerol, 10 g/L; presença de citrato de amônio e acetato de sódio; agitado

Consumo de glicerol, r²: regressão linear. td: tempo de geração. $Y_{X/S}$: fator de conversão de glicerol em biomassa; Q_X : produtividade em biomassa; Q_S : velocidade de consumo de substrato.

4.5 Enzimas envolvidas na assimilação de glicerol

4.5.1 Obtenção de extrato enzimático

Para a seleção do método de rompimento celular foi considerado como resposta a concentração de proteína obtida após ruptura celular, por detergente iônico (Y-PER®), esferas de vidro, sonda de ultrasom e banho de ultrasom; de suspensões de lactobacilos cultivadas em meio MRS contendo glicerol de biodiesel, cujos resultados são apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 – Concentração de proteínas obtidas por diferentes métodos de extração*

	Proteína (mg/g células)**			
	Y-PER®	Esferas	Ultra-som***	Sonda Ultra-som
<i>L. plantarum</i> ATCC 8014	11,1 ± 0,3	13,3 ± 0,2	5,5 ± 0,2	27,1 ± 0,2
<i>L. delbrueckii</i> UFV-H2b20	15,8 ± 0,8	13,9 ± 0,4	10,7 ± 0,5	33,6 ± 0,7
<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356	18,4 ± 0,1	13,4 ± 0,6	7,9 ± 0,1	32,0 ± 0,1

*Extratos obtidos após 24 h de cultivo de *Lactobacillus* em meio MRS modificado contendo glicerol de biodiesel; ** Experimentos conduzidos em triplicata; ***Banho de ultra-som; Y-PER® (Yeast protein extration reagent): detergente iônico.

Observa-se que as maiores concentrações de proteínas foram obtidas mediante rompimento celular com sonda de ultra-som, sendo estes valores 3 a 5 vezes superiores aos obtidos com banho de ultrasom convencional. Os tratamentos com Y-PER® (detergente iônico) e tratamento mecânico com esferas de vidro permitiram obter concentrações de proteína semelhantes entre si, porém até 200% inferiores aos obtidos com sonda de ultra-som, justificando, desta forma, a seleção deste método para a obtenção dos extratos celulares e subsequente estudo da atividade das enzimas de assimilação de glicerol pelas respectivas estirpes de lactobacilos.

4.5.2 Determinação da atividade enzimática e parâmetros cinéticos

4.5.2.1 Glicerol quinase

Os extratos celulares de *L. plantarum* ATCC 8014, *L. delbrueckii* UFV-H2b20 e *L. acidophilus* ATCC 4356 apresentaram atividade de glicerol quinase, conforme demonstrado na Figura 18.

Na Figura 18A observa-se a variação da atividade de glicerol quinase (EC. 2.7.1.30) nos extratos enzimáticos obtidos após 12, 24 e 48 h de cultivo das estirpes de *Lactobacillus* em meio MRS modificado contendo glicerol, citrato de amônio e acetato de sódio. Os maiores valores de atividade foram alcançados após 24 h de cultivo, correspondendo a 46,5; 109,5; e 95,5 $\mu\text{M}/\text{min}$ para *L. plantarum* ATCC 8014, *L. delbrueckii* UFV-H2b20 e *L. acidophilus* ATCC, respectivamente.

Ressalta-se ainda que os extratos enzimáticos das estirpes *L. delbrueckii* UFV-H2b20 e *L. acidophilus* ATCC 4356, apresentaram as maiores atividades específicas de glicerol quinase, entre 12 e 24 h de cultivo, correspondente à fase exponencial e estacionária de crescimento (Figura 18B). Os valores máximos de atividade específica foram 228,7 e 232,5 U/mg para *L. delbrueckii* UFV-H2b20 e *L. acidophilus* ATCC 4356, respectivamente. A maior atividade específica de glicerol quinase (91,1U/mg) de *L. plantarum* ATCC 8014 foi alcançada com 24 h de cultivo, no entanto, este valor é 156% inferior ao máximo observado para *L. acidophilus* ATCC 4356. Isto poderia explicar, em parte; o menor desempenho de *L. plantarum* ATCC 8014 no tocante à produção de biomassa, quando comparado com as outras estirpes avaliadas.

Desta forma, os extratos enzimáticos obtidos após 24 h de cultivo foram utilizados para a determinação dos parâmetros cinéticos (K_m e V_{max}) das reações catalisadas por glicerol quinase.

Figura 18 – Atividade de glicerol quinase de *L. plantarum* ATCC 8014; *L. delbrueckii* UFV-H2b20 e *L. acidophilus* ATCC 4356 em função do tempo de cultivo. (A) Atividade, μM/min (B) Atividade específica (U/mg proteína).

De acordo com a cinética de Michaelis-Menten, a Figura 19 apresenta a atividade de glicerol quinase em função da concentração de substrato. Observa-se que, variando as concentrações de glicerol na mistura reacional, se obteve respostas de velocidades de reação em forma de hipérboles características do modelo proposto por Michaelis-Menten.

Para determinação dos parâmetros cinéticos referentes às enzimas envolvidas na assimilação de glicerol, empregaram-se os métodos de Lineweaver-Burk, Hanes-Woolf e Eadie-Hofstee (Figuras 20 e 22), que consistem em representações lineares de velocidades iniciais e suas recíprocas quando uma enzima obedece ao modelo de Michaelis-Menten (THORNER; PAULUS, 1972; HUANG et al, 1997).

A inclinação da reta corresponde à razão de $K_m/V_{m\acute{a}x}$; $1/V_{m\acute{a}x}$ e $-K_m$ para Lineweaver-Burk, Hanes-Woof e Eadie-Hofstee, respectivamente e a ordenada na origem corresponde a $1/V_{m\acute{a}x}$, $K_m/V_{m\acute{a}x}$ e $V_{m\acute{a}x}$, respectivamente.

Figura 19 – Cinética de Michaelis-Menten para glicerol quinase de *L. plantarum* ATCC 8014 (A), *L. delbrueckii* UFV-H2b20 (B) e *L. acidophilus* ATCC 4356 (C) em função da concentração de glicerol.

Desta forma, os valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ para glicerol quinase foram obtidos por meio dos gráficos mostrados na Figura 19 e apresentados na Tabela 15. Observa-se que as velocidades máximas ($V_{m\acute{a}x}$) da reação catalisada por glicerol quinase para *L. plantarum* ATCC 8014, *L. delbrueckii* UFV-H2b20 e *L. acidophilus* ATCC 4356 foram de 47,1; 117,8 e 121,4 $\mu\text{M}/\text{min}$ e 47,4; 112,8 e 119 $\mu\text{M}/\text{min}$ obtidas pelo método Hanes-Woof e Eadie-Hofstee, respectivamente. Estes valores de $V_{m\acute{a}x}$ diferem em duas unidades quando comparados com os valores obtidos pelo método de Lineweaver-Burk. O último geralmente apresenta uma distribuição não uniforme das velocidades de reação (Figura 20).

A constante de Michaelis-Menten (K_m) corresponde à concentração de substrato para a qual a velocidade da reação é a metade da velocidade máxima e é inversamente proporcional à afinidade da enzima pelo substrato, sendo característica de cada enzima. Os menores valores da constante de Michaelis-Menten (K_m) encontrados foram de 1,2 e 2,5 mM para glicerol quinase de *L. delbrueckii* e *L. acidophilus*, respectivamente (Tabela 15). Estes valores são de 1,5 a 2 vezes inferiores ao valor de K_m de *L. plantarum* ATCC 8014, o que pode justificar o menor crescimento observado em meio contendo glicerol de biodiesel.

Figura 20 – Regressão dupla-recíproca de Lineweaver-Burk (I), Hanes (II) e Eadie-Hofstee (III) para determinação da constante de Michaelis-Menten (K_m) e velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$) da enzima glicerol quinase de *L. plantarum* ATCC 8014 (A), *L. delbrueckii* UFV-H2b20 (B) e *L. acidophilus* ATCC 4356 (C)

Tabela 15 – Valores de K_m e V_{max} de glicerol quinase (EC. 2.7.1.30) obtidos por diferentes métodos de linearização

Métodos	<i>L. plantarum</i> ATCC 8014		<i>L. delbrueckii</i> UFV-H2b20		<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356	
	V_{max} ($\mu\text{M}/\text{min}$)	K_m (mM)	V_{max} ($\mu\text{M}/\text{min}$)	K_m (mM)	V_{max} ($\mu\text{M}/\text{min}$)	K_m (mM)
Lineweaver-Burk	49,8	4,41	110,2	1,01	119,4	2,51
Hanes-Woolf	47,1	3,95	117,8	1,29	121,4	2,66
Eadie-Hofstee	47,4	4,01	112,8	1,07	119,0	2,49
Regressão hiperbólica	46,4	3,75	115,1	1,17	119,4	2,52

Na literatura consultada, não foi descrita a síntese de glicerol quinase (EC 2.7.1.30) em *L. delbrueckii* UFV-H2b20, *L. plantarum* ATCC 8014 e *L. acidophilus* ATCC 4356. No entanto, o estudo do genoma completo destas espécies, por homologia com o genoma de bactérias como *Escherichia coli* e *Bacillus sp.*, permite inferir a sequência dos genes *glpK* (LAB 1878), *glpK* (LBUL_1941) e *glpK* (lp_0370), que codificariam a síntese da enzima glicerol quinase (EC 2.7.1.30) em *Lactobacillus acidophilus* NCFM (ATCC 4356), *Lactobacillus delbrueckii var bulgaricus* ATCC BAA-365 e *Lactobacillus plantarum* WCFS1 (ATCC 8014), respectivamente (KLEEREBEZEM et al., 2003; ALTERMANN et al., 2005; MAKAROVA et al., 2006).

Valores de K_m próximos aos obtidos no presente trabalho foram reportados por Aragonet al. (2008), que avaliaram a atividade de glicerol quinase de extratos brutos provenientes de levedura seca de panificação, e constataram valores de K_m de 1,99 a 3,11 mM.

Hayashi e Lin (1967) estudaram a purificação e caracterização da enzima glicerol quinase de *Escherichia coli* K 10 (*strain 7*) e observaram atividades enzimáticas elevadas na faixa de pH de 7,3 a 9,3. A reação enzimática catalisada por glicerol quinase pura, conduzida a 25 °C e pH 9,0, revelou valores de K_m e V_{max} de 0,0013 mM e 100 μ M/min, respectivamente.

Por outro lado, valores de K_m próximos a 0,01 mM foram observados com a enzima glicerol quinase purificada de *Escherichia coli* K 10 (*strain 72*) em reações conduzidas a 25 °C e pH 7,0 (THORNER; PAULUS, 1972).

Huang et al (1996) caracterizaram a enzima glicerol quinase termoestável da bactéria *Thermus flavus* em meio contendo glicerol (20 g/L), obtendo K_m de 0,038 mM (HUANG et al., 1997). Os valores de K_m para a enzima glicerol quinase obtidas no presente trabalho são superiores aos obtidos para *Escherichia coli*. Entretanto, cabe salientar que estes valores correspondem aos extratos livres de células não submetidas a tratamento de purificação.

4.5.2.2 Glicerol desidrogenase

Em relação à atividade de glicerol desidrogenase nas estirpes estudadas, verificou-se que não foram detectadas atividades enzimáticas para a reação direta de oxidação de glicerol na presença de NAD^+ (EC 1.1.16) e NADP^+ (EC 1.1.1.2). Isto sugere que o sistema enzimático para assimilação de glicerol por parte dos lactobacilos estudados, provavelmente, não utiliza a enzima glicerol desidrogenase para a reação direta de assimilação, sendo a enzima glicerol quinase (EC 2.7.1.30, Mg-ATP dependente), aparentemente a mais importante.

No entanto, nos extratos celulares das estirpes testadas foram detectadas atividades de glicerol desidrogenase EC 1.1.1.72 (NADPH dependente) para a reação inversa, que utiliza DL-gliceraldeído como substrato, fato não descrito na literatura consultada. As curvas de Michaelis-Menten para a cinética de reações enzimáticas de glicerol desidrogenase, em função da concentração de substrato, estão apresentadas na Figura 21, e os parâmetros cinéticos na Tabela 16.

Figura 21 – Cinética de Michaelis-Menten para glicerol desidrogenase (NADPH dependente) de *L. plantarum* ATCC 8014 (A), *L. delbrueckii* UFV-H2b20 (B) e *L. acidophilus* ATCC 4356 (C) em função da concentração de DL-gliceraldeído.

Nota-se que as velocidades de reações catalisadas por glicerol desidrogenase em função das concentrações do substrato (DL-gliceraldeído) descrevem o comportamento característico de hipérboles proposto por Michaelis-Menten (Figura 21).

Os valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ para glicerol desidrogenase foram obtidos por leitura nos graficos apresentados na Figura 22.

Figura 22 – Regresso dupla-recproca de Lineweaver-Burk (I), Hanes (II) e Eadie-Hofstee (III) para determinao da constante Michaelis-Menten (K_m) e velocidade mxima ($V_{m\acute{a}x}$) da enzima glicerol desidrogenase (NADP dependente) de *L. plantarum* ATCC 8014 (A), *L. delbrueckii* UFV-H2b20 (B) e *L. acidophilus* ATCC 4356 (C)

A reao de oxidao de glicerol na presena de $NADP^+$ (reao direta) ocorreu abaixo do limite de deteco. Com isso, a presena de rudo eletrnico no permitiu a avaliao da variao da absorvncia para a reao direta, impossibilitando a determinao da atividade.

Estudos da atividade de glicerol desidrogenase de *Hypocrea jecorina* na via oxidativa (NADP⁺) mostraram ser esta 4000 vezes inferior à reação de redução de D-gliceraldeído NADPH dependente, provavelmente devido à formação de gliceraldeído ser energeticamente menos favorecida que a reação inversa (LIEPINS et al., 2006).

Os valores de $V_{\text{máx}}$ de glicerol desidrogenase (EC. 1.1.1.72) corresponderam a 1,25; 1,05 e 2,63 $\mu\text{M}/\text{min}$ para *L. plantarum* ATCC 8014, *L. delbrueckii* UFV-H2b20 e *L. acidophilus* ATCC 4356, respectivamente (Tabela 16). Estes valores observados para glicerol desidrogenase são 50 a 100 vezes inferiores aos obtidos para glicerol quinase (Tabela 16).

Tabela 16 – Valores de K_m e V_{max} de glicerol desidrogenase (EC1.1.1.72) obtidos por diferentes métodos de linearização

Métodos	<i>L. plantarum</i>		<i>L.delbrueckii</i>		<i>L.acidophilus</i>	
	V_{max} ($\mu\text{M}/\text{min}$)	K_m (mM)	V_{max} ($\mu\text{M}/\text{min}$)	K_m (mM)	V_{max} ($\mu\text{M}/\text{min}$)	K_m (mM)
Lineweaver-Burk	1,23	19,22	1,03	12,84	2,70	33,31
Hanes-Woolf	1,25	19,93	1,05	13,95	2,63	31,41
Eadie-Hofstee	1,24	19,62	1,03	12,94	2,69	33,11
Regressão hiperbólica	1,25	20,21	1,04	13,33	2,63	30,84

A enzima glicerol desidrogenase detectada mostrou considerável afinidade por DL-gliceraldeído e NADPH, indicado pelos valores de K_m de 12,84 a 33,31 mM. No entanto, estes valores foram maiores que aqueles observados para glicerol quinase (Tabela 15).

Na literatura consultada, não foram descritas atividades da enzima glicerol desidrogenase (EC 1.1.1.72) em *L. delbrueckii* UFV-H2b20, *L. plantarum* ATCC 8014 e *L. acidophilus* ATCC 4356.

4.7 Microencapsulamento de bactérias probióticas

Nesta etapa do trabalho, estudou-se o emprego de polímeros naturais na formação de uma matriz polimérica para o encapsulamento das bactérias probióticas selecionadas em meio MRS modificado contendo glicerol tratado.

4.7.1 Interação química na matriz polimérica de alginato de cálcio-amido de banana verde (ABV)

A análise dos espectros de transmitância obtida pela técnica de espectroscopia no infravermelho médio (FTIR) das misturas poliméricas foi realizada para detectar qualquer alteração nos espectros de transmitância, que indique interação entre os grupos funcionais dos polímeros que formam a matriz de encapsulamento.

A comparação dos espectros de transmitância de polímeros utilizados na formação das micropartículas em relação àqueles disponíveis na literatura para compostos puros permite identificar os grupos funcionais e a interação dos mesmos na formação de pontes de hidrogênio.

A Figura 23 apresenta os espectros de FTIR de polímeros e misturas de alginato de sódio-amido de banana verde gelificadas com Ca^{+2} , utilizadas na obtenção de microcápsulas sem células.

A estrutura molecular do alginato de sódio contém radicais $-\text{OH}$ e $-\text{COO}^-$ que podem interagir com os radicais $-\text{OH}$ do amido. As bandas de absorção na faixa de 3800 a 3000 cm^{-1} , observadas em todos os polímeros e misturas poliméricas; corresponde a grupos hidroxila (Figura 23).

Os picos de transmitância de $-\text{OH}$ são menos pronunciados no amido de banana verde, alginato de cálcio e alginato de sódio puro.

Figura 23 – Espectros de transmitância FTIR de amidos, alginatos e misturas poliméricas. A: alginato; ABV: amido de banana verde.

Com o aumento da concentração de amido de banana verde de 2% a 6% e alginato de sódio de 2% a 3,5% na mistura, observa-se uma tendência ao estreitamento do pico centrado no comprimento de onda de 3380 cm^{-1} . O aumento da intensidade da banda na região de $3500\text{ a }3400\text{ cm}^{-1}$ é característico da interação entre grupos -OH em misturas poliméricas, onde o pico estreito e pronunciado indica a menor disponibilidade de -OH livre para interagir com outros grupo hidroxilas (SIDDARAMAIAH et al., 2008).

Esta variação nos espectros de transmitância sugere a interação intermolecular mediante a formação de pontes de hidrogênio entre os grupos COO- do alginato de sódio e OH do amido de banana verde.

4.7.2 Determinação da morfologia e análise de tamanho de partícula

A Figura 24 apresenta a morfologia das microcápsulas de alginato-ABV produzidas por emulsificação. Observa-se que em geral, as microcápsulas apresentaram forma esférica ou oval.

Figura 24 – Morfologia das micropartículas em co-matriz de alginato de cálcio-amido de banana verde; (a) cristais de amido de banana verde; (b,c) Microcápsulas esféricas; (d) microcápsulas em forma de gota; (e) deformação e fragmentação de partículas; (f) microcápsulas contendo *L. acidophilus*; (g) superfície de microcápsulas aumento 1000x e (h,i) aumento 1500x.

As deformações e rupturas das partículas mostradas nas Figuras 24d e 24e estão associadas a forças de cisalhamento e turbulência geradas pelo tipo de rotor utilizado e a viscosidade da fase dispersa ou descontínua. Quando a fase descontínua é menos viscosa que a fase contínua (óleo), observa-se o aumento das forças de cisalhamento não uniformes sobre as gotas, causando deformação e ruptura das mesmas (PONCELET et al., 1999; SALAGER, 1996). Por outro

lado, os agitadores tipo hélice ou turbina produzem um campo de cisalhamento hiperbólico, cujo efeito é o alongamento das gotas na emulsão. Com o aumento do cisalhamento, observa-se que a gota se alonga de forma sigmóide formando pontas agudas e instáveis frente a forças capilares, o que origina a ruptura dos extremos da microcápsula (SALAGER, 1996).

Poncelet (2001) afirmou que a deformação das esferas observada na formação de micropartículas se deve à incompleta coalescência da gota durante a gelificação interna do alginato com carbonato de cálcio e às forças de cisalhamento. Por outro lado, Sultana et al. (2000) relataram a presença de partículas de forma elíptica associada à forças de cisalhamento durante a emulsificação.

As imagens em microscópio eletrônico (Figura 24h e 24i) mostram que as superfícies das microcápsulas se apresentam compactas e com aparente baixa porosidade. Isto pode indicar que a mistura amido-alginato forma uma estrutura densa que permite reter células no interior.

A Figura 25 ilustra a distribuição típica de tamanhos das para partículas de alginato-ABV formadas pelo processo de emulsificação.

As curvas de distribuição de tamanho de partículas foram do tipo bimodal, com um pico que representa a moda principal e um pico satélite, que representa partículas de tamanho menor agrupadas em um pico modal secundário. A formação de pico satélite está relacionada com o regime de turbulência do líquido que projeta as partículas formadas pela emulsificação contra a parede do reator, reduzindo o tamanho das partículas (PONCELET et al.,1999).

A redução da turbulência pode, por exemplo, ser controlada pela redução da velocidade de agitação, o que contribui para diminuir ou eliminar a formação de picos satélite. No entanto, a redução da velocidade do rotor durante o processo de emulsificação permitiu a coalescência das gotas e consequente aumento do tamanho de microcápsulas.

Figura 25 – Distribuição de tamanhos de partículas de alginato de cálcio-ABV. Curva unimodal (A); curva bimodal (B).

A Tabela 17 apresenta a distribuição de tamanho das partículas. A distribuição de tamanho das partículas foi analisada em função da concentração de surfactante (Polisorbato 80) e concentração de polímeros encapsulantes. Para todas as concentrações de polímeros estudadas, observa-se a diminuição do diâmetro médio das partículas com o aumento da concentração de surfactante de 0,02% a 1,0%. O Polisorbato 80, nome comercial de polioxietileno (20) sorbitan monoleato (Tween 80), é constituído por uma cadeia de ácido graxo saturado simples que permite uniformidade e compactação do grupo hidrofóbico na interface das gotas dispersas no óleo, favorecendo a redução de tamanho de partícula pela redução da tensão superficial e a redução da coalescência das mesmas (WAN; HENG; CHAN, 1994).

O aumento da concentração de Polisorbato 80 levou à deformação moderada e fragmentação das micropartículas (Figura 25d). Estudos visando obtenção de microencapsulados também reportam a deformação e fragmentação das microcápsulas com o aumento da concentração de surfactante (PONCELET et al., 1999, PONCELET, 2001; WAN; HENG; CHAN, 1994).

Tabela 17 – Distribuição de tamanho de partículas (µm) de alginato de cálcio-ABV em função da concentração de polímeros e surfactante

Composição A/ABV (% / %)	Polisorbato 80														
	0,02%					0,1%					1,0%				
	D[0,1]	D[0,5]	D[0,9]	Span	Curva	D[0,1]	D[0,5]	D[0,9]	Span	Curva	D[0,1]	D[0,5]	D[0,9]	Span	Curva
2/2	133	411	837	1,7	Bimodal	97	321	756	1,1	Bimodal	42	114	294	2,2	Bimodal
2/4	560	954	1517	1,0	Unimodal	489	970	1457	1,1	Bimodal	236	481	814	1,2	Bimodal
2/6	620	1047	1596	0,9	Unimodal	385	980	1565	1,2	Bimodal	177	708	1033	1,3	Bimodal
3.5/2	458	885	1499	1,2	Bimodal	146	626	1319	1,6	Unimodal	71	179	1113	5,8	Bimodal
3,5/3,5	478	896	1502	1,1	Bimodal	188	750	1424	1,9	Bimodal	88	197	394	1,4	Unimodal
3,5/4	407	812	1442	1,3	Bimodal	333	749	1360	1,4	Bimodal	113	272	585	1,5	Unimodal

A: alginato de cálcio; ABV:amido de banana verde; D[0,1]= diâmetro, abaixo do qual, se encontra 10% do total da população de partículas; D[0,5]= diâmetro em que 50% do total da população de partículas está acima e 50% está abaixo do diâmetro indicado; D[0,9]= diâmetro, abaixo do qual, se encontra 90% do total da população de partículas; Span (amplitude de distribuição específica)= $D[0,9]-D[0,1]/D[0,5]$.

Por outro lado, com o aumento da concentração de alginato ou amido de banana verde, obteve-se diâmetro médio de partícula 50% superior aos observados para a concentração mais baixa de polímeros, para todas as concentrações de surfactante (Tabela 17). Como descrito em outros estudos, o tamanho das partículas está diretamente associado à viscosidade e concentração de solução polimérica utilizada para a preparação das microcápsulas (PONCELET et al., 1999; RODRIGUES et al, 2006; SACCHETIN et al., 2010). A redução da concentração de polímeros resulta em menor tamanho de partícula. Entretanto, essa redução pode afetar a resistência mecânica e estabilidade das microcápsulas e, conseqüentemente, a sobrevivência e a viabilidade dos micro-organismos encapsulados (PONCELET, 2001; SULTANA et al, 2000).

Os tamanhos de partículas obtidos no presente trabalho são similares aos observados por Poncelet (2001), que estudou a produção de micropartículas de alginato por emulsificação em óleo vegetal e gelificação interna com carbonato de cálcio, utilizando Span 80 como surfactante. O autor observou tamanhos médios de microesferas de 200 a 1000 μm , com amplo espectro de distribuição de tamanhos associado com baixas concentrações de alginato e carbonato de cálcio. De igual forma, o autor reportou a diminuição do diâmetro médio de partícula de forma assintótica com o aumento da concentração de Span 80. Na encapsulação de bactérias lácticas, Sultana et al. (2000) obtiveram micropartículas de alginato (2%)-amido resistente Hi-maize (2%) com tamanho médio de partícula de 500 a 1000 μm , valores próximos aos obtidos no presente trabalho.

Concentrações de polímeros superiores a 4% dificultaram a manipulação devido ao aumento da viscosidade da suspensão de amido de banana verde e alginato de sódio, sendo necessárias temperaturas superiores a 70 °C para manter a fluidez do gel. O uso de temperatura elevada pode reduzir o número total de células viáveis, afetando de forma considerável a eficiência de encapsulamento final (PONCELET, 2001).

A baixa concentração de polímeros (2% alginato - 2% ABV) associada à concentração de surfactante (0,1%) resultou na formação de microcápsulas de

tamanho igual ou inferior a 400 μm , condição esta; que favoreceria a aplicação em alimentos sem afetar as características sensoriais (textura). Dessa forma, foi selecionada esta condição para dar continuidade aos trabalhos.

4.7.3 Eficiência de encapsulamento

O efeito do processo de emulsificação sobre a retenção e viabilidade celular das bactérias probióticas encapsuladas, em matriz polimérica natural contendo alginato (2%) e amido de banana verde (2%); foi analisado considerando a eficiência de encapsulamento.

Na Tabela 18 são apresentados os valores de eficiência de encapsulamento e viabilidade das células de lactobacilos em co-matriz de alginato de cálcio–ABV.

Tabela 18 – Eficiência de encapsulamento e viabilidade de diferentes estirpes de *Lactobacillus* em matriz de amido de banana verde e alginato.

Estirpes	Alginato de cálcio-ABV			Alginato de cálcio		
	E (%)	Células viáveis (UFC/g)	Tamanho de microcápsula μm	E (%)	Células viáveis (UFC/g)	Tamanho de microcápsula μm
<i>L.acidophilus</i> ATCC 4356	56,8 $\pm$ 2,4	4,60x10 ¹⁰	321	44,4 $\pm$ 2,0	4,14x10 ¹⁰	289
<i>L.plantarum</i> ATCC 8014	39,6 $\pm$ 1,6	3,58x10 ¹⁰	365	31,3 $\pm$ 2,3	3,32x10 ¹⁰	257
<i>L.delbrueckii</i> UFV-H2b20	49,0 $\pm$ 3,1	4,23x10 ¹⁰	388	40,6 $\pm$ 1,5	3,91x10 ¹⁰	214

E: eficiência; ABV:amido de banana verde

O encapsulamento com amido de banana verde promoveu uma eficiência de encapsulamento até 15% superior aos observados em alginato como polímero

encapsulante, o que sugere a formação de um reticulado polimérico mais compacto pela combinação e interação de polímeros.

Os valores obtidos no presente trabalho são similares àqueles reportados por Annan et al. (2008), que estudaram o encapsulamento de *Bifidobacterium adolescentis* em microesferas de alginato-gelatina pelo método de emulsificação em óleo de canola, cujos valores se encontram na faixa de 29,9 a 43,5%. Chávarri et al. (2010) encapsularam *B. bifidum* e *L. gasseri* em alginato de cálcio-quitosana, pelo processo de extrusão, alcançando valores de eficiência de 19,5 a 40,2%. O processo de obtenção de microcápsulas de caseína por emulsificação em óleo de girasol e gelificação promovida por transglutaminase permitiu verificar eficiência de 70 e 93% para *L. paracasei* ssp. *paracasei* F19 e *B. lactis* Bb12, respectivamente (HEIDEBACH; FORST; KULOZIK, 2009). Os altos índices de viabilidade celular observados após encapsulamento reportados por Heidebach et al. (2009), estariam associados com a formação de ligações covalentes que originam estruturas compactas de elevada estabilidade física, permitindo a maior retenção e viabilidade celular.

Os baixos valores de eficiência obtidos no presente trabalho podem estar relacionados com perda de células para a fase contínua (óleo) durante a gelificação do alginato-ABV, e com a sensibilidade do organismo ao estresse do processo de emulsificação, associado à velocidade e ao tipo de rotor utilizado (CAPELA et al., 2007; HEIDEBACH; FORST; KULOZIK, 2009). No entanto, a contagem de células viáveis encapsuladas foi superior a 10^7 UFC/g, valor mínimo estimado como necessário para que as células de bactérias probióticas confirmem benefícios à saúde do hospedeiro (OUWEHAND; SALMINEN, 1998).

4.7.4 Avaliação *in vitro* da sobrevivência de *Lactobacillus* microencapsulado em fluido gástrico simulado (FGS)

Para produzir efeitos benéficos à saúde do hospedeiro, os micro-organismos probióticos devem sobreviver às condições de baixa acidez estomacal e apresentar a

capacidade de colonizar o trato gastro intestinal (KAILASAPATHY, 2002; MUTHUKUMARASAMY; HOLLEY, 2007; SHAH, 2000). Desta forma, avaliou-se a sobrevivência dos lactobacilos microencapsulados em alginato de cálcio-ABV e alginato de cálcio em contacto com fluído gástrico simulado (FGS) contendo pepsina, cujos resultados encontram-se apresentados na Tabela 19.

Observa-se que as microcápsulas produzidas com 2% de alginato de cálcio e 2% de amido de banana verde conferiram resistência às células frente às condições de fluído gástrico simulado, apresentando sobrevivência de 74, 71 e 66% de *L. acidophilus* ATCC 4356, *L. delbrueckii* UFV-H2b20, e *L. plantarum* ATCC 8014, respectivamente. Estes valores representam de 2,0 a 3,0 reduções decimais na viabilidade celular após 120 min de contacto com fluído gástrico simulado, valores baixos se comparados com as células livres, que experimentaram redução de 6,0 log UFC/mL.

Tabela 19 – População de células de *Lactobacillus* microencapsuladas e livres incubadas a 37 °C em fluído gástrico simulado (FGS) em diferentes tempos de incubação

Tratamento	Células viáveis (log UFC/mL)					Sobrevivência (%)
	Tempo de incubação					
	Inicial	30min	60min	90min	120min	
Alginato-ABV						
<i>L. acidophilus</i>	9,09 ± 0,12	8,53 ± 0,04	7,46 ± 0,23	7,04 ± 0,06	6,72 ± 0,51	74
<i>L. plantarum</i>	9,05 ± 0,13	8,54 ± 0,02	7,40 ± 0,05	6,54 ± 0,12	6.00 ± 0,05	66
<i>L. delbrueckii</i>	9,25 ± 0,07	8,83 ± 0,13	8,20 ± 0,90	7,49 ± 0,10	6,59 ± 0,04	71
Alginato						
<i>L. acidophilus</i>	8,95 ± 0,07	7,45 ± 0,06	5,58 ± 0,06	4,73 ± 0,08	3,29 ± 0,11	37
<i>L. plantarum</i>	9,12 ± 0,05	7,17 ± 0,09	5,45 ± 0,06	3,21 ± 0,11	2.49 ± 0,13	27
<i>L. delbrueckii</i>	9,69 ± 0,56	7,87 ± 0,08	5,92 ± 0,24	4,17 ± 0,04	2,87 ± 0,11	30
Célula livre						
<i>L. acidophilus</i>	9,33 ± 0.04	6,85 ± 0,07	5,07 ± 0,09	3,91 ± 0.040	2,69 ± 0,16	29
<i>L. plantarum</i>	8,97 ± 0,06	5,79 ± 0,05	3,93 ± 0,17	2,10 ± 0,10	<1	-
<i>L. delbrueckii</i>	10,02 ± 0,15	6,34 ± 0,14	4,78 ± 0,04	3,93 ± 0,09	2,15 ± 0,05	21

Alginato-ABV (2%,2%); Alginato (2%)

O efeito protetor do alginato-amido de banana verde sobre a população de *L. acidophilus* ATCC 4356 foi superior ao obtido por Sultana et al.(2000), utilizando alginato-amido Hi-Maize nas mesmas concentrações. Estes autores reportaram a redução da população inicial de células de *L. acidophilus* encapsuladas em amido resistente igual ou superior a 5 ciclos log a pH 2,0. Estudos desenvolvidos por Annan et al (2008) utilizando alginato de cálcio e gelatina mostraram redução de 1 a 1,6 log UFC/mL de *Bifidobacterium adolescentis* após 60 min de exposição a fluido gástrico simulado. Estes resultados são similares aos observados no presente trabalho, quando as estirpes de *Lactobacillus* foram microencapsuladas em alginato de cálcio-amido de banana verde.

Por outro lado, a sobrevivência das células microencapsuladas em alginato de cálcio 2% foi igual ou inferior a 37%. Diferentes estudos *in vitro* mostram que o alginato de cálcio confere resistência a células bacterianas frente às condições de baixo pH e presença de sais biliares, permitindo sobrevivência superior a 50% (FÁVARO-TRINDADE; GROSSO, 2000; KIM et al., 2008; SABIKHI et al., 2010). Entretanto, outros estudos reportam baixa capacidade de proteção associada principalmente a concentrações de alginato de cálcio inferiores a 3% (m/v), que proporciona baixa resistência à passagem de íons H^+ , como consequência da menor disponibilidade de unidades poliméricas (menos sítios de ligação com Ca^{+2}) por unidade de volume, afetando a espessura de parede e porosidade da partícula (FÁVARO-TRINDADE; GROSSO, 2000; PONCELET, 2001).

4.7.5 Estabilidade das bactérias encapsuladas e armazenadas a 4 °C

A resistência dos micro-organismos às condições ambientais de armazenagem representa um fator preponderante para a seleção do material encapsulante, visando assegurar a maior viabilidade durante o período de estocagem ou vida de prateleira.

Desta forma, estudou-se a viabilidade dos micro-organismos encapsulados durante estocagem a 4 °C e os resultados se encontram apresentados na Figura 26.

Nota-se que após 7 dias de armazenagem a 4 °C não houve perda considerável da viabilidade celular (<1 log UFC/mL), tanto para as células microencapsuladas em alginato de cálcio-ABV quanto para as células livres.

Figura 26 – População de estirpes de *Lactobacillus* armazenadas a temperatura de refrigeração (4 °C). Células microencapsuladas em alginato de cálcio – amido de banana verde (símbolo cheio), células livres (símbolo vazio). *L. acidophilus* ATCC 4356 (●,○); *L. plantarum* ATCC 8014 (■,□,); *L. delbrueckii* UFV-H2b20 (▲,△)

Após 28 dias de armazenagem, a contagem de células microencapsuladas foi de 8,87; 8,80 e 8,36 log UFC/mL para *L. acidophilus* ATCC 4356, *L. delbrueckii* UFV-H2b20 e *L. plantarum* ATCC 8014, respectivamente, valores que representam sobrevivência superior a 88%. Entretanto, observa-se que a população de células

livres apresenta sobrevivência inferior a 62%, o que representa 3,53 a 4,91 reduções decimais na viabilidade celular, após 28 dias de armazenagem a 4 °C.

Chavarri et al. (2010) obtiveram resultados inferiores no encapsulamento de bactérias probióticas em matriz de alginato de cálcio-quitosana, após 28 dias de armazenamento a 4 °C. Estes autores reportaram contagens de células de 7,48 e 7,13 log UFC/mL, que representam sobrevivência de 78 e 76% das células de *L. gasseri* e *B. bifidum*, respectivamente.

Os resultados do presente trabalho mostram a potencialidade da matriz alginato de cálcio - amido de banana verde como material encapsulante na proteção de bactérias probióticas. Na literatura consultada não foram encontradas referências do uso de amido de banana verde para o encapsulamento de probióticos.

5 CONCLUSÕES

O tratamento do glicerol de biodiesel de óleo de soja com diferentes ácidos concentrados demonstrou eficácia na remoção de ácidos graxos combinados na forma de sabão.

O ácido fosfórico utilizado no tratamento do glicerol permitiu a maior remoção de impurezas e obtenção de uma mistura com concentração de glicerol de 964 g/L (pH final de 4,0).

A análise de íons metálicos confirmou a ausência de metais pesados e a presença de potássio, fosforo e nitrogênio no glicerol.

Treze estirpes de *Lactobacillus* estudadas apresentaram capacidade de crescimento em meio contendo glicerol derivado da produção de biodiesel.

Os cultivos em meio contendo glicerol tratado revelaram a maior capacidade de crescimento de *Lactobacillus delbrueckii* UFV-H2b20 e *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356.

Os maiores rendimentos ($Y_{X/S}$) observados correspondem a cultivos em meio MRS modificado contendo glicerol tratado com ácido fosfórico.

O extrato de farelo de arroz favoreceu o crescimento de todas as estirpes estudadas nos meios contendo glicerol tratado, porém, em menor grau quando comparado com meio formulado a base de MRS.

Os estudos de cinética de crescimento em frascos Erlenmeyer revelaram a influência do pH no crescimento das espécies de bactérias estudadas, assim como a composição do meio de cultivo.

Foi identificada a enzima glicerol quinase (EC.2.7.1.30) como o principal biocatalisador envolvido na assimilação de glicerol nas bactérias probióticas *L. plantarum* ATCC 8014, *L. delbrueckii* UFV-H2b20 e *L. acidophilus* ATCC 4356.

Detectou-se a atividade catalítica de enzima glicerol desidrogenase (EC 1.1.1.72, NADPH dependente) nos extratos celulares das três estirpes avaliadas.

A concentração de surfactante (Polisorbato 80) e polímeros encapsulantes (alginato-amido de banana verde) interferiu no diâmetro e distribuição de tamanho de partículas, assim como na morfologia das microcápsulas obtidas por emulsificação em óleo de soja e gelificação ionotrópica com cloreto de cálcio.

O encapsulamento de células de *Lactobacillus* probióticos em alginato-amido de banana verde permitiu a sobrevivência das células encapsuladas superior a 65%, demonstrando a capacidade protetora da mistura polimérica na presença de fluído gástrico simulado.

Em condições de armazenagem a 4 °C, a sobrevivência das células de *Lactobacillus* probióticos microencapsuladas em alginato-amido de banana verde foi superior a 88%.

6 SUGESTÕES

Avaliar o crescimento das bactérias probióticas selecionadas sob condições controladas de aeração em reator de bancada.

Avaliar a produção de biomassa e biomoléculas produzidas por co-fermentação de glicerol com outros açúcares.

Estudar a melhor condição para a síntese das enzimas envolvidas na assimilação de glicerol nas estirpes selecionadas e sua caracterização.

Avaliar a utilização de matrizes poliméricas de amido de banana verde junto a outros polímeros naturais e sua interação na obtenção de microcápsulas para aumentar a sobrevivência das bactérias probióticas.

REFERÊNCIAS

- ADHIKARI, K., MUSTAPHA, A., GRUN, I.V., AND FERNANDO, L Viability of microencapsulated bifidobacteria in set yoghurt during refrigerated storage. **Journal of Dairy Science**, v.83, p.1946-1951, 2000.
- AINSLEY. R.A; REID, A.; VUILLEMARD, J.C.; BRITTEN, M. ; ARCAND, Y.; FARNWORTH, E.; CHAMPAGNE, C.P. Microentrapment of probiotic bacteria in a Ca^{2+} -induced whey protein gel and effects on their viability in a dynamic gastro-intestinal model. **Journal of Microencapsulation**, v. 22, n.6, p.603-619, 2005.
- AGOSTINHO, S.M.M. **Comportamento do *Lactobacillus acidophilus* H2b20 sob condições do trato digestivo in vitro e efeito de métodos de preservação em sua atividade**. 1988. 10p. Dissertação(Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1988.
- ALTERMANN, E.; RUSSELL, W.M.; AZCARATE-ERIL, M.A.; BARRANGAOU, R.; BUCK, B.L.; McAULIFFE, O.; SOUTHER, N., DOBSON, A.; DUONG, T.; CALLANAN, M.; LICK, S.; HAMRICK, A.; CANO, R.; KLAENHAMMER, R.T. Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM. **Proceeding of National Academy of Science(PNAS)**, v. 102, p. 3906-3912, 2005.
- ALVAREZ, M.F; MEDINA, R.; PASTERIS, S.; STRASSER DE SAAD, A.M.; SESMA, F. Glycerol Metabolism of *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469: Cloning and Expression of Two Glycerol Kinase Genes. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v.7, p.170-181, 2004.
- ANDRE, A., DIAMANTOPOULOU, P., PHILIPPOUSSIS, A., SARRIS, D., KOMAITIS, M., PAPANILOLAOU, S. Biotechnological conversions of bio-diesel derived waste glycerol into added-value compounds by higher fungi: production of biomass, single cell oil and oxalic acid. **Industrial Crops and Products**, v.31, p.407-416, 2010.
- ANNAN, N.T.; BORZA, A.D.; HANSEN, L.T. Encapsulation in alginate-coated gelatin microspheres improves survival of the probiotic *Bifidobacterium adolescentis* 15703T during exposure to simulated gastro-intestinal conditions. **Food Research International**, v. 41, p. 184-193, 2008.

ANP – Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis – Boletim Mensal de Biodiesel, Agosto-2011. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br>>. Acesso em: 10 set. 2012.

ANSELL, R.; GRANATH, K.; HOHMANN, S.; THEVELEIN, J.M.; ADLER, L. The two isoenzymes for yeast NAD⁺-dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase encoded by *GPD1* and *GPD2* have distinct roles in osmoadaption and redox regulation. **EMBO Journal**, v.16, p.2179-2187, 1997.

ASAD-UR-REHMAN, A.; SAMAN WIJESEKARA R.G, NOMURA, N.; SATO, S.; MATSUMURA, M. Pre-treatment and utilization of raw glycerol from sunflower oil biodiesel for growth and 1,3-propanediol production by *Clostridium butyricum* **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.83, n.7, p.1072-1080, 2008

ARAGON, C.C.; FERREIRA-DIAS, S.; LUCCA GATTAS, E.A.; PERES, M.F.S. Characterization of glycerol kinase from baker's yeast: Response surface modeling of the enzymatic reaction. **Journal of Molecular Catalysis B**, v.52-53, p. 113-120, 2008.

ARAÚJO, E.A et al. Viabilidade de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 em leite fermentado e queijo tipo cottage após condições de estresse. **Revista do instituto de laticínios Cândido Tostes**, v.62, n.357, p. 119-123, 2007.

ASP, N-G.; AMELSVOORT, J.M.M.; HAUTVAST, J.G.A.J. Nutritional implications of resistant starch. **Nutrition Research Reviews**, v. 9, p.1-31, 1996.

AXELSSON, L. Lactic acid bacteria: Classification and Physiology. In: Lactic Acid Bacteria : Microbiological and Functional Aspects, 3rd ed. New York: Editores Salminen, Wright, Ouwehand, New York, 2004.

AXELSSON, L.; CHUNG, T.; DOBROGODZ , W.; LINDGREN, S. Production of a broad spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri*. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v.2, n.2, p. 131-136, 1989.

BARBIRATO, F.; SOUCAILLE, F.; BORIES, A. Physiologic Mechanisms Involved in Accumulation of 3-Hydroxypropionaldehyde during Fermentation of Glycerol by *Enterobacter agglomerans*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, p.4405-4409, 1996.

BARBOSA, C.R. **Avaliação do glicerol proveniente da produção de biodiesel como substrato para a produção de endotoxinas por *Bacillus thuringiensis* var *israelensis***. 2009. 133p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial)- Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2009.

BERNARDEAU, M.; VERNOUX, J.P.; HENRI-DUBERNET, S.; GUEGUEN, M. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus. **International Journal of Food Microbiology**, v.125, p.278-285, 2008.

BILGEN, S.; KELES, S.; KAYGUSUZ, A.; SARI, A.; KAYGUSUZ, K. Global warming and renewable energy sources for sustainable development: A case study in Turkey. **Renew Sustainable Energy Reviews**, v.12, n.2, p. 372-396, 2008.

BIODIESELBRASIL. **Biodiesel inunda mercado no país e derruba preços**. Disponível em: <<http://www.biodieselbr.com/noticias/biodiesel/glicerina-biodiesel-inunda-mercado-pais-derruba-precos-02-05-07.htm>>. Acesso em: 2jun. 2011

BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. **Manual de laboratório de química de alimentos**. São Paulo: Varela, 2003. 134 p.

BRADFORD, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

BRENDA Enzyme Database. Disponível em: <<http://www.brenda-enzymes.org/>> Acesso em: 15 mar. 2009.

BRISSON, D.; VOHL, M.C.; ST-PIERRE, J.; HUDSON, T.J.; GAUDET, D.; Glycerol: A neglected variable in metabolic processes? **Bioessays**, v.23, p.534-542, 2001.

BROOIJMANS, R. J., POOLMAN, B.; SCHUURMAN-WOLTERS, G.K.; DE VOS, W.M.; HUGENHOLTZ, J. Generation of a membrane potential by *Lactococcus lactis* through aerobic electron transport. **Journal of Bacteriology**, v.189, p.5203-5209, 2007.

CANTONI, C.; MOLNAR, M.R. Investigations on the glycerol metabolism of lactobacilli. **Journal of Applied Bacteriology**, v.30, n.1, p.197-205, 1967

CAPELA, P.; HAY, T. K. C.; SHAH, N. P. Effect of homogenisation on bead size and survival of encapsulated probiotic bacteria. **Food Research International**, v.40, n.1, p.1261-1269, 2007.

CARMO, A.P. **Produção de cultura DVS (Direct Vat Set) para *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 cultivado em soro de queijo Minas Frescal**. 2006. 66 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade de Viçosa, Viçosa, 2006.

CANETTIERI, E. V.; ALMEIDA E SILVA, J. B. FELIPE, M. G. A. Application of factorial design to the study of xylitol production from eucalyptus hemicellulosic hydrolysate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.94, p.159-168, 2001.

CARVALHEIRO, F.; MONIZ, P.; DUARTE, L.C.; ESTEVES, M.P.; GÍRIO, F.M. Mannitol production by lactic acid bacteria grown in supplemented carob syrup. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, p. 221-227, 2011.

CASULA, G.; CUTTING, S.M. *Bacillus* Probiotics: Spore Germination in the Gastrointestinal Tract. **Applied and Environmental Microbiology**, n.68, p.2344-2352, 2002.

CAVALHEIRO, J., ALMEIDA, M., GRANDFILS, C., FONSECA, M. Poly (3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* using waste glycerol. **Process Biochemistry**, v.44, p.509-515, 2009.

CHAMPAGNE, C.P.; FUSTIER, P. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. **Current Opinon in Biotechnology**, v.18, p.184-190, 2007.

CHAPLIN, M. **Alginate Water structure and science**. Disponível em: <http://lsbu.ac.uk/water/hyalg.html>. Acesso em: 10 jul. 2011.

CHATTOPADHYAYA, S.; SINGHAL, R.S.; KULKARNI, P.R. Oxidised starch as gum arabic substitute for encapsulation of flavours. **Carbohydrate Polymers**, v.37, p.143-144, 1998.

CHATZIFRAGKOU, A.; MAKRI, A.; BELKA, A.; BELLOU, S.; MAVROU, M.; MASTORIDOU, M.; MYSTRIOTI, P.; ONJARO, G.; AGGELIS, G.; PAPANIKOLAOU, S. Biotechnological conversions of biodiesel derived waste glycerol by yeast and fungi species. **Energy**, v. 36, p.1097-1108, 2001.

CHÁVARRI, M.; MARAÑÓN, I.; ARES, R.; IBAÑEZ, F.C.; MARZO, F.; VILLARÁN, M.C. Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improve survival in simulated gastro-intestinal conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v.142, p. 185-189, 2010.

CHENG, K-K.; ZHANG, J-A.; LIU, D-H.; SUN, Y.; LIU, H-J.; YANG, M-D.; XU J-M. Pilot-scale production of 1,3 - propanediol using *Klebsiella pneumoniae*. **Process Biochemistry**, v.42, p.740-744, 2007.

CHOI, S.S.; KIM, Y.; HAN, K.S.; YOU, S.; OH, S.; KIM, S.H. Effects of *Lactobacillus* strains on cancer cell proliferation and oxidative stress in vitro. **Letters in Applied Microbiology**, v.42, p.452-458, 2006.

CLAISSE, O.; LONVAUD-FUNEL, A. Assimilation of glycerol by a strain of *Lactobacillus collinoides* isolated from cider. **Food Microbiology**, v.17, p.513-519, 2000.

CLARET, C.; BORIES, A.; SOUCAILLE, P. Glycerol inhibition of growth and dihydroxyacetone production by *Gluconobacter oxydans*. **Current Microbiology**, v.25, p.149-155, 1992.

COELHO, M.D.G. **Avaliação do uso de probióticos no combate a infecção causada por Ancylostomidae em cães (*Canis familiaris*) naturalmente infectados**. 2010. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2010.

CONDON, S. Responses of lactic acid bacteria to oxygen. **FEMS Microbiology Reviews**, v.46, p.269-280, 1987.

CORDENUNSI, B.R.; LAJOLO, F.M. Starch breakdown during banana ripening: sucrose synthase and sucrose phosphate synthase. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.43, p.347-351, 1995.

COUTINHO, T.S. **Avaliação do efeito de microrganismos probióticos sobre *Cryptosporidium parvum* em camundongos C57BL/6 imunossuprimidos**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2008.

CUMMINGS, J.H.; ENGLYST, H.N. Measurement of starch fermentation in the human large intestine. **Canadian Journal of Physiological Pharmacology**, v.60, p.121-129, 1991.

DABROCK, B.; BAHL, H.; GOTTSCHALK, G. Parameters affecting solvent production by *Clostridium pasteurianum*. **Applied Environment and Microbiology**, v.58, p.1233-1239, 1992.

DANIEL, R.; STUERTZ, K.; GOTTSCHALK, G. Biochemical and molecular characterization of the oxidative branch of glycerol utilization by *Citrobacter freundii*. **Journal of Bacteriology**, v. 177, p.4392-4401, 1995.

DASARI, M.A.; KIATSIMKUL, P.P.; SUTTERLIN, W.R.; SUPPES, G.J. Low-pressure hydrogenolysis of glycerol to propylene glycol. **Applied Catalist A-Gen**, v.28, p.225-233, 2005.

DE ANGELIS, M.; BINI, L.; PALLINI, V.; COCCONCELLI, P.S.; GOBBETTI, M. The acid-stress response in *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1. **Microbiology**, v.147, p.1863-1873, 2001.

DE VOS, P. FAAS, M.M.; SPASOJEVIC, M.; SKKEMA, J. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. **Interantional Dairy Journal**, v.20, p.292-302, 2010.

DELLAGLIO, F.; FELIS, G.E.; GERMOND, J-E. Should names reflect the evolution of bacterial species?. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.54, p.279-281, 2004.

DEUTSCHER, J.; SAUERWALD, H. Stimulation of dihydroxyacetone kinase and glycerol kinase activity in *Streptococcus faecalis* by Phosphoenolpyruvate-dependent phosphorylation catalyzed by Enzyme I and HPr of the phosphotransferase system. **Journal of Bacteriology**, v.166, n.3, p.829-836, 1986.

DIANAWATI, D.; SHAH, N.P. Enzyme stability of microencapsulated *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* Bb 12 after freeze drying and during storage in low water activity at room temperature. **Journal of Food Science**, v.76, n.6, p.M464-M471, 2011.

DILLIS, S.S.; APPERSON, A.; SCHMIDT, M.R.; SAIER, M.H. Carbohydrate transport in bacteria. **Microbiology Reviews**, v.44, p.385-418, 1980.

DING, W.K.; SHAH, N.P. Effect of various encapsulating materials on the stability of probiotics bacteria. **Journal of Food Science**, v.72, p.M100-M107, 2009.

DING, W.K.; SHAH, N.P. An improved method of microencapsulation of probiotic bacteria for stability in acid and bile conditions during storages. **Journal of Food Science**, v.74, n.2, p. M54-M61, 2009.

DOANE, W. M. Encapsulation of pesticides in starch by extrusion. **Industrial Crops and Products**, v.1, p.83-87, 1992.

DONATI, I.; HOLTAN, S.; MORCH, Y.A.; BORGOGNHA, M.; DENTINI, M.; SKJAK-BRAEK, K. New hypothesis on the role of alternating sequences in calcium-alginate gels. **Biomacromolecules**, v.6, p.1031-1040, 2005.

EL-OSTA, Y.G.A.; HILLIER, A.J.; DOBOS, M. Construction of a combined physical and genetic map of the chromosome of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 and Characterization of the rRNA operons. **Microbiology**, v.151, p.875-892, 2005.

ENGLYST, H.N.; KINGMAN, S.M.; CUMMINGS, J.H. Classification and measurement of nutritionally important starch fractions. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.46 (s Suppl), p. S33-S 50, 1992.

ETHIER, S.; WOISARD, K.; VAUGHAN, D.; WEN, Z. Continuous culture of the microalgae *Schizochytrium limacinum* on biodiesel-derived crude glycerol for producing docosahexaenoic acid. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 88-93, 2011.

FAISANT, N.; GALLANT, D.J.; BOUCHET, B.; CHAMP, M. Banana starch breakdown in the human small intestine studied by electron microscopy. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 49, p.98-104, 1995a.

FAISANT, N.; GALLANT, D.J.; BOUCHET, B.; CHAMP, M. Composition and functional properties of banana flour from different varieties. **Starch**, v.52, 63-68, 1995b.

FAO/WHO - Joint FAO/WHO Expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. 2001. Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf>. Acesso em 01 abr. 2009

FAO/WHO. **Legal Notice N. 66/2003**. Heavy metals regulations. Disponível em: <<http://faolex.fao.org/docs/pdf/eri42405.pdf>>. Acesso em: 12 dez. 2010

FÁVARO-TRINDADE, C.S.; GROSSO, C.R.F. Microencapsulation of *L.acidophilus* (La-05) and *B. lactis* (Bb-12) and evaluation of their survival at the pH values of the stomach and in bile. **Journal of Microencapsulation**, v. 19, n.4, p.485-493, 2002.

FÁVARO-TRINDADE, C.S.; GROSSO, C.R.F. The effect of the immobilisation of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* in alginate on their tolerance to gastro-intestinal secretions. **Michwissenschaft**, v.55; p.496-499, 2000.

FERAIN, T.; SCHANCK, K.; DELCOUR, J. ¹³ C nuclear magnetic resonance analysis of glucose and citrate end products in an *ldhL-ldhD* double knockout strains of *Lactobacillus plantarum*. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 24, p.7311-7315, 1996.

FERREIRA, A.B. **Estudo da resistência a antimicrobianos em *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 submetido a condições de estresse**. 2006. 53p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

FLORESTA, F.A. **Análise da Região Codificadora de rRNA de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20**: Filogenia e Presença de Sequência de Inserção Putativa. 2003. 54p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade de Viçosa, Viçosa, 2003.

FUENTES-ZARAGOZA, E.; SÁNCHEZ-ZAPATA, EL.; SENDRA, E.; SAYAS E.; NAVARRO, C.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; PÉREZ-ALVAREZ, J.A. Resistant starch as prebiotic: A review. **Starch**, v. 63, p 406-415, 2011.

FUKUDA, H.; KONDO, A.; NODA, I. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.92, p.405-416, 2001.

FUSSATI, P.; PRENCIPE, L. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. **Clinical Chemistry**, v. 28, p. 2077-2080, 1982.

GAZZONI, D. L. **As políticas públicas de biocombustíveis e o mercado de oleaginosas**. Disponível em: <<http://www.iea.usp.br/iea/online/midioteca/politicaspublicasgazzoni.pdf>>. Acesso em: 10 set. 2011.

GILLILAND, S.E. Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Review**, v. 87, p. 175-188, 1990.

GONÇALVES, M.M. **Desenvolvimento e caracterização de queijo tipo quark simbiótico**. 2009. 76p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade de Viçosa, Viçosa, 2009.

GONZÁLEZ-PAJUELO, M.; MEYNIAL-SALLES, I.; MENDES, F.; ANDRADE J.C.; VASCONCELOS, I.; SOUCAILLE, P, Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* for the industrial production of 1,3-propanediol from glycerol. **Metabolic Engineering**.v.7, p.329-336, 2005.

GOTZ, F. SEDEWITZ, B.; ELSTNER, E.F. Oxygen utilization by *Lactobacillus plantarum*. I. Oxygen consuming reactions. **Archives of Microbiology**, v.125, p.209-214, 1980.

GODERSKA, K.; CZARNECKI, Z. Characterization of selected strains from *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum*. **African Journal of Microbiology Research**, v.1, n.6, p.65-78, 2007.

GOTZ, F.; SEDEWITZ, B.; ELSTNER, E.F. Oxygen utilization by *Lactobacillus plantarum* II. Superoxide and superoxide dismutation. **Archives of Microbiology**, v.125, 215-220, 1980.

GREHK, T.M.; BERGER, R.; BEXEL, U. Investigation of the drying process of linseed oil using FTIR and ToF-SIMS. **Journal of Physics: Conference Series**, v.100, p.1-4, 2008.

GRUNNET, N.; LUNDQUIST, F. Kinetics of glycerol kinases from mammalian liver and *Candida mycoderma*. **European Journal of Biochemistry**, v.3, p.78-84, 1967.

HAYASHI, S-I; LIN, E.C.C. Purification and properties of glycerol kinase from *Escherichia coli*. **The Journal of Biological Chemistry**, v.242, n.5, p.1030-1035, 1967.

HEIDEBACH, T.; FORST, P.; KULOZIK, U. Transglutaminase-induced caseinate gelation for the microencapsulation of probiotics cells. **International Dairy Journal**, v.19, p. 77-84, 2009.

HICKEY, M.W.; HILLIER, A.J.; JAGO, G.R. Metabolism of pyruvate and citrate in lactobacilli. **Australian Journal of Biological Sciences**, v. 36, p. 487-496, 1983.

HOLMBERG, C.; BEIJER, L.; RUTBERG, B.; RUTBERG, L. Glycerol catabolism in *Bacillus subtilis*: nucleotide sequence of the encoding glycerol kinase (glpK) and glycerol-3-phosphate dehydrogenase. **Journal of General Microbiology**, v.136, p.2367-2375, 1990.

HOLTMAN, C.K.; PAWLYK, A.C.; MEADOW, N.D.; PETTIGREW, D.W. Reverse genetics of *Escherichia coli* glycerol kinase allosteric regulation and glucose control of glycerol kinase utilization in vivo. **Journal of Bacteriology**, v.183, n.11, p.3336-3344, 2001.

HOLZAPFEL, W.H. et al. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.73, n.2, p.365-373, 2001.

HOMAYOUNI, A.; AZIZI, A.; EHSANI, M.R.; YARMAND, M.S.; RAZAVI, S.H. Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of synbiotic ice cream. **Food Chemistry**, v. 11, p.50-55, 2008.

HU, H., WOOD, T. An evolved *Escherichia coli* strain for producing hydrogen and ethanol from glycerol. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.391, p.1033-1038, 2010.

HUANG, H.-S.; YOSHIDA, T.; MENG, Y.; KABASHIMA, T.; ITO, K.; NISHIYA, Y.; KAWAMURA, Y.; YOSHIMOTO, T. Purification and characterization of thermostable glycerol kinase from *Thermus flavus*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.83, n.4, p.328-332, 1997.

HUANG, Y.; ZHENG, Y. The probiotic *Lactobacillus acidophilus* reduces cholesterol absorption through the down-regulation of Niemann-Pick C1-like in Caco-2 cells. **British Journal of Nutrition**, v. 103, 473-478, 2010.

HUANG, Y.; WANG, J.; CHENG, J.W.; ZHENG, Y. The hypocholesterolaemic effects of *Lactobacillus acidophilus* ATTC 4356 in rats are mediated by the down-regulation of Niemann-Pick C1-Like 1. **British Journal of Nutrition**, v. 104, p807-812, 2010.

HUTKINS, R.W.; NANNEN, N.L. pH homeostasis in Lactic Acid bacteria. **Journal of Dairy Science**. v.76, p.2354-2365, 1993.

IBGE. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. Fevereiro de 2011. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201102.pdf> Acesso em: 17 abr. 2012.

ITO, T.; NAKASHIMADA, Y.; SENBA, K.; MATSUI, T.; NISHIO, M. Hydrogen and Ethanol Production from Glycerol-Containing Wastes Discharged after Biodiesel Manufacturing Process. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.100, n.3, p.260-265, 2005.

IVANOVA, E.; CHIPEVA, V.; IVANOVA, I. Encapsulation of lactic acid bacteria in calcium alginate beads for bacteriocin production. **Journal of Culture Collections**, v.3, 2000-2002, p.53-58, 2002.

IYER, C.; KAILASAPATHY, K. Prebiotics on increasing the viability of encapsulated bacteria under in vitro acidic and bile salt conditions and in yoghurt. **Journal of Food Science**, v.70, p. m18-23, 2005.

IZARIO FILHO, H.J. **Determinação de Co, Cu, Fe, Mn e Mo em tântalo com alta pureza usando espectrometria por absorção atômica em forno de grafite**. 1999. 170f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.

JANKOWSKI, T.; ZIELINSKA, M.; WYSAKOWSKA, A. Encapsulation of lactic acid bacteria with alginate/starch capsules. **Biotechnology Techniques**, v.11, n.1, p.31-34, 1997.

JENKINS, J.K.; COURTNEY, P.D. *Lactobacillus* growth and membrane composition in the presence of linoleic or conjugated linoleic acid. **Canadian Journal of Microbiology**, v.49, p.51-57, 2003.

JUAREZ-GARCIA, E., AGAMA-ACEVEDO, E., SAYAGO-AYERDI, S.G., RODRIGUEZ -AMBRIZ, S.L. AND BELLO-PEREZ, L.A. Composition, digestibility and application in breadmaking of banana flour. **Plant Foods for Human Nutrition**, v.61, p.131-137, 2006.

JUNG, H., JEONG, H., LEE, O., PARK, G., KIM, K., PARK, H. Influence of glycerol on production and structural-physical properties of cellulose from *Acetobacter* sp. V6 cultured in shake flasks. **Bioresource Technology**, v.101, p.3602-3608, 2010.

KAILASAPATHY, K. M. Microencapsulation of probiotic bacteria: Technology and potential applications. **Current Issues in Intestinal Microbiology**, v.3, p.39-48, 2002.

KAILASAPATHY, K. Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt. **LWT-Food Science and Technology**, v.39, n.10, p.1221-1227, 2006.

KANDLER, O. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.49, p.209-224, 1983

KANDLER, O.; WEISS, N. Regular, nonsporing Gram-positive rods, p. 1208-1260. In: Sneath, P.H.A.; Mair, N.S.; Sharpe, M.E; Holt, J.G (ed). **Bergey's manual of systematic bacteriology**, Baltimore: Williams and Wilkins, 1986, v.2

KANEHISA, M.; GOTO, S. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. **Nucleic Acids Research**, v.28, n.1, p.27-30, 2000.

KASK, S.; ADAMBERG, K.; ORLOWSKI, A.; VOGENSEN, F.K.; MOLLER, P.L.; ARDO, Y.; PAALME, T. Physiological properties of *Lactobacillus paracasei*, *L. danicus* and *L. curvatus* strains isolated from Estonian semi-hard cheese. **Food Research International**, v.36, p.1037-1046, 2003.

KASHKET, E.R. Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 46, p.233-244, 1987.

KEGG–**Kyoto Encyclopedia of genes and genoma**. Disponível em <<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>> Acesso em: 15 jun. 2010.

KELLER, R.J. The Sigma Library of FT-IR Spectra. Ed. I, v.1, Sigma Chemical Inc, USA, 1986.

KELLER, R.J. **The sigma library of FT-IR spectra**. St. Louis: Sigma Chemical Inc, USA, 1986, v.1.

KIM, S.J.; CHO, S.Y.; KIM, S.H.; SONG, O.J.; SHIN, S.; CHA, D.S.; PARK, H.J. Effect of microencapsulation on viability and other characteristics in *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. **LWT–Food Science and Technology**, v.41, p.493-500, 2008.

KLEEREBEZEM, M.; BOEKHORST, J.; VAN KRANENBURG, R.; MOLENAAR, D.; KUIPERS, O.; LEER, R.; TARCHINI, R.; PETERS, S.A.; SANDBRINK, H.M.; FIER, M. W. E. J.; STIEKEMA, W.; LANKHORST, R.M.K.; BRON, P.A.; HOFFER, S. M.; NIEROP GROOT, M.N.; KERKHOVEN, R.; VRIES, M.; URSING, B.; de VOS, W.M.; SIEZEN, R.J. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States**, v.100, p.1990-1995, 2003.

KODICEK, E.; WORDEN, A.N. The effect of unsaturated fatty acids on *Lactobacillus helveticus* and other Gram-positive micro-organisms. **Biochemical Journal**, v.39, n.1, p.78-85, 1945.

KRÁLOVÁ, I.; RIGDEN, D.J.; OPPERDOES, F.R.; MICHELS, P.A.M. Glycerol kinase of *Trypanosoma brucei*: cloning, molecular characterization and mutagenesis. **European Journal of Biochemistry**, v.267, p.2323-2333, 2000.

KRASAEKOOPT, W.; BHANDARI, B.; DEETH, H. The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotics bacteria. **International Dairy Journal**, v.14, p.737-743, 2004.

KRASAEKOOPT, W.; BHANDARI, B.; DEETH, H. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. **International Dairy Journal**, v.14, p.3-13, 2003

LAGES, F.; SILVA-GRAÇA, M.; LUCAS, C. Active glycerol uptake is a mechanism underlying halotolerance in yeasts : a study of 42 species. **Microbiology-SGM**, v.145, p.2577-2586, 1999.

LANDS, W.E. M.; SACKS, R.W.; SAUTER, J. Selective effects of fatty acids upon cell growth and metabolic regulation. **Lipids**, v.13, n.12, p.878-886, 1979.

LASH, B.W.; MYSLIWIEC, T.H.; GOURAMA, H. Detection and partial characterization of a broad-range bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014. **Food Microbiology**, v.22, p.199-204, 2005.

LAU, T.T.; WANG, C.; WANG, D-A. Cell delivery with genipin crosslinked gelatin microspheres in hydrogel/microcarrier composite. **Composites Science and Technology**, v.70, p.1909-1914, 2010.

LEANDRO, E.S et al. Sobrevivência de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 em sorvete. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.61, n.351, p.300-303, 2006.

LEE, L.G.; WHITESIDES, G.M. Preparation of optically active 1,2-diols and α -hydroxy ketones using glycerol dehydrogenase as catalyst: Limits to enzyme-catalyzed synthesis due to noncompetitive and mixed inhibition by product. **Journal of Organic Chemistry**, v.51, n.1, p.25-36, 1986.

LIEPINS, J; KUORELAHTI, S; PENTTILA, M; RICHARD, P. Enzymes for the NADPH-dependent reduction of dihydroxyacetone and D-glyceraldehyde and L-glyceraldehyde in the mould *Hypocrea jecorina*. **FEBS Journal**, v 273, p.4229- 4234, 2006.

LILLY, D.M.; STILLWELL, R.H. Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. **Science**, v.12, n.147, p.747-748, 1965.

LIMA, D.O.; SOGABE, V.P.; CALARGE, T.C. Mercado do biodiesel: um panorama mundial. **Espacios**, v.29, p.1-4, 2008.

LIN, E.C.C.; MAGASANIK, B. The activation of glycerol dehydrogenase from *Aerobacter aerogenes* by monovalent cations. **Journal of Biological Chemistry**, v.232, p.1820-1823, 1960.

LIN, M.Y.; YEN C.L. Antioxidative ability of lactic acid Bacteria. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.47, p.1460-1466, 1999.

LIN, M.Y.; CHANG, F.J. Antioxidative effect of instestinal bacteria *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 and *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. **Digestive Diseases and Sciences**, v.45, n.8, p.1617-1622, 2000.

LIN, M.Y.; CHEN, T.W. Reduction of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 em culture broth. **Journal of Food and Drug Analysis**, v.8, p.97-102, 2000.

LIU, W.Z.; FABER, R.; FEESE, M.; REMINGTON, S.J.; PETTIGREW, D.W. Escherichia coli glycerol kinase: role of a tetramer interface in regulation by fructose 1,6-bisphosphate and phosphotransferase system regulatory protein III glc. **Biochemistry**, v.33, p.10120-10126, 1994.

LOBO, A.R.; LEMOS-SILVA, G.M. Resistant starch and its physicochemical properties. **Revista de Nutrição-Campinas**, v.16, n.2, p.219-226, 2003

LORCA, G.L.; FONT DE VALDEZ, G.A. Low- pH- inducible, stationary-phase acid tolerant response in *Lactobacillus acidophilus* CRL 639. **Current Microbiology**, v.42, p.21-25, 2000.

LORCA, G.L.; RAYA, R.R.; TARANTO, M.P.; VALDEZ, G.F (1998) Adaptive acid tolerance response in *Lactobacillus acidophilus*. **Cryobiology**, v.39, p.144-149, 1998.

LORQUET, F.; GOFFIN, P.; MUSCARIELLO, L.; BAUDRY, J-B.; LADERO, V.; SACCO, M.; KLEEREBEZEM, M.; HOLS, P. Characterization and functional analysis of the *poxB* Gene, which encodes pyruvate oxidase in *Lactobacillus plantarum*. **Journal of Bacteriology**, v.186, n.12, p.3749-3759, 2004

LÜTHI-PENG, Q.; DILEME, F.B.; PUHAN, Z. Effect of glucose on glycerol bioconversion by *Lactobacillus reuteri*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.59, p.289-296, 2002.

LUYTEN, K.; ALBERTYN, J.; SKIBBE, W.F.; PRIOR, B.A.; RAMOS, J.; THEVELEIN J.M.; HOHMANN, S. Fps1, a yeast member of the MIP family of channel proteins, is a facilitator for glycerol uptake and efflux and is inactive under osmotic stress. **EMBO Journal**, v.14, p.1360-71, 1995.

MACFARLANE, G.T.; ENGLYST, H.N. Starch utilization by the human large intestine microflora. **Journal of Applied Bacteriology**, v.60, p.195-201, 1986.

MAKAROVA, K.; SLESAREV, A.; WOLF, Y.; SOROKIN, A.; MIRKIN, B.; KOONIN, E.; PAVLOV, A.; PAVLOVA, N.; KARAMYCHEV, V.; POLOUCHINE, N.; SHAKHOVA, V.; GRIGORIEV, I.; LOU, Y.; ROHKSAR, D.; LUCAS, S.; HUANG, K.; GOODSTEIN, D.M.; HAWKINS, T.; PLENGVIDHYA, V.; WELKER, D.; HUGHES, J.; GOH Y.; BENSON, A.; BALDWIN, K.; LEE, J.H.; DÍAZ-MUÑIZ, I.; DOSTI, B.; SMEIANOV, V.; WECHTER, W.; BARABOTE, R.; LORCA, G.; ALTERMANN, E.; BARRANGOU, R.; GANESAN, B.; XIE, Y.; RAWSTHORNE, H.; TAMIR, D.; PARKER, C.; BREIDT, F.; BROADBENT, J.; HUTKINS, R.; O'SULLIVAN, D.; STEELE, J.; UNLU, G.; SAIER, M.; KLAENHAMMER, T.; RICHARDSON, P.; KOZYAVKIN, S.; WEIMER, B.; MILLS, D.; Comparative genomics of the lactic acid bacteria. **Proceedings of National Academy of Sciences (PNAS)**, v.103, p.15611-15616, 2006.

MAKRI, A., FAKAS, S., AGGELIS, G. Metabolic activities of biotechnological interest in *Yarrowia lipolytica* grown on glycerol in repeted batch cultures. **Bioresource Technology**, v.101, p.2351-2358, 2010.

MAZZITELLI, S.; LUCA, G.; TOSI, A.; BALESTRA, C.; CAPRETTO, L.; NASTRUZZI, C. Automatic production of double coated aginate microcapsules: Analysis of the experimental parameters by design of experiments. **Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly**, v. 13, n.3, p.117-126, 2007.

MEDINA, V.M.; PEREIRA, M.E.C. Pós-colheita.Em: O cultivo da bananeira. Borges, Silva Souza, editores – Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004, p.209.

MOAT, A.G.; FOSTER, J.W.; SPECTOR, M.P. Central pathways of carbohydrate metabolism.In: MOAT, A.G.; FOSTER, J.W; SPECTOR, M.P.(Ed) **Microbial physiology**. New York: Wiley-Liss, 2002, p.363-427.

MOON, C., AHN, J., KIM, S., SANG, B., UM, Y. Effect of Biodiesel-derived raw glycerol on 1,3-propanediol production by different microorganisms. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.161, n.1-8, p.502-510, 2010.

MORITA, H. ; TOH, H.; FUKUDA, S.; HORIKAWA, H.; OSHIMA, K.; SUZUKI, T.; MURAKAMI, M.; HISAMATSU, S.; KATO,Y.; TAKIZAWA,T.; FUKUOKA, H.; YOSHIMURA, T.; ITOH, K.; SULLIVAN, D.J.O.; McKAY, L.L.; OHNO, H.; KIKUCHI, J.; MASAOKA, T.; HATTORI, M. Comparative genome analysis of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus fermentum* reveal a genomic island for reuterin and cobalamin production. **DNA Research**, v.125, n.3, p.151-161, 2008

MUNDT, J.O. Enterococci. In: Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E., Holt, J.G., (Eds). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams and Wilkins Co., 1986; v. 2, p.1063-1065.

NAKAMURA, C.E.; GATENBY, A.A.; HSU, A.K-H.; LA-REAU, R.D.; HAYNIE, S.L.; DIAZ-TORRES, M.; TRIMBUR, D.E.; WHITED, G.M.; NAGARAJAN, V.; PAYNE, M.S.; PICATAGGIO, S.K.; NAIR, V.R. **Method for the production of 1,3-propanediol by recombinant microorganisms**. US Patent 6,013,494, 11 Jan 2000
MUTHUKUMARASAMY, P.; HOLLEY, R.A. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in dry fermented sausages containing micro-encapsulated probiotic lactic acid bacteria. **Food Microbiology**, v.24, p.82- 88, 2007.

MYINT, L.L; EL-HALWAGI, M.M. Process analysis and optimization of biodiesel production from soybean oil. **Clean Technology and Environmental Policy**, v11, p.263-276, 2009.

NEVOIGT, E.; STAHL, U. Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**, v.21, p.231-241, 1997.

NEUMANN, E.; OLIVEIRA, M.A.; CABRAL, C.M.; MOURA, L.N.; NICOLI, J.R.; VIEIRA, E.C.; CARA, D.C.; PODOPRIGORA, G.I. Monoassociation with *Lactobacillus acidophilus* UFV H2b20 stimulates the immune defense mechanisms of germfree mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.31, p.1565-1573, 1998.

NILSSON, A.; THOMSON, K.S.; ADLER, L. Purification and characterization of glycerol kinase in the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.991, n.2, p.296-302, 1989.

NILSSON, K.; BIRNBAUM, S.; FLYGARE, S.; LINSE, L.; SCHRODER, U.; JEPPSSON, U.; LARSSON, P-O.; MOSBACH, K.; BRODELIUS, P. A general method for the immobilization of cells with preserved viability. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, n.17, p.319-326, 1983.

NOMOTO, K. Prevention of infection by probiotics. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.100, n.6, p.583-692, 2005.

OECD SIDS.Glycerol. CAS °N: 56-81-5. **SIDS Initial Assessment Report**. UNEP Publicantions, Paris, France, 2002.

OLIVEIRA, A.C. **Viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis*, microencapsulados por coacervação, seguida de secagem por spray drying e leite de jorro**. 2006. 77p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

OLIVEIRA, L.B.; ARAUJO, M.S.; ROSA, L.P.; BARATA, M.; LA ROVERE, E. Analysis of the sustainability of using wastes in the Brazilian power industry. **Renew Sustainable Energy Reviews**, v.12, p.883-890, 2008.

OLIVEIRA, M. Petroquímica Verde. **Pesquisa. FAPESP**, v.149, p.84-87, 2008.

OLIVEIRA, M.N.; SIVIERI, K.; ALEGRO, J.H.A.; SAAD, S.M.I Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.38, n.1, 2002.

ONGEN, G.; YILMAZ, G.; JONGBOOM, R.O.J.; FEIL, H. Encapsulation of α -amylase in a starch matrix. **Carbohydrate Polymers**, v.50, p.1-5, 2002.

OOI, K.T.; YONG, K.C.; HAZIMAH, A.H.; DZULKEFLY, K.; WAN-YUNUS, W.M.Z. Glycerol residue. A rich source of glycerol and medium chain fatty acids. **Journal of Oleo Science**, v.53, p.29-33, 2004.

ORMO, M.; BYSTROM, C.E.; REMINGTON, S.J. Crystal structure of a complex of *Escherichia coli* glycerol kinase and an allosteric effector fructose-1,6-biphosphate. **Biochemistry**, v.37, p.16565-72, 1998.

OWEHAND, A.C.; SALMINEN, S.J. The health effects of culture milk products with viable and non-viable bacteria. **International Dairy Journal**, v.8, p.749-758, 1998
PACHLER, K.G.R. PACHLER FT-IR Atlas. A collection of FT-IR spectra. Ed VCH – Germany, 1988.

PAPANIKOLAOU, S., FAKAS, S., FICK, M., CHEVALOT, I., GALIOTOU-PANAYOTOU, M., KOMATIS, M. Biotechnological valorisation of raw glycerol discharged after bio-diesel (fatty acid methyl esters) manufacturing process: Production of 1,3-propanediol, citric acid and single cell oil. **Biomass and Bioenergy**, v.32, p.60-71, 2008.

PASTERIS, S.E., STRASSER DE SAAD, A.M.. Sugar-Glycerol cofermentations by *Lactobacillus hilgardii* isolated from wine. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.57, n.9, p.3853-3858, 2009.

PASTERIS, S.E., STRASSER DE SAAD, A.M. Characterization of glycerol kinase and NAD-independent glycerol-3-phosphate dehydrogenase from *Pediococcus pentosaceus* N5p. **Letters in Applied Microbiology**, v.27, p.93-97, 1998.

PARRADO, J.; MIRAMONTES, E.; JOVER, M.; GUTIERREZ, J.F.; COLLANTES DE TERAN, L.; BAUTISTA, J. Preparation of a rice bran enzymatic extract with potential use as functional food. **Food Chemistry**, v.98, p.742-748, 2006.

PELISSARI, F.M.; ANDRADE-MAHECHA, M.M.; SOBRAL, P.J.A.; MENEGALLI, F.C. Isolation and characterization of the flour and starch of plantain bananas (*Musa paradisiaca*). **Starch**.v.64, p.382-391, 2012.

PETTIGREW, D.W.; MA, D.P.; CONRAD, C.A.; JOHNSON, J.R. *Escherichia coli* glycerol kinase: cloning and sequencing of the *glpK* gene and the primary structure of the enzyme. **Journal of Biological Chemistry**, v.263, p.135-139, 1988.

PETTIGREW, D.W.; YU, G-J; LIU, Y. Nucleotide regulation of *Escherichia coli* glycerol kinase: initial-velocity and substrate binding studies. **Biochemistry**, v.29, p.8620-8627, 1990.

PETTIGREW, D.W.; LIU, W.Z.; HOLMES, C.; MEADOW, N.D.; ROSEMAN, S. A single amino acid change in *Escherichia coli* glycerol kinase abolishes glucose control of glycerol utilization in vivo. **Journal Bacteriology**, v.178, n.10, p.2846-2852, 1996.

PINGYI-ZHANG, R. L.; WHISTLER, J. N.; BEMILLER, B. R. H. Banana starch: production, physical-chemical properties and digestibility: a review. **Carbohydrate Polymers**, v.59, p.443-458, 2005.

PISANO, M.B.; PATRIGNANI, F.; COSENTINO, S.; GUERZONI, M.E.; FRANZ, C.M.A.P.; HOLZAPFEL, W.H. Diversity and functional properties of *Lactobacillus plantarum*-group strains isolated from italian chesse products. **Dairy Science and Technology**, v.91, n.1, p.65-76, 2010.

PNPB - Programa nacional de produção e uso de biodiesel. Disponível em: <http://www.biodiesel.gov.br/docs/Folder_biodiesel_portugues_paginad.pdf>. Acesso em: 12 mar. 2009.

PONCELET, D.; BALAK, V.; DULIEU, C.; PICOT, A. A physico-chemical approach to production of alginate beads by emulsification-internal ionotropic gelation. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.155, p.171-176, 1999.

PONCELET, D. Production of Alginate Beads by Emulsification/Internal Gelation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 944, p.74-82, 2001.

POPPI, L.B. **Avaliação do efeito antagônico de espécies de *Lactobacillus* sobre *Escherichia coli* O157:H7 e *Listeria monocytogenes***. 2005. 113 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) - Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena, 2005.

PRÜSSE, U.; FOX, B.; KIRCHHOFF, M.; BRUSKE, F.; BREFORD, J.; VORLOP, K.-D. New process (Jet Cutting Method) for the production of spherical beads from highly viscous polymer solutions. **Chemical Engineering and Technology**, v.21, n.1, p.29-33, 1998.

RAMOS, D.P.; LEONEL, M.; LEONEL, S. Amido resistente em farinhas de banana verde. **Alimentos e Nutrição. Araraquara**, v.20, n.3, p.479-483, 2009.

REID, G. The scientific basis for probiotic strains of *Lactobacillus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, n.9, p.3763-3766, 1999.

REID, G. Probiotics and Prebiotics – Progress and challenges. **International Dairy Journal**, v.18, p.969-975, 2008.

RIBEIRO, M.A. **Aspectos da produção de peróxido de hidrogênio e inibição de bactérias por *Lactobacillus acidophilus* UFV H2b20**. 1995. 60p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade de Viçosa, Viçosa, 1995.

RODRIGUES, A.P.; HIRSCH, D.; FIGUEIREDO, H.C.P.; LOGATO, P.V.R.; MORAES, A.M. Production and characterisation of alginate microparticles incorporating

Aeromonas hydrophila designed for fish oral vaccination. **Proces Biotechmistry**, v.41, n.3, p.638-643, 2006.

RODRÍGUEZ-AMBRIZ, S. L.; ISLAS-HERNÁNDEZ, J.J.; AGAMA-ACEVEDO, E.; TOVAR, J.; BELLO-PEREZ, L.A. Characterization of fibre-rich powder prepared by liquefaction of unripened banana flour. **Food Chemistry**, v.107, p.1515-1521, 2008.

ROSSLAND, E.; LANGSRUD, T.; GRANUM, P.E.; SORHAUG, T. Production of antimicrobial by strains of *Lactobacillus* or *Lactococcus* co-cultured with *Bacillus cereus* in milk. **International Journal of Food Microbiology**, v.98, p.93-100, 2005.

RUZHEINIKOV, S.N.; BURKE, J.; SEDELNIKOVA, S.; BAKER, P.J.; TAYLO, R.; BULLOUGH, P.A.; MUIR, N.M.; GORE, M.G.; RICE, D.W. Glycerol dehydrogenase: structure, specificity, and mechanism of a family III polyol dehydrogenase. **Structure**, v.9, p.789-802, 2001.

SAAD, S.M.Y. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.42, n.1, p.1-16, 2006.

SABIKHI, L.; BABU, R.; THOMPSON, D.K.; KAPILA, S. Resistance of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* LA1 to processing treatments and simulated gut conditions. **Food and Bioprocess Technology**, v.3, p.585-593, 2010.

SACCHETIN, P.S.C.; MORAES, A.M.; LEAL, C.A.G.; FIGUEIREDO, C.P. Produção de micropartículas de alginato contendo *Flavobacterium columnare* inativada pelo método de emulsão para vacinação de peixes por via oral. **Química Nova**, v.33, n.2, p.263-268, 2010.

SAENGE, C.; CHEIRSILP, B.; SUKSAROG, T.; BOURTOOM, T. Potential use of oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for the bioconversion of crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids. **Process Biochemistry**, v.46, p.210-218, 2011.

SAKAMOTO, M.; KOMAGATA, K. Aerobic growth of and activities of NADH oxidase and NADH peroxidase in Lactic Acid Bacteria. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 82, n.3, p.210-216, 1996.

SAKASEGAWA, S-I.; YOSHIOKA, I.; KOGA, S.; TAKAHASHI, M.; MATSUMOTO, K.; MISAKI, H.; OHSHIMA, T. A novel glycerol kinase from *Flavobacterium meningosepticum*: characterization, gene cloning and primary structure. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.62, n.12, p.2388-2395, 1998.

SAKASEGAWA, S-I.; TAKEHARA, H.; YOSHIOKA, I.; TAKAHASHI, M.; KAGIMOTO, Y.; MISAKI, H.; SAKURABA, H.; OHSHIMA, T. Increasing the thermostability of *Flavobacterium meningosepticum* glycerol kinase by changing Ser329 to Asp in the subunit interface region. **Protein Engineering**, v.14, n.9, p.663-667, 2001.

SALAGER J.L. Guidelines to handle the formulation, composition and stirring to attain emulsion properties on design (type, drop size, viscosity and stability), Surfactants in Solution. In: Chattopadhyay, A.; Mittal, K. (Eds). **Surfactant science series 64**. New York: Dekker, Chapter 16, 1996, p. 261-295.

SAN, K-Y.; BENNETT, G.N.; BERRIOS-RIVERA, S.J.; VADALI, R.V.; YANG, Y-T.; HORTON, E.; RUDOLPH, F.B.; SARIYAR, B.; BLACKWOOD. Metabolic Engineering through cofactor manipulation and its effects on metabolic flux redistribution in *Escherichia coli*. **Metabolic Engineering**, v.4, p.182-192, 2002.

SANDERS, M.E. Summary of conclusions from a consensus panel of experts on health attributes of lactic cultures: Significance to fluid milk products containing cultures. **Journal of Dairy Science**, v.76, p.1819-828, 1993.

SANDERS, M.E. Overview of functional foods: emphasis on probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v.8, p.341-347, 1998.

SANDERS, M.E. Probiotics: considerations for human health. **Nutrition Reviews**, v.61, n.3, p.91-99, 2003.

SANDOVAL-CASTILLA, O.; LOBATO-CALLEROS, C.; GARCÍA-GALINDO, H.S.; ALVAREZ-RAMIREZ, J., - VERNON-CARTER, E.J. Textural properties of alginate-pectin beds and survival of entrapped *Lb. casei* in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. **Food Research International**, v.43, p.111-117, 2010.

SANTOS, N.S. **Isolamento de *Lactobacillus acidophilus* de fezes de crianças alimentadas ao seio e de bezerros, visando a sua utilização como adjuvante dietético**. 1984. 69p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1984.

SCHUURINK, R.; BUSINK, R.; HONDMANN, D.H.A.; WITTEVEEN, C.F.B.; VISSER, J. Purification and properties of NADP⁺-dependent glycerol dehydrogenases from *Aspergillus nidulans* and *A.niger*. **Journal of General Microbiology**, v.136, p.1043-1050, 1990.

SEDEWITZ, B.; SCHEIFER, K.H.; GOTZ, F. Physiological role of pyruvate oxidase in the aerobic metabolism of *Lactobacillus plantarum*. **Journal of Bacteriology**, v.160, n.1, p.462-565, 1984.

SENUMA, Y.; LOWE, C.; ZWEIFEL, Y.; HILBORN, J.G.; MARISON, I. Alginate hydrogel microspheres and microcapsules prepared by spinning disk atomization. **Biotechnology and Bioengineering**, v.67, n.5, p.616-622, 2000.

SEQUEIRA, T.C.G.; RIBEIRO, C.M.; GOMES, M.I.F. Potencial bioterapêutico dos probióticos nas parasitoses intestinais. **Ciência Rural** 2008. Disponível em <<http://www.ufsm.br/ccr/revista>>. Acesso em: 20 out. 2008.

SHAH, N.P. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. **Journal of Dairy Science**, v.83, p.894-907, 2000.

SHAHIDI, F.; HAN, X.Q. Encapsulation of food ingredients. **Critical Reviews in Food Sciences and Nutrition**, v.33, p.501-547, 1993.

SHEU, T.Y.; MARSHALL, R.T. Microentrapment of lactobacilli in calcium alginate gels. **Journal of Food Science**, v.58, n.3, p.557-571, 1993.

SIDDARAMAIAH, T.M.; MRUTHYUNJAYA-SWAMY, T.M.; RAMARAJ, B.; LEE, J.H. Sodium alginate and its blends with starch: Thermal and morphological properties. **Journal of Applied Polymer Science**, v.109, p.4075-4081, 2008.

SILVA NETO, S. P. da; GUIMARÃES, T. G. **Evolução da cultura da banana no Brasil e no mundo**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2011. Disponível em: <<http://www.cpac.embrapa.br/noticias/artigosmidia/publicados/287/>>. Acesso em: 05 jan. 2011.

SOLEIMANI, N.A.; KERMANSHAHI, R.K.; YAKHCHALI, B.; SATTARI, T.J.; Antagonistic activity of probiotic lactobacilli against *Staphylococcus aureus* isolated

from bovine mastitis. **African Journal of Microbiology Research**, v.4, n.20, p.2169-2173, 2010.

SSEB - SOUTHERN STATES ENERGY BOARD. **Developing State Policies Supportive of Bioenergy Development**: Technical progress report submitted to U.S. Department of Energy National Energy Technology Laboratory. 2005. Disponível em: <<http://www.osti.gov/bridge/servlets/purl/837189-Yhbgdr/native/837189.pdf>>. Acesso em: 20 jun. 2010.

STEINBORN, K.; SZALLIES, A.; MECKE, D.; DUSZENKO, M. Cloning, heterologous expression and kinetic analysis of glycerol kinase (TbGLK1) from *Trypanosoma brucei*. **Biological Chemistry**, v.381, p.1071-1077, 2000.

STEVENS, M. J., WIERSMA, A., de VOS, W. M., KUIPERS, O. P., SMID, E. J., MOLENAAR, D.; KLEEREBEZEM, MJ. Improvement of *Lactobacillus plantarum* aerobic growth as directed by comprehensive transcriptome analysis. **Applied and Environment Microbiology**, v.74, p.4776-477, 2008.

STILES, M. E.; HOLZAPFEL, W. H. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. **International Journal of Food Microbiology**, v.36, p.1-2, 1997.

SUN, J.; HEUVEL, J.; SOUCAILLE, P.; QU, Y.; ZENG, A-P. Comparative Genomic Analysis of *dha* regulon and related genes for anaerobic glycerol metabolism in bacteria. **Biotechnology Progress**, v.19, p.263-272, 2003.

SULTANA, K.; GODWARD, G.; REYNOLDS, N.; ARUMUGASWAMY, R.; PEIRIS, P.; KAILASAPATHY, K. Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. **International Journal of Food Microbiology**, v.62, p.47-55, 2000.

SUMITA, T.C. **Caracterização de cepas de Lactobacillus isolados de fezes humanas quanto à propriedade probiótica**. 2007. 93 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial)- Universidade de São Paulo, Lorena, 2007.

SZULCZYK, K.R.; McCARL, B.A. Market penetration of biodiesel. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.14, p.2426-2433, 2010.

TALARICO, T. L., CASAS, I. A., CHUNG, T. C; DOBROGOSZ, W. J. Production and isolation of reuterin, a growth inhibitor produced by *Lactobacillus reuteri*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.32, p.1854-1858, 1988.

TALARICO, T.L; DOBROGOSZ, W.J. Chemical characterization of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus reuteri*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.33, p.674-679, 1989.

TALARICO, T.L.; DOBROGOSZ, W.J. Purification and characterization of glycerol dehydratase from *Lactobacillus reuteri*. **Applied and Environmental Microbiology**, n.56, p.1195-1197, 1990.

TANG, C-T.; RUCH, F.E.; LIN, E.C.C. Purification and properties of a Nicotinamide Adenine Dinucleotide-linked dehydrogenase that serves an *Escherichia coli* mutant for glycerol catabolism. **Journal of Bacteriology**, v.140, p.182-187, 1979.

TANG, S., BOEHME, L., LAM, H., and ZHANG, Z. *Pichia pastoris* fermentation for phytase production using crude glycerol from biodiesel production as the sole carbon source. **Biochemical Engineering Journal**, v.43, p.157-162, 2009.

TBCAUSP. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos**. Disponível em: <<http://www.fcf.usp.br/tabela/>> Acesso em:14 jun. 2010.

TEUNOU, E.; PONCELET, D. Rotary disc atomisation for microencapsulation applications - prediction of the particle trajectories. **Journal of Food Engineering**, v.71, p.345-35, 2005.

THOMPSON, J.C.; HE, B. Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks. **Applied Engineering and Agriculture**, v.22, p.261-265, 2006.

THORNER, J.W.; PAULUS, H. Catalytic and allosteric properties of glycerol kinase from *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry**, v.248, n.11, p.3922-3932, 1972.

THU, B.; SMIDSDOD, O.; SKJAK-BRAEK, G. Alginate gels – Some structure-function correlations relevant to their use as immobilization matrix for cells. In: Wijffels, R.H; Buitelaar, R.M.; Bucke, C.; Tramper, J. (Eds). **Immobilized Cells: Basics and Applications**, London: Elsevier Science, 1996, p.19-30.

TOPPING, D.L. CLIFTON, P.M. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. **Physiological Reviews**, v.81, n.3, p.1031-1064, 2001.

UNIPROT. Disponível em: <<http://www.uniprot.org>>. Acesso em:20 jan. 2010.
VACCARO, G.L.R.; POHLMANN, C.; LIMA, A.C.; SANTOS, M.S.; SOUZA, C.B.; AZEVEDO, D. Prospective scenarios for the biodiesel chain of a Brazilian state. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.14, p.1263-1272, 2010.

VANDAMME, P.; POT, B.; GILLIS, M.; DE VOS, P.; KERSTERS, P.; SWINGS, J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiology Review**, v.60, p.407-438, 1996.

VEIGA DA CUNHA, M.; FOSTER, M. A. Sugar and glycerol cofermentations in lactobacilli: the fate of lactate. **Journal of Bacteriology**, v.174, p.1013-1019, 1992.

VICENTE, G.; MARTÍNEZ, J.A. Integrated biodiesel production: a comparison of different homogeneous catalyst system. **Bioresources Technology**, v.92, p.297-305, 2004.

VIDHYALAKSHMI, R.; BHAKYARAJ, R.; SUBHASREE, R.S. Encapsulation: The future of probiotics – A review. **Advances in Biological Research**, v. 3-4, p.96-103, 2009.

VISWANATH-REDDY, M.; PYLE, J.; BRANCH, H.H. Purification and Properties of NADP⁺-linked glycerol dehydrogenase from *Neurospora crassa*. **Journal of General Microbiology**, v.107, p.289-296, 1978.

VOEGELE, R.T.; SWEET, G.D.; BOOS, W. Glycerol kinase of *Escherichia coli* is activated by interaction with the glycerol facilitator. **Journal of Bacteriology**, v.175, n.4, p.1087-1094, 1993.

VOO, W-P.; RAVINDRA, P.; TEY, B-T.; CHAN, E-S. Comparison of alginate and pectin based beads for production of poultry probiotics cells. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.11, n.3, p.294-299, 2011.

YAZDANI, S.S.; GONZALEZ, R. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. **Current Opinions on Biotechnology**, v.18, p.213-219, 2007.

VRIES, M.C.; VAUGHAN, E.E.; KLEEREBEZEM, M.; VOS, W.M. *Lactobacillus plantarum* – survival, functional and potencial probiotic properties in the human intestinal tract. **International Dairy Journal**, v.16, p.1018-1028, 2006.

WAN, L.S.C.; HENG, P.W.S.; CHAN, L.W. Surfactant effects on alginate microspheres. **International Journal of Pharmaceutics**, v.104, p.267-275, 1994.

YAMADA, H.; NAGAO, A.; NISHISE, H.; TANI, Y. Formation of glycerol dehydrogenase by microorganisms. **Journal of Agricultural and Biological Chemistry**, v.46, n.9, p.2325-2331, 1982.

YEH, J.I.; CHARRIER, V.; PAULO, J.; HOU, L.; DARBON, E.; CLAIBORNE, A.; HOL, W.G.J.; DEUTSCHER, J. Structures of enterococcal glycerol kinase in the absence and presence of glycerol: Correlation of conformation o substrate binding and a mechanism of activation by phosphorylation. **Biochemistry**, v.43, p.362-373, 2004.

YILMAZ, G.; JONGBOOM, R.O.J.; FEIL, H.; HENNINK, W.E. Encapsulation of sunflower oil in starch matrices via extrusion: effect of the interracial properties and processing conditions on the formation of dispersed phase morphologies. **Carbohydrate Polymers**, v.45, p.403-410, 2001.

YONG, K.C.; OOI, T.L.; DZULKEFLY, K.; WAN-YUNUS, W.M.Z.; HAZIMAH, A.H. Refining of crude glycerine recovered from glycerol residue by simple vacuum distillation. **Journal of Oil Palm Research**, v.13, p.39-44, 2001.

YU, K., KIM, W., HAN, S. Engineering of glycerol utilization pathway for ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioresource Technology**, v.101, p.4157-4161, 2010.

ZAGONEL, G.F.; PERALTA-ZAMORA, P.; RAMOS, L.P. Multivariate monitoring of soybean oil ethanolysis by FTIR. **Talanta**, v.63, p.1021-1025, 2004.

ZHANG, A., YANG, S. Propionic acid production from glycerol by metabolically engineered *Propionibacterium acidpropionici*. **Process Biochemistry**, v.44, p.1346-1351, 2009.

ZHAO, Y-N.; CHEN, G.; YAO, S-J. Microbial production of 1,3-propanediol from glycerol by encapsulated *Klebsiella pneumoniae*. **Biochemistry Engineering Journal**, v.32, p.93-99, 2006.

ZWAIG, N.; KISTLER, W.S.; LIN, E.C.C. Glycerol kinase, the pacemaker for the dissimilation of glycerol in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v.111, p.753-759, 1970.

APÊNDICE

Figura A1 –Cinética Michaelis-Menten para glicerol quinase de *L. delbrueckii* UFV-H2b20 em função da concentração de glicerol.

Tabela A1- Resultados da variação da velocidade de reação enzimática de glicerol quinase de *L. delbrueckii* UFV-H2b20 em função à concentração de glicerol.

Glicerol (mM)	Velocidade ($\mu\text{M}/\text{min}$)
0.5	37.44
1	51.43
3	83.77
5	89.42
10	101.94
15	110.13

Figura A2 –Cinética Michaelis-Menten para glicerol quinase de *L. platarum* ATCC 8014 em função da concentração de glicerol.

Tabela A2- Resultados da variação da velocidade de reação enzimática de glicerol quinase de *L.plantarum* ATCC 8014 em função à concentração de glicerol

Glicerol (mM)	Velocidade ($\mu\text{M}/\text{min}$)
1	9.15
3	21.20
5	26.87
10	32.62
15	37.73

Figura A3 – Cinética Michaelis-Menten para glicerol quinase de *L. acidophilus* ATCC 4356 em função da concentração de glicerol.

Tabela A3- Resultados da variação da velocidade de reação enzimática de glicerol quinase de *L. acidophilus* ATCC 4356 em função à concentração de glicerol.

Glicerol (mM)	Velocidade ($\mu\text{M}/\text{min}$)
1	9.15
3	21.20
5	26.87
10	32.62
15	37.73

Figura A4 –Cinética Michaelis-Menten para glicerol desidrogenase de *L. delbrueckii*UFV-H2b20 em função da concentração de glicerol.

Tabela A4- Resultados da variação da velocidade de reação enzimática de glicerol desidrogenase de *delbrueckii*UFV-H2b20 em função à concentração de glicerol.

DL-gliceraldeído (mM)	Velocidade (μM/min)
5	0.29
15	0.56
25	0.68
50	0.80
75	0.88
100	0.94

Figura A5 –Cinética Michaelis-Menten para glicerol desidrogenase de *L.plantarum* ATCC 8014 em função da concentração de glicerol.

Tabela A5- Resultados da variação da velocidade de reação enzimática de glicerol desidrogenase de *L. plantarum* ATCC 8014 em função à concentração de glicerol

DL-gliceraldeído(mM)	Velocidade (μM/min)
5	0.25
15	0.53
35	0.79
50	0.90
75	0.96

Figura A6 –Cinética Michaelis-Menten para glicerol desidrogenase de *L.acidophilus* ATCC 4356 em função da concentração de glicerol.

Tabela A6- Resultados da variação da velocidade de reação enzimática de glicerol desidrogenase de *L. acidophilus* ATCC 4356 em função à concentração de glicerol

DL-gliceraldeído (mM)	Velocidade (μM/min)
5	0.35
15	0.82
35	1.40
50	1.71
75	1.83
100	1.99