

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 ($V_{m\acute{a}x}$) 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.*