

# Hidrolisado de Proteína de Soja em Meio de Cultivo para a Produção de Agente de Controle Biológico

Soybean Protein Hydrolysate as a Low Cost Culture Media for Production of Biocontrol agent

---

*Ítala Layanne de Souza Alves<sup>1</sup>, Paula Fernnanda de Souza Tavares<sup>2</sup>, Jéssica de Souza Lima<sup>3</sup>, Naiane Cilira Duarte<sup>1</sup>, Carlos Alberto Tuão Gava<sup>4</sup>*

## Resumo

Os produtos de controle biológico devem ser produzidos com custo competitivo em relação aos sintéticos para que seu uso se torne generalizado. A fermentação é uma das etapas mais caras para o escalonamento da produção por causa do valor dos ingredientes dos meios de cultura. Neste trabalho, *Pichia kudriavzevii* L9, um agente de controle de podridão pós-colheita de frutas, foi utilizada como modelo para a avaliação de hidrolisado de proteína de soja como fonte de nitrogênio em meio de cultura líquido. Foram testadas cinco concentrações de proteína de soja ( $50 \text{ L}^{-1}$  a  $250 \text{ g L}^{-1}$ ) em solução aquosa contendo concentrações de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  de 0 a 1,0 N, tratadas em autoclave a  $121 \text{ }^\circ\text{C}$  e 1,0 atm de pressão. Após o resfriamento, o produto obtido foi alcalinizado com KOH até atingir o pH de 6,0 – 7,0. Nas condições do experimento, a melhor condição para a hidrólise do proteinato de soja e obtenção de maior concentração de aminoácidos no meio, foi de  $200 \text{ g L}^{-1}$  de proteinato em solução de HCl 0,5 N, produzindo  $32,1 \text{ g L}^{-1}$  de aminoácido livre, quantificado pelo método da ninhidrina. O hidrolisado foi utilizado para o

---

<sup>1</sup>Estudante de Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco (UPE), Petrolina, PE.

<sup>2</sup>Mestranda da Universidade do Estado da Bahia (Uneb), Juazeiro, BA.

<sup>3</sup>Doutoranda em Ciências Agrárias, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), Cruz das Almas, BA. <sup>4</sup>Engenheiro-agrônomo, D.Sc. em Proteção de plantas, pesquisador da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE, carlos.gava@embrapa.br.

crescimento de *P. kudriavzevii* L9, obtendo-se a maior produtividade de células viáveis de levedura com a adição de 2% do hidrolisado obtido no meio de cultura, na faixa entre 0,2 a 0,5 N de HCL.

**Palavras-chave:** controle biológico; fermentação; *Pichia kudriavzevii*; leveduras.

## Introdução

A aplicação de leveduras para o controle de podridões de frutas é uma alternativa promissora por se tratar de microrganismos não toxigênicos, comumente encontrados na superfície de frutos (FIALHO, 2010) e com relatos de sucesso em diferentes culturas a exemplo de pera, maçã e citros (ABRAHAM et al., 2010; YU et al., 2012). Apesar de também produzirem antibióticos, a indução de resistência e a competição por nutrientes e espaço físico com os patógenos é o mecanismo de controle mais comum entre as leveduras (BAUTISTA-ROSALES et al., 2013).

Uma etapa muito importante para a aplicação generalizada de agentes de controle biológico é o desenvolvimento de processos economicamente viáveis de produção e formulação em escala industrial. O produto final deve apresentar eficiência agrônômica, mas também ser competitivo economicamente com os produtos convencionais, sob o risco de não encontrar aplicabilidade.

A ampliação de escala de elaboração em bioprocessos é condicionada aos ensaios iniciais de bancada em laboratório, para que estes sejam, em seguida, submetidas a testes piloto e semi-piloto. Somente depois desses estudos preliminares é que se inicia o processamento industrial. O aumento de escala deve ser realizado após a determinação das condições ótimas de trabalho que favorecerão de forma segura, os fatores que podem vir a intervir nas velocidades e rendimentos dos processos (BEZERRA, 2006).

Neste trabalho, testou-se a substituição de reagentes de elevado custo por proteína de soja como substrato alternativo para a produção em escala de leveduras previamente selecionadas para o controle da podridão pós-colheita de frutas, a fim de se obter valor de produção mais competitivo em relação aos produtos convencionais.

## Material e Métodos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Controle Biológico da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE. Os isolados de leveduras L9 e LF foram obtidos por meio de isolamentos em frutos nativos ou coletados em áreas comerciais no Polo Petrolina/Juazeiro. O isolado *Pichia kudriavzevii* L9 foi obtido a partir de epiderme de manga cultivada no Submédio do Vale do São Francisco, e selecionado para o controle de patógenos causadores de podridões pós-colheita nessa cultura.

O proteinato de soja comercial passou por tratamento em solução de HCl em diferentes concentrações (0 N; 0,1 N; 0,2 N; 0,5 N; 1,0 N). Nas soluções, adicionou-se diferentes massas de proteinato de soja (1%, 2%, 5%, 10% e 20%). As misturas HCl + proteinato foram acondicionadas em erlenmeyers de 125 mL e, em seguida, autoclavado a 121 °C e 1 atmosfera. Após resfriamento, neutralizou-se o composto hidrolisado com KOH 1M até atingir pH na faixa 6,0 – 7,0. Em seguida, realizou-se a análise do teor de aminoácidos liberados da termo-hidrólise pelo método da ninhidrina (ROSEN, 1957).

O meio de cultura líquido foi preparado adicionando-se 2% dos hidrolisados obtidos nos diferentes tratamentos e 2% de sacarose. A levedura L9 foi inoculada com 1mL de suspensão contendo  $10^3$  células mL<sup>-1</sup> em frascos contendo 30 mL do meio. Os frascos foram incubados sob agitação constante a 120 rpm em câmara de crescimento com temperatura controlada a 28 °C por 48 horas. O crescimento das leveduras foi avaliado por contagem de células em câmara de Neubauer.

O experimento foi conduzido em arranjo fatorial. As variáveis independentes foram as concentrações de HCl e proteinato na termo-hidrólise e as dependentes a liberação de aminoácidos e a produção de células de levedura. Todos os experimentos foram realizados duas vezes, com tratamentos em triplicata. Os resultados apresentados são médias dos dois experimentos.

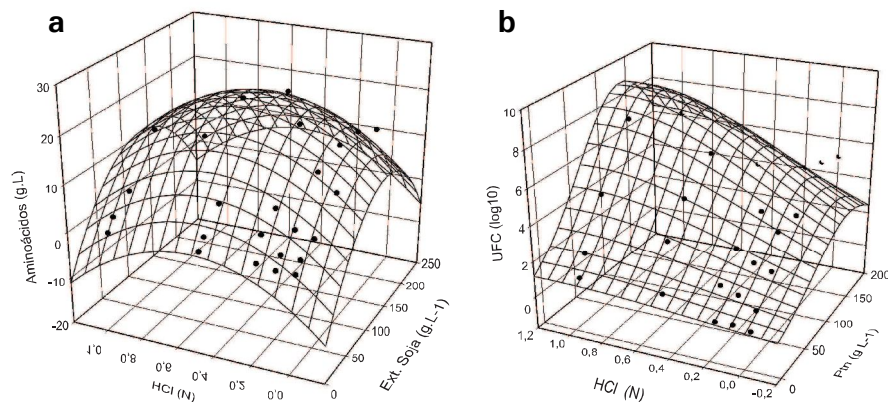
## Resultados e Discussão

Os meios de cultivo comumente utilizados para a multiplicação de agentes de controle biológico são à base de glucose (dextrose ou hexose) e extrato de leveduras, ambos muito caros para uso em

escala industrial. Nesta fase do trabalho, testou-se a viabilidade da hidrólise ácida parcial do proteinato de soja como substituto do extrato de levedura.

O proteinato de soja, apesar de ser muito mais barato que o de levedura, apresenta complexos proteicos ligados ao amido e a lipídeos, bem como lipo-polipeptídeos, que podem ser de acesso restrito às enzimas envolvidas na pré-digestão de peptídeos antes da absorção microbiana (KENNEDY; KROUSE, 1999). Nas condições utilizadas, o tratamento com doses crescentes de extrato de soja e de ácido clorídrico resultou em uma curva de resposta (Figura 1a) na qual as condições ótimas para a obtenção de aminoácidos foi de 200 g L<sup>-1</sup> de proteinato e concentração de 0,5 N de HCl, com faixa ótima entre 0,2-0,5 N. Nestas condições, o rendimento de aminoácidos liberados para a solução foi de 24,6 g L<sup>-1</sup> a 31,2 g L<sup>-1</sup>.

Os tratamentos com maior teor de extrato de soja entre 100 g L<sup>-1</sup> e 200 g L<sup>-1</sup> e de ácido resultaram em maior crescimento do isolado L9 (Figura 1b), embora a hidrólise nas maiores concentrações de ácido não tenham resultado em liberação mais acentuada de aminoácidos. Este resultado pode ser explicado por duas hipóteses: a primeira seria de que a determinação de aminoácidos pode apresentar limitações, já que o método da ninhidrina quantifica grupamentos amínicos e amídicos no meio, fragmentos maiores de peptídeos e proteínas liberados pela hidrólise seriam subestimados (RYDON; SMITH, 1952). Já a segunda hipótese, seria de que a hidrólise em concentrações de HCl resultaria, também, na hidrólise de amido e liberação de açúcares no meio. Em ambos os casos haveria maior crescimento microbiano.



**Figura 1.** Teor de aminoácidos em solução de hidrolisado de proteína de soja em meio ácido com aquecimento a 121 °C e 1 atm (a) e crescimento de *P. kudriavzevii* L9 (b) em meio de cultivo preparado após a neutralização.

De forma geral, a máxima produtividade de levedura foi alcançada entre 0,2-0,5 N de HCl, coincidindo também com o maior teor de aminoácidos no meio. A menor concentração de ácido (0,2 N) é a mais interessante por causa do menor consumo de KOH para neutralização, resultando também em menor salinidade do meio. Nestas condições, a produção de células ficou entre  $10^8$  a  $10^9$  células  $\text{mL}^{-1}$ .

A busca por novos meios de cultura para a fermentação de microrganismos tem sido uma constante na ciência de fermentações (BUSTOS et al., 2004). Neste trabalho, o uso de proteína de soja para substituir o extrato de levedura no meio para produção em escala mostrou-se como uma alternativa para reduzir o custo do escalonamento da produção.

## Conclusão

A melhor condição para a hidrólise de proteinato de soja para a liberação de aminoácidos no meio foi de  $200 \text{ g L}^{-1}$  de proteinato em solução de HCl 0,5 N. De forma similar, a maior produtividade de células viáveis de levedura foi atingida com a adição de 1% do produto hidrolisado nas concentrações de 0,2 a 0,5 N de HCl.

## Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq pela concessão de bolsa de iniciação científica à primeira autora.

## Referências

- ABRAHAM, A. O.; LAING, M. D.; BOWER, J. P. Isolation and in vivo screening of yeast and *Bacillus* antagonists for the control of *Penicillium digitatum* of citrus fruit. **Biological Control**, San Diego, v. 53, n. 1, p. 32-38, 2010.
- BAUTISTA-ROSALES, P. U.; CALDERON-SANTOYO, M.; SERVIN-VILLEGAS, R.; OCHOA-ALVAREZ, N. A.; RAGAZZOSANCHEZ, J. A. Action mechanisms of the yeast *Meyerozyma caribbica* for the control of the phytopathogen *Colletotrichum gloeosporioides* in mangoes. **Biological Control**, San Diego, v. 65, n. 3, p. 293-301, 2013.

BEZERRA, M. S. **Levantamento e avaliação de critérios para ampliação de escala de produção de biossurfactantes utilizando melaço como substrato**. 2006. 101 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.

BUSTOS, G.; MOLDES, A. B.; ALOUSO, J. L.; VAZQUEZ, M. Optimization of d-lactic acid production by *Lactobacillus coryniformis* using response surface methodology. **Food Microbiology**, London, v. 21, p. 143-148, 2004.

FIALHO, M. B.; AUGUSTO, F.; PEDROSO, M. P.; PASCHOLATI, S. F.; TOFFANO, L. Volatile organic compounds produced by *Saccharomyces cerevisiae* inhibit the in vitro development of *Guignardia citricarpa*, the causal agent of citrus black spot. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 26, p. 925-932, 2010.

KENNEDY, M.; KROUSE, D. Strategies for improving fermentation medium performance: a review. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 23, n. 6, p. 456-475, 1999.

ROSEN, H. A modified ninhydrin colorimetric analysis for amino acids. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 67, n. 1, p.10, 1957.

RYDON, H. N.; SMITH, P. W. G. A new method for the detection of peptides and similar compounds on paper chromatograms. **Nature**, London, v. 169, p. 922-923, 1952.

YU, T.; LI, H. Y.; ZHENG, X. D. Synergistic effect of chitosan and *Cryptococcus laurentii* on inhibition of *Penicillium expansum* infections. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 114, p. 261-266, 2007.