

27 A 29 DE OUTUBRO DE 2020



ON LINE

7º Simpósio de
Segurança Alimentar

Inovação com sustentabilidade

AVALIAÇÃO DO USO DE PROTEÍNA DE SOJA TEXTURIZADA COMO UM MEIO DE CULTURA ALTERNATIVO E DE BAIXO CUSTO PARA O CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE ALIMENTOS

C.H.S. Cruz¹, J.B.Santos¹, F.P.Santos¹, G.M.M. Silva¹, G.L.P.A. Ramos², J.S.
Nascimento¹

1- Departamento de Alimentos - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro – CEP: 20270-021 - Rio de Janeiro - RJ - Brasil, Telefone 55 (21)2566-7792 – e-mail: (janaina.nascimento@ifrj.edu.br).

2 - Departamento de Bromatologia - Universidade Federal Fluminense – Faculdade de Farmácia – CEP: 24241-001- Niterói - RJ – Brasil, Telefone 55 (21) 2629-9601 – e-mail: (gustavoanciens@gmail.com).

RESUMO: A maioria dos meios de cultura utilizada no cultivo de bactérias é composta por ingredientes complexos, elevando o valor do produto. Logo, o desenvolvimento de um meio alternativo de composição simples, como a proteína de soja texturizada (PTS), e custo menor se torna interessante. Este trabalho objetivou a utilização da PTS como meio de cultura de baixo custo que possibilite o crescimento de bactérias isoladas de alimentos. Para a composição dos caldos, concentrações entre 0,5% e 10% foram preparadas. Trinta e oito bactérias, incluindo importantes patógenos associados a alimentos, foram inoculadas e a concentração de 7,5% de PTS permitiu o crescimento de 100% das bactérias testadas, com custo de produção de aproximadamente 88% e 69% menor do que o caldo e do que o ágar triptona de soja, respectivamente. Assim, a utilização de um meio de cultura de fácil aquisição e baixo custo é viável e apresenta bons resultados.

ABSTRACT - Most of the culture media used in the cultivation of bacteria are composed of complex ingredients, increasing the value of the product. Therefore, the development of an alternative means of simple composition, such as textured soy protein (PTS), and a lower cost becomes interesting. This work aimed to use PTS as a low cost culture medium that allows the growth of bacteria isolated from food. For the composition of the broths, concentrations between 0.5% and 10% were prepared. Thirty-eight bacteria, including important pathogens associated with food, were inoculated and the concentration of 7.5% PTS allowed the growth of 100% of the tested bacteria, with a production cost of approximately 88% and 69% lower than the broth and than tryptone soy agar, respectively. Thus, the use of a culture medium of easy acquisition and low cost is feasible and has good results.

PALAVRAS-CHAVE: meio de cultura, proteína de soja texturizada, crescimento bacteriano.

KEYWORDS: culture medium, textured soy protein, bacteria isolated from food.

1. INTRODUÇÃO

A soja é rica em proteínas e aminoácidos essenciais, bem como uma ótima fonte de ferro e cálcio, comparável às carnes bovinas. A soja é uma das principais culturas do Brasil e responde por aproximadamente 1,5 % do PIB. Segundo a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), o Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja, atrás apenas dos Estados Unidos.

REALIZAÇÃO



ORGANIZAÇÃO



www.officeeventos.com.br



Somente em 2018, o país arrecadou cerca de 40,8 bilhões de dólares com exportações (Embrapa, 2019).

Proteínas vegetais texturizadas são obtidas a partir de fontes de proteínas comestíveis e caracterizadas por ter integridade estrutural e textura identificável, resistindo aos procedimentos utilizados na preparação dos alimentos para consumo. A proteína de soja texturizada (PTS) é geralmente obtida por extrusão em altas temperaturas da farinha de soja desengordurada (Mattos et al., 2015; Wu et al., 2018) e sua principal aplicação, sem dúvidas, é na alimentação humana, em substituição à carne moída. Porém, também pode ser empregada na alimentação animal (Stein et al., 2008).

Muitos meios de cultura utilizados para o crescimento de micro-organismos também possuem algum derivado de soja em sua composição, mas em geral, são constituídos por ingredientes complexos, o que eleva o valor do produto. Levando em consideração o alto teor nutritivo da PTS e seu custo relativamente baixo para o mercado interno, este trabalho teve por objetivo elaborar um meio de cultura não seletivo à base de PTS com o intuito de viabilizar seu uso para o crescimento de diversos tipos de bactérias em instituições de ensino e pesquisa com recursos limitados, validando sua eficácia no crescimento de diversas espécies de bactérias isoladas de alimentos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Várias marcas de PTS foram adquiridas em mercados locais. Para a composição dos caldos, as amostras foram moídas em um liquidificador elétrico e diferentes concentrações (0,5%, 1,0%, 2,5%, 5%, 7,5% e 10% [p/v]) foram preparadas em água destilada, filtradas em papel de filtro para a remoção de debris e autoclavadas. Para a composição do meio sólido, foi acrescido, ainda, 1,5% [p/v] de ágar-ágar.

Para a avaliação da formulação mais promissora, quinze espécies de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas isoladas de alimentos, identificadas previamente por espectrometria de massas (MALDI-TOF) e com diferentes níveis de exigências nutricionais, foram submetidas ao crescimento nas seis formulações de PTS. Importantes patógenos alimentares como *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* também foram testados. As bactérias foram crescidas em ágar triptona de soja (ágar Casoy) e diluídas em solução salina a 0,85% [p/v], até a concentração de aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Vinte microlitros de cada suspensão foram inoculados na superfície dos meios sólidos e as placas foram incubadas a 37 °C por 18 h.

A partir da formulação com melhores resultados, um total de 38 isolados provenientes de alimentos e pertencentes a diferentes espécies foram testados quanto ao crescimento. O caldo triptona de soja (caldo Casoy) foi utilizado como controle positivo.

Para avaliação econômica do meio de cultura desenvolvido, foi realizada uma pesquisa de preços de proteína de soja texturizada, de ágar triptona de soja e de ágar-ágar (necessário para a confecção do ágar PTS) de diferentes marcas e comercializados por diferentes empresas, a fim de se calcular o valor médio de produção do meio PTS.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Alguns trabalhos descritos na literatura também buscam a obtenção de meios de cultura de baixo custo. Tomás e colaboradores (2010) elaboraram um meio de cultura para o crescimento e produção de bacteriocina de uma estirpe urogenital de *Lactobacillus salivarum*. Em um estudo realizado na Índia, foi desenvolvido um meio de cultura alternativo para crescimento bacteriano a partir de restos de frutas e vegetais (Jadhav et al., 2018). No entanto, este trabalho aparenta ser o

primeiro que usa proteína de soja texturizada como ingrediente único para a composição de um meio de cultura de baixo custo.

As formulações de ágar PTS contendo concentrações de 7,5% e 10% de PTS se mostraram mais promissoras, com crescimento de 87% das bactérias testadas, conforme indicado na Tabela 1.

Algumas espécies apresentaram, ainda, formação de halo de proteólise no meio PTS a 10%. Assim sendo, a concentração de 7,5% foi selecionada para os experimentos posteriores. Vale ressaltar que não houve diferença entre as marcas de PTS testadas. As bactérias que não cresceram em alguma concentração se comportaram da mesma forma nos meios preparados com as quatro marcas testadas.

Tabela 1: Teste inicial de avaliação do crescimento bacteriano em diferentes concentrações de ágar PTS

Bactérias testadas	Concentrações de proteína de soja texturizada no ágar PTS						Controle
	0,5%	1,0%	2,5%	5,0%	7,5%	10%	
Gram-positivas							
<i>Bacillus cereus</i>	++	++	+	+	++	++*	++
<i>Micrococcus luteus</i>	++	+	+	++	+	++*	++
<i>Staphylococcus aureus</i>	++	+	+	++	++	++	++
Gram-negativas							
<i>Enterobacter absuriae</i>	-	+	++	+	++	++	++
<i>Escherichia coli</i>	++	+	+	+	++	++*	++
<i>Hafnia alvei</i>	-	+	+	+	+	++	++
<i>Klebsiella ornythinolytica</i>	++	++	++	++	++	++	++
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	++	++	++	++	++	++
<i>Leclercia adecarboxylata</i>	+	+	-	-	+	+	+
<i>Pantoea agglomerans</i>	++	+	++	++	++	++	++
<i>Serratia liquefaciens</i>	++	++	++	++	+	++	++
<i>Serratia marcescens</i>	++	+	++	++	+	++*	++
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	+	-	+	+	++	++	+

-: ausência de crescimento; +: crescimento escasso (colônias isoladas); ++: crescimento abundante (confluyente); *: presença de halo de proteólise.

Uma vez selecionada a concentração de 7,5% como ideal, 38 isolados oriundos de diferentes matrizes alimentares foram submetidos ao crescimento em caldo PTS a 7,5% por 18h. Todas apresentaram crescimento bom a excelente, similar ao do controle em caldo triptona de soja, apresentando contagens entre $1,1 \times 10^9$ e $5,1 \times 10^{12}$ UFC/mL após o período de incubação, como exibido na Tabela 2.

Tabela 2: Crescimentos de diferentes micro-organismos isolados de alimentos em caldo PTS comparativamente ao controle (caldo triptona de soja).

Gêneros bacterianos	Espécies	Contagens*, em UFC/ml, após 18 h de incubação	
		Caldo PTS	Controle
<i>Acinetobacter</i> ¹	<i>A. bereziniae</i>	$1,1 \times 10^{10}$	$5,0 \times 10^{12}$
	<i>A. guillouiae</i>	$5,0 \times 10^{12}$	$9,5 \times 10^{10}$
	<i>A. ursingii</i>	$3,4 \times 10^{10}$	$1,6 \times 10^{11}$
<i>Enterobacter</i> ²	<i>E. asburiae</i>	$1,0 \times 10^{10}$	$5,0 \times 10^{10}$
	<i>E. cloacae</i>	$5,0 \times 10^{10}$	$5,0 \times 10^{10}$



	<i>E. hormaechei</i>	1,5 x 10 ¹⁰	6,0 x 10 ⁹
	<i>E. kobei</i>	8,6 x 10 ¹¹	5,0 x 10 ¹²
<i>Escherichia</i> ³	<i>E. coli</i>	5,0 x 10 ¹²	5,0 x 10 ¹⁰
	<i>K. oxytoca</i>	4,8 x 10 ¹¹	2,9 x 10 ¹⁰
<i>Klebsiella</i> ²	<i>K. pneumoniae</i>	5,0 x 10 ¹²	1,6 x 10 ¹⁰
	<i>K. varicola</i>	9,6 x 10 ¹⁰	5,0 x 10 ¹²
<i>Leclercia</i> ²	<i>L. adecarboxylata</i>	3,6 x 10 ¹¹	8,9 x 10 ¹⁰
<i>Pantoea</i> ²	<i>P. agglomerans</i>	2,2 x 10 ¹¹	9,0 x 10 ⁹
	<i>P. chloraphis</i>	9,6 x 10 ¹¹	5,0 x 10 ¹²
	<i>P. extremorientalis</i>	9,5 x 10 ¹¹	5,0 x 10 ¹²
	<i>P. koreensis</i>	8,3 x 10 ¹⁰	1,4 x 10 ¹¹
	<i>P. libanensis</i>	5,0 x 10 ¹²	9,0 x 10 ¹¹
<i>Pseudomonas</i> ⁴	<i>P. mosseli</i>	5,0 x 10 ¹²	8,6 x 10 ¹⁰
	<i>P. nitroreducens</i>	8,7 x 10 ¹⁰	5,0 x 10 ¹²
	<i>P. plecoglossicida</i>	2,2 x 10 ¹¹	2,6 x 10 ¹⁰
	<i>P. synxantha</i>	6,5 x 10 ¹¹	1,0 x 10 ¹⁰
	<i>P. tolaasii</i>	1,5 x 10 ¹⁰	6,7 x 10 ¹¹
	<i>P. vancouverensis</i>	5,4 x 10 ¹⁰	5,1 x 10 ¹²
<i>Raoutella</i> ²	<i>R. ornithinolytica</i>	1,0 x 10 ¹¹	1,0 x 10 ⁹
<i>Serratia</i> ²	<i>S. liquefaciens</i>	5,0 x 10 ¹⁰	1,1 x 10 ⁹
<i>Stenotrophomonas</i> ²	<i>S. maltophilia</i>	5,0 x 10 ¹²	8,3 x 10 ¹¹
	<i>Bacillus</i> sp. 1	1,3 x 10 ¹⁰	2,0 x 10 ¹⁰
	<i>Bacillus</i> sp. 2	1,0 x 10 ¹⁰	1,3 x 10 ¹¹
	<i>Bacillus</i> sp. 3	3,5 x 10 ¹⁰	4,0 x 10 ¹¹
<i>Bacillus</i> ^{3,5}	<i>Bacillus</i> sp. 4	3,2 x 10 ¹⁰	4,5 x 10 ¹⁰
	<i>B. cereus</i>	3,7 x 10 ¹¹	5,0 x 10 ¹⁰
	<i>B. megaterium</i>	5,0 x 10 ¹⁰	5,0 x 10 ¹⁰
	<i>B. stearothermophilus</i>	4,2 x 10 ¹¹	5,0 x 10 ¹⁰
	<i>Staphylococcus</i> sp. 1	4,2 x 10 ¹¹	2,5 x 10 ¹⁰
	<i>Staphylococcus</i> sp. 2	5,8 x 10 ¹¹	6,5 x 10 ¹⁰
<i>Staphylococcus</i> ⁵	<i>Staphylococcus</i> sp. 3	5,0 x 10 ¹⁰	5,0 x 10 ¹⁰
	<i>Staphylococcus</i> sp. 4	4,2 x 10 ¹⁰	1,3 x 10 ¹¹
	<i>Staphylococcus</i> sp. 5	5,0 x 10 ¹⁰	3,0 x 10 ¹⁰

*Os valores representam a média de dois experimentos independentes. Fontes dos isolados: ¹, Ramos & Nascimento, 2019a; ², Ramos, 2019; ³, Banco de bactérias do Laboratório de Microbiologia do IFRJ; ⁴, Ramos & Nascimento, *in press*; ⁵, Oliveira *et al.*, 2012.

Em países em desenvolvimento, muitas vezes, pesquisas e aulas envolvendo microorganismos não são realizadas devido à escassez de recursos para a aquisição dos insumos necessários (Uthayasooryan *et al.*, 2016).

O valor dos meios de cultura convencionais, em especial o caldo e o ágar triptona de soja (Casoy), é extremamente elevado por possuir ingredientes complexos. Por isso, foi realizada uma



pesquisa de preços para verificar se o PTS seria um bom substituto aos meios de cultura convencionais com um valor mais acessível. Foi verificado que o custo de produção do caldo PTS no Brasil é, em média, cerca de 88% menor do que o caldo Casoy e 69% menor do que o ágar Casoy, respectivamente, como exemplificado na Tabela 3.

Tabela 3: Comparação dos custos de produção entre os meios Casoy e PTS.

Valor por grama (em R\$)		Valor médio necessário para o preparo de 100 ml de meio de cultura (em R\$)		Diferença de custo
Caldo Casoy	0,60 ± 0,10	Caldo Casoy (3g/100ml)	1,80	87,8%
Peptona de soja texturizada	0,03 ± 0,01	Caldo PTS a 7,5%	0,22	
Ágar Casoy	0,96 ± 0,36	Ágar Casoy (4,5g/100 ml)	4,32	69,2%
Ágar-ágar	0,77 ± 0,13	Ágar PTS a 7,5% *	1,33	

* Caldo PTS acrescido de 1,5% de ágar

4. CONCLUSÕES

O meio de cultura PTS, na concentração de 7,5%, apresenta eficiência comparável aos padrões de crescimento dos meios comerciais, por um custo menor, sendo mais acessível principalmente às instituições de ensino que não dispõem de grandes recursos para as aulas de Microbiologia e aos pequenos laboratórios de pesquisa, em atividades que visem apenas o crescimento bacteriano. A utilização de mais bactérias isoladas de alimentos, em especial Gram-positivas, e as análises estatísticas dos resultados estão sendo executadas de modo a ampliar e aprimorar os dados do potencial de utilização do meio PTS.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Embrapa. Soja em números (safra 2018/19). (2019). Disponível em: <https://www.embrapa.br/web/portal/soja/cultivos/sojal/dados-economicos>
- Jadhav, P., Sonne, M., Kadam, A., Patil, S., Dahigaonkar, K., & Oberoi, J. K. (2018). Formulation of Cost Effective Alternative Bacterial Culture Media Using Fruit and Vegetables Waste. *International Journal of Current Research and Review*, 10(2), 6.
- Mattos, E. C., Atui, M. B., Silva, A. M., Ferreira, A. R., Nogueira, M. D., Soares, J. S., & Marciano, M. A. M. (2015). Estudo da identidade histológica de subprodutos de soja (*Glycine max* L.). *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 74(2), 104-110.
- Oliveira, V. F., Abreu, Y. J. L., Fleming, L. R., & Nascimento, J. S. (2012). Anti-staphylococcal and antifungal substances produced by endospore-forming bacilli. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2, 154-157.
- Ramos, G. L. P. A. (2019). *Caracterização de bacilos gram-negativos e detecção da presença de resíduos de antibióticos em leite caprino cru*. (Dissertação de mestrado). Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- Ramos, G. L. P. A., & Nascimento, J. S. (2019). Characterization of *Acinetobacter* spp. from raw goat Milk. *Ciência Rural*, 49(10), Epub.
- Ramos, G. L. P. A., & Nascimento, J. S. (2020). *Pseudomonas* sp. in uninspected raw goat's milk in Rio de Janeiro, Brazil. *Food Science and Technology, In press*.



Stein, H. H., Berger, L. L., Drackley, J. K., Fahey Jr, G. C., Hernot, D. C., & Parsons, C. M. (2008). Nutritional properties and feeding values of soybeans and their coproducts. *Soybeans*, 613-660. AOCS Press.

Tomás, M. S. J., Bru, E., Wiese, B., & Nader-Macías, M. E. (2010). Optimization of Low-Cost Culture Media for the Production of Biomass and Bacteriocin by a Urogenital *Lactobacillus salivarius* Strain. *Probiotics And Antimicrobial Proteins*, 2(1), 2-11.

Uthayasooryan, M., Pathmanathan, S., Ravimannan, N., & Sathyaruban, S. (2016). Formulation of alternative culture media for bacterial and fungal growth. *Der Pharmacia Lettre*, 8(1), 431-436.

Wu, M., Sun, Y., Bi, C., Ji, F., Li, B., & Xing, J. (2018). Effects of extrusion conditions on the physicochemical properties of soy protein/gluten composite. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*, 11(4), 230-237.