

REAPROVEITAMENTO DE CALDO YEAST PEPTONE DEXTROSE (YPD) PARA CULTIVO DE *Pichia pastoris*

FRANÇA, Rodrigo Correa¹; SANTOS, Diego Gil de los¹⁻⁴; HAUBERT, Louise²;
CONCEIÇÃO, Fabrício Rochedo¹; SILVA, Wladimir Padilha da²;

MOREIRA, Ângela Nunes¹⁻³;

¹Centro de Biotecnologia – UFPel; ²Lab. Microbiologia de Alimentos, DCTA/FAEM – UFPel;
³Faculdade de Nutrição – UFPel; ⁴Instituto Federal Sul-riograndense
Campus Universitário – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900, rodrigofranca@hotmail.com

1 INTRODUÇÃO

Uma das mais promissoras áreas de desenvolvimento de alimentos funcionais tem sido o uso de probióticos e prebióticos devido a sua função relacionada diretamente com a saúde do hospedeiro e devido às restrições impostas pelos mercados consumidores ao uso de antibióticos e outros quimioterápicos, tanto para uso terapêutico, para a prevenção das doenças ou para incrementar a eficiência alimentar (ERICKSON & HUBBARD, 2000).

O termo probiótico deriva do grego e significa “a favor da vida”, sendo o antônimo de antibiótico, que significa “contra a vida”. Ainda que ao longo dos anos o termo teve diferentes acepções, atualmente é utilizado para designar preparações ou produtos que contêm micro-organismos viáveis definidos e em quantidade adequada, que alteram a microbiota própria das mucosas por implantação ou colonização de um sistema do hospedeiro, produzindo efeitos benéficos em sua saúde (SCHREZENMEIR & DE VRESE, 2001).

Pichia pastoris é uma levedura da família Saccharomycetaceae, gênero *Pichia*. Apresenta como característica poder utilizar como fonte de carbono o metanol, devido à presença dos genes Álcool Oxidase I e II (AOX1 e AOX2), o que permite o seu uso no processo de expressão de proteínas heterólogas. Esta levedura se destaca na produtividade quanto à quantidade de células por litro (até 150g/litro de matéria seca) (STORCH, 2008; FONSECA, 2006), que representa um fator importante quando se trata em produção em grande escala. Dentro deste contexto sua utilização como probiótico está sendo estudada pelo Centro de Biotecnologia do Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec/UFPel). O nosso laboratório possui várias pesquisas em andamento onde pretende-se avaliar a *Pichia pastoris* como probiótico em ensaios onde serão necessários elevadas quantidades da levedura e, conseqüentemente, com altos custos de produção com os meios atualmente utilizados. *P. pastoris* apresenta capacidade de utilização de diferentes fontes nutritivas para o seu cultivo, até mesmo aquelas constituídas por efluentes industriais. Schneid et al. (2004) demonstraram que o efluente aquoso gerado no processo de parboilização do arroz continha níveis de nutrientes adequados para o cultivo de leveduras como *Saccharomyces boulardii*, e que multiplicaram-se mais rapidamente que o grupo controle, demonstrando seu potencial como meio alternativo de cultura para leveduras e até mesmo para *Pichia pastoris*.

Um dos meios de cultura comumente utilizados no nosso laboratório para o cultivo de *P. pastoris* é Yeast Peptone Dextrose (YPD). Este meio contém extrato de levedura, peptona e dextrose, caracterizando-se por ser um meio rico e com um custo de aproximadamente R\$ 9,17 por litro de meio. Neste trabalho, busca-se estudar a possibilidade do reaproveitamento do meio YPD acompanhando o seu rendimento em massa por seis reutilizações, servindo como fonte de crescimento para a levedura *P. pastoris*.

2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

2.1 Micro-organismos

Utilizou-se colônias de *P. pastoris* cepa X-33 isoladas em Ágar Yeast Peptone Dextrose (YPD).

2.2. Preparação do Inóculo

As colônias de *P. pastoris* foram cultivadas num agitador orbital em 10 mL de caldo Yeast Peptone Dextrose (YPD) usando um balão aletado e incubadas *overnight* a 28°C e 150 rpm. Cinco mililitros desta solução foram transferidos para 45 mL de caldo YPD produzindo-se o pré-inóculo. Do pré-inóculo, 20 mL foram adicionados a 180 mL de caldo YPD e incubado nas mesmas condições por 12 horas. Este cultivo (total 200 mL) foi aliqotado em tubos contendo 20 mL e armazenado em câmara fria, para usar-se como inóculo nos testes de reutilização de meio.

2.3. Cultivo

O cultivo foi realizado em duplicata usando-se erlenmeyer de 1000 mL num agitador orbital a 28°C e 150 rpm por 12 horas. Cada erlenmeyer continha inicialmente 180 mL de caldo YPD devidamente esterilizado sendo acrescentados 20 mL de inóculo. Após o primeiro cultivo de 12 horas centrifugou-se as células a 5.000 g, a 20°C durante 10 minutos. O sobrenadante foi adicionado a um novo erlenmeyer, 20 mL do inóculo previamente preparado e armazenado em câmara fria foi acrescido e cultivado nas mesmas condições do primeiro cultivo. Este procedimento foi repetido por seis vezes.

2.4. Determinação da biomassa celular

As células obtidas nos pellets foram lavadas duas vezes sendo ressuspensas em água destilada e centrifugadas novamente a 5.000 g, a 20°C durante 10 minutos. Após a segunda lavagem os pellets foram ressuspensos em 45 mL e a DO da suspensão foi medida em triplicata efetuando-se diluições de forma a obter-se um valor entre 0,2 e 0,8. A biomassa foi calculada usando-se a equação padrão Massa seca (g) = 0,0002.DO - 1*10⁻⁵.

2.5. Análise estatística

Os resultados de biomassa foram analisados utilizando o software Statistics 7 sendo utilizado o teste de Turkey em nível de significância 5%.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os rendimentos em peso de massa seca (g.L^{-1}) dos sete cultivos de *P. pastoris* testados indicam que não houve diferença significativa entre o primeiro e o segundo cultivo, o mesmo ocorrendo entre o segundo e quarto cultivo. No quinto e sexto cultivos, os dados apresentados são referentes a um único balão, não podendo ser usados nos testes estatísticos, porém apresentaram dados muito semelhantes aos obtidos nos terceiro e quarto cultivos. Ressalta-se que neste caso os valores de produção estão relacionados à utilização de agitador orbital (Tabela 1.)

Tabela 1: Rendimento em peso de massa seca de *Pichia pastoris* (g.L^{-1})

Amostras	Média em peso de massa seca (g/L)
1	7,5 ^a
2	6,71 ^{a,b}
3	5,91 ^b
4	6,15 ^b
5	6,29*
6	5,9*

Obs.: Os dados com letras iguais na mesma coluna não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

* Nestes experimentos apresentam-se os valores de massa de somente um erlenmeyer

Os dados obtidos demonstram que o meio não se esgota como fonte de nutrientes para o desenvolvimento da levedura *P. pastoris* mesmo após seis reutilizações. Observando estes resultados podemos extrapolar uma economia para diferentes projetos de pesquisa ou até para nível industrial, não apenas para a produção de probiótico, mas também em trabalhos em que a levedura é utilizada como sistema de expressão de proteínas heterólogas, que também são desenvolvidas no CDTEC/UFPEL.

Um litro de caldo YPD produz 20 g da levedura liofilizada. Em um experimento com 250 aves, as quais receberiam um total de 1000 kg de ração contendo 10^7 UFC da levedura liofilizada por grama durante 40 dias, sem o reaproveitamento seria necessário 500 L de meio, enquanto que reaproveitando 4 vezes o mesmo caldo, usaríamos 125 L de meio. Como o custo do caldo por litro é de R\$ 9,17, então a reutilização do meio por quatro vezes permitiria ao laboratório uma economia de R\$ 3.438,75, somente neste experimento.

4 CONCLUSÕES

Os resultados comprovam que há possibilidade de reutilização do meio de cultura YPD em cultivos com a levedura *Pichia pastoris*, representando uma economia considerável para o laboratório.

5 REFERÊNCIAS

ERICKSON, L. K.; HUBBARD, E. N. Probiotic immunomodulation in health and disease. **Journal of Nutrition**, 130, p. 403-109, 2000.

FONSECA, M.C.; Produção de estreptavidina recombinante pela levedura *Pichia pastoris*. 2006. Dissertação do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa

SCHNEID, A. S., GIL DE LOS SANTOS, J. R., ELIAS, M. C., STORCH, O. B., CRUZ, F. W., GIL-TURNES, C. Wastewater Of Rice Parboilizing Process As Substrate For Probiotics. In: **2nd International Probiotic Conference**, Kosice, Slovakia, Anais. p 66, 2004.

SCHREZENMEIR, J.; DE VRESE, M. Probiotics, prebiotics and symbiotics: approaching a definition. **American Journal of Clinical Nutrition**, 73: 2, 361S-364, 2001.

STORCH, Otávio Brod. **Avaliação de *Pichia pastoris* e *Pichia pastoris* recombinante contendo o gene da fosfolipase C de *Clostridium perfringens* como probióticos para frangos de corte.** 2008, Dissertação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 17/11/08.