

OBTENÇÃO DE MASSA CELULAR DA *KOMAGATAELLA PHAFFII* CEPA X33 PARA PRODUÇÃO DE MICROCÁPSULAS

**EDIANE DEIJALY DOS SANTOS¹; KETNEN RIEFFEL DAS CHAGAS²; YASMIM
DE MACEDO CORRÊA³; ISABELA BOLDRINI DUTRA RASCH⁴; MARCELO
ROSADO FURTADO⁵; PATRICIA SILVA DIAZ⁶**

¹*Universidade Federal de Pelotas 1 – dejaly@hotmail.com*

² *Universidade Federal de Pelotas 2 – rieffelketnen@gmail.com*

³ *Universidade Federal de Pelotas – yasmimcorress2@gmail.com*

⁴ *Universidade Federal de Pelotas – isabelabrasch@gmail.com*

⁵ *Universidade Federal de Pelotas – marcelorosado2011@hotmail.com*

⁶ *Universidade Federal de Pelotas – bilicadiaz@yahoo.com*

1. INTRODUÇÃO

A microbiota intestinal é um sistema complexo e dinâmico composto por trilhões de microrganismos que desempenham um papel importante na manutenção da homeostase do organismo. Com isso, nos últimos anos tem ocorrido um interesse crescente no uso de probióticos que oferecem benefícios à saúde e/ou doença, em busca da modulação da microbiota intestinal e manutenção da homeostase do organismo. (ECKBURG et al 2005; CRYAN, BOEHME, DINAN, 2019).

Conforme definido pela Organização Mundial da Saúde (OMS/FAO, 2002), os probióticos são microrganismos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefício para a saúde do hospedeiro. Para ter efeito no hospedeiro, os probióticos devem sobreviver às adversidades do trato gastrointestinal (GI), ser seguros para uso humano e animal, resistir ao processamento industrial e permanecer viáveis por longos períodos de armazenamento e transporte (SAAD, 2006).

Diversas bactérias possuem efeito probiótico comprovado. Os gêneros de bactérias mais utilizados como probióticos são *Lactobacillus*, *Enterococcus* e *Bifidobacterium*. Já entre as leveduras, apenas *Sacharomyces boulardii* e *Sacharomyces cerevisiae* são consideradas probióticos (BUTS; KEYSER, 2006; MARTINS et al., 2010).

A *Komagataella Phaffii* (também chamada de *Pichia Pastoris*) é uma levedura amplamente conhecida por sua característica de expressar proteínas heterólogas. Dada a sua grande semelhança com *Saccharomyces cerevisiae* (TRAN, 2017), percebe-se que a *Komagataella Phaffii* em alguns estudos, tem demonstrado efeitos probióticos promissores como o estudo de FRANÇA et al (2015), o qual demonstrou que a *Komagataella Phaffii* sobreviveu aos estresses do trato gastrointestinal *in vitro* e *in vivo*, concluindo que a levedura possui propriedades probióticas.

Apesar da atividade funcional dos probióticos, estudos apontam que a sobrevivência desses microrganismos livres em alimentos é limitada, pois estão sujeitos à condições que não são favoráveis a sua sobrevivência, como o processamento (temperaturas extremas, adição de sal, substâncias antimicrobianas, etc.), tempo de armazenamento do alimento, constituição do alimento, etc. Assim, necessitam de uma barreira física que os proteja das condições adversas do meio, como a microencapsulação (BURGAIN et al., 2015; CAVALHEIRO et al., 2015b; VOS et al., 2010).

A microencapsulação de probióticos consiste no englobamento das células por um material encapsulante, formando partículas de diâmetro variado (0,2 µm a 5000 µm). Essas cápsulas devem proteger os microrganismos das condições adversas do meio e, quando atingirem o local para qual foram destinadas, promoverem a liberação das células. Esse processo também protege o alimento, pois pode impedir as bactérias de se desenvolverem no mesmo, alterando suas características sensoriais (SILVA et al., 2015).

Dessa forma, o estudo teve como objetivo fermentar a levedura *Komagataella Phaffii* cepa X33 para obtenção de massa celular e avaliar sua viabilidade celular para possível microencapsulação.

2. METODOLOGIA

A levedura *Komagataella Phaffii* cepa X-33, pertencente ao estoque do Núcleo de Biotecnologia do CDTec, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), de acordo com FRANÇA et al (2015) e algumas modificações, foi cultivada em caldo Yeast Peptone Dextrose (YPD) por 24h a 28°C, sob agitação de 200 rpm em agitador orbital e conservada em glicerol e YPD sob congelamento.

O processo de fermentação foi realizado em triplicata para análise do rendimento de massa celular úmida e contagem de células viáveis em cada fermentação e assim obter o rendimento total das três fermentações e sua viabilidade celular. Com isso, em cada fermentação foi adicionado quinhentos mililitros de sacarose e quinhentos mililitros de inóculo a 4L de caldo YPD e incubados em biorreator (Bioflo110, New Brunswick), a 28°C, 500rpm, 1vvm de ar por 24h. Foi utilizado antiespumante 204 (Sigma) durante a fermentação.

Após cada fermentação, as células foram centrifugadas a 5000 × g por 15min, lavadas em solução salina 0,9% a 4°C, concentradas dez vezes e quantificadas. A viabilidade da levedura foi analisada através das contagens de células viáveis, determinadas através do plaqueamento das diluições decimais em ágar YPD após incubação a 28°C por 48h. No final das três fermentações foi realizado a junção das mesmas e avaliado a contagem de células viáveis dessa junção, determinadas através do plaqueamento das diluições decimais em ágar YPD após incubação a 28°C por 48h.

Para controle foi utilizada a levedura *Sacharomyces Boullard* adquirida em comércio local, a qual foi cultivada e fermentada de acordo a *Komagataella Phaffii*.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo, avaliamos a obtenção de massa celular úmida através do rendimento após centrifugação de três fermentações consecutivas da *Komagataella Phaffii* cepa X33 e sua viabilidade celular, comparando os resultados com a *Sacharomyces Boullard*.

O resultado do rendimento de massa celular úmida está apresentado na Tabela 1 onde podemos observar que a *Komagataella Phaffii* obteve rendimento maior que a *Sacharomyces Boullard* nas duas primeiras fermentações, tendo rendimento igual na terceira fermentação. Com isso, percebe-se que a *Komagataella Phaffii* apresentou rendimento total de massa celular úmida superior a *Sacharomyces Boullard*.

Tabela 1 – Rendimento de massa celular úmida das fermentações realizadas com as leveduras.

Leveduras	Rendimento fermentações			Rendimento total
	1^a	2^a	3^a	
<i>Komagataella Phaffii</i>	267g	230g	209g	706g
<i>Sacharomyces Boullard</i>	230g	217g	209g	656g

No que se trata da viabilidade celular, podemos observar na Tabela 2 que a *Komagataella Phaffii* obteve concentrações acima que a *Sacharomyces Boullard* em todas fermentações e na concentração total da mistura das três fermentações.

Tabela 2 – Concentração de células viáveis em cada fermentação e após mistura das três fermentações, log UFC.g⁻¹

Leveduras	Concentração de células viáveis			Concentração de células viáveis total
	1^a	2^a	3^a	
<i>Komagataella Phaffii</i>	$3,76 \times 10^{10}$	$2,57 \times 10^{10}$	$4,27 \times 10^9$	$5,0 \times 10^{11}$
<i>Sacharomyces Boullard</i>	$3,68 \times 10^{10}$	$1,3 \times 10^{10}$	$2,37 \times 10^9$	$3,9 \times 10^{11}$

Inúmeros benefícios à saúde têm sido atribuídos à ingestão de probióticos, porém, é importante ressaltar que tais benefícios somente ocorrem se os mesmos estiverem totalmente viáveis nos produtos onde serão incluídos, ou seja, que sobrevivam durante seu processamento e condições de armazenamento, sendo assim ingeridos em quantidades adequadas, alcançando um número viável de microrganismos (10^6 - 10^7 UFCg⁻¹) (SOHAIL et al., 2011; TRIPATHI; GIRI, 2014). No Brasil, a legislação recomenda 10^8 – 10^9 UFC/100g na recomendação diária do produto pronto para consumo (BRASIL, 2008).

Sabe-se até o momento que estudos não tem demonstrado o efeito probiótico da *Komagataella Phaffii* visando a sua encapsulação e que para se ter eficiência na microencapsulação é desejável que os microrganismos de interesse possuam a maior quantidade de células viáveis possíveis. Tendo em vista os resultados apresentados das fermentações realizadas, podemos confirmar que a *Komagataella Phaffii* apresenta vantagens, quando comparada a *S. boulardii* por apresentar produtividade e viabilidade celular superior. Com isso, um litro de caldo (YPD mais sacarose) produziu em torno de 47g de massa úmida da *Komagataella Phaffii* a uma concentração de $5,0 \times 10^{11}$ UFC.g⁻¹, demonstrando seu potencial para possível encapsulação.

4. CONCLUSÕES

Dado o apresentado neste estudo, conclui-se ser possível a microencapsulação da *Komagataella Phaffii* tendo em vista sua viabilidade celular, apresentando potencial para ser caracterizada como probiótico e ser uma inovação tecnológica.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas para alimentos com alegações de propriedades funcionais e / ou de saúde, novos alimentos / ingredientes, substâncias bioativas e probióticos. Brasília, 2008.
- BURGAIN, J. et al. Encapsulation of probiotics in milk protein microcapsules. **Microencapsulation and microspheres for food applications**. Elsevier Inc. All rights reserved. 1 Ed, France, p. 391-406, 2015.
- BUTS, JP; KEYSER N.D. Effects of *Saccharomyces boulardii* on Intestinal Mucosa. **Springer Science**, n 51, p.1485-1492, 2006.
- CAVALHEIRO, C. P. et al. Encapsulação: alternativa para a aplicação de microrganismos probióticos em alimentos termicamente processados. **Ciencia & Natura**, v. 37, p. 65-74, 2015b.
- CRYAN, J.F., BOEHME, M., DINAN, T.G. Is the fountain of youth in the gut microbiome? **J. Physiol.** p. 2323–2324, 2019.
- ECKBURG, P.B., BIK, E.M., BERNSTEIN, C. N., PURDOM, E., DETHLEFSEN, L., SARGENT, M., GILL, S. R., NELSON, K. E., RELMAN, D.A. Diversity of the human intestinal microbial flora. **Science**. V. 308, p. 1635–1638, 2005.
- FAO/WHO. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. FAO/ WHO. **Food and Agriculture Organization / World Health Organization**. [Food and Agriculture Organization/World Health Organization.], London.1–11. 2002.
- FRANÇA, R.C.; CONCEIÇÃO, F.R.; MENDONÇA, M.; HAUBERT, L.; SABADIN, G.; DE OLIVEIRA, P. D.; AMARAL, M. G.; SILVA, W. P.; MOREIRA, A.N. *Pichia pastoris* X-33 has probiotic properties with remarkable antibacterial activity against *Salmonella Typhimurium*. **Appl Microbiol Biotechnol**. p. 7953–7961, 2015.
- MARTINS, F. S.; DALMASSO, G.; ARANTES, R. M. E.; DOYE, A.; LEMICHEZ, E.; LAGADEC, P.; IMBERT, V.; PEYRON, J.; RAMPAL, P.; NICOLI J. R.; CZERUCKA, D. Interaction of *Saccharomyces boulardii* with *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Protects Mice and Modifies T84 Cell Response to the Infection. **PLoS ONE**. v 5, 2010.
- SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 1, p. 1-16, 2006.
- SILVA, T. M. et al. Coacervação complexa: uma técnica para a encapsulação de probióticos. **Ciencia & Natura**, v. 37, p. 49-55, 2015.
- SOHAIL, A. et al. Survivability of probiotics encapsulated in alginate gel microbeads using a novel impinging aerosols method. **International Journal of Food Microbiology**, v.145, n.1, p. 162- 168, 2011.
- TRAN, A. M., NGUYEN, T.T., NGUYEN, C. T., HUYNH-THI, X. M., TRINH, M.T., TRAN, L. T., CARTWRIGHT, S.P., BILL, R.M., TRAN-VAN, H. *Pichia pastoris* versus *Saccharomyces cerevisiae*: a case study on the recombinant production of human granulocytemacrophage colony-stimulating factor. **BMC Res. Notes**, 2017.
- TRIPATHI, M. K.; GIRI, S. K. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. **Journal of Functional Foods**, v. 9, p. 225-241, 2014.
- VOS, P. et al. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. **International Dairy Journal**, v. 20, n. 4, p. 292-302, 2010.