

SOBREVIVÊNCIA DA LEVEDURA KOMAGATAELLA PHAFFII CEPA X-33 DURANTE ARMAZENAMENTO SOB REFRIGERAÇÃO

MARCELO ROSADO FURTADO¹; EDIANE DEIJALY DOS SANTOS²;
ISABELA BOLDRINI DUTRA RASCH³; KETNEN RIEFFEL DAS CHAGAS⁴;
MARIA LUIZA DE OLIVEIRA ZANINI⁵; PATRÍCIA SILVA DIAZ⁶;

¹Universidade federal de Pelotas – marcelorosado2011@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – deijaly@hotmail.com

³Universidade federal de Pelotas – isabelabrasch@gmail.com

⁴Universidade federal de pelotas – rieffelketnen@gmail.com

⁵Universidade federal de pelotas – luizaznn@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – bilicadiaz@yahoo.com

1. INTRODUÇÃO

A *Komagataella phaffii*, antigamente conhecida como *Picchia Pastoris*, é uma levedura metilotrófica amplamente utilizada como plataforma de produção para proteínas heterólogas (CREGG, 1985, 2000; TORRES, 2000). Em 2015, FRANÇA *et al* comprovou a propriedade probiótica da *K. phaffii*, a partir deste fato, os estudos com a levedura, até o momento, *Picchia Pastoris*, se intensificavam – obtendo também comprovação de atividade antibacteriana contra *Salmonella Typhimurium* por FRANÇA *et al*, 2015.

O meio de cultura utilizado, comumente a fermentação de *Komagataella phaffii* e de *Saccharomyces boulardii*, é o meio *Yeast Peptone Dextrose* (YPD), conhecido como YPD (SANTOS *et al*, 2012; FRANÇA *et al*, 2015). No entanto, há estudos com meios utilizando de efluente de arroz parboilizado suplementado com glicerol de biodiesel (GABOARDI *et al*, 2018; SANTOS *et al*, 2012, 2018).

Os microrganismos precisam de armazenamento para evitar variabilidade fenotípica e genotípica, e para estudos retrospectivos e prospectivos, além de aplicação industrial nas áreas relacionadas com biotecnologia (KAWAMURA *et al*, 1995).

Além disso, a secreção de micotoxinas por uma espécie de *Penicillium* pode ser influenciada pelas condições de armazenamento, o que também pode alterar a produção e secreção de enzimas relacionadas ao metabolismo e à virulência das leveduras (SANTOS *et al.*, 2002).

Portanto, torna-se indispensável o armazenamento correto do microrganismo, e MENEZES *et al* atesta, em 2019, que os meios de cultura que possuem apenas glicose minimizam o risco de alterações, e categoriza os meios líquidos como água destilada e solução salina esterilizada, como baratas e capazes de manter a viabilidade além de diminuir a chance de mutações.

Com este estudo, temos como objetivo avaliar a sobrevivência da *K. phaffii* e da *Saccharomyces boullardii* durante o período de armazenamento em solução salina durante nove meses em temperatura de refrigeração (4 °C), conferindo se a mesma permanece dentro dos parâmetros da Food and Agriculture Organizations of the United Nations (FAO/WHO, 2001).

2. METODOLOGIA

A levedura *K. phaffii*, cepa X-33, pertencente ao estoque do Núcleo de Biotecnologia do Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), foi cultivada, de acordo com França *et al*

(2015), com modificações no tempo de cultivo e na utilização de sacarose durante as fermentações, em caldo Yeast Peptone Dextrose (YPD) por 48 h a 28 °C, sob agitação de 200 rpm em agitador orbital. A levedura foi conservada em glicerol (30%) e YPD (70%) sob congelamento (-20 °C).

Seguindo para a fermentação em cuba de 10L do biorreator (Bioflo110, New Brunswick) contendo 4L de caldo YPD, 500 ml de sacarose e 500 ml de inóculo, que possuía mais que 11 UFC.ml⁻¹, o cultivo foi incubado a 28 °C, 500 rpm, 1 vvm de ar por 24h, com a adição de antiespumante 204 (Sigma®) durante a fermentação. Após a fermentação, o cultivo foi centrifugado a 5000 × g por 15 min a 4°C e o *pellet* contendo as células foi lavado em solução salina 0,9% e mantido sob refrigeração a 4°C. Para a contagem de células viáveis, uma alíquota foi coletada e a concentração foi determinada por plaqueamento das diluições decimais em salina 0,9%, em placas com ágar YPD. As placas foram incubadas a 28°C por 48h e as contagens foram expressas como log unidade formadora de colônia por grama (log UFC.g⁻¹).

As fermentações foram realizadas três vezes, durante três semanas consecutivas, para avaliar a produtividade de massa celular úmida (biomassa celular) e determinar a sobrevivência das células viáveis.

Para controle, foi utilizada a levedura *S. boulardii*, adquirida em comércio local (Floratil®, Brasil), a qual foi cultivada e fermentada nas mesmas condições de *K. phaffii*. Pellets de células das leveduras foram mantidos refrigerados a 4°C e ressuspensos em solução salina 0,9% durante todo o experimento.

Após isso, durante nove meses, as células livres, suspensas na solução salina 0,9% e armazenadas em temperatura de refrigeração (4 °C), estavam sendo avaliadas de três em três meses.

Alíquotas foram coletadas e analisadas para avaliar a contagem de células viáveis e a concentração de células foi expressa em UFC.g⁻¹.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das fermentações podem ser observados na Tabela 1, onde *K. phaffii* obteve produtividade de biomassa úmida significativamente superior a *S. boulardii* nas duas primeiras fermentações, tendo produtividade igual na terceira. Observou-se ainda que *K. phaffii* e *S. boulardii*, apresentaram, na primeira e na terceira fermentação, concentrações de células viáveis sem diferença significativa. Todavia, na segunda fermentação, *K. phaffii* apresentou contagem de células viáveis superior a *S. boulardii*, com diferença significativa.

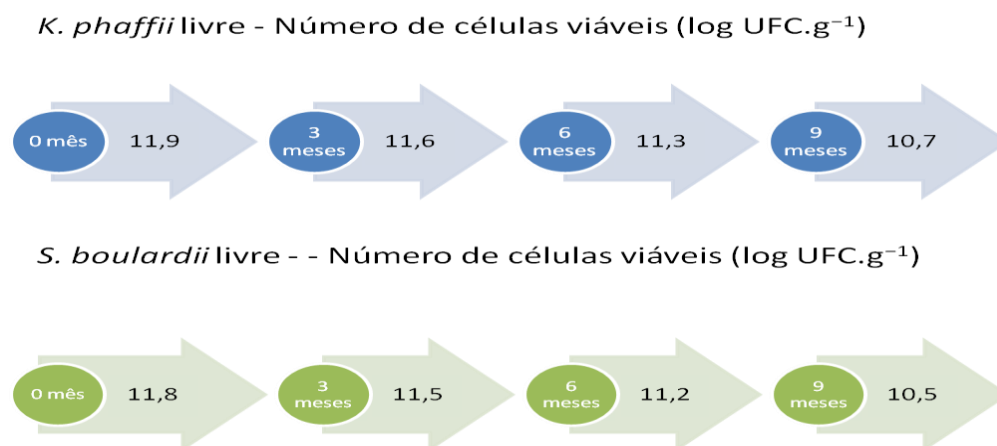
Tabela 1 – Produtividade da biomassa celular e contagem das células viáveis das leveduras *K. phaffii* e *S. boulardii* após três fermentações.

Leveduras	Produtividade / Contagem	Fermentações		
		1 ^a	2 ^a	3 ^a
<i>K. phaffii</i>	Biomassa (g)	267 ^a	230 ^a	209 ^a
	Contagem (log UFC.g ⁻¹)	11,9±0,16 ^a	11,9±0,16 ^a	11,8±0,26 ^a
	Biomassa (g)	230 ^b	217 ^b	209 ^a
<i>S. boulardii</i>	Contagem (log UFC.g ⁻¹)	11,8±0,31 ^a	11,7±0,34 ^b	11,7±0,34 ^a

Fonte: Elaborado pela coautora. Os resultados da biomassa e da contagem representam a média \pm desvio padrão. Letras sobrescritas diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatisticamente significativas teste T e qui-quadrado ao nível de 5% de significância.

Os resultados da sobrevivência das leveduras livres sob armazenamento em refrigeração podem ser observados na Figura 1.

Figura 1– Linha do tempo da taxa de sobrevivência (log UFC.g⁻¹) de *K. phaffii* e *S. boulardii* livres sob armazenamento de nove meses e temperatura de 4 ± 1 °C (refrigeração).



A sobrevivência já havia sido demonstrada eficaz em períodos menores, por pelo menos dois meses por França *et al* em 2015 e em três meses por Gaboardi *et al* em 2019. O nosso estudo não só concorda com os dados apresentados pelos pesquisadores, como também amplia este tempo de armazenamento.

A *K. phaffii*, e a *S. boulardii* são excelentes leveduras nos quesitos de produtividade e tempo de armazenamento com viabilidade. A *K. phaffii* apresenta sempre uma leve quantidade superior durante quase todas as fermentações e mantém a taxa de sobrevivência equivalente a levedura controle, que já se encontra disponível no mercado.

4. CONCLUSÕES

A *Komagataella phaffii* demonstrou números próximos/superiores a *Sacharomyces boulardii*. Isto a coloca como um ótimo probiótico, podendo ser armazenado por diversos meses e perdendo pouquíssima qualidade, além de conseguir se equivaler às leveduras probióticas conhecidas do mercado.

A *K. phaffii* respondeu bem à solução salina 0,9%, assim como a *S. boulardii*. É interessante analisar também o fato da pouca perda de UFC, durante os seis meses iniciais, o que é um resultado promissor para a *K. phaffii*.

A *Komagataella phaffii* demonstra-se uma levedura muito resistente e diversos testes vêm demonstrando que ela será uma boa adição ao mercado.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CREGG J., M.; BARRINGER K., J.; HESSLER A., Y.; MADDEN K., R.; (1985) *Pichia pastoris* as a host system for transformations. **Mol Cell Biol** 5:3376–3385.

CREGG J., M.; CEREGHINO J., L.; SHI J.; HIGGINS D., R.; (2000) Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. **Mol Biotechnol** 16:23–52.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATIONS OF THE UNITED NATIONS. **FAO DATABASE**. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data>

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**, 2015.

GABOARDI, G.; Santos, D.; MENDES L.; CENTENO, L.; MEIRELES, T.; VARGAS, S.; GRIEP, E.; SILVA, A.; MOREIRA, Â.; CONCEIÇÃO, F. Bioremediation and biomass production from the cultivation of probiotic *Saccharomyces boulardii* in parboiled rice effluent. **J Environ Manage**. 2018 Nov 15;226:180-186. doi: 10.1016/j.jenvman.2018.08.027.

KAWAMURA, S.; MURAKAMI, Y.; MIYAMOTO, Y.; KIMURA, K.; Cryopreservation and freeze-drying protocols. Freeze-drying of yeasts. **Methods Mol Biol**. 1995; 38: 31-7.

PEDROSO, R. dos S.; MENEZES, R. de P. Viabilidade in vitro de leveduras armazenadas à temperatura ambiente. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Goiânia, v. 16, n. E, 2019.

SANT'ANA, P. de L. **Diferentes processos de armazenamento de levedura: estudos sobre a variabilidade fenotípica e genotípica**. 2006. 137p. Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Piracicaba, SP.

SANTOS D., G.; SANTOS J., R.; GIL-TURNES, C.; GABOARDI, G.; SILVA, L.; FRANÇA, R.; FERNANDES, C.; CONCEIÇÃO, F.; Probiotic effect of *Pichia pastoris* X-33 produced in parboiled rice effluent and YPD medium on broiler chickens. **PLoS One**. 2018 Feb 15;13(2):e0192904. doi: 10.1371/journal.pone.0192904.

SANTOS D., G.; GIL-TURNES C.; CONCEIÇÃO F. (2012) Bioremediation of parboiled rice effluent supplemented with biodiesel-derived glycerol using *Pichia pastoris* X-33. **Sci World J**.

Santos IM, Abrunhosa L, Venâncio A, Lima N. The effect of culture preservation techniques on patulin and citrinin production by *Penicillium expansum* Link. **Lett ppl Microbiol**. 2002; 35: 272-5.

SANTOS, G; SANTOS, J.; STORCH, O.; FERNANDES, C.; GIL-TURNES, C.; (2012) Evaluation in roilers of the probiotic properties of *Pichia pastoris* and a recombinant *P. pastoris* containing the *Clostridium perfringens* alpha toxin gene. **Vet. Microbiology**. 156(3–4):448- 451.

TORRES F., A., G.; MORAES L., M., P.; (2000). Proteínas recombinantes produzidas em leveduras. **Biotechnol Cien Desenv** 12:20–22.