

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária



Dissertação

**Avaliação como probióticos para frangos de corte
de *Pichia pastoris* e *Pichia pastoris* recombinante
contendo o gene da fosfolipase C de *Clostridium
perfringens***

Otávio Brod Storch

Pelotas, 2008

OTÁVIO BROD STORCH

Avaliação como probióticos para frangos de corte de *Pichia pastoris* e *Pichia pastoris* recombinante contendo o gene da fosfolipase C de *Clostridium perfringens*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de conhecimento: Doenças Infecciosas).

Orientador: Dr. Carlos Gil Turnes

Co-orientador: Dr. João Rodrigo Gil de los Santos

Pelotas, 2008

Banca examinadora:

Prof. Dr. Carlos Gil Turnes, Universidade Federal de Pelotas (Orientador)

Prof. Dr. Gilberto D'Ávila Vargas, Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Marcos Antonio Anciuti, CAVG, Universidade Federal de Pelotas

Suplente: Dr. João Rodrigo Gil de los Santos

*Dedico esta dissertação à meus pais,
Roberval (in memorian) e Regina,
aos meus irmãos,
Rafael e Raquel,
e ao meu Orientador e Mestre,
Carlos Gil Turnes.*

Sou eternamente grato a Vocês....

Agradecimentos

A Deus, pela vida e pelas chances que Ele me deu.

Aos meus pais, que me deram à vida, acima de tudo, e que do seu jeito, me ensinaram quase tudo que sabiam, ficavam quase loucos quando eu desmontava tudo e depois remontava, para botar a prova aquilo que eles tinham me ensinado, e é claro, me amaram muito para agüentar isso (ao meu pai, que eu sei que onde quer que ele esteja, ele está olhando por mim, e minha mãe, que se não esta olhando, tenho certeza que ela tem o número do celular).

Ao meu irmão Rafael e minha irmã Raquel, por me ajudarem, me ensinarem e por acreditarem em mim (vocês podem dar trabalho, mas eu acredito que não haveria irmãos melhores para mim).

Ao meu Cunhado, Luiz Alberto Echenique Dominguez, que me ensinou muito, me ajudou, e acima de tudo, foi meu amigo nas piores horas.

Ao meu chefe, Carlos Gil Turnes, que me aceitou como orientado antes mesmo de eu começar a Faculdade de Veterinária, e sempre que pode me ajudou do jeito que podia. (E sempre se preocupou comigo. Professor, Muito Obrigado).

A minha avó, Beda Heling Brod (*in memorian*), que não deixou eu desistir dos meus sonhos.

A Carina, uma amiga valiosa, que me ajudou e que me orientou, sempre que eu precisei (acho que eu deveria tê-la colocado de Co-orientadora também....).

A Nice, a Marcela, ao Alceu, ao Rodrigo, ao André, a Mariana, a Michele, a Roberta, a Flávia, ao Everton, ao Nizolli e ao Luciano, galera do CENBIOT, pessoas que me concederam sua amizade, e que além disso me ajudaram na realização do experimento.

Ao professor José Antônio Guimarães Aleixo, que me ensinou muito ao longo de oito anos.

A professora Claire Tondo Vendruscolo, que é quase uma segunda mãe para mim.

A Angelita, uma valiosa amiga.

Ao Sinuhe, ao Daniel, ao Thiago e ao Rodrigo, alguns dos melhores amigos que eu já encontrei.

A professora Cristina Gevehr Fernandes, que me ajudou muito no meu experimento (muito mesmo) com toda a parte de patologia, e muito mais do que isso, é uma sensacional amiga e conselheira. Cris, Muito Obrigado (acho que ela também poderia ir de Co-orientadora...).

A Silvana Aline Cordeiro Antonioli, que apesar de nossas desavenças, me ajudou muito, por muitas vezes nas piores horas, e é uma pessoa extremamente importante para mim.

Ao João Rodrigo, meu Co-orientador e amigo, Valeu.

Ao Matheus e a Paulinha, meus amigos de longa data, e em particular ao Matheus, pelas necropsias que ele ajudou, e pelas mais de 1000 lâminas de tecidos dos meus animais que ele olhou (ele teve muita paciência).

Ao Thomas, que além de meu amigo, ajudou o Matheus com as lâminas de tecidos e com as necropsias.

A Adalgisa, a Andréa, a Talita, a Luana e a Liana, por serem minhas amigas e me ajudarem no laboratório, e às fora vezes dele também.

A Srta. Eveline Bordignon, uma pessoa excepcional, pelo seu empurrão final, para que eu concluísse uma etapa e começasse outra.

A todos mais que me ajudaram e que não apareceram aqui, o meu Muito Obrigado.

RESUMO

Storch, Otávio Brod. **Avaliação como probióticos para frangos de corte de *Pichia pastoris* e *Pichia pastoris* recombinante contendo o gene da fosfolipase C de *Clostridium perfringens***. 2008. 54f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brasil.

Os antibióticos utilizados como promotores de crescimento nas últimas décadas foram banidos em vários países devido ao risco de induzir o surgimento de bactérias resistentes. Entre as alternativas para sua substituição, os probióticos, suplementos alimentares compostos de microrganismos vivos que beneficiam a saúde do hospedeiro através do equilíbrio da microbiota intestinal, aparecem como a mais plausível. Este trabalho objetivou determinar as propriedades como probiótico da levedura *Pichia pastoris* e sua variante recombinante contendo o gene da fosfolipase C de *Clostridium perfringens*. Frangos de um dia de idade da linhagem Ross[®] P8 foram distribuídas aleatoriamente em quatro grupos de dez animais cada, em três repetições, e alimentadas com ração comercial isenta de antibacterianos. O grupo 1 (Controle) recebeu ração não suplementada, o grupo 2 recebeu a mesma ração suplementada com 1×10^6 células viáveis gr^{-1} de *P. pastoris* cepa KM71H, o grupo 3 ração suplementada com 1×10^6 gr^{-1} de células viáveis de *P. pastoris* recombinante contendo o gene da toxina α de *C. perfringens*, e o grupo 4 ração suplementada com 1×10^6 gr^{-1} de esporos viáveis de *Bacillus cereus* var. Toyoi. Ração e água foram oferecidos *ad libitum*. Estimou-se o ganho de peso de cada animal aos 49 dias de idade, e a conversão alimentar de cada grupo. Determinou-se a soroconversão individual por ELISA, utilizando como antígeno a toxina α padrão de *C. perfringens*, a partir de amostras de sangue coletadas aos 1, 10, 20, 30 e 49 dias de idade. Ao término do experimento os animais foram abatidos e amostras de órgãos submetidos a análise histopatológica. No dia 49, os pesos vivos médios foram 2,172, 2,228, 2,410 e 2,333 kg, significativamente diferentes ($P < 0,05$) ao grupo controle, para os grupos 1, 2, 3 e 4, respectivamente. As conversões alimentares médias foram 2,58, 2,41, 2,35 e 2,5 para os grupos 1, 2, 3 e 4, respectivamente. As soroconversões ao dia 49 foram 1,1, 1,4, 1,5 e 1,3 para os grupos 1, 2, 3 e 4, respectivamente, significativamente diferentes ($P < 0,05$) ao grupo controle. Nos estudos histopatológicos não foram encontradas alterações. Concluiu-se que *P. pastoris* e *P. pastoris* recombinante podem ser utilizadas como probiótico em frangos de corte por aumentar a eficiência alimentar e a soroconversão, sem apresentar contraindicações.

Palavras-chave: *Pichia pastoris*, Soroconversão, Promotores de Crescimento, Probiótico, Suplementos alimentares.

ABSTRACT

Storch, Otávio Brod. **Evaluation of the probiotic properties in broilers of *Pichia pastoris* and a recombinant *Pichia pastoris* containing the *Clostridium perfringens* fosfolipase C gene.** 2008. 54p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brasil.

Antibiotics used for the last decades as growth promoters for animals, were banned in several countries because of the risk of inducing the appearance of antibiotic resistant bacteria. Probiotics, live microorganisms that benefit health promoting the stability of the gut microbiota, are their most promising substitutes. The objective of this research was to determine the probiotic properties of *Pichia pastoris* and a recombinant *P. pastoris* containing the *Clostridium perfringens* fosfolipase C gene. Ross® P8 female chicks were randomly distributed in four groups of ten each, in three repeats, and fed with a commercial food devoid of antibacterials. Group 1 was fed with un-supplemented food; group 2 was supplemented with 1×10^6 viable *P. pastoris* strain KM71H gr^{-1} ; group 3 with 1×10^6 viable recombinant *P. pastoris* containing the *C. perfringens* fosfolipase C gene gr^{-1} and group 4 with 1×10^6 viable spores of *Bacillus cereus* var. Toyoi gr^{-1} . Water and food were supplied *ad libitum*. Weight gain of each animal and food conversion of each group at 49 days of age, were estimated. Individual seroconversions against *C. perfringens* α toxin at days 1, 10, 20, 30 and 49 were estimated. At the end of the experiment the animals were slaughtered and samples from different organs examined histologically. Mean live weights at 49 days of age were 2.172, 2.228, 2.410 and 2.333 Kg for groups 1, 2, 3 and 4, respectively, different at $P < 0.05$. Mean food conversions were 2.58, 2.41, 2.35 and 2.50 for groups 1, 2, 3 and 4, respectively. Seroconversions at 49 days of age were 1.1, 1.4, 1.5 and 1.3 for groups 1, 2, 3 and 4, respectively, different at $P < 0.05$. Histological alterations were not detected. It was concluded that *P. pastoris* and recombinant *P. pastoris* may be used as probiotics for broilers due to their capacity of increasing food efficiency and seroconversion without undesirable effects.

Key words: *Pichia pastoris*, Growth Promoters, Seroconversion, Probiotics, Food supplements.

Lista de figuras

Figura 1. Ganho de peso obtido pelos diferentes grupos experimentais.....39

Figura 2: Dot-ELISA de amostras de soro dos grupos experimentais, utilizando toxina α recombinante de *Clostridium perfringens* como antígeno.....41

Lista de tabelas

Tabela 1. Conversão alimentar dos diferentes grupos experimentais.....39

Tabela 2 . Soroconversão dos grupos experimentais.....40

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. Artigo 1: <i>Pichia pastoris</i> como probiótico	16
Introdução	19
Conclusão	26
Referências	27
3. ARTIGO 2: Avaliação de <i>Pichia pastoris</i> e <i>Pichia pastoris</i> recombinante, contendo o gene da fosfolipase C de <i>Clostridium perfringens</i> como probióticos para frangos de corte	31
Introdução	35
Materiais e métodos	35
Resultados	38
Discussão	41
Bibliografia	43
4. Conclusões	46
5. Referências Bibliográficas	47
6. Anexos	56

1. INTRODUÇÃO

Desde o final da segunda guerra mundial, os antibióticos são utilizados como promotores de crescimento, devido a seus efeitos sobre a eficiência alimentar dos animais. O principal problema que sua utilização acarreta é a possibilidade de induzir resistência de microorganismos à antibióticos. Por isso, a demanda por produtos de origem animal produzidos sem a utilização de antibióticos como promotores de crescimento tem se tornado cada vez maior. Os probióticos, que segundo as definições de FULLER (1989) e KAUR et al. (2002) são suplementos alimentares compostos de microrganismos vivos que beneficiam a saúde do hospedeiro através do equilíbrio da microbiota intestinal, se apresentam como uma alternativa para a substituição dos antibióticos.

O Brasil tem a necessidade de manter e conquistar novos mercados, com elevados níveis de exigência e de alto poder aquisitivo, principalmente Europa, Japão e Estados Unidos. O constante aparecimento de bactérias multirresistentes devido a uso rotineiro de antibióticos, aliado às novas exigências impostas por esses mercados, e a questão imposta quanto o controle de doenças em animais de produção, fazem com que tanto a indústria quanto a pesquisa brasileira procurem formas de produzir alimentos de origem animal de elevada qualidade sanitária e a preços competitivos, sem a utilização de antibióticos na alimentação animal. Dentre as alternativas viáveis para esse fim, os probióticos, que vem sendo utilizados com

sucesso há décadas na alimentação humana, tanto com finalidades profiláticas quanto terapêuticas, são uma das soluções mais atraentes para esse problema.

Na alimentação animal o interesse pelos probióticos é crescente. Seus efeitos benéficos sobre várias espécies animais são conhecidos, mesmo que algumas poucas pesquisas tenham demonstrado o contrário. Ainda que já tenha sido comprovado que algumas espécies de probióticos, além de mudar a microbiota do trato gastrointestinal de aves podem prevenir infecções mantendo os mesmos índices de produtividade alcançados com a suplementação por antibióticos, as indústrias ainda estão relutantes quanto à sua utilização devido aos resultados controversos apontados pela literatura, principalmente referente ao custo-benefício de sua utilização. Porém, assim como ocorreu na medicina humana, é muito provável que a utilização em larga escala de probióticos seja uma realidade nos próximos anos, tornando-os indispensáveis na produção animal. (Gil De Los Santos & Gil-Turnes, 2005).

Vários probióticos foram desenvolvidos para uso em humanos e animais. Dentre estes, *Bacillus cereus* var. *toyoi* e *Saccharomyces boulardii* produzidos no Centro de Biotecnologia da UFPel, deram resultados promissores em diversas espécies animais (Zani et al., 1998; Gil de los Santos et al., 2005). Ambos apresentam características apropriadas para uso em produção animal, já seja devido à capacidade para esporular do primeiro, que o protege frente às condições adversas que enfrenta o probiótico durante o processo de preparação das rações e durante o armazenamento (Gil Turnes et al., 1999), ou à facilidade de utilização de meios de cultura de baixo custo, do segundo (Schneid et al., 2004).

As leveduras são microrganismos eucarióticos utilizados na produção eficiente de grande número de produtos e processos a partir de substratos de baixo

custo. Leveduras do gênero *Saccharomyces* são utilizadas como probióticos em humanos e animais desde há muito tempo (Gil de los Santos et al., 200.). Não existem registros, porém, do uso de leveduras do gênero *Pichia* com essa finalidade.

Pichia pastoris é uma levedura da família *Saccharomycetaceae*, gênero *Pichia*, que pode ser utilizada para a produção de proteínas recombinantes em larga escala. Outras leveduras desta família também podem ser utilizadas para tal fim, como *Saccharomyces cerevisiae*, que produziu a proteína Gag recombinante do Vírus da Imunodeficiência Adquirida Humana (HIV) tipo 2 (Morikawa et al., 2007). Apesar de que a utilização do metanol não é uma característica exclusiva deste gênero (os gêneros *Candida*, *Hansenula* e *Torulopsis* também tem a mesma propriedade), *Pichia* se destaca na produtividade em quanto à quantidade de células por litro (até 130g de matéria seca/litro) e na sua capacidade de expressar proteínas heterólogas em grande quantidade (Cregg, 2008). Uma das características do gênero *Pichia* é que pode utilizar como fonte de carbono o metanol, devido à presença dos genes Álcool Oxidase I e II (AOX1 e AOX2). Estes genes, principalmente o AOX1, também servem de promotores para a produção da proteína desejada (INVITROGEN, 2004). Atualmente, outras fontes de carbono tais como o glicerol resultante da fabricação de biodiesel, estão sendo estudadas para a indução de produção de proteínas (Çelik et al., 2008).

HIPÓTESE

A levedura *Pichia pastoris* selvagem apresenta propriedades probióticas.

A levedura *Pichia pastoris* recombinante, contendo o gene da toxina α de *C. perfringens* induzirá uma resposta imune específica contra essa toxina.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar a utilização de *Pichia pastoris* em produção animal

Objetivos específicos

Avaliar o efeito probiótico em frangos de corte de *Pichia pastoris*.

Avaliar a resposta imune induzida por *Pichia pastoris* recombinante contendo o gene da toxina α de *C. perfringens*.

2 ARTIGO 1

***Pichia pastoris* COMO PROBIÓTICO**

(Revisão a ser submetida à revista Ciência Rural)

***Pichia pastoris* como probiótico**

***Pichia pastoris* as probiotic**

Otávio Brod Storch, Carlos Gil Turnes

- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA -

Resumo

Os antibióticos são utilizados como promotores de crescimento, devido a seus efeitos sobre a eficiência alimentar dos animais. O principal problema que sua utilização acarreta é a possibilidade de induzir resistência de microorganismos à antibióticos. Devido à crescente demanda mundial por produtos saudáveis, e também por exigências de mercados consumidores, como a Europa, que desde 2006 proibiu a comercialização de produtos de origem animal que receberam antibióticos, os antibióticos tendem a ser banidos em outras partes do mundo como promotores de crescimento. Os probióticos tem se apresentado como uma alternativa ao uso dos antibióticos. Probióticos são suplementos alimentares compostos de microorganismos vivos que beneficiam a saúde do hospedeiro através do equilíbrio da microbiota intestinal. Leveduras como a *Saccharomyces cerevisiae* e *S. boulardii* já são utilizadas como probióticos há muitos anos. *Pichia pastoris* é uma levedura da família *Saccharomycetaceae*, gênero *Pichia*, que é utilizada para a produção de proteínas recombinantes em larga escala, embora exista pouca informação sobre a utilização desta levedura como probiótico. Esta revisão apresenta as propriedades já conhecidas de *P. pastoris* e demonstra que esta levedura tem potencial como probiótico.

Palavras chave: *Pichia pastoris*, probiótico, promotores de crescimento, avicultura, conversão alimentar

ABSTRACT

Antibiotics are used as growth promoters due to their effect on feed efficiency in animals, although they can induce the appearance of antibiotic resistant bacteria. Due to the increasing demand of healthy products of animal origin, several markets banned the importation of products originated from antibiotic fed animals, such as Europe that enforced the ban in 2006. Probiotics surged as the most promising alternative for their substitution. Yeasts such as *Saccharomyces cerevisiae* and *S. boulardii* have been used as probiotics for many years. *Pichia pastoris*, yeast from the *Saccharomycetacea* family, is used to produce recombinant proteins in large scale, although their properties as probiotic were not studied. This review presents *P. pastoris*' known characteristics and properties, and the possibility of using this yeast as probiotic.

Key words: *Pichia pastoris*, probiotic, growth promoters, poultry, feed efficiency

Introdução

A utilização de probióticos para substituir aos antibióticos como promotores de crescimento está se tornando cada vez mais freqüente. Os probióticos são suplementos alimentares compostos de microrganismos vivos que beneficiam a saúde do hospedeiro através do equilíbrio da microbiota intestinal (FULLER, 1989; KAUR et al., 2001). Devem apresentar características específicas, como ser apatogênicos na natureza, resistentes à destruição durante o processamento industrial das rações (peletização, secagem), resistir à ação do suco gástrico e a bile, aderirem ao epitélio intestinal, serem capazes de colonizar o trato gastrintestinal, mesmo que por um curto período, produzir substâncias antimicrobianas, modular a resposta imune e o metabolismo (TEITELBAUM & WALKER, 2002). Independentemente do conceito utilizado, os probióticos trazem benefícios à saúde do hospedeiro, não deixam resíduos nos produtos de origem animal e não favorecem resistência às drogas (NEPOMUCENO & ANDREATTI, 2000).

Prebióticos são substâncias não absorvíveis ou hidrolisáveis pelo animal que as consome que favorecem a flora comensal, evitando a proliferação de patógenos (TEITELBAUM & WALKER, 2002). As leveduras, algumas das quais são utilizadas como probióticos em humanos há várias décadas, apresentam, além das propriedades já descritas, efeito prebiótico quando administradas mortas ou inativadas, como foi demonstrado por OEZTUERK et al. (2005).

Devido à crescente demanda mundial por produtos saudáveis, e também por exigências de mercados consumidores, como a Europa (COUNCIL of the EUROPEAN UNION, 2003, EU legislation, Council Regulation N°. 2821/98), que desde 2006 proibiu a comercialização de produtos de origem animal que receberam antibióticos, os antibióticos tendem a ser banidos em outras partes do mundo como promotores de crescimento, principalmente devido ao fato que seu uso contínuo favorece o surgimento de cepas

bacterianas resistentes a estes, tal qual foi comunicado por FALLON et al. (2003), na Irlanda, com o *Clostridium jejuni*, PEZZOTI et al. (2003), na Itália, com o gênero *Campylobacter* spp. e CHANG (2000), na Coreia do Sul, com o gênero *Salmonella* spp.. Além disso, resíduos de antimicrobianos nos produtos que podem induzir alergias severas.

Proteína unicelular

Proteína Unicelular, *Single Cell Protein* (SCP), foi a denominação cunhada por Carol Wilson do Massachusetts Institute of Technology (WARE, 1977) em seu estudo sobre o reaproveitamento dos dejetos, para dar um nome mais aceitável à proteína microbiana. No século passado, entre as décadas de 60 e 70, cogitou-se utilizar bactérias e leveduras como fonte de proteína, devido a sua elevada capacidade de produção em um curtíssimo espaço de tempo comparado com as fontes animal e vegetal, utilizando como substrato a fração residual do petróleo, metano, metanol e outras fontes alternativas de carbono, baixando assim o preço deste importante nutriente. Durante os anos 60 cogitou-se a utilização de SCP na alimentação de humanos, e nos anos 70, foi utilizada como fonte de proteína para animais na Inglaterra, Japão, Itália e União Soviética, dentre outros, chegando ao ponto de construírem-se plantas industriais para a sua produção. Com a crise do petróleo dos anos 80, e a conseqüente elevação de preço, outras fontes de proteína, como a soja, se tornaram mais acessíveis (ISRAELIDIS, 2008).

As leveduras contêm elevado valor protéico, apresentando apenas baixos teores de metionina, cistina e leucina, dependendo do material analisado (levedura íntegra, autolisado, extrato, concentrado protéico fosforilado), além de apresentar uma alta concentração de vitaminas do complexo B (YAMADA et al., 2003). O maior entrave detectado neste trabalho foi que a difícil digestão da parede celular diminuía drasticamente a utilização de

nutrientes. Este problema foi resolvido através da lise da parede celular, tornando os componentes internos da célula disponíveis para a absorção do animal.

Pichia pastoris

Pichia pastoris é uma levedura da família *Saccharomycetaceae*, gênero *Pichia*, que pode ser utilizada para a produção de proteínas recombinantes em larga escala. Outras leveduras desta família também podem ser utilizadas para tal fim, como *Saccharomyces cerevisiae*, que produziu a proteína Gag recombinante do Vírus da Imunodeficiência Adquirida Humana (HIV) tipo 2 (MORIKAWA et al., 2007). Uma das características do gênero *Pichia* é que pode utilizar como fonte de carbono o metanol, devido à presença dos genes Álcool Oxidase I e II (AOX1 e AOX2). Estes genes, principalmente o AOX1, também servem de promotores para a produção da proteína desejada (INVITROGEN, 2004). Atualmente, outras fontes de carbono tais como o glicerol resultante da fabricação de biodiesel, estão sendo estudadas para a indução de produção de proteínas (ÇELIK et al., 2008). Apesar de que a utilização do metanol não é uma característica exclusiva deste gênero (os gêneros *Candida*, *Hansenula* e *Torulopsis* também tem a mesma propriedade), *Pichia* se destaca na produtividade em quanto à quantidade de células por litro (até 130g/litro de matéria seca) e na sua capacidade de expressar proteínas heterólogas em grande quantidade (CREGG, 2008).

Usos de *Pichia pastoris*

Pichia pastoris apresenta várias vantagens sobre o método tradicional de produção de proteínas heterólogas em bactérias como *Escherichia coli*, por exemplo, devido à

facilidade de seleção de clones recombinantes através da resistência à Zeocina, um antibiótico de uso exclusivo em pesquisa, à alta capacidade de produção de proteínas, à capacidade de produzir proteínas de eucariotos, devido à sua própria natureza de eucarioto, a possibilidade de introduzir DNA heterólogo através de plasmídios, e à capacidade de controlar a expressão das proteínas através da quantidade de metanol que é fornecida à cultura (INVITROGEN, 2004).

Nos anos 70, a empresa Phillips Petroleum Company estudou a levedura, quando se desenvolveu o conceito de SCP como fonte de proteína para animais, primeiro transformando gás metano em metanol, e logo após transformando o metanol em proteína concentrada como SCP (CREGG, 2008). Atualmente *Pichia pastoris* é utilizada para a produção dos mais diferentes tipos de proteínas: fosfolipase C de *Bacillus cereus* (SEO & RHEE, 2004), antígeno de superfície do *Plasmodium falciparum*, o parasita causador da malária, visando à produção de uma vacina (YADAVA & OCKENHOUSE, 2003), proteínas codificadas pelos genes Ba86, Bd86 e Bm86 de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, *R. annulatus* e *R. decoloratus*, carrapatos que afetam animais de zonas intertropicais, visando desenvolver uma vacina (CANALES et al., 2008), oxalato oxidase do gérmen de trigo (PAN et al., 2007). Proteínas estruturais recombinantes do vírus da Dengue também foram produzidas visando à produção de uma vacina (SUGRUE et al., 1997; BISHT et al., 2001; WEI et al., 2003; VALDÉS et al., 2007).

P. pastoris apresenta como característica importante sua grande capacidade de utilização de diferentes fontes nutritivas para o seu cultivo, especialmente 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*, sendo necessário apenas o acréscimo de carboidratos, como por exemplo, a sacarose comercial. O estudo

demonstrou que leveduras cultivadas com efluente de parboilização multiplicaram-se mais rapidamente que o grupo controle, demonstrando seu potencial como meio alternativo de cultura para leveduras como *Pichia pastoris*.

Estruturas de *Pichia pastoris* e *Saccharomyces cerevisiae*

Quando *P. pastoris* é cultivada utilizando como fonte de carbono o metanol mostra uma grande proliferação de peroxissomos contendo metanol-oxidase e diidroxiacetona sintetase, entre outras enzimas, podendo constituir até 80% do volume da célula (VEENHUIS et al., 1983; HARDER & BROOKE, 1990). Devido a esse grande acúmulo de enzimas, o interesse inicial nessa levedura foi a produção de SCP, antes que fosse reconhecida sua capacidade como hospedeira de genes heterólogos (CREGG et al., 1985, 1993; SREEKRISHNA & KROPP, 1996).

Leveduras como *S. boulardii* e *S. cerevisiae* apresentam um efeito benéfico em seu hospedeiro, mesmo após inativadas (OEZTUERK et al., 2005). Uma potencial explicação para os efeitos estimulantes de leveduras ou produtos de leveduras pode ser relacionada com a composição da parede celular ou outros conteúdos celulares de *S. boulardii*. A parede celular contém três componentes, chamados de glucanos, manoproteínas, e quitina, que representam 20% do peso seco da célula. Isso consiste de uma estrutura de camadas, com uma camada interna constituída de β -1,3 e β -1,6 glucanos, assim como uma pequena quantidade de quitina e manoproteínas, e outra camada constituída de manoproteínas (FLEET, 1991; KLIS, 1994; MOUKADIRI et al., 1997). Estas estruturas são substratos apropriados para a fermentação microbiana no intestino, independente do estado da levedura (OEZTUERK et al. 2005). É possível que este efeito observado nas leveduras anteriormente citadas seja observado também em *P. pastoris*.

ROSSANESE et al. (1999) sugerem que *P. pastoris* tem um aparelho de Golgi melhor estruturado que *S. cerevisiae*, o qual apresenta esse aparelho disperso, relacionando esta característica com a grande facilidade para exportar as proteínas produzidas verificada em *P. pastoris*. Segundo YAMADA et al. (2003), que realizou seu estudo com amostras de *S. cerevisiae*, coletas de destilarias e cervejarias, a parede celular das leveduras representa um problema quando se busca a absorção da proteína deste microorganismo, devido à elevada resistência que esta parede apresenta à digestão em monogástricos, fato o qual poderia explicar a facilidade com que as leveduras atingem o intestino, mantendo sua viabilidade. As leveduras de uma forma geral apresentam altos índices protéicos e grande quantidade de vitaminas do complexo B, assim como grande quantidade de glucanos, com ligações β -1,3 e β -1,6, provenientes de sua parede, como foi citado anteriormente.

Leveduras como probióticos

A utilização de leveduras como probióticos em animais é recente, apesar de que a idéia de sua utilização como fonte de proteína remonte aos anos 70, durante os estudos de desenvolvimento de SCP. Embora as leveduras venham sendo estudadas como fonte de proteína desde os anos 70, sua utilização como probióticos em animais é recente. Em humanos, leveduras foram avaliadas como probióticos para o tratamento de problemas digestivos provocados pela utilização prolongada de antibióticos com resultados promissores (SURAWICZ et al., 1989, MCFARLAND et al., 1995).

Em animais, estudos recentes demonstraram que a suplementação da ração de frangos de corte com *S. boulardii* aumentou a eficiência alimentar (GIL DE LOS SANTOS et al., 2005). RODRIGUEZ et al. (2000) constataram que camundongos gnotobióticos suplementados com *S. boulardii* apresentaram aumento significativo da expressão de IgA e

do número de células de Küpffer, além de constatar diminuição da quantidade de *Escherichia coli* no trato gastrointestinal, demonstrando que houve uma modulação da resposta imune benéfica para o hospedeiro.

LILA et al. (2004) constataram que a utilização *in vitro* de células vivas de *S. cerevisiae* em líquido ruminal de bovinos estimulou a fermentação ruminal de microorganismos, além de diminuir a quantidade de lactato, metano e hidrogênio produzido pelos animais. CHEN et al. (2000) utilizaram *P. pastoris* recombinante contendo o gene para a expressão do hormônio do crescimento (rGH) como suplemento para a ração de frangos de corte. Essas leveduras utilizadas na suplementação foram submetidas ao processo de expressão via metanol, sendo depois utilizada apenas a levedura seca como suplemento. A biomassa de *P. pastoris* resultante continha pequena quantidade de rGH no interior das células, provavelmente nos peroxissomos, sendo que os animais suplementados apresentaram ganhos de peso significativamente superiores aos do grupo controle suplementado com a levedura nativa. LARA-FLORES et al. (2003) suplementaram a ração de peixes da espécie Tilapia (*Oreochromis niloticus*) com as bactérias *Streptococcus faecium* e *Lactobacillus acidophilus*, e a levedura *S. cerevisiae*, constatando que os grupos suplementados com *S. cerevisiae* apresentaram desempenhos superiores aos restantes.

Esses estudos sugerem que o uso de leveduras pode trazer benefícios à produção animal, em especial o estudo de CHEN et al. (2000), pois através da levedura *P. pastoris* poder-se-ia introduzir outras proteínas no organismo dos animais através da complementação ou suplementação da alimentação com probióticos, como forma de estimular seu crescimento e sua imunidade, além de suprir eventuais deficiências nutricionais, que podem aparecer eventualmente em certas dietas.

Testes recentes realizados em frangos de corte suplementados com probióticos na Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas demonstraram que os títulos de

anticorpos contra a toxina α de *Clostridium perfringens* A de animais suplementados com *P. pastoris* recombinante foram 32% maiores que os dos animais que receberam *P. pastoris* (27,6%) e *Bacillus cereus* var. *toyoi* (20%), em relação ao grupo controle (STORCH et al., 2008).

Conclusão

Pichia pastoris, por suas propriedades probióticas, capacidade de cultivar em meios pouco exigentes e por permitir a clonagem de genes heterólogos, poderá vir a ser utilizada de forma vantajosa, em associação a outros probióticos atualmente utilizados em produção animal. Além disso, a administração de probióticos recombinantes abre um imenso leque de possibilidades, que vão desde imunógenos até hormônios e enzimas.

REFERÊNCIAS

- BISHT, H. et al. Expression and purification of Dengue Virus type 2 envelope protein as a fusion with Hepatitis B surface antigen in *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, v. 23, p. 84-96, 2001.
- CANALES M. et al. Expression of recombinant *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, *R. annulatus* and *R. decoloratus* Bm86 orthologs as secreted proteins in *Pichia pastoris*. **BMC Biotechnology**, 2008, Disponível em <http://www.biomedcentral.com/1472-6750/8/14> . Capturado em 09/06/2008.
- ÇELİK, E. et al. Use of biodiesel byproduct crude glycerol as the carbon source for fermentation processes by recombinant *Pichia pastoris*. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v 47, p 2985-2990, 2008.
- CHANG, Y. H. Prevalence of *Salmonella* spp. in poultry broilers and shell eggs in Korea. **Journal of Food Protection**, v. 63, n. 5, p. 655-658, 2000.
- CHEN, C. M. et al. Growth enhancement of fowls by dietary administration of recombinant yeast cultures containing enriched growth hormone. **Life Sciences**, v 67, p 2103-2115, 2000.
- COUNCIL OF EUROPE, 2000. Ban on antibiotics in food production. Recommendation 1446. Capturado em 15 out. 2003. Online. Disponível na Internet <http://assembly.coe.int/Documents/AdoptedText/ta00/EREC1446.HTM>
- CREGG, J. M. et al. *Pichia pastoris* as a host system for transformations. **Molecular Cell Biology**, v 5, p 3376–3385. 1985
- CREGG, J. M. et al. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. **Biotechnology**, v 11, p 905–910, 1993.
- CREGG J. The *Pichia* System, **Keck Graduate Institute**, Claremont, California. Disponível em http://rctech.com/pichia/pichia_system.pdf Capturado em 09/06/2008.
- FALLON, R. et al. Antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from broiler chickens isolated at an Irish poultry processing plant. **Letters in Applied Microbiology**, v. 36, n. 5, p. 277, 2003.

FLEET, G. H. **Cell walls. The Yeasts.** A. H. ROSE AND J. S. HARRISON, ed. **Academic Press**, New York, NY. v. 14, 1991. p.199–277.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 66, n. 5, p. 365-378, 1989.

GIL DE LOS SANTOS, J. R. et al. *Bacillus cereus* var. *toyoi* and *Saccharomyces boulardii* increase feed efficiency in broilers infected with *Salmonella enteritidis*. **British Poultry Science**, v 46, n 4, p 494-497, 2005.

HARDER, W.; BROOKE, A. C. Methylophilic yeasts. In: *Yeast Biotechnology and Biocatalysis*. Edited by H. Verachtert & R. De Mot. New York: Marcel Dekker. p. 395–428, 1990.

INVITROGEN LIFE TECHNOLOGIES. The *Pichia pastoris* Expression System. Put the proven strength of *Pichia* behind your protein expression. www.invitrogen.com , 2001.

ISRAELIDIS C. J. Nutrition - single cell protein, twenty years later. **Food Technology Institute**, Athens, Greece. Disponível em <http://www.biopolitics.gr/HTML/PUBS/VOL1/isreali.htm>, Capturado em 09/06/2008.

KAUR, I. P. et al. Probiotics: potential pharmaceutical applications. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 15, p. 1-9, 2002.

KLIS, F. M. Review: Cell wall assembly in yeast. **Yeast**, v 10, p 851–869, 1994.

KOOK-HWA SEO; JONG IL RHEE. High-level expression of recombinant phospholipase C from *Bacillus cereus* in *Pichia pastoris* and its characterization. **Biotechnology Letters**, v 26, p 1475–1479, 2004.

LARA-FLORES, M. et al. Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v 216, I 1-4, p 193-201, 2003.

LILA, Z. A. et al. Effects of a twin strain of *Saccharomyces cerevisiae* live cells on mixed ruminal microorganism fermentation in vitro. **Journal of Animal Science**, v 82, p 1847-1854, 2004.

MCFARLAND, L. V. et al. Prevention of beta-lactam-associated diarrhea by *Saccharomyces boulardii* compared with placebo. **American Journal of Gastroenterology**, v 90, p 439–48, 1995.

MORIKAWA, Y. et al. Defect of Human Immunodeficiency Virus Type 2 Gag assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Virology**, v. 81, n. 18, p. 9911–9921, 2007

MOUKADIRI, I. et al. Identification of a mannoprotein present in the inner layer of the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bacteriology**, v 179, p 2154–2162, 1997.

NEPOMUCENO, E. S.; ANDREATTI, R. L. F. Probióticos e prebióticos na avicultura. In: **II Simpósio de Sanidade Avícola**. Santa Maria, RS. Anais, v. 1, p. 45-55, 2000.

OEZTUERK, H. et al. Influence of living and autoclaved Yeasts of *Saccharomyces boulardii* on *in vitro* ruminal microbial metabolism. **Journal of Dairy Science**, v 88, p 2594–2600, 2005.

PAN, H. et al. Characterization of wheat germen (oxalate oxidase) expressed by *Pichia pastoris*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.356, p 925–929. 2007.

PEZZOTTI, G. et al. Occurrence and resistance to antibiotics of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in animals and meat in northeastern Italy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 82, n. 3, p. 281-287, 2003.

RODRIGUES, A.C.P. et al. *Saccharomyces boulardii* stimulates sIgA production and the phagocytic system of gnotobiotic mice. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, p. 404-414, 2000.

ROSSANESE, O. W. et al. Golgi structure correlates with transitional endoplasmic reticulum organization in *Pichia pastoris* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Cell Biology**; v 145, p 69–81, 1999.

SCHNEID, A. S. et al. Wastewater of rice parboilizing process as substrate for probiotics. In: **2nd International Probiotic Conference**, 2004, Kosice, Slovakia. **Anais...Research Institute of Veterinary Medicine**, Kosice, Slovakia. 2004, p 66.

STORCH, O.B. et al. Utilização de *Pichia pastoris* como probiótico em frangos de corte. In: 35º CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 2008, Gramado. **Anais...**Gramado: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 2008.

SURAWICZ C.M. et al. Prevention of antibiotic-associated diarrhea by *Saccharomyces boulardii*: a prospective study. **Gastroenterology**. v 96, p 981–988, 1989.

SREEKRISHNA, K., KROPP, K. E. *Pichia pastoris*. In: **Nonconventional Yeasts in Biotechnology**. Edited by K. Wolf. Berlin: Springer,1996, p. 203–253.

SUGRUE, R. J. et al. Expression of the Dengue virus structural proteins in *Pichia pastoris* leads to the generation of virus-like particles. **Journal of General Virology**, v. 78, p. 1861-1866, 1997.

TEITELBAUM, J. E.; WALKER, W. A. Nutritional impact of pre- and probiotics as protective gastrointestinal organisms. **Annual Review of Nutrition**, n 22, p 107–38, 2002.

VALDÉS, I. et al. Expression in *Pichia pastoris* and immunological evaluation of a truncated Dengue envelope protein. **Molecular Biotechnology**, v. 35, p. 23-30, 2007.

VEENHUIS, M. et al. The significance of peroxisomes in the metabolism of one-carbon compounds in yeasts. **Advances in Microbial Physiology**, v 24, p 1–82. 1983.

WARE, S.A., "Single cell protein and other food recovery technologies from waste". **Municipal Environmental Research Laboratory**. Office of Research and Development of United States, Environmental Protection Agency. Cincinnati, Ohio 45268, 1977.

WEI, H. et al. Secreted expression of Dengue virus type 2 full-length envelope glycoprotein in *Pichia pastoris*. **Journal of Virological Methods**, v. 109, p. 17-23, 2003.

YADAVA, A.; OCKENHOUSE, C. F. Effect of codon optimization on expression levels of a functionally folded malaria vaccine candidate in prokaryotic and eukaryotic expression systems. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 9, p. 4961–4969, 2003.

YAMADA, E. A. et al. Composição centesimal e valor protéico de levedura residual da fermentação etanólica e de seus derivados. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.16, n.4, 423-432, 2003.

3 ARTIGO 2

AVALIAÇÃO COMO PROBIÓTICOS PARA FRANGOS DE CORTE DE *Pichia pastoris* E *Pichia pastoris* RECOMBINANTE CONTENDO O GENE DA FOSFOLIPASE C DE *Clostridium perfringens*

(Artigo a ser submetido á revista Food and Agricultural Immunology)

Avaliação como probióticos para frangos de corte de *Pichia pastoris* e *Pichia pastoris* recombinante, contendo o gene da fosfolipase C (toxina α) de *Clostridium perfringens*

Otávio Brod Storch, João Rodrigo Gil de los Santos, Cristina Gehver Fernandes, Carlos Gil Turnes

Resumo

Foram avaliadas as propriedades como probiótico da levedura *Pichia pastoris* e sua variante recombinante contendo o gene da fosfolipase C de *Clostridium perfringens*. Frangas de um dia de idade da linhagem Ross[®] P8 foram distribuídas aleatoriamente em quatro grupos de dez animais cada, em três repetições, e alimentadas com ração comercial isenta de antibacterianos. O grupo 1 (Controle) recebeu ração não suplementada, o grupo 2 recebeu a mesma ração suplementada com 1×10^6 células viáveis gr^{-1} de *P. pastoris* cepa KM71H, o grupo 3 ração suplementada com 1×10^6 gr^{-1} de células viáveis de *P. pastoris* recombinante contendo o gene da toxina α de *C. perfringens*, e o grupo 4 ração suplementada com 1×10^6 gr^{-1} de esporos viáveis de *Bacillus cereus* var. Toyoi. Ração e água foram oferecidos *ad libitum*. Estimou-se o ganho de peso de cada animal aos 49 dias de idade, e a conversão alimentar de cada grupo. Determinou-se a soroconversão individual por ELISA, utilizando como antígeno a toxina α padrão de *C. perfringens*, a partir de amostras de sangue coletadas aos 1, 10, 20, 30 e 49 dias de idade. Ao término do experimento os animais foram abatidos e amostras de órgãos submetidos à análise histopatológica. No dia 49, os pesos vivos médios foram 2,172, 2,228, 2,410 e 2,333 kg, significativamente diferentes ($P < 0,05$), para os grupos 1, 2, 3 e 4, respectivamente. As conversões alimentares médias foram 2,58, 2,41, 2,35 e 2,5 para os grupos 1, 2, 3 e 4, respectivamente. As soroconversões ao dia 49 foram 1,1, 1,4, 1,5 e 1,3 para os grupos 1, 2, 3 e 4, respectivamente, significativamente diferentes ($P < 0,05$). Concluiu-se que *P. pastoris* e *P. pastoris* recombinante podem ser utilizadas como probiótico em frangos de corte por aumentar a eficiência alimentar e a soroconversão, sem apresentar contraindicações.

Palavras-chave: *Pichia pastoris*, *Pichia pastoris* recombinante, Probiótico, Suplementos alimentares.

Abstract

The probiotic properties of *Pichia pastoris* and a recombinant *P. pastoris* containing the *Clostridium perfringens* fosfolipase C gene were evaluated in broilers. Ross® P8 female chicks were randomly distributed in four groups of ten each, in three repeats, and fed with a commercial food devoid of antibacterials. Group 1 was fed with un-supplemented food; group 2 was supplemented with 1×10^6 viable *P. pastoris* strain KM71H gr^{-1} ; group 3 with 1×10^6 viable recombinant *P. pastoris* containing the *C. perfringens* fosfolipase C gene gr^{-1} and group 4 with 1×10^6 viable spores of *Bacillus cereus* var. Toyoi gr^{-1} . Water and food were supplied *ad libitum*. Weight gain of each animal and food conversion of each group at 49 days of age, were estimated. Individual seroconversions against *C. perfringens* α toxin at days 1, 10, 20, 30 and 49 were estimated. At the end of the experiment the animals were slaughtered and samples from different organs examined histologically. Mean live weights at 49 days of age were 2.172, 2.228, 2.410 and 2.333 Kg for groups 1, 2, 3 and 4, respectively, different at $P < 0.05$. Mean food conversions were 2.58, 2.41, 2.35 and 2.50 for groups 1, 2, 3 and 4, respectively. Seroconversions at 49 days of age were 1.1, 1.4, 1.5 and 1.3 for groups 1, 2, 3 and 4, respectively, different at $P < 0.05$. It was concluded that *P. pastoris* and recombinant *P. pastoris* may be used as probiotics for broilers due to their capacity of increasing food efficiency and seroconversion without undesirable effects.

Key words: *Pichia pastoris*, recombinant *Pichia pastoris*, Probiotics, Food supplements.

Introdução

A utilização de probióticos em alimentação animal incrementou nos últimos anos como consequência da necessidade de substituir os antibióticos das rações devido às exigências de mercados consumidores (Council of the European Union, 2003). Probióticos desenvolvidos no Centro de Biotecnologia da UFPel utilizando *Bacillus cereus* var. Toyoi ou *Saccharomyces boulardii* demonstraram sua capacidade de aumentar a eficiência alimentar e controlar doenças infecciosas em suínos (Zani et al., 1998; Gil Turnes et al., 1999) e frangos (Gil de los Santos et al., 2005), assim como por sua imunomodulação em camundongos (Bugallo, 2002; Conceição et al., 2002; Coppola et al., 2004).

Na procura de novos probióticos iniciamos estudos de validação da levedura *Pichia pastoris* utilizada para expressão de proteínas heterólogas, determinando sua influencia na eficiência alimentar e na indução de imunidade contra a toxina α de *Clostridium perfringens* A.

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos probióticos da levedura *Pichia pastoris* selvagem e uma variante recombinante em frangos de corte.

Materiais e métodos

Animais de experimentação

Frangas de um dia de idade da linhagem Ross[®] P8 foram distribuídas aleatoriamente em quatro grupos de dez animais cada, em três repetições, e alimentadas com ração comercial isenta de antibacterianos (ProFrango – Supra). O grupo um (Controle) recebeu ração não suplementada, o grupo dois recebeu a mesma ração suplementada com 1×10^6 células viáveis gr^{-1} de *P. pastoris* cepa

KM71H , o grupo três ração suplementada com 1×10^6 gr⁻¹ de células viáveis de *P. pastoris* recombinante contendo o gene da toxina α de *C. perfringens*, e o grupo quatro ração suplementada com 1×10^6 gr⁻¹ de esporos viáveis de *B. cereus* var. Toyoi. Ração e água foram oferecidos *ad libitum*. Os animais foram manejados de acordo com os requerimentos legais dispostos na Lei Nacional de Proteção aos animais de experimentação.

Ganho de Peso e Conversão Alimentar

Estimou-se o ganho de peso de cada animal, subtraindo-se do peso aos 49 dias do dia 1 de cada grupo. A conversão alimentar foi estimada dividindo o ganho médio de peso de cada grupo pela quantidade de ração consumida.

Avaliação da resposta sorológica

Amostras de sangue foram coletadas aos 1, 10, 20, 30 e 49 dias de idade. A resposta sorológica foi avaliada por ELISA, expressando os resultados em soroconversão dividindo as absorbâncias aos 10, 20 30 e 49 dias pelas obtidas ao 1 dos animais do grupo respectivo (GIL-TURNES et al., 1999).

Placas de poliestireno (Greiner Labortechnik, Alemanha) foram sensibilizadas com 50 μ L de toxina α padrão de *Clostridium perfringens* (Product Nº P7633, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA) e com toxina α recombinante produzida no CenBiot (Gil de los Santos, 2007) suspendida em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6 durante a noite, em refrigeração. Posteriormente as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T (tampão salina fosfatada pH 7,6 contendo Tween 20 a 0,05 %). Após, diluições 1:50 em PBS-T dos pools dos soros de cada grupo obtidos nas diferentes coletas de sangue, foram colocados na placa e incubados a 37°C por 1,5 horas. Posteriormente, as placas foram lavadas 3 vezes

com PBS-T e a seguir foi adicionado 50 µl de soro de cabra anti IgY de frango conjugado com peroxidase (Peroxidase conjugated goat anti IgY Ig, Sigma, St. Louis, EUA), diluído 1:2000 em PBS-T, por cavidade, sendo incubadas a 37°C por 1,5 horas. As placas foram lavadas 5 vezes com PBS-T e a reação foi revelada usando 50 µl por cavidade de solução substrato (Orto-Fenil-Diamina em tampão fosfato-citrato adicionada de peróxido de hidrogênio 30 volumes). Após foram deixadas no escuro à temperatura ambiente para reagir durante 15 minutos. As leituras da densidade ótica foram feitas a 450 nm num leitor de microplacas de ELISA (MR700 Microplate reader, Dynatech Laboratories), ELISA, 10 minutos após adicionar o revelador.

Dot-Elisa

Prepararam-se Dot-ELISAs colocando 3µl de toxina α padrão de *Clostridium perfringens* (Product Nº P7633, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA) ou toxina α recombinante como antígenos sobre membrana de nitrocelulose de 0,45 µm de diâmetro de poro. A membrana foi mantida a temperatura ambiente até a secagem dos antígenos, sendo posteriormente bloqueada com suspensão de leite em pó desnatado a 5% em PBS-T, durante 1 hora, sob agitação a temperatura ambiente. Após 3 lavados com PBS-T, adicionaram-se 3µl de pool de soros dos animais dos diferentes grupos sobre o antígeno, incubando-se a 37°C por 30 minutos. A membrana foi novamente lavada três vezes com PBS-T sendo posteriormente adicionado soro de cabra anti IgY de frango conjugado com peroxidase (Sigma) diluído 1:2000, e incubado durante 30 minutos sob agitação. Após 5 lavagens com PBS-T a reação foi revelada com solução substrato de diaminobenzidina (DAB).

Após o aparecimento da reação, esta foi interrompida com H₂O Milli-Q pura. Após a secagem das membranas, foi feita avaliação da reação.

Análise Histopatológica

Todos os animais foram necropsiados. Coletaram-se amostras para análise histopatológica do fígado, pulmão, rim, baço, bursa de Fabricius, coração, cérebro, pâncreas, pró-ventrículo, moela, intestino delgado e intestino grosso de cada animal abatido. As 1440 lâminas foram coradas por Hematoxilina-Eosina e avaliadas mediante microscopia óptica.

Análise estatística

A diferença das médias das conversões e as diferenças das médias dos ganhos de peso dos animais de cada grupo foram analisadas por ANOVA mediante o programa Statistix versão 8 (Analytical Software, Tallahassee, Florida, USA). Os valores reportados são as médias de três repetições.

Resultados

Ganho de peso

O maior ganho de peso ($P < 0,05$), 2,36.kg, foi obtido pelos animais suplementados com *Pichia pastoris* recombinante, seguido pelos que receberam *Bacillus cereus* var. Toyoi (2,28 Kg), ambos superiores ($P < 0.05$) que os do grupo suplementado com *P. pastoris* (9% menor em relação ao grupo *P. pastoris* recombinante) e o controle (11% menor em relação ao grupo *P. pastoris* recombinante) (Figura 1).

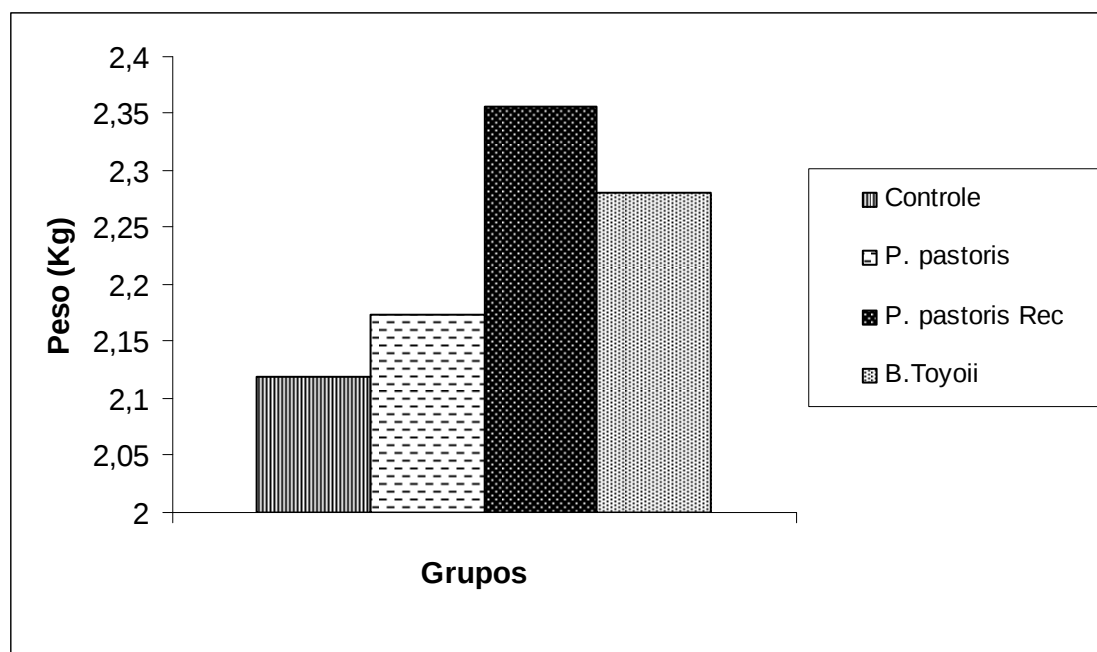


Figura 1. Ganho de peso obtido pelos diferentes grupos experimentais. Letras diferente indicam diferença estatística ($P < 0,05$).

Conversão Alimentar

Os animais que receberam *P. pastoris* recombinante tiveram a melhor Conversão Alimentar seguidos pelos que receberam *P. pastoris*, *B. cereus*, sendo os controles não suplementados os que apresentaram pior Conversão (Tabela 1).

Tabela 1. Conversão alimentar dos diferentes grupos experimentais.

Grupo	Conversão Alimentar
Controle	2,58
<i>Pichia pastoris</i>	2,41
<i>Pichia pastoris</i> Recombinante	2,35
<i>Bacillus cereus</i> var. Toyoi	2,50

Avaliação da resposta sorológica

Através da análise sorológica pode-se observar um aumento do título de anticorpos antitoxina α de *C. perfringens* no dia 49, estatisticamente significativo ($P < 0,05$) nos grupos *Pichia pastoris* e *Pichia pastoris* recombinante em relação aos Controle e *Bacillus cereus* var. Toyoi.

Tabela 2: Soroconversão dos grupos experimentais

Grupo	Soroconversão
Controle	1.1256 ^b
<i>Pichia pastoris</i>	1.4389 ^a
<i>Pichia pastoris</i> Recombinante	1.4854 ^a
<i>Bacillus cereus</i> var. Toyoi	1.3395 ^{ab}

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($P < 0,05$)

Dot ELISA

Soros dos animais de todos os grupos experimentais reconheceram a toxina α padrão. A figura 2 mostra o resultado do Dot Elisa, onde se pode observar que os soros dos animais de todos os grupos reconheceram também a toxina α recombinante de *Clostridium perfringens*.

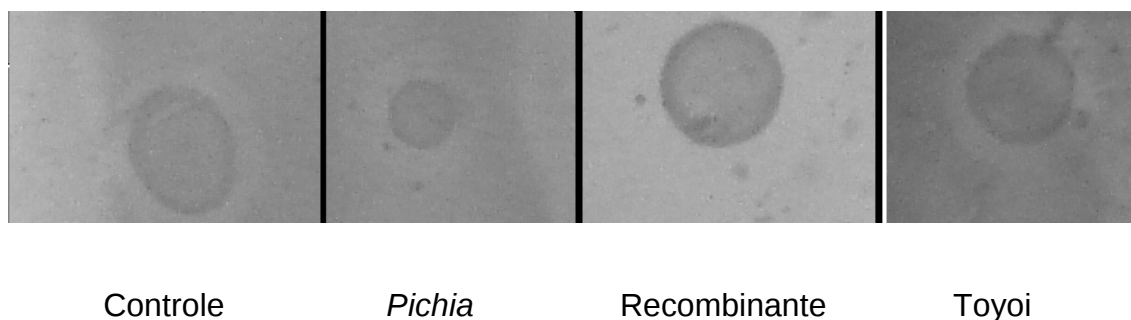


Figura 2: Dot-ELISA de amostras de soro dos grupos experimentais, utilizando toxina α recombinante de *Clostridium perfringens* como antígeno.

Análise Histopatológica

Não foram encontradas alterações histopatológicas significativas em nenhum dos grupos.

Discussão

O efeito probiótico da levedura *Pichia pastoris*, amplamente usada como vetor de expressão de proteínas heterólogas, foi testado neste experimento, pois existem poucos dados sobre sua utilização como suplemento alimentar. CHEN et al. (2000) utilizaram *P. pastoris* recombinante que expressava hormônio de crescimento (rGH) como suplemento para a ração de frangos de corte, e comprovaram que ainda que a biomassa de *P. pastoris* continha pequena quantidade de rGH no interior das células, os animais suplementados tiveram ganhos de peso significativamente superiores aos do grupo controle, que foi suplementado com a levedura não recombinante. Em nosso estudo, além da *P. pastoris* não recombinante foi utilizada uma cepa recombinante contendo o gene da toxina α de *Clostridium perfringens*, visando avaliar seu efeito probiótico e sua inocuidade, demonstrando que ambas apresentaram efeito probiótico. Foi

constatado aumento da eficiência alimentar em ambos os grupos, sendo este mais pronunciado no grupo suplementado com a levedura recombinante.

Os grupos suplementados demonstraram aumento do título de anticorpos quando comparados ao controle, sugerindo que os suplementos tiveram efeito imunoestimulante, propriedade já demonstrada para outros probióticos em diferentes espécies (Perdigón & Alvarez, 1992; Conceição et al., 2000; Coppola et al., 2004; Gil de los Santos et al., 2005). Rodriguez et al. (2000) constataram que camundongos gnotobióticos suplementados com *Saccharomyces boulardii* apresentaram aumento significativo da expressão de IgA e do número de células de Küpffer, além de constatar diminuição da quantidade de *Escherichia coli* no trato gastrintestinal. Lara-Flores et al. (2003) suplementaram a ração de peixes da espécie Tilapia (*Oreochromis niloticus*) com as bactérias *Streptococcus faecium* e *Lactobacillus acidophilus*, e a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, constatando que os grupos suplementados apresentaram desempenhos melhores que o do grupo controle, sendo que *S. cerevisiae* teve um desempenho superior aos outros tratamentos.

O efeito imunoestimulante de *B. cereus* var. *toyo* em frangos, probiótico utilizado em nosso estudo, foi previamente relatado (Gil de los Santos et al., 2005), mas até agora esse efeito não havia sido relatado para *P. pastoris*. Foi sugerido que o efeito imunoestimulante das leveduras ou de produtos delas derivados pudesse estar relacionado com a composição da parede celular ou outros componentes celulares. A parede celular de *S. boulardii* contém β -1,3 e β -1,6 glucanos, manoproteínas e quitina, que representam 20% do peso seco da célula (Fleet, 1991; Klis, 1994; Moukadiri et al., 1997). Estas estruturas são substratos apropriados para a fermentação microbiana no intestino, independente da

viabilidade da levedura, indicando que elas podem atuar como probióticos e como prebióticos (Oeztuerk et al., 2005).

A ausência de lesões detectáveis tanto na necropsia quanto na histopatologia, associada ao aumento da eficiência alimentar, demonstram a inocuidade da *P. pastoris*, tanto na sua forma selvagem quanto na sua forma recombinante, para ser utilizada como probiótico nas doses testadas.

Probióticos recombinantes com a finalidade de adicionar novas propriedades estão sendo avaliados em diferentes laboratórios. A imunização contra a Enterite Necrótica das Aves produzida por *Clostridium perfringens* A, uma doença até agora controlada pela administração de antibióticos à alimentação, é uma alternativa para o controle desta enfermidade em animais criados de acordo com as exigências dos mercados consumidores. Nossos resultados sugerem que probióticos que expressem antígenos de interesse *in situ* podem ser uma alternativa que facilite a imunização de animais e humanos.

Agradecimentos

Otávio Brod Storch usufruiu uma bolsa da Capes; financiaram este estudo CNPq (processo 474509/2004-4) e FAPERGS (processo Nº 05.2329.9.). A Carina Martins de Moraes e a Matheus S. Folgerini por seu apoio técnico.

Bibliografia

Bugallo, M.Q. *Efeito dos probióticos Bacillus cereus var toyoii e Sacharomyces boulardii nos níveis de colesterol em camundongos BALB-C.* (2002). Dissertação,

Programa de Pós Graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Brasil.

Conceição, F. R.; Zani, J. L. & Gil-Turnes, C. (2000). Effect of the probiotic CenBiot on the humoral response to an *Escherichia coli* bacterin. *Food and Agriculture Immunology*, **14**, 135-140.

Coppola, M. M., Conceição, F. R. & Gil-Turnes, C. (2005) Effect of *Saccharomyces boulardii* and *Bacillus cereus* var. *toyoii* on the humoral and cellular response of mice to vaccines. *Food & Agricultural Immunology*, **16**, 213-219.

Fleet, G. H. (1991), Cell walls. In: *The Yeasts*. (A. H. Rose and J. S. Harrison, Eds.) Academic Press, New York, pp 199–277.

Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, **66**, 365-378.

Gil De Los Santos, J. R. (2004). *Efeito de probióticos na translocação de Salmonella enteritidis e na eficiência alimentar de frangos de corte*. Dissertação (Mestrado em Veterinária) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Gil De Los Santos, J.R.; Storch, O. B. & Gil-Turnes, C. (2005). *Bacillus cereus* var. *toyoii* and *Saccharomyces boulardii* increased feed efficiency in broilers infected with *Salmonella enteritidis*. *British Poultry Science*, **46**, 494-497.

Gil Turnes, C., Dos Santos, A.F., Da Cruz, F.W. & Monteiro, A.V. (1999). Properties of the *Bacillus cereus* strain used in Probiotic CenBiot. *Brazilian Journal of Microbiology*, **30**, 11-14.

Lara-Flores, M., Olvera-Novoa, M. A., Guzmán-Méndez, B. E. & López-Madrid, W. (2003). Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*

and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, **216**, 193-201.

Perdigón, G. & Alvarez, S. (1992). Probiotics and the immune state, in *Probiotics: the scientific basis* (Fuller, R., Ed.). Chapman and Hall, London. pp. 145-180.

Rodrigues, A.C.P., Cara, D.C., Fretez, S.H.G.G., Cunha, F.Q., Vieira, E.C., Nicoli, J.R. & Vieira, L.Q. (2000) *Saccharomyces boulardii* stimulates sIgA production and the phagocytic system of gnotobiotic mice. *Journal of Applied Microbiology*. **89**, 404-414.

Kaur, I. P.; Chopra, K. & Saini, A. (2002). Probiotics: potential pharmaceutical applications. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **15**, 1–9.

Klis, F. M. (1994). Review: Cell wall assembly in yeast. *Yeast*, **10**, 851–869.

Moukadiri, I., Armero, J., Abad, A., Sentandreu, R. & Zueco, J. (1997). Identification of a mannoprotein present in the inner layer of the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, **179**, 2154–2162.

Oeztuerk, H. et al. (2005). Influence of living and autoclaved yeasts of *Saccharomyces boulardii* on *in vitro* ruminal microbial metabolism. *Journal of Dairy Science*, **88**, 2594–2600.

Van Der Sluis, W. (2000). Clostridial enteritis is an often underestimated problem. *World Poultry Science Journal*, **16**, 42-43.

Zani, J. L., Cruz, F. W., Santos, A. F. & Gil-Turnes, C. (1998). Effect of probiotic CenBiot on the control of diarrhoea and feed efficiency in pigs. *Journal of Applied Microbiology*, **84**, 68-71.

4. CONCLUSÕES

Pichia pastoris, tanto a forma selvagem quanto a recombinante, apresentaram efeitos probióticos em frangos de corte, melhorando a conversão alimentar, o ganho de peso e a imunoestimulação.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BISHT, H.; CHUGH, D. A.; SWAMINATHAN, S.; KHANNA, N. Expression and purification of Dengue Virus type 2 envelope protein as a fusion with Hepatitis B surface antigen in *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, v. 23, p. 84-96, 2001.

BUGALLO, M.Q. Efeito dos probióticos *Bacillus cereus* var *toyoii* e *Sacharomyces boulardii* nos níveis de colesterol em camundongos BALB-C. M.Sc. **Dissertação, Programa de Pós Graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Brasil**. 68 p. 2002.

CANALES M.; DE LA LASTRA, J. M. P.; NARANJO V.; NIJHOF A. M.; HOPE M.; JONGEJAN F.; DE LA FUENTE, J. Expression of recombinant *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*, *R. annulatus* and *R. decoloratus* Bm86 orthologs as secreted proteins in *Pichia pastoris*. **BMC Biotechnology**, 2008, Disponível em <http://www.biomedcentral.com/1472-6750/8/14> . Capturado em 09/06/2008.

ÇELIK E.; OZBAY, N.; OKTAR, N.; ÇALIK, P. Use of Biodiesel Byproduct Crude Glycerol as the Carbon Source for Fermentation Processes by Recombinant *Pichia pastoris*. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 47, p. 2985-2990, 2008.

CHANG, Y. H. Prevalence of *Salmonella* spp. in poultry broilers and shell eggs in Korea. **Journal of Food Protection**, v. 63, n. 5, p. 655-658, 2000.

CHEN, C. M.; CHENG, W. T.K.; CHANG, Y. C.; CHANG, T. J.; CHEN, H. L. Growth enhancement of fowls by dietary administration of recombinant yeast cultures containing enriched growth hormone. **Life Sciences**, v. 67, p. 2103-2115, 2000.

CONCEIÇÃO, F.R.; ZANI, J.L.; GIL-TURNES, C. Effect of the probiotic CenBiot on the humoral response to an *Escherichia coli* bacterin. **Food and Agriculture Immunology**, v. 14, p. 135-140, 2000.

COPPOLA, M. M.; CONCEIÇÃO, F. R.; GIL-TURNES, C. Effect of *Saccharomyces boulardii* and *Bacillus cereus* var. *toyoii* on the humoral and cellular response of mice to vaccines. **Food & Agricultural Immunology**, Grã Bretanha, v. 16, n. 3, p. 213-219, 2005.

COUNCIL OF EUROPE, 2000. Ban on antibiotics in food production. Recommendation 1446. Capturado em 15 out. 2003. Online. Disponível na Internet <http://assembly.coe.int/Documents/AdoptedText/ta00/EREC1446.HTM>

CREGG, J. M.; BARRINGER, K. J.; HESSLER, A. Y.; MADDEN, K. R. *Pichia pastoris* as a host system for transformations. **Molecular Cell Biology**, v. 5, p. 3376–3385. 1985

CREGG, J. M.; VEDVICK, T. S.; RASCHKE, W. C. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. **Biotechnology**, v. 11, p. 905–910, 1993.

CREGG J., Ph.D., The Pichia System, **Keck Graduate Institute**, Claremont, California. Disponível em http://rctech.com/pichia/pichia_system.pdf Capturado em 09/06/2008.

FALLON, R. et al. Antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from broiler chickens isolated at an Irish poultry processing plant. **Letters in Applied Microbiology**, v. 36, n. 5, p. 277, 2003.

FLEET, G. H. Cell walls. The Yeasts. A. H. ROSE AND J. S. HARRISON, **ed. Academic Press**, New York, NY. v. 14, p. 199–277, 1991.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 66, n. 5, p. 365-378, 1989.

GIL DE LOS SANTOS, J.R. Efeito de probióticos na translocação de *Salmonella enteritidis* e na eficiência alimentar de frangos de corte. 2004. 80f. **Dissertação (Mestrado em Veterinária) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.**

Gil De Los Santos, J.R. & Gil-Turnes, C. 2005. Probióticos em avicultura. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.3, p.741-747.

GIL DE LOS SANTOS, J.R.; STORCH, O. B.; GIL-TURNES, C. *Bacillus cereus* var. Toyoi and *Saccharomyces boulardii* increased feed efficiency in broilers infected with *Salmonella enteritidis*. **British Poultry Science**, v.46, n.4, p. 494-497, 2005.

GIL TURNES, C.; DOS SANTOS, A.F.; DA CRUZ, F.W.; MONTEIRO, A.V. Properties of the *Bacillus cereus* strain used in Probiotic CenBiot. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 30, p. 11-14, 1999.

HARDER, W.; BROOKE, A. C. Methylotrophic yeasts. In Yeast Biotechnology and Biocatalysis,. **Edited by H. Verachtert & R. De Mot**. New York: Marcel Dekker. p. 395–428, 1990.

INVITROGEN LIFE TECHNOLOGIES. The *Pichia pastoris* Expression System. Put the proven strength of *Pichia* behind your protein expression. www.invitrogen.com , 2001.

ISRAELIDIS C. J. Nutrition - single cell protein, twenty years later. **Food Technology Institute**, Athens, Greece. Disponível em <http://www.biopolitics.gr/HTML/PUBS/VOL1/isreali.htm>, Capturado em 09/06/2008.

KAUR, I. P.; CHOPRA, K.; SAINI, A. Probiotics: potential pharmaceutical applications. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 15, p. 1–9, 2002.

KLIS, F. M. Review: Cell wall assembly in yeast. **Yeast**, v. 10, p. 851–869, 1994.

KOOK-HWA SEO; JONG IL RHEE. High-level expression of recombinant phospholipase C from *Bacillus cereus* in *Pichia pastoris* and its characterization. **Biotechnology Letters**, v. 26, p. 1475–1479, 2004.

LARA-FLORES, M.; OLVERA-NOVOA, M. A.; GUZMÁN-MÉNDEZ, B. E.; LÓPEZ-MADRID, W. Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v. 216, p. 193-201, 2003.

LILA, Z. A.; MOHAMMED, N.; YASUI, T.; KUROKAWA, Y.; KANDA, S.; ITABASHI, H. Effects of a twin strain of *Saccharomyces cerevisiae* live cells on mixed ruminal microorganism fermentation in vitro. **Journal of Animal Science**. v. 82, p. 1847-1854, 2004.

MCFARLAND, L. V.; SURAWICZ, C. M.; GREENBERG, R. N.; ELMER, G. W.; MOYER, K. A. Prevention of beta-lactam-associated diarrhea by *Saccharomyces boulardii* compared with placebo. **American Journal of Gastroenterology**. v. 90, p. 439–48, 1995.

MORIKAWA, Y.; GOTO, T.; YASUOKA, D.; MOMOSE, F.; MATANO, T. Defect of human immunodeficiency virus type 2 Gag assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal Of Virology**, v. 81, n. 18, p. 9911–9921, 2007.

MOUKADIRI, I.; ARMERO J.; ABAD, A.; SENTANDREU, R.; ZUECO, J. Identification of a mannoprotein present in the inner layer of the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bacteriology**, v. 179, p. 2154–2162, 1997.

NEPOMUCENO, E. S.; ANDREATTI, R. L. F. Probióticos e prebióticos na avicultura. In: **II Simpósio de Sanidade Avícola**. Santa Maria, RS. Anais, v. 1, p. 45-55, 2000.

OEZTUERK, H. et al. Influence of Living and Autoclaved Yeasts of *Saccharomyces boulardii* on In Vitro Ruminal Microbial Metabolism, **Journal of Dairy Science**. v. 88, p. 2594–2600, 2005.

PAN, H.; WHITTAKER, M. M.; BOUVERET, R.; BERNA, A.; BERNIER, F.; WHITTAKER, J. W. Characterization of wheat germen (oxalate oxidase) expressed by *Pichia pastoris*. **Biochemical And Biophysical Research Communications**; n. 356: p 925–929. 2007.

PERDIGÓN, G.; ALVAREZ, S. Probiotics and the immune state. In: FULLER, R. **Probiotics: the scientific basis**. London: Chapman e Hall, 1992. p.145-180.

PEZZOTTI, G. et al. Occurrence and resistance to antibiotics of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in animals and meat in northeastern Italy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 82, n. 3, p. 281-287, 2003.

RODRIGUES, A.C.P.; CARA, D.C.; FRETEZ, S.H.G.G.; CUNHA, F.Q.; VIEIRA, E.C.; NICOLI, J.R.; VIEIRA, L.Q. *Saccharomyces boulardii* stimulates sIgA production and the phagocytic system of gnotobiotic mice. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, p. 404-414, 2000.

ROSSANESE, O. W.; SODERHOLM, J.; BEVIS, B. J.; SEARS, I. B.; O'CONNOR, J.; WILLIAMSON, E. K.; AND GLICK, B. S. Golgi Structure Correlates with Transitional Endoplasmic Reticulum Organization in *Pichia pastoris* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Cell Biology**; v. 145, p. 69–81, 1999.

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.

SURAWICZ C.M.; ELMER G.W.; SPEELMAN P.; MCFARLAND L.V.; CHIN J.; VAN BELLE G. Prevention of antibiotic-associated diarrhea by *Saccharomyces boulardii*: a prospective study. **Gastroenterology**. v. 96, p. 981–988, 1989.

WARE, S.A., "Single cell protein and other food recovery technologies from waste". **Municipal Environmental Research Laboratory**. Office of Research and Development of United States, Environmental Protection Agency. Cincinnati, Ohio 45268, 1977.

SREEKRISHNA, K.; KROPP, K. E. *Pichia pastoris*. In **Nonconventional Yeasts in Biotechnology**, p. 203–253. Edited by K. Wolf. Berlin: Springer, 1996.

STORCH, O.B. et al. Utilização de *Pichia pastoris* como probiótico em frangos de corte. In: 35º CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 2008, Gramado. **Anais...** Gramado: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 2008.

SUGRUE, R. J.; FU, J.; HOWE, J.; CHAN, Y.-C. Expression of the Dengue virus structural proteins in *Pichia pastoris* leads to the generation of virus-like particles. **Journal of General Virology**, v. 78, p. 1861-1866, 1997.

TEITELBAUM, J. E.; WALKER, W. A. Nutritional impact of pre- and probiotics as protective gastrointestinal organisms. **Annual Review of Nutrition**, n. 22, p. 107–38, 2002.

VALDÉS, I.; HERMIDA, L.; ZULUETA, A.; MARTÍN, J.; SILVA, R.; ÁLVAREZ, M.; GUZMÁN, M. G.; GUILLÉN, G. Expression in *Pichia pastoris* and immunological evaluation of a truncated Dengue envelope protein. **Molecular Biotechnology**, v. 35, p. 23-30, 2007.

VAN DER SLUIS, W. Clostridial enteritis is an often underestimated problem. **World Poultry**, v. 16, p. 42-43, 2000.

VEENHUIS, M.; VAN DIJKEN, J. P.; HARDER, W. The significance of peroxisomes in the metabolism of one-carbon compounds in yeasts. **Advances in Microbial Physiology**, v. 24, p. 1–82. 1983.

WEI, H.; JIANG, L.; XUE, Y.; FANG, D.; GUO, H. Secreted expression of Dengue virus type 2 full-length envelope glycoprotein in *Pichia pastoris*. **Journal of Virological Methods**, v. 109, p. 17-23, 2003.

YADAVA, A. AND. OCKENHOUSE, C. F. Effect of Codon Optimization on Expression Levels of a Functionally Folded Malaria Vaccine Candidate in Prokaryotic and Eukaryotic Expression Systems. **Infection And Immunity**, p. 4961–4969 Vol. 71, No. 9, 2003.

YAMADA, E. A., ALVIM, I. D., SANTUCCI, M. C. C., SGARBIERI, V. C. Composição centesimal e valor protéico de levedura residual da fermentação etanólica e de seus derivados. **Revista de Nutrição**, Campinas, 16(4):423-432, 2003.

ZANI, J. L., CRUZ, F. W., SANTOS, A. F. & GIL-TURNES, C. Effect of probiotic CenBiot on the control of diarrhoea and feed efficiency in pigs. **Journal of Applied Microbiology**, v 84: p 68-71, 1998.

Anexos

Dia 30[illegible]

Anexo 2 Conversão Alimentar (CA)

	CA
Controle	2,58164
Recombinante	2,35473
Pichia	2,41702
Toyoi	2,50714

Anexo 3 Soroconversões

Grupo Controle

	Coleta 0	Coleta 1	Coleta 2	Coleta 3	Coleta 4
Controle	1	0,27943662	0,158831584	0,397280967	1,548090198
Controle	1	0,243380282	0,550433592	0,395770393	1,321675104
Controle	1	0,246760563	0,179826563	0,329305136	1,158766682
Controle	1	0,394366197	0,158831584	0,549848943	1,100782329
Controle	1	0,269295775	0,198083067	0,339879154	0,901978831
Controle	1	0,436056338	0,214513921	0,486404834	1,262770364
Controle	1	0,241126761	0,124144226	1,064954683	1,125632766
Controle	1	0,233239437	0,278411684	0,950151057	1,29038196
Controle	1	0,377464789	0,864445459	1,64652568	0,755637368
Controle	1	0,249014085	0,326791419	0,572507553	0,860561436
Controle	1	0,228732394	0,152441807	0,451661631	2,059825127
Controle	1	0,947605634	0,201734368	0,518126888	1,075931891
Controle	1	0,223098592	0,174349612	0,663141994	0,935112747
Controle	1	0,376338028	0,146964856	0,581570997	0,638748274
Controle	1	0,283943662	0,216339571	1,876132931	0,847676024
Controle	1	0,267042254	0,141487905	0,351963746	1,426599172
Controle	1	0,274929577	0,203560018	0,339879154	1,020708698
Controle	1	0,26028169	0,170241899	0,472809668	0,849516797
Controle	1	0,27943662	0,150616157	0,481873112	0,949838932
Controle	1	0,305352113	0,160657234	0,46978852	1,376898297
Controle	1	0,301971831	0,14057508	0,628398792	1,107225035
Controle	1	0,158873239	0,180739388	0,749244713	0,761159687
Controle	1	0,201690141	0,113190324	0,29305136	1,046479521
Controle	1	0,250140845	0,175262437	0,270392749	1,212149103
Controle	1	0,256901408	0,121405751	1,632930514	0,646111367
Controle	1	0,308732394	0,183477864	0,321752266	1,818683847
Controle	1	0,208450704	0,263806481	0,788519637	0,973768983
Controle	1	0,192676056	0,137836604	0,614803625	1,350207087
Controle	1	0,167887324	0,171611136	0,403323263	0,849516797
Controle	1	0,448450704	0,247375628	0,055891239	1,49654855
Média Controle	1	0,297089202	0,216932907	0,62326284	1,125632766

Grupo Pichia

	Coleta 0	Coleta 1	Coleta 2	Coleta 3	Coleta 4
Pichia	1	0,305121294	0,366888094	0,344497608	2,413970211
Pichia	1	0,28032345	0,373019928	0,806698565	1,792501284
Pichia	1	0,536927224	0,205416454	0,690909091	1,354904982
Pichia	1	0,319137466	0,268778743	1,120574163	1,080636877
Pichia	1	0,544474394	0,231987736	0,407655502	1,452491012
Pichia	1	0,859299191	0,638732754	0,525358852	1,123780175
Pichia	1	0,477628032	0,22074604	0,491866029	1,531587057
Pichia	1	0,557412399	0,320899336	0,925358852	1,861325116
Pichia	1	0,656603774	0,332141032	0,683253589	1,407293272
Pichia	1	0,582210243	0,310679612	0,510047847	
Pichia	1	0,376280323	0,412876852	0,402870813	1,392912173
Pichia	1	0,531536388	0,262646909	0,83062201	1,330251669
Pichia	1	0,435579515	0,38221768	0,837320574	1,15767848
Pichia	1	0,360107817	0,306591722	0,667942584	1,985618901
Pichia	1	0,45606469	0,422074604	0,646889952	1,307652799
Pichia	1	0,481940701	0,230965764	0,471770335	0,964560863
Pichia	1	0,615633423	0,363822177	0,813397129	1,34565999
Pichia	1	0,708355795	0,273888605	0,793779904	1,31587057
Pichia	1	0,865768194	0,231987736	1,146411483	
Pichia	1	0,520754717			
Pichia	1	0,576819407	0,366888094	0,948325359	1,032357473
Pichia	1	0,376280323	0,501788452	0,567464115	1,357986646
Pichia	1	0,176819407	0,434338273	0,529186603	1,707241911
Pichia	1	0,274932615	0,41185488	0,493779904	2,072932717
Pichia	1	0,718059299	0,239141543	0,260287081	1,44324602
Pichia	1	0,434501348	0,36075626	0,416267943	1,078582435
Pichia	1	0,787061995	0,125702606	0,498564593	1,863379558
Pichia	1	0,486253369	0,225855902	0,658373206	1,679506934
Pichia	1	0,532614555	0,221768012	0,783732057	0,847457627
Pichia	1	0,449595687	0,218702095	0,844976077	0,949152542
Média Pichia	1	0,509469901	0,319419238	0,659247649	1,438908863

Grupo Recombinante

	Coleta 0	Coleta 1	Coleta 2	Coleta 3	Coleta 4
Recombinante	1	0,247978437	0,255014327	0,312315852	1,351302785
Recombinante	1	0,41509434	0,302292264	0,626988804	1,699910153
Recombinante	1	0,265947889	0,315186246	0,366529169	1,180592992
Recombinante	1	0,233602875	0,366762178	0,252209782	2,215633423
Recombinante	1	0,504941599	0,691977077	0,416028285	1,460916442
Recombinante	1	0,397124888	0,359598854	0,282852092	1,482479784
Recombinante	1	0,558849955	0,353868195	0,309958751	1,464510332
Recombinante	1	0,355795148	0,253581662	0,299351797	1,509433962
Recombinante	1	0,456424079	0,242120344	0,371243371	1,35309973
Recombinante	1	0,075471698	0,316618911		
Recombinante	1	0,323450135	0,283667622	0,520919269	1,538185085
Recombinante	1	0,603773585	0,359598854	0,421921037	1,21114106
Recombinante	1	0,181491465	0,359598854	0,383028874	1,356693621
Recombinante	1	0,265947889	0,362464183	0,229817325	1,39083558
Recombinante	1	0,447439353	0,309455587	0,332351208	1,805929919
Recombinante	1	0,32524708	0,478510029	0,388921626	1,804132974
Recombinante	1	0,285714286	0,297994269	0,27695934	1,714285714
Recombinante	1	0,410601977	0,39469914	0,33706541	1,291105121
Recombinante	1	0,600179695	0,362464183	0,390100177	1,038634322
Recombinante	1				
Recombinante	1	0,262353998	0,29226361	0,252209782	1,087151842
Recombinante	1	0,336028751	0,398280802	0,267530937	2,032345013
Recombinante	1	0,398921833	0,310888252	0,433706541	2,871518419
Recombinante	1	0,240790656	0,421203438	0,249852681	1,169811321
Recombinante	1	0,278526505	0,272206304	0,443134944	1,275831087
Recombinante	1	0,251572327	0,299426934	0,465527401	2,09344115
Recombinante	1	0,168912848	0,276504298	0,261638185	1,593890386
Recombinante	1	0,177897574	0,253581662	0,520919269	0,914645103
Recombinante	1	0,397124888	0,335243553	0,3087802	0,197663971
Recombinante	1	0,519317161			
Média Recombinante	1	0,344362859	0,34018113	0,360068967	1,485374863

Grupo Toyoi

	Coleta 0	Coleta 1	Coleta 2	Coleta 3	Coleta 4
Toyoi	1	0,400457666	0,321477428	0,436185133	2,459218643
Toyoi	1	0,366132723	0,306429549	0,855539972	1,180260452
Toyoi	1	0,354691076	0,279069767	0,821879383	1,100753941
Toyoi	1	0,439359268	0,291381669	0,378681627	1,095270733
Toyoi	1	0,496567506	0,302325581	0,869565217	1,782042495
Toyoi	1	0,652173913	0,358413133	0,482468443	2,882796436
Toyoi	1	0,707093822	0,302325581	0,423562412	0,6429061
Toyoi	1	0,423340961	0,298221614	0,640953717	1,236463331
Toyoi	1	0,448512586			
Toyoi	1	0,459954233			
Toyoi	1	0,551487414	0,264021888	0,46002805	0,960932145
Toyoi	1	0,693363844	0,351573187	0,577840112	2,328992461
Toyoi	1	0,464530892	0,247606019	0,551192146	0,933516107
Toyoi	1	0,503432494	0,244870041	0,381486676	1,069225497
Toyoi	1	0,57208238	0,268125855	0,53997195	1,687457162
Toyoi	1	0,414187643	0,236662107	0,705469846	1,75736806
Toyoi	1	0,517162471	0,280437756	0,265077139	1,698423578
Toyoi	1	0,489702517	0,213406293	0,846423562	1,490061686
Toyoi	1	0,366132723	0,242134063	0,485273492	1,128169979
Toyoi	1	0,549199085	0,168262654	0,168302945	0,900616861
Toyoi	1	0,562929062	0,311901505	0,514726508	1,115832762
Toyoi	1	0,805491991	0,257181943	0,569424965	1,786154901
Toyoi	1	0,558352403	0,235294118	0,469845722	1,155586018
Toyoi	1	0,450800915	0,207934337	0,471248247	1,354352296
Toyoi	1	0,80778032	0,322845417	0,270687237	0,582590816
Toyoi	1	0,42791762	0,389876881	1	1,289924606
Toyoi	1	0,487414188	0,257181943	0,67601683	0,962302947
Toyoi	1	0,411899314	0,259917921	0,559607293	0,906100069
Toyoi	1	0,2402746	0,259917921	0,471248247	1,374914325
Toyoi	1	0,258581236	0,17373461	0,531556802	0,644276902
Média Toyoi	1	0,496033562	0,273304671	0,55086656	1,339518261

Anexo 4 Análise Estatística - Soroconversões

Statistix - 30 Day Trial Version 8.1
11:19:06

2/10/2007,

LSD All-Pairwise Comparisons Test of soroconve for Grupo

Grupo	Mean	Homogeneous Groups
3	0.7318	A
4	0.6649	AB
2	0.6325	BC
1	0.5657	C

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0355 TO
0.0363

Critical T Value 1,965 Critical Value for Comparison 0.0698 TO
0.0714

Error term used: Error, 444 DF

There are 3 groups (A, B, etc.) in which the means
are not significantly different from one another.

LSD All-Pairwise Comparisons Test of soroconve for Grupo*Coleta

Grupo	Coleta	Mean	Homogeneous Groups
2	4	1.4854	A
3	4	1.4389	AB
4	4	1.3395	B
1	4	1.1256	C
3	3	0.6592	D
1	3	0.6233	DE
4	3	0.5509	DE
3	1	0.5095	E
4	1	0.4960	EF
2	3	0.3601	FG
2	1	0.3444	GH
2	2	0.3402	GH
3	2	0.3194	GH
1	1	0.2971	GH
4	2	0.2733	GH
1	2	0.2169	H

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0703 TO
0.0741

Critical T Value 1,965 Critical Value for Comparison 0.1382 TO
0.1457

Error term used: Error, 444 DF

There are 8 groups (A, B, etc.) in which the means
are not significantly different from one another.

Anexo 5 Análise Estatística – Ganho de Peso

Statistix - 30 Day Trial Version 8.1
10:38:40

25/7/2008,

LSD All-Pairwise Comparisons Test of Peso for Grupo*Pesagem

Grupo	Pesagem	Mean	Homogeneous Groups
2	5	2410.9	A
4	5	2333.7	B
3	5	2228.3	C
1	5	2172.3	C
2	4	1130.4	D
4	4	1119.2	DE
1	4	1068.3	EF
3	4	1022.2	F
4	3	581.5	G
2	3	564.9	G
1	3	548.9	G
3	3	521.9	G
4	2	142.3	H
3	2	141.3	H
1	2	138.6	H
2	2	135.3	H
3	1	54.1	I
2	1	53.7	I
1	1	53.6	I
4	1	53.6	I

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 26.289 TO
31.711

Critical T Value 1,964 Critical Value for Comparison 51.629 TO
62.277

Error term used: Error, 608 DF

There are 9 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

LSD All-Pairwise Comparisons Test of Peso for Pesagem

Pesagem	Mean	Homogeneous Groups
5	2286.3	A
4	1085.0	B
3	554.3	C
2	139.4	D
1	53.7	E

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 14.583 TO
15.055

Critical T Value 1,964 Critical Value for Comparison 28.638 TO
29.567

Error term used: Error, 608 DF

All 5 means are significantly different from one another.

LSD All-Pairwise Comparisons Test of Peso for Grupo

Grupo	Mean	Homogeneous Groups
2	859.03	A
4	846.07	A
1	796.32	B
3	793.56	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 12.895 TO
13.832
Critical T Value 1,964 Critical Value for Comparison 25.325 TO
27.164
Error term used: Error, 608 DF
There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly
different from one another.