

UTILIZAÇÃO DE *Pichia pastoris* COMO PROBIÓTICO EM FRANGOS DE CORTE

STORCH, O.B.¹; GIL de los SANTOS, J.R.^{2*}; CONCEIÇÃO, F.R.³;
FERNANDES, C.G.⁴; GIL-TURNES, C.^{3,4}

1. INTRODUÇÃO

Os mercados consumidores de produtos de origem animal exigem a utilização de animais saudáveis não somente desde o ponto de vista sanitário, mas também de sua alimentação e manejo. Entre as restrições de maior impacto nos sistemas de produção, está a proibição da utilização de antibióticos como promotores de crescimento que caracterizaram a produção intensiva de animais desde o fim da segunda guerra mundial, iniciada em 2006 pela União Européia (COUNCIL OF THE EUROPEAN UNION, 2003). Esta exigência, que gradualmente está entendendo-se a outros mercados consumidores, baseia-se na certeza de que o uso contínuo desses suplementos favorece o surgimento de cepas bacterianas resistentes (CHANG, 2000; FALLON et al., 2003; PEZZOTI et al., 2003), comprometendo o uso terapêutico dos antibióticos tanto para animais quanto para humanos. Dentre as alternativas que estão sendo avaliadas para substituir a utilização de antibióticos, os probióticos aparecem como as mais promissoras.

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., 2002), beneficiando a saúde do hospedeiro sem deixar resíduos nos produtos de origem animal nem induzindo resistência às drogas (NEPOMUCENO & ANDREATTI, 2000). É desejável que os probióticos destinados à produção animal sejam não-patogênicos, resistentes à destruição durante o processamento industrial das rações, resistentes à ação do suco gástrico e a bile, capazes de aderirem ao epitélio intestinal, de colonizar o trato gastrointestinal, mesmo que por um curto período, de produzir substâncias antimicrobianas, e de modular a resposta imune e o metabolismo (TEITELBAUM & WALKER, 2002).

Nos últimos anos tem havido um interesse crescente em avaliar o desempenho de novos probióticos baseados tanto em bactérias quanto em leveduras, para aumentar a gama de opções do produtor. Desde o início da década dos 90, nosso grupo desenvolveu probióticos em base a *Bacillus cereus* var *toyoi* (Zani et al., 1998) e *Saccharomyces boulardii* (Gil de los Santos et al., 2005), efetivos tanto no incremento da eficiência alimentar quanto no controle de doenças de suínos e aves. Com o desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante, iniciaram-se também estudos tendentes a desenvolver probióticos que veiculem antígenos, visando imunização por via oral.

¹ Mestrando. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Faculdade de Veterinária, UFPel.

² Bolsista ProDoc CAPES, Faculdade de Veterinária, UFPel. UFPel, Centro de Biotecnologia, Campus universitário sn, CP 354, 96010-900, Pelotas-RS. *E-mail: gildelossantos@uol.com.br

³ Centro de Biotecnologia, UFPel.

⁴ Faculdade de Veterinária, UFPel.

Neste trabalho relatam-se os resultados da avaliação da levedura *Pichia pastoris* como probiótico para aves.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Pintos Ross 308 fêmeas de um dia de idade foram aleatoriamente divididos em quatro grupos de dez animais cada e alimentados *ad libitum* com ração comercial livre de antibióticos. O grupo 1 recebeu ração não suplementada, o grupo 2 ração contendo 1×10^6 UFC g^{-1} de *P. pastoris* KM71H transformada com o gene da toxina α de *Clostridium perfringens*, o grupo 3 ração contendo 1×10^6 UFC g^{-1} de *P. pastoris* KM71H, e o grupo 4 ração contendo 1×10^6 esporos viáveis g^{-1} de *Bacillus cereus* var. *toyoi*. Os animais foram pesados nos dias 0, 10, 20, 30 e 49 de idade, e o consumo de ração foi registrado. Estimou-se o ganho de peso subtraindo-se o respectivo peso pelo peso médio do grupo ao dia 0. Ao abate coletaram-se amostras de fígado, intestino e baço que foram submetidos a estudos histopatológicos.

Coletaram-se amostras de sangue aos 1, 10, 20, 30 e 49, e seus níveis de anticorpos anti-toxina α foram avaliados por ELISA usando toxina comercial (*C. perfringens* phospholipase C type I, Product N° P7633, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA) como antígeno. Os resultados foram expressos em soroconversão dividindo a respectiva absorbância pela absorbância média de todos os animais no 0 dia pv.

Analisaram-se as médias de três repetições, determinando a significância das diferenças por ANOVA por médio do programa Statistix *software* 8 *version* (Analytical Software, Tallahassee, FL, USA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A utilização de leveduras na alimentação animal vem gerando resultados promissores. GIL de los SANTOS et al. (2005) observaram que *S. boulardii* incrementou o ganho de peso em frangos desafiados com *Salmonella* Enteritidis em 7.5%, demonstrando a propriedade probiótica dessa levedura. No presente experimento o ganho de peso dos animais suplementados foi 11%, 2.6% e 7.4% maior do que o dos controles, para os grupos 2, 3 e 4 respectivamente (Tabela 1). Além disso, os animais suplementados com as leveduras melhoraram a conversão alimentar, demonstrando que *P. pastoris* tem efeito probiótico nos frangos.

A levedura também demonstrou efeito imunomodulador ao induzir a produção de anticorpos antitoxina α nos animais suplementados (Tabela 1). CHEN et al. (2000) utilizaram *P. pastoris* recombinante contendo o gene do hormônio do crescimento (rGH) como suplemento para a ração de frangos de corte. Ainda que a biomassa da levedura contivesse pequena quantidade de rGH no interior das células, os animais suplementados apresentaram ganhos de peso significativamente superiores aos do grupo controle, suplementado apenas com a levedura nativa, demonstrando que houve um efeito do gene recombinante. Em nosso experimento, *P. pastoris* recombinante induziu uma soroconversão média levemente maior (1.49) que a selvagem (1.44), embora sem diferença significativa (Tabela 1), sugerindo que o aumento foi consequência do efeito imunomodulador

dos probióticos e não pela indução do antígeno expresso pela levedura recombinante.

Embora a *P. pastoris* nativa tenha induzido um ganho de peso de 2.23 kg (Tabela 1), não diferente estatisticamente ($P>0.05$) dos controles (2.17 kg), os frangos suplementados com ela apresentaram melhor índice de conversão alimentar em comparação aos não suplementados (2.41 e 2.58, respectivamente), demonstrando seu efeito probiótico. Os animais que receberam a *P. pastoris* recombinante apresentaram os melhores índices de ganho de peso e conversão alimentar (Tabela 1).

Não foram observadas alterações patológicas nos animais suplementados, sugerindo que tanto a *P. pastoris* recombinante quanto a nativa cepa KM71H foram inócuas para os frangos, demonstrando propriedades probióticas.

Tabela 1: Índices de eficiência alimentar dos frangos.

Grupo	Soroconversão	Ganho de peso		CA** (kg)
		kg	%*	
Controle	1.13 ^b	2.17 ^c		2.58
<i>P. pastoris</i> recombinante	1.49 ^a	2.41 ^a	+11.0	2.35
<i>P. pastoris</i>	1.44 ^a	2.23 ^c	+2.6	2.41
<i>B. toyoi</i>	1.36 ^{ab}	2.33 ^b	+7.4	2.5

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($\alpha=0.05$)

*: aumento em relação aos controles; **: CA: Conversão alimentar.

4. CONCLUSÃO

P. pastoris demonstrou efeito probiótico, caracterizado por melhora nos índices de eficiência alimentar e imunomodulação, gerando maior ganho de peso e soroconversão nos animais suplementados, com potencial para ser usada como suplemento em alimentação animal.

Financiado pelo CNPq (auxílio 474509/04) e FAPERGS (auxílio 0523299).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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**, vol.67, n.17, p.2103-2115, 2000.

COUNCIL OF EUROPEAN UNION. Council Regulation on the authorization of the additive avilamycin in feedingstuffs. 2003. Acessado em 17 out. 2003. Disponível em <<http://register.consilium.eu.int/pdf/en/03/st06/st06120en03.pdf>>

FALLON, R.; O'SULLIVAN, N.; MAHER, M; CARROLL, C. Antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from broiler chickens isolated at an Irish poultry processing plant. **Letters in Applied Microbiology**, vol.36, n.5, p.277 – 281, 2003.

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.; 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.

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

NEPOMUCENO, E.S.; ANDREATTI, R.L.F. Probióticos e prebióticos na avicultura. In: II SIMPÓSIO DE SANIDADE AVÍCOLA, 2000, Santa Maria, RS. **Anais...** Concórdia, SC: EMBRAPA SUÍNOS E AVES, v.1, p.45-55, 2000.

PEZZOTTI, G.; SERAFIN, A.; LUZZI, I.; MIONI, R.; MILAN, M.; PERIN, R. 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.

TEITELBAUM, J.E.; WALKER, W.A. Nutritional impact of pre- and probiotics as protective gastrointestinal organisms. **Annual review of nutrition**, vol.22, p.107-138, 2002.

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.