

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS

ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE LEVEDURAS PRODUTORAS  
DE FATOR "KILLER" PARA APLICAÇÃO NA PRODUÇÃO DE  
BEBIDAS ALCOÓLICAS

Parecer

Este exemplar corresponde a relação final  
da tese defendida por Antônio Marcolino  
do Nascimento e aprovada pela Comissão  
Julgadora em

Antônio Marcolino do Nascimento 71/17  
Farmacêutico Bioquímico

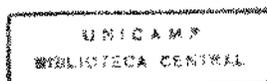
07.11.94.

Hélia Harumi Sato

Prof<sup>a</sup> Dra. Hélia Harumi Sato †  
Orientadora

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos como parte dos  
requisitos exigidos para obtenção do título de mestre

Campinas-SP  
1994

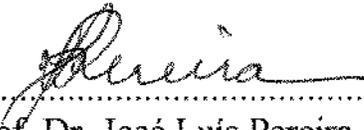


000000

Banca Examinadora:



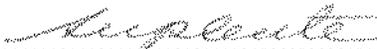
.....  
Prof.a.Dra. Hélia Harumi Sato  
*Orientadora*



.....  
Prof. Dr. José Luís Pereira  
*Membro*



.....  
Prof.Dr. João Bosco Faria  
*Membro*



.....  
Prof.Dr. Yong Kun Park  
*Membro*

Campinas, 07 de novembro de 1994

“Os homens só são impotentes quando admitem que o são.”

*Jean-Paul Sartre*

À minha mãe, meu pai (*in memoriam*),  
meus irmãos e sobrinhos,  
dedico.

À Profa.Dra.Hélia Harumi Sato,  
*pela orientação segura e dedicada e apoio  
recebidos durante o desenvolvimento desta tese,  
a minha gratidão.*

## AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, especificamente ao Departamento de Ciência dos Alimentos, pela oportunidade concedida para a realização desta pesquisa.

À CAPES, Coordenadoria de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior, pelo apoio financeiro.

Aos Professores Doutores Yong Kun Park e Gláucia Maria Pastore do Laboratório de Bioquímica de Alimentos da FEA-UNICAMP pelo exemplo de dedicação à pesquisa.

Aos Professores Aerovaldo Del'acqua e Maria da Penha Longo Mortatti da UNESP Campus Araraquara pelo encaminhamento à UNICAMP.

Aos colegas e funcionários do Laboratório de Bioquímica de Alimentos da FEA-UNICAMP pelo companheirismo e boa vontade, sempre solidários em todos os momentos.

Ao Dr. Roberto V. Nonato pela valiosa contribuição na análise de polimorfismo cromossomal por eletroforese de campo alternado.

Ao Professor Rubens Cruz da UNESP Campus de Assis pela assistência prestada durante a coleta das amostras nas usinas daquela região.

Aos amigos Patrícia, Dong Koo, Érica e Eliane pelo constante incentivo nos momentos de dificuldade.

À todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta tese.

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi selecionar leveduras produtoras de fator "killer" e com alta capacidade fermentativa para aplicação na produção de bebidas alcoólicas. Seiscentos e vinte e três linhagens de leveduras foram isoladas de amostras de frutas, caldo e mosto de usinas produtoras de álcool e testadas quanto a produção de fator "killer". As linhagens Y-161-1, Y-167-5, Y-500-4L, Y-500-7R, Y-548, Y-769-9R, Y-769-9RL e Y-769-11L, identificadas como *Saccharomyces cerevisiae* foram capazes de produzir fator "killer" que mata as leveduras comerciais Fleischmann e Itaiquara. As linhagens Y-66-1 e Y-1131 identificadas como *Hansenula sp* e *Candida sp* respectivamente, foram capazes de matar a levedura *Torulopsis glabrata* ATCC 15126 (padrão "killer" K11) e não apresentaram atividade "killer" contra as leveduras Fleischmann e Itaiquara. Quando avaliadas quanto à capacidade fermentativa em melaço de cana contendo 24% de açúcares totais a 25°C, as leveduras *S.cerevisiae* Y-167-5 e Y-500-4L apresentaram maior rendimento de etanol que a levedura Fleischmann enquanto as linhagens *S. cerevisiae* Y-161-1, Y548, Y-769-11L apresentaram rendimento de etanol similar a levedura Fleischmann. A levedura *S. cerevisiae* Y-500-4L apresentou maior espectro de ação, maior atividade "killer" e maior rendimento de etanol entre as leveduras testadas.

**Palavras Chaves:** *toxina "killer", fermentação alcoólica, Saccharomyces cerevisiae, levedura*

## SUMMARY

The objective of this research was to screen yeast cultures for the production of the killer factor and fermentative capacity for the production of alcoholic beverages. Six hundred and twenty three yeast strains were isolated from fruits and from sugar cane juice and must from alcohol producing plants and tested for their production of killer factor. The strains Y-161-1, Y-167-5, Y-500-4L, Y-500-7R, Y-548, Y-769-9R, Y-769-9RL and Y-769-11L, all identified as *Saccharomyces cerevisiae*, were shown to produce the killer factor, capable of killing the commercial yeasts produced by Fleischmann and Itaiquara. The strains Y-66-1 and Y-1131, identified as *Hansenula sp* and *Candida sp* respectively, were shown to be capable of killing the yeast *Torulopsis glabrata* ATCC 15126 (standard killer K11) but did not show killer activity against the Fleischmann and Itaiquara yeasts. With respect to their fermentative capacity, using sugar cane molasses containing 24% total sugars as raw material and a temperature of 25°C, the yeast *S.cerevisiae* Y-167-5 and Y-500-4L showed greater alcohol production than Fleischmann yeast whilst the strains *S. cerevisiae* Y-161-1, Y-548 and Y-769-11L showed alcohol yield similar to the Fleischmann yeast. Of the yeast tested *S.cerevisiae* Y-500-4L showed the greatest spectrum of action, with the greatest killer activity and greatest alcohol production.

**Key-words:** *killer toxin, alcohol production, Saccharomyces cerevisiae, Yeast*

# ÍNDICE GERAL

	Página
Resumo.....	vii
Summary.....	viii
Índice geral.....	ix
Índice das tabelas.....	xi
Índice das figuras.....	xii
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>2</b>
2.1. Características bioquímicas e aspectos genéticos do fator “killer”.....	2
2.2. Modo de ação da toxina “killer”.....	10
2.3. Incidência de leveduras “killer”.....	18
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>22</b>
3.1. Coleta de amostras.....	22
3.2. Isolamento de leveduras.....	22
3.3. Seleção de leveduras “killer”.....	23
3.4. Identificação das leveduras “killer”.....	24
3.4.1 Obtenção de culturas puras.....	24
3.4.2. Características morfológicas.....	24
3.4.2.1. Morfologia em meio líquido e sólido.....	24
3.4.2.1.1. Crescimento em meio líquido.....	24
3.4.2.1.2. Crescimento em meio sólido.....	25
3.4.2.2. Formação de pseudomicélio e micélio verdadeiro.....	25
3.4.3. Características sexuais, formação de asco e ascosporos.....	25
3.4.4. Características fisiológicas e bioquímicas.....	26
3.4.4.1. Resistência a cicloheximida.....	26
3.4.4.2. Desenvolvimento em diferentes temperaturas.....	26
3.4.4.3. Assimilação de nitrato.....	26
3.4.4.4. Produção de amônia a partir de uréia.....	27
3.4.4.5. Fermentação de carboidratos.....	27

3.4.4.6. Assimilação de compostos de carbono.....	28
3.4.5. Análise de polimorfismo cromossomal por eletroforese de campo alternado (TAFE) .....	29
3.4.5.1. Preparação de DNA .....	29
3.4.5.2. Desenvolvimento da eletroforese de campo alternado.....	30
3.5. Estudo da atividade “killer” das linhagens selecionadas sobre as linhagens “killer” padrão.....	31
3.6. Interação entre as linhagens “killer” selecionadas.....	31
3.7. Estudo da capacidade fermentativa das leveduras “killer” isoladas e a influência destas linhagens no processo fermentativo desenvolvido pela levedura Fleischmann .....	32
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>34</b>
4.1. Seleção das leveduras “killer” .....	34
4.2. Identificação das leveduras “killer” selecionadas.....	35
4.3. Estudo da atividade “killer” das linhagens selecionadas .....	35
4.4. Interação entre as linhagens “killer” selecionadas.....	37
4.5. Estudo da capacidade fermentativa das leveduras “killer” isoladas e a influência destas linhagens no processo fermentativo desenvolvido pela levedura Fleischmann .....	37
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>40</b>
<b>6. SUGESTÕES PARA CONTINUIDADE DA PESQUISA.....</b>	<b>41</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>68</b>

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Leveduras "killer"-Padrão.....	43
Tabela 2 - Características Morfológicas e Sexuais das Leveduras "killer" Seleccionadas .....	44
Tabela 3 - Características Fisiológicas e Bioquímicas das Leveduras "killer" Seleccionadas .....	45
Tabela 4 - Identificação das Linhagens "killer" seleccionadas .....	46
Tabela 5 - Atividade "killer" das Linhagens Seleccionadas sobre as Linhagens "killer" Padrão e Leveduras Prensadas Fleischmann e Itaiquara. ....	47
Tabela 6 - Interação entre as linhagens "killer"seleccionadas .....	48
Tabela 7 - Produção de Etanol a partir da fermentação de melaço de cana-de-açúcar contendo 24% de açúcares totais .....	49

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Halo de inibição decorrente do efeito "killer" das linhagens Y-161-1 e Y-167-5 sobre as leveduras prensadas sensíveis comerciais Fleischmann (A) e Itaiquara (B).....	51
Figura 2 - Morfologia da colônia da linhagem Y-66-1 em meio Ágar YM a 30°C, 48 horas de incubação.....	52
Figura 3 -Morfologia da colônia da linhagem Y-161-1 em meio Ágar YM a 30°C, 48 horas de incubação.....	52
Figura 4 - Morfologia da colônia da linhagem Y-167-5 em meio Ágar YM a 30°C, 48 horas de incubação.....	53
Figura 5 - Morfologia da colônia da linhagem Y-500-4L em meio Ágar YM a 30°C, 48 horas de incubação.....	53
Figura 6 - Morfologia da colônia da linhagem Y-500-7R em meio Ágar YM a 30°C, 48 horas de incubação .....	54
Figura 7 - Morfologia da colônia da linhagem Y-548 em meio Ágar YM a 30°C, 48 horas de incubação.....	54
Figura 8 - Morfologia da colônia da linhagem Y-769-9R em meio Ágar YM a 30°C, 48 horas de incubação.....	55
Figura 9 - Morfologia da colônia da linhagem Y-769-9RL em meio Ágar YM a 30°C, 48 horas de incubação.....	55
Figura 10 - Morfologia da colônia da linhagem Y-769-11L em meio Ágar YM a 30°C, 48 horas de incubação.....	56
Figura 11 - Morfologia da colônia da linhagem Y-1131 em meio Ágar YM a 30°C, 48 horas de incubação.....	56

Figura 12A - Eletroforese de campo alternado de DNA cromossomal (integral) das linhagens de leveduras "killer" selecionadas .....	57
Figura 12B - Representação gráfica do gel de corrida da análise de DNA cromossomal (integral) das linhagens de leveduras "killer" selecionadas.....	57
Figura 13 - Capacidade fermentativa da levedura Y-66-1 e influência da levedura "killer" na fermentação de melação de cana 24% de açúcares totais à 25°C pela levedura Fleischmann .....	58
Figura 14 - Capacidade fermentativa da levedura Y-161-1 e influência da levedura "killer" na fermentação de melação de cana 24% de açúcares totais à 25°C pela levedura Fleischmann .....	58
Figura 15 - Capacidade fermentativa da levedura Y-167-5 e influência da levedura "killer" na fermentação de melação de cana 24% de açúcares totais à 25°C pela levedura Fleischmann .....	59
Figura 16 - Capacidade fermentativa da levedura Y-500-4L e influência da levedura "killer" na fermentação de melação de cana 24% de açúcares totais à 25°C pela levedura Fleischmann .....	59
Figura 17 - Capacidade fermentativa da levedura Y-500-7R e influência da levedura "killer" na fermentação de melação de cana 24% de açúcares totais à 25°C pela levedura Fleischmann .....	60
Figura 18 - Capacidade fermentativa da levedura Y-548 e influência da levedura "killer" na fermentação de melação de cana 24% de açúcares totais à 25°C pela levedura Fleischmann .....	60
Figura 19 - Capacidade fermentativa da levedura Y-769-9R e influência da levedura "killer" na fermentação de melação de cana 24% de açúcares totais à 25°C pela levedura Fleischmann .....	61

Figura 20 - Capacidade fermentativa da levedura Y-769-9RL e influência da levedura "killer" na fermentação de melaço de cana 24% de açúcares totais à 25° C pela levedura Fleischmann .....	61
Figura 21 - Capacidade fermentativa da levedura Y-769-11L e influência da levedura "killer" na fermentação de melaço de cana 24% de açúcares totais à 25° C pela levedura Fleischmann .....	62
Figura 22 - Capacidade fermentativa da levedura Y-1131 e influência da levedura "killer" na fermentação de melaço de cana 24% de açúcares totais à 25° C pela levedura Fleischmann .....	62
Figura 23 - Cromatografia ilustrando o perfil de utilização dos carboidratos sacarose, glicose e frutose e produção de etanol pelas linhagens Y-66-1, Y-161-1 e Y-167-5.....	63
Figura 24 - Cromatografia ilustrando o perfil de utilização dos carboidratos sacarose, glicose e frutose e produção de etanol pelas linhagens Y-500-4L, Y-500-7R e Y-548 .....	64
Figura 25 - Cromatografia ilustrando o perfil de utilização dos carboidratos, sacarose, glicose e frutose e produção de etanol pelas linhagens Y-769-9R, Y-769-9R e Y-769-11L.....	65
Figura 26 - Cromatografia ilustrando o perfil de utilização dos carboidratos sacarose, glicose e frutose e produção de etanol pelas linhagens Y-1131 e Fleischmann .....	66
Figura 27 - Ilustração da predominância da levedura "killer" durante a fermentação de melaço usando cultura mista de levedura "killer" e Fleischmann.....	67

# 1 - INTRODUÇÃO

## 1.1 - O efeito “killer” de leveduras

Leveduras “killer” secretam proteínas ou glicoproteínas denominadas toxinas “killer” ou fator “killer” que são letais às células sensíveis de sua própria espécie e frequentemente às outras espécies e gêneros de leveduras.

Linhagens produtoras de fator “killer” tem sido descritas em culturas de *Saccharomyces cerevisiae*, leveduras para vinho, leveduras de cerveja, leveduras para saquê e também em leveduras do gênero *Candida*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia* e *Torulopsis*.

Quando testadas contra leveduras sensíveis ou testadas entre si, as linhagens “killer” de diferentes espécies ou gêneros mostram grande variação no seu espectro de atividade.

Alguns processos fermentativos como os utilizados na produção de cerveja, saquê e vinho, utilizam mosto não pasteurizado. Na produção de vinho, por exemplo, muitas leveduras selvagens provenientes da própria fruta ou trazidas por insetos podem predominar na fermentação do vinho destruindo a levedura principal inicialmente inoculada. Estas contaminações podem levar à lentidão ou ao bloqueio da fermentação, aumento da acidez, surgimento de aroma e sabor desagradáveis pela produção de óleo fúseo, acetaldeído e ácido láctico, bem como a redução do rendimento de etanol. Todos estes fatores podem resultar em sérios prejuízos para a indústria vinícola. Como consequência destes problemas potenciais, pesquisadores da indústria de fermentação tem procurado leveduras úteis para a aplicação industrial. Uma vez selecionada ou produzida geneticamente, a linhagem “killer” é avaliada comercialmente e analisada quanto a capacidade de inibir o crescimento de outras espécies de leveduras. Novas linhagens de leveduras “killer” estão sendo selecionadas a partir da natureza e seus espectros de atividade tem sido estudados. O entendimento de suas características genéticas, mecanismos de regulação, compatibilidade, e nível de produção da toxina produzida, contribuirão sem dúvida para o desenvolvimento de leveduras com atividade “killer” para aplicação industrial visando diminuir os efeitos causados por leveduras indesejáveis nos processos fermentativos.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Características bioquímicas e aspectos genéticos do fator “killer”

O fenótipo “killer” foi descrito pela primeira vez em linhagens de laboratório de *Saccharomyces cerevisiae* por BEVAN e MAKOWER, 1963. Estes pesquisadores propuseram que certas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* podiam ser classificadas em um dos três fenótipos: “killer”, sensível e neutro. Quando células “killer” e sensíveis cresciam em um mesmo meio de cultura, uma grande proporção das células sensíveis morriam. As células neutras não matavam células sensíveis, nem eram mortas por células “killer”. Os autores verificaram que a levedura “killer” era imune à ação de seu próprio fator “killer”.

WOODS e BEVAN, 1968 verificaram que o efeito “killer” era causado por uma proteína extracelular sensível ao calor e a proteases. Estes autores estabeleceram as condições necessárias para o crescimento de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e a produção de soluções estáveis de toxina. O pH ótimo para produção e estabilidade da toxina em meio líquido foi na faixa de pH 4,6 - 4,8 a 22°C. O fator “killer” foi inativado em temperaturas superiores a 25°C, em meio líquido tamponado e em temperaturas inferiores a 42°C, em meio sólido. O efeito “killer” foi também inativado por filtração ou quando vigorosamente aerado. A toxina apresentou espectro de ação altamente específico.

FINK e STYLES, 1972 submeteram linhagens “killer” de *Saccharomyces cerevisiae* ao tratamento com cicloheximida e observaram que o determinante genético do fenótipo “killer” podia ser seletivamente removido transformando as linhagens “killer” em linhagens sensíveis e incapazes de matar outras leveduras.

BERRY e BEVAN, 1972 investigando a natureza química dos determinantes genéticos citoplasmáticos envolvidos no caráter “killer” de linhagens de levedura de panificação, *S. cerevisiae*, detectaram uma espécie de RNA de fita dupla. Esta espécie foi caracterizada como dsRNA com base na sua resistência a altas concentrações de RNAase, mobilidade eletroforética em gel de poliacrilamida e coloração com ortotoluidina.

BEVAN *et alii*, 1973 confirmaram a presença do RNA de fita dupla em *Saccharomyces cerevisiae* descrito por Berry e Bevan em 1972

e reportaram a existência de uma outra espécie de dsRNA. As investigações revelaram que as linhagens "killer" possuíam duas espécies de moléculas de peso molecular  $2,5 \cdot 10^6$  e  $1,4 \cdot 10^6$  referidas como P1 e P2 respectivamente. Os ácidos nucleicos das linhagens "killer" neutras e sensíveis foram analisados por eletroforese em gel. Os testes mostraram que as linhagens sensíveis possuíam apenas a espécie P1, ou em alguns casos nenhuma delas. Baseados em evidências genéticas, os autores concluíram que, as duas moléculas juntas, determinariam o caráter "killer" herdado citoplasmaticamente.

HERRING e BEVAN, 1974 mostraram que os RNA de fita dupla encontrados em linhagens de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* "killer" e sensíveis estavam associados às partículas semelhantes a vírus. As linhagens de leveduras sensíveis apresentavam somente uma espécie de dsRNA enquanto as linhagens "killer" mostravam duas espécies de dsRNA, que pareciam estar encapsuladas separadamente.

WOODS, ROSS e HENDRY, 1974 isolaram uma linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* que apresentava um novo fenótipo "killer". Diferente das linhagens de *S. cerevisiae* descobertas por Bevan e Makower em 1963 que apresentavam fenótipos "killer," sensíveis ou neutros, a linhagem isolada por estes pesquisadores apresentava um fenótipo "killer/sensível". A linhagem que mostrou-se sensível ao fator "killer" KF1 descrito por Wood e Bevan em 1968 e Bussey em 1972, também produzia um novo fator "killer" KF2 que matava células sensíveis. Segundo os autores a produção do fator KF2 pelas células "killer/sensíveis" conferiu-lhes uma menor sensibilidade ao fator KF1 em comparação as células sensíveis. Estas últimas se revelaram mais susceptíveis à ação do fator KF2 na fase logarítmica de crescimento. Verificou-se ainda que o fator KF2 era uma proteína termoestável.

WICKNER, 1974(a) verificou que linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, que apresentavam caráter "killer", quando incubadas a temperaturas elevadas produziam quase que exclusivamente células sem capacidade "killer" devido a perda ou mutação de parte do genoma "killer" não cromossomal. Este fenômeno foi descrito como cura por crescimento a temperatura elevada. No estudo, as leveduras foram inoculadas em placas contendo meio YPDA e submetidas ao crescimento à 23°, 30°, 37° e 40° C. Após o crescimento, as leveduras foram testadas quanto ao fenótipo "killer". A maioria das colônias crescidas a 37° e 40° C perdiam a habilidade de matar e transformavam-se em não "killer", ao passo que as linhagens crescidas a 23° e 30°C continuavam sendo "killer".

A temperatura de cura variou de uma linhagem a outra, porém o aumento na frequência de colônias não "killer" foi evidente. Os autores consideraram a cura do plasmídeo diferente da termolabilidade da substância "killer" observada por Woods e Bevan em 1968 porque a habilidade "killer" das células crescidas nestas temperaturas foi analisada a 23°C, temperatura na qual a toxina "killer" era totalmente ativa.

WICKNER, 1974 (b) estudou o efeito de mutações cromossomais e não cromossomais no caráter "killer" de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*. Entre os mutantes isolados haviam linhagens que possuíam genes cromossomais necessários à manutenção do elemento não cromossomal (*mak1* e *mak2*), expressão do fator "killer" (*kex1* e *kex2*) ou expressão de resistência ao fator "killer" (*rex1*).

VODKIN *et alii*, 1974 compararam as espécies de dsRNA presentes em linhagens "killer" de *Saccharomyces cerevisiae* e mutantes. Os autores concluíram que as análises da quantidade e composição do dsRNA em linhagens "killer" padrão e mutantes reforçaram a noção de que as bandas LdsRNA e MdsRNA determinariam o fenótipo "killer" de leveduras. Os autores relataram que linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* que apresentavam caráter "killer" possuíam duas espécies de RNA de fita dupla (dsRNA) com pesos moleculares estimados em  $2,5 \cdot 10^6$  daltons (LdsRNA) e  $1,4 \cdot 10^6$  daltons (MdsRNA). Todos os mutantes obtidos da linhagem "killer" que não produziam toxina e não apresentavam imunidade não possuíam MdsRNA. Um destes mutantes tinha uma nova espécie de dsRNA de peso molecular  $5,0 \cdot 10^5$  daltons. Uma outra classe de mutantes era representada por linhagens que não produziam toxina ou não mostravam imunidade ao fator "killer". Nesta classe estavam incluídas as linhagens "killer" sensíveis a temperatura, as "superkillers" e as que não possuíam imunidade. O perfil de dsRNA das linhagens "killer" sensíveis a temperatura era semelhante ao da levedura padrão "killer". As linhagens "superkillers" possuíam quantidades 2,5 vezes maiores de MdsRNA que a levedura padrão "killer". Estes resultados se mostraram coerentes com a hipótese de que o MdsRNA seria o responsável pelo controle da produção de toxina.

OLIVER *et alii*, 1977 estudaram algumas características da partícula semelhante a vírus (VLP) da linhagem sensível *S. cerevisiae* S7. Esta linhagem foi escolhida por possuir grande quantidade de P1-dsRNA ( $2,5 \cdot 10^6$  daltons) e não apresentar P2-dsRNA ( $1,4 \cdot 10^6$  daltons) conforme relataram Bevan *et alii* em 1973. As partículas semelhantes a

vírus foram isoladas da célula por gradiente de CsCl e o seu rendimento controlado pela recuperação do dsRNA. A quantidade de dsRNA de células crescidas em fonte fermentescível de carbono (glicose) foi comparada com a de células crescidas em fonte não fermentescível de carbono (etanol). As leveduras crescidas em meio contendo glicose apresentaram níveis mais baixos de dsRNA que as crescidas em meio contendo etanol como fonte de carbono. No meio contendo glicose o acúmulo de dsRNA ocorreu durante a fase logarítmica de crescimento ao passo que em meio contendo etanol o aumento foi observado durante a transição da fase logarítmica para a estacionária. Foi observado que três proteínas estavam firmemente associadas às partículas semelhantes a vírus. O peso molecular das três proteínas foi estimado em 75.000, 53.000 e 37.000 e, cuja soma 165.000, explicaria o valor estimado da proteína em 167.000 que o genoma viral da P1-dsRNA poderia codificar.

YOUNG e YAGIU, 1978 promoveram a interação entre as 20 leveduras "killer" de vários gêneros e espécies reportadas por Philliskirk e Young em 1975. As leveduras foram avaliadas quanto à atividade "killer" que possuíam e foram classificadas em 10 grupos distintos, denominados pelos autores de K1, K2, K3, K4, K5, K6, K7, K8, K9 e K10. Com relação à resistência que apresentavam em relação a ação "killer" outros 10 grupos foram reportados e denominados de Ra, Rb, Rc, Rd, Re, Rf, Rg, Rh, Ri e Rj. Três grupos de linhagens (K1, K2 e K3) pertencentes ao gênero *Saccharomyces*, puderam ser curados de seu caráter "killer" por tratamento com cicloheximida (0,01-0,1ppm) ou incubação a temperaturas elevadas (37-40°C). Somente as leveduras pertencentes ao gênero *Saccharomyces* foram curadas por esses dois tratamentos. A ineficácia destes tratamentos, foi o indicativo da categoria. O peso molecular das espécies de dsRNA encontrados nas linhagens de *S. cerevisiae* também foi utilizado como parâmetro para a classificação. Por exemplo, as linhagens classificadas como K1 possuíam LdsRNA com peso molecular próximo a  $2,44 \cdot 10^6$  daltons enquanto as K2 e K3, possuíam  $2,54 \cdot 10^6$  e  $2,50 \cdot 10^6$  daltons, respectivamente. A análise dos efeitos de enzimas proteolíticas, temperatura e pH na atividade "killer" do extrato bruto da fator "killer" demonstrou, através de cromatografia em gel, que as toxinas de diferentes classes "killer" eram bioquimicamente diferentes, porém todas elas possuíam propriedades em comum, como a existência de um componente proteico importante para a ação "killer".

OUCHI *et alii*, 1978 estudaram o efeito do glicerol na estabilização do fator "killer" de *Saccharomyces cerevisiae* KL88. Os autores reportaram que a toxina foi marcadamente estabilizada por sulfato

de amônio e álcoois polihídricos como glicerol, eritról e manitol. Foram feitos estudos quantitativos do efeito do glicerol na estabilidade da toxina "killer" em várias condições. Quando a toxina "killer" foi mantida em soluções de glicerol, a atividade "killer" permaneceu por 12 horas. O fator "killer" foi instável à temperaturas superiores a 30 ° C ou na faixa de pH 4,5-5,0, mesmo em presença de glicerol a 20 %.

FRIED e FINK, 1978 descreveram um método de extração de dsRNA de *Saccharomyces cerevisiae*. Os autores cogitaram que a origem das espécies SdsRNA seria resultado das deleções e replicações de MdsRNA. Algumas linhagens raras não possuíam LdsRNA nem MdsRNA. Entretanto, das inúmeras linhagens de laboratório analisadas quanto ao dsRNA que possuíam, nenhuma apresentou a espécie MdsRNA sem LdsRNA.

PALFREE e BUSSEY, 1979 purificaram a toxina "killer" de *Saccharomyces* K12-1 através da concentração do sobrenadante do meio de cultura por precipitação com polietilenoglicol e cromatografia em coluna de gliceril-CPG. Na eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida a toxina migrou como uma banda única de proteína. A partir da mobilidade eletroforética e composição de aminoácidos o peso molecular da toxina foi estimado em 11.470 daltons. A filtração em gel da toxina ativa indicou que o monômero 11.470 foi a unidade ativa. A toxina foi mais estável na faixa de pH 4,2-4,6.

OUCHI *et alii*, 1979 obtiveram uma linhagem "killer" adequada para a produção de saquê. A linhagem "killer" foi criada por citodução (transferência do genoma citoplasmático de uma linhagem a outra por formação heterocarionte sem diploidização) do plasmídeo "killer" de *Saccharomyces cerevisiae* KL88 em linhagem Kyokai 7 através de fusão nuclear defectiva. O teste fermentativo do saquê produzido pelas linhagens haplóide e diplóide obtidas mostrou que as linhagens poderiam fermentar o mosto de saquê da mesma forma que a linhagem Kyokai 7 e que produziam saquê de qualidade satisfatória quando comparada com o saquê produzido pela Kyokai 7.

BOSTIAN *et alii*, 1980 reportaram que a espécie LdsRNA estava presente em quase todas as linhagens de *S. cerevisiae* estudadas até então. As linhagens sensíveis não "killer" (K- R-) possuíam LdsRNA sem MdsRNA e uma espécie menor de dsRNA denominada S (<1.10<sup>6</sup> dalton). A espécie SdsRNA reteria seqüências terminais de MdsRNA. No intuito de entender a relação funcional entre as espécies L e MdsRNA e o

genoma nuclear, assim como a importância de cada um deles nos processos de encapsulação do dsRNA, produção da toxina e imunidade, esses autores iniciaram estudos a partir dos produtos do gene até a formação das espécies de dsRNA. Os autores utilizaram para este fim, a análise translacional *in vitro* através do sistema de síntese proteica de germe de trigo sem células. A espécie de MdsRNA desnaturada por aquecimento programou a síntese de dois polipeptídeos maiores, M-P1 e M-P2 de peso molecular 32.000 e 30.000, respectivamente. Através do princípio de mapeamento proteolítico e antigenicidade cruzada, o polipeptídeo M-P1 mostrou conter um outro polipeptídeo de 12.000 daltons que corresponderia a toxina produzida *in vivo*, estabelecendo assim que a espécie MdsRNA carregaria o gene da toxina. Uma espécie MdsRNA obtida de uma linhagem neutra ( $K^-$ ,  $R^+$ ) também programou *in vitro*, a síntese de um polipeptídeo idêntico em peso molecular a M-P1, indicando assim que o determinante citoplasmático do fenótipo mutante neutro seria ou um simples ponto de mutação no gene da toxina ou então uma mutação no gene dsRNA requerido para a produção funcional da toxina. A translação *in vitro* de cada um dos três diferentes SdsRNA supressores resultou na produção de um polipeptídeo S-P1 de aproximadamente 8.000 daltons no lugar do polipeptídeo M-P1 de 32.000 programado pelo MdsRNA. Os resultados se mostraram de acordo com a análise heteroduplex destes dsRNA acompanhados de deleções internas largas em cada um dos S dsRNA translados.

GUNGE *et alli*, 1981 descreveram dois plasmídeos lineares de DNA, denominados pGKI 1 e pGKI 2, isolados da levedura *Kluyveromyces lactis* IFO 1267. Os plasmídeos pGKI 1 e pGKI 2 possuíam pesos moleculares  $5,4 \cdot 10^6$  e  $8,4 \cdot 10^6$  respectivamente. Os dois plasmídeos possuíam a mesma densidade de  $1,687 \text{ g/cm}^3$ , menor que a densidade da mitocôndria ( $1,692 \text{ g/cm}^3$ ) e do DNA nuclear ( $1,699 \text{ g/cm}^3$ ). O mapa de restrição de pGKI 1 foi construído por tratamento do plasmídeo com as endonucleases *Eco* RI, *Hind* III, *Pst* I e *Bam* HI. O plasmídeo pGKI 2 foi clivado pela endonuclease *Eco* RI em sete fragmentos e pela *Bam* HI em dois. A linhagem de *Kluyveromyces lactis* IFO 1267 matou linhagens sensíveis e "killer" de *S. cerevisiae*, e algumas linhagens de *S. italicus*, *K. lactis*, *K. thermotolerans* e *K. vanudenii*. Todas as linhagens de *K. lactis* que não possuíam o plasmídeo pGKI não eram "killer". Os autores construíram um híbrido com a linhagem de *K. lactis* IFO 1267 e uma outra linhagem de *K. lactis* não "killer" e sujeitaram-no à análise tétrade após a esporulação. O caráter "killer" foi transmitido através de gene extracromossômico em todos os tétrades em associação com os plasmídeos pGKI. O plasmídeo "killer" dsRNA não foi detectado

em nenhuma linhagem "killer" de *K. lactis*. Isto levou os pesquisadores a acreditarem que o caráter "killer" desta linhagem, seria mediado por este plasmídeo linear de DNA. Apenas um gene cromossomal da linhagem "killer" de *K. lactis* foi descrito como responsável pela resistência da linhagem.

GUNGE e SAKAGUCHI, 1981 transferiram integralmente os plasmídeos pGKI 1 e pGKI 2 de linhagem "killer" de *Kluyveromyces lactis* a uma linhagem não "killer" de *Saccharomyces cerevisiae* através de fusão protoplasmática. As células de *Saccharomyces cerevisiae* que aceitaram os plasmídeos pGKI expressaram o mesmo fenótipo "killer" que o doador e tornou-se resistente à toxina "killer" de *K. lactis*. O plasmídeo pGKI na célula de *S. cerevisiae* foi curado por tratamento com brometo de etídio e o fenótipo "killer" de resistência foi também perdido. A partir destes resultados, os autores concluíram que, tanto o gene "killer" quanto o da resistência estariam localizados nos plasmídeos pGKI.

YOUNG, 1981 descreveu um procedimento no qual o caráter "killer", citoplasmaticamente hereditário, de uma linhagem de *S. cerevisiae* foi transferido a uma linhagem de levedura de cerveja. Não foram requeridos para o processo, a preparação dos protoplastos da levedura de cerveja nem tão pouco a mutação de seus genes nucleares. A linhagem "killer" de cerveja produzida teve vantagens em relação a seus parentes pois mataram células sensíveis e foram imunes ao fator "killer" de algumas leveduras. O método descrito pelos autores ofereceu vantagens significativas no comando de processos que envolviam a manipulação genética de leveduras comerciais.

HARA *et alii*, 1981 reportaram a criação de uma linhagem "killer" criofílica de *Saccharomyces cerevisiae* através do cruzamento da levedura "killer" de *S. cerevisiae* KL-88 obtida de planta piloto de produção de vinho, com uma linhagem "killer" de *S. cerevisiae* WL-7 que fermentava mosto de uva a temperaturas próximas de 15°C. Os haplóides da linhagem KL-88 foram cruzados com os haplóides da linhagem WL-7 para gerar a primeira geração de híbridos. Os híbridos haplóides que possuíam tanto a atividade "killer" quanto a tolerância a SO<sub>2</sub> foram selecionados para originar a segunda geração de híbridos. As linhagens "killer" híbridas foram comparadas com a linhagem WL-7 quanto a habilidade que possuíam para fermentar a 15°C, tolerar altas concentrações de SO<sub>2</sub> e crescer em meio contendo β-alanina a 35°C. A linhagem 2HYL-2 escolhida, produziu um vinho tão bom quanto o

produzido pela linhagem WL-7 (fermentação a 15°C em escala piloto). O híbrido matou somente leveduras do gênero *Saccharomyces* no mosto de uva. No último estágio de fermentação do mosto de uva "Kosho" com o híbrido 2HYL-2, não foi detectada nenhuma levedura sensível, todas elas foram mortas pela levedura "killer". Além disso, a maioria das linhagens neutras como *Kloeckera* e *Torulopsis*, que eram abundantes no suco de uva antes da adição da levedura iniciadora, desapareceram no último estágio. Por outro lado, no último estágio da fermentação do mosto com a linhagem WL-7, muitas leveduras sensíveis formadoras de pseudofilmes do gênero *Saccharomyces* foram detectadas. Os resultados mostraram a possibilidade da fermentação de mostos utilizando uma linhagem única de levedura "killer" criofílica a baixa temperatura sem a contaminação de outras linhagens.

PFEIFFER e RADLER, 1982, verificaram a existência e caracterizaram as toxinas "killer" intra e extracelulares de *Saccharomyces cerevisiae* 28. As toxinas foram parcialmente purificadas por ultrafiltração e cromatografia de troca iônica. Com relação a toxina extracelular, os autores reportaram que se tratava de uma glicoproteína de peso molecular aproximado de 16.000 daltons. A análise dos aminoácidos, segundo os autores, revelou que a toxina possuía 111 resíduos de aminoácidos, equivalentes ao peso molecular de 14.045 daltons. A proporção de proteínas em relação a carboidratos foi de 9 : 1. A toxina apresentou ponto isoelétrico em pH 4,4 - 4,5 e sua atividade máxima, utilizando células sensíveis, foi observada à pH 5,0. A toxina killer intracelular foi obtida através de lise mecânica da célula, lavada previamente com tampão citrato fosfato pH 5,0 para a remoção da toxina extracelular aderida a parede. O ponto isoelétrico da toxina intracelular foi semelhante ao da toxina extracelular.

SHIMIZU *et alii*, 1985 reportaram algumas propriedades e características de leveduras de vinho. Foram encontradas 8 linhagens "killer" das quais sete eram leveduras comerciais para vinho e uma obtida da Wine Yeast Collection of Forschungsanstalt Geisenheim, Alemanha. Os estudos taxonômicos das leveduras mostraram que as linhagens pertenciam ao gênero *Saccharomyces*, exceto uma linhagem que havia assimilado nitrato de potássio. A análise das características "killer" levou a conclusão de que as oito linhagens eram do tipo K2. As leveduras encontradas foram capazes de matar leveduras formadoras de pseudopelícula durante a fermentação de vinho. As linhagens não foram curadas de sua atividade "killer" por elevação da temperatura a 37°C,

exceto a linhagem 71B. A estabilidade da atividade "killer" diminuiu com a elevação da temperatura e se mostrou instável a pH acima de 5,0.

GOTO *et alii*,(a) em 1990 descreveram as características da linhagem "killer" *Saccharomyces cerevisiae* 337. Os autores verificaram que o gene da toxina era codificado por RNA plasmídeo de fita dupla. O tratamento da linhagem *S. cerevisiae* 337 com cicloheximida e incubação a 37°C resultava na perda da característica "killer". A linhagem *S. cerevisiae* KHS que apresentava toxina "killer" codificada no cromossomo não foi curada após tratamento com cicloheximida e incubação a 37°C.

GOTO *et alii*,(b) em 1990 descreveram as propriedades de uma toxina "killer" cromossomo dependente, de uma linhagem de *Saccharomyces cerevisiae*. A pequena quantidade de toxina secretada pela linhagem dificultava o estudo de suas características. Os autores obtiveram transformantes com multicópias do vetor com gene KHR que podiam secretar de 3 a 4 vezes a quantidade de toxina "killer" da linhagem doadora. A toxina purificada apresentou peso molecular de 20.000 em SDS-PAGE, ponto isoeletrico em pH 5,3 e atividade ótima em pH 5,6-5,7. Os autores observaram que a linhagem produtora de toxina "killer" KHR não apresentava imunidade a sua própria toxina.

## 2.2. Modo de ação da toxina "killer"

Embora no início dos anos 70 a toxina "killer" já tivesse sido parcialmente purificada, pouco se conhecia sobre o seu modo de ação.

WOODS e BEVAN, 1968 acreditavam que a ação letal da toxina sobre leveduras sensíveis não estava relacionada com a absorção do fator "killer" já que a ação "killer" poderia ser diminuída pela variação das condições do meio. Segundo estes autores a ação letal do fator "killer" era muito semelhante àquela causada pelas colicinas produzidas por algumas bactérias, uma vez que matavam o organismo sem causar a lise da célula.

BUSSEY, 1972 descobriu que células sensíveis de *Saccharomyces cerevisiae*, morriam de maneira mais lenta quando suas paredes celulares eram submetidas à ação de glucanase antes do tratamento com a toxina "killer". Esta descoberta deu início a vários estudos a respeito do modo de ação da toxina "killer" a partir de sua ligação à parede celular da levedura.

BUSSEY *et alii*, 1973 avaliaram o grau de ligação da toxina "killer" de *Saccharomyces cerevisiae* à parede celular de leveduras e a importância desta ligação na ação letal da toxina. Quando lançada no meio, a toxina "killer" ligava-se tanto às paredes das células sensíveis de *S. cerevisiae*, quanto das células "killer", porém estas últimas eram imunes à ação da toxina. Esta descoberta e as obtidas através dos estudos de ligação de toxinas "killer" marcadas e parcialmente purificadas, levavam a crer que a maioria das toxinas permaneciam ligadas à parede celular, e aparentemente não tinham outra função além do processo de morte. Um mutante denominado R18, isolado de uma cultura de linhagem sensível, apresentou fenótipo "killer"-resistente e foi incapaz de se ligar à toxina "killer". Entretanto, os esferoplastos produzidos a partir deste mutante foram totalmente sensíveis à ação da toxina. Assim, os sítios de ligação na parede celular pareceram ser necessários à ação "killer" na célula integral.

BUSSEY e SHERMAN, 1973 examinaram a ação da toxina "killer" em células de leveduras sensíveis. O fator "killer" causou uma inibição coordenada da síntese de proteínas e de ácidos nucleicos, assim como da incorporação de moléculas de D-glicose [ $^{14}\text{C}$ ] a macromoléculas em células sensíveis em fase de crescimento. Durante o período de inibição foi evidenciado a presença de ATP no meio de crescimento que atingiu níveis 4 a 20 vezes maiores que nas culturas controle. No período de extravazamento do ATP para o exterior da célula, não houve perdas substanciais de macromoléculas, mas foi evidenciado um aumento no efluxo de lisina e glicose. Estes resultados foram coerentes com a alteração da membrana celular de levedura induzida pelo fator "killer".

BUSSEY, 1974 evidenciou, por espectrofotometria, um aumento da turbidez da suspensão de levedura sensível *S. cerevisiae* S14 quando expostas à ação da toxina "killer" de *S. cerevisiae* K12. O aumento da turbidez induzido pela toxina coincidiu com a perda de ATP celular reportada por Bussey e Sherman em 1973 e pareceu ser causado pelo espalhamento de luz por redução do volume das células tratadas, no entanto, esferoplastos de células sensíveis também mostraram sensibilidade ao fator "killer" e um aumento na turbidez. O autor concluiu que o aumento na turbidez não estava relacionado com alteração do volume das células e sim ao espalhamento de luz provocado por modificações da membrana celular induzidas pelo fator "killer".

BUSSEY e SKIPPER, 1975 relataram a existência de um complexo proteico tóxico, denominado de PEST, produzido por linhagens

de *Torulopsis glabrata*, que era capaz de matar células sensíveis e células "killer" de *Saccharomyces cerevisiae*. As células de *S.cerevisiae* em fase de crescimento apresentaram perda de potássio celular, dissipação parcial de ATP intracelular e inibição da síntese de macromoléculas quando tratadas com o PEST. O complexo proteico tóxico foi parcialmente purificado e pelo menos três glicoproteínas tóxicas foram separadas. O complexo glicoproteico mostrou-se estável na faixa de pH compreendido entre pH 3,0-7,0, porém a atividade máxima foi obtida em pH 7,0.

IMAMURA *et alli*, 1975 extraíram a toxina "killer" produzida pela linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* 78, isolada de mosto de fermentação de saquê, e investigaram a ligação desta toxina às células de levedura sensível de saquê e de levedura mutante " killer-resistente 701X-2". Os pesquisadores também investigaram a ligação da toxina às células da levedura produtora, *S.cerevisiae* 78. A ligação da toxina às células foi confirmada na faixa de pH 3,0-8,0. Não houve ligação nos pHs acima de 10,0. Os autores observaram que a toxina "killer" pré adsorvida pelas células de *S. cerevisiae* 78 e pelas células da linhagem sensível de saquê podia ser removida por ajuste do pH da suspensão de células na faixa de pH 9,0-11,0 quando incubadas a 30°C por 20 minutos. Também foi observado que as células tratadas com a toxina podiam ser preservadas da ação letal quando lavadas com uma solução alcalina diluída (pH 11,0) e incubadas a 3°C por 5 minutos. Os esferoplastos da levedura mutante "killer-resistente 701X-2" foi sensível ao fator "killer", enquanto suas células integrais se mostraram resistentes.

KOTANI *et alii*, 1977 avaliaram o efeito de íons  $\text{Ca}^{2+}$  e ADP na ação da toxina "killer" produzida pela linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* 78, isolada de mosto de fermentação de saquê. A ação da toxina foi avaliada pela média de crescimento de células viáveis da levedura sensível em presença da toxina em meio ágar YEPD quando incubadas a 30°C. A média de sobrevivência das leveduras diminuiu com o período de tratamento da célula com a toxina, chegando a 54 % após 120 minutos. O acréscimo de 100 mM de  $\text{CaCl}_2$  ao meio alterou este padrão elevando a média dos sobreviventes para 71%. Os autores concluíram que este aumento não era decorrente da inativação da toxina "killer" e sim da presença dos íons  $\text{Ca}^{2+}$  que atuavam de maneira contrária à ação da toxina. A adição de 50 mM de  $\text{CaCl}_2$  foi suficiente para proteger as células sensíveis, alcançando a média de 90% de sobreviventes.

SKIPPER e BUSSEY, 1977 compararam a ação da toxina "killer" de *Saccharomyces cerevisiae* com a ação do complexo

glicoproteico tóxico (PEST), produzido pela levedura *Torulopsis glabrata*. As duas toxinas induziram perdas substanciais de potássio em células de leveduras sensíveis. Entretanto, somente as leveduras que estavam sob a ação da toxina "killer" de *Saccharomyces cerevisiae* tiveram restabelecido o controle de íons potássio quando a produção e a utilização de energia destas células estavam sob o bloqueio de agentes químicos. Isso mostrou que a ação da toxina "killer" de *Saccharomyces cerevisiae* é dependente de ATP.

BUSSEY *et alii*, 1979 avaliaram a interação da toxina "killer" com células sensíveis e resistentes de *Saccharomyces cerevisiae*. Foi utilizado como célula sensível a linhagem S14a e como resistente a linhagem kre 1-1, obtida por mutação nos genes cromossômicos *kre1* e *kre2*. As células sensíveis ligaram-se a toxina de maneira diferente das resistentes; nas células sensíveis a ligação foi intensa e de maneira específica, ao passo que nas resistentes a ligação foi fraca e inespecífica. Os receptores de parede das linhagens foram solubilizados por digestão com zimoliase e as células foram submetidas mais uma vez à ação da toxina "killer". A solução proveniente da digestão da parede celular da levedura sensível, reduziu a morte da levedura sensível integral por competição com a toxina "killer". A mesma redução não foi conseguida pelo digerido da parede celular da linhagem resistente kre 1-1 dado a baixa competitividade mostrada entre ele e a levedura sensível integral pela ligação com a toxina "killer". Os autores reportaram que  $2,8 \cdot 10^4$  moléculas de toxinas foram necessárias para matar a célula sensível S14a.

DE LA PEÑA *et alii*, 1980 reportaram os efeitos primários da toxina "killer" de *Saccharomyces cerevisiae* imediatamente após a sua adição às células sensíveis de leveduras. Os pesquisadores observaram que quarenta minutos após a adição da toxina "killer" às células sensíveis, 50% delas já haviam morrido. Embora a fase lag tivesse sido cogitada como importante na ação da toxina, os autores reportaram experimentos que mostraram o efeito "killer" afetando a célula sensível imediatamente após a sua ligação à parede celular, por inibição do transporte de L-[<sup>3</sup>H]-leucina e de prótons que normalmente seriam transportados com o aminoácido ou com a histidina para o interior da célula. A toxina "killer" também inibiu o bombeamento de prótons para o meio em células que metabolizavam ativamente a glicose. Todos os efeitos reportados dependeram da concentração da toxina no meio. Os resultados obtidos sugeriram que a toxina "killer" atuava modificando o gradiente eletroquímico de prótons através da membrana plasmática.

DE LA PEÑA *et alii*, 1981 relataram que uma suspensão de leveduras de *S. cerevisiae*, imediatamente após a adição de solução de glicose, metabolizava ativamente o açúcar, acidificando o meio. Ao mesmo tempo, as células acumulavam em seu interior íons de potássio para neutralizar o potencial elétrico gerado pela saída de prótons. Quando uma preparação de toxina "killer" de *S. cerevisiae* foi adicionada à suspensão de células sensíveis, os autores observaram tanto uma inibição imediata da saída de prótons quanto a entrada de potássio. A taxa de consumo de glicose no estágio inicial da ação "killer" não foi alterada, no entanto, ela foi claramente diminuída no estágio final. Através da medida do acúmulo de ácido propiônico [ $^{14}\text{C}$ ] fracamente permeável, os autores verificaram que o pH interno das células de leveduras normais era de 6,42 e o pH externo era de 4,6. Nas células tratadas com a toxina, o pH interno foi diminuído com o passar do tempo. O gradiente de concentração do próton foi reduzido de 66 para 17 vezes. Isso mostra que a alteração no gradiente de próton induzida pela toxina foi devido a um aumento da permeabilidade do próton através da membrana da levedura quando a toxina estava ligada à célula. Os autores sugeriram que a toxina agiria como um condutor próton molecular, similar em alguns aspectos, aos condutores de prótons (2,4-dinitrofenol, por exemplo).

KAGAN, 1983 reportou que a toxina "killer" proveniente da levedura *Pichia kluyveri* formaria canais permeáveis a íons em camadas fosfolipídicas das membranas. O autor propôs que as propriedades eletrofisiológicas destes canais observadas *in vitro*, contribuiriam para os efeitos letais observados nas células intoxicadas.

HUTCHINS e BUSSEY, 1983 reportaram o envolvimento da molécula (1-6)- $\beta$ -D-glucana como receptor de toxina "killer" em parede celular de leveduras. Moléculas de (1-6)- $\beta$ -D-glucana, postuladas e luteoses inibiram competitivamente a ação da toxina "killer". Outros polissacarídeos encontrados na parede de leveduras como (1-3)- $\beta$ -D-glucana, manana, quitina e glicogênio foram ineficazes como inibidores da toxina. Para identificar o receptor da toxina "killer" tentou-se fracionar os componentes da parede celular da linhagem sensível de *S. cerevisiae* S14a. As glucanas insolúveis foram consideradas como responsáveis pela atividade receptora da toxina killer na parede celular de leveduras sensíveis, já que as mananas e glucanas solúveis em álcali possuíam baixa atividade receptora. A menor fração da atividade receptora foi removida por lavagens das células de leveduras em álcali e extração a quente com ácido acético, um procedimento que solubilizou um pouco de (1-6)- $\beta$ -D-

glucana e glicogênio. A maior fração da atividade receptora, mais que 70 %, permaneceu com as moléculas de (1-6)- $\beta$ -D-glucana e (1-3)- $\beta$ -D-glucanas solúveis em ácido. A enzima zimoliase, uma endo(1-3)- $\beta$ -D-glucanase solubilizou uma fração substancial da atividade receptora nas glucanas solúveis em ácido. A atividade receptora da parede celular da levedura foi diminuída pela enzima (1-6)- $\beta$ -D-glucanase, porém se mostrou resistente à ação das enzimas (1-3)- $\beta$ -D-glucanase e  $\alpha$ -amilase. A linhagem mutante kre1-1 resistente à toxina "killer" apresentou uma quantidade de (1-6)- $\beta$ -D-glucana 50% menor que a linhagem sensível S14a.

PFEIFFER *et alii*, 1988 demonstraram que a toxina "killer" KT28 de *S. cerevisiae*, inibia o crescimento de células sensíveis de leveduras e não mostrava nenhum efeito em relação a vários fungos patogênicos e ao protozoário *Trichomonas vaginalis*. Os autores observaram uma inibição parcial do fungo de pele *Trichophyton rubrum* e *Microsporum canis* com a toxina "killer" a pH 6,5 e concentração 0,1 mg/ml (100 vezes mais alta que a necessária para inibir o crescimento de leveduras). Por outro lado, nenhuma atividade farmacológica foi detectada nos testes realizados em vários organismos animais, demonstrando ação quando consumida oralmente, devido a sua instabilidade, a toxina seria facilmente inativada devido à temperatura corporal, ação das proteases no estômago ou pH elevado do duodeno.

SCHMITT *et alii*, 1989 reportaram que a toxina "killer" KT28 inibia a síntese de DNA em *Saccharomyces cerevisiae*. O tratamento de células sensíveis de *S. cerevisiae* com a toxina KT28 afetou a viabilidade da célula, de acordo com a fonte de energia utilizada, após 2 horas. Os autores observaram que o tratamento das células com a toxina KT28 levava a uma interrupção do crescimento celular. A célula mãe possuía DNA, mas as células filhas não possuíam. O impedimento da migração de DNA das células mãe para as células filhas poderia ser causado por distúrbios no aparelho tubular mitótico da célula ou em estágios anteriores a este, como uma interferência na síntese de DNA. Para investigar a maneira pela qual a toxina bloqueava a síntese de DNA, os autores utilizaram uma levedura sensível mutante, que em temperaturas inferiores a 30°C incorporava facilmente [<sup>3</sup>H]dTMP em seu DNA (leveduras selvagens não são capazes de incorporar dTMP). Os autores observaram uma inibição significativa da incorporação de [<sup>3</sup>H]dTMP, após a adição da toxina KT28 às células. Esta inibição foi constante durante 5 horas de exposição à toxina. Para demonstrar que a toxina KT28 inibia a

horas de exposição à toxina. Para demonstrar que a toxina KT28 inibia a síntese de DNA e que o efeito observado não era causado pelo bloqueio do sistema de transporte ativo com a baixa afinidade pelo fosfato, as células marcadas com [<sup>3</sup>H]dTMP foram incubadas a 23°C até que a biossíntese do dTMP fosse realizada, assim a atividade do DNA diminuiria. Inicialmente foi adicionado 5.10<sup>6</sup> unidades de KT28, sendo uma unidade o correspondente a cerca de 0,1 mg da toxina KT28 purificada. Decorridas 6 horas, a radioatividade da célula controle, sem toxina KT28, diminuiu como o esperado, enquanto que a quantidade de DNA marcado não mudou nas células tratadas com a toxina KT28. Assim os resultados dos experimentos indicaram que a toxina KT28 interferia na síntese de DNA e não no consumo de dTMP.

ZHU e BUSSEY, 1989 mostraram que a toxina "killer" tipo K1 de *Saccharomyces cerevisiae* matou esferoplastos de leveduras do gênero *Candida*, *Kluyveromyces* e *Schwanniomyces*. As células integrais destes organismos não eram sensíveis à ação da toxina. Os autores verificaram que a toxina ligou-se à célula de *Kluyveromyces lactis* de maneira precária, ao passo que na célula de *Candida albicans*, a ligação ocorreu em extensão similar àquela observada em *Saccharomyces cerevisiae*. Assim, os receptores de parede poderiam definir a especificidade da toxina e não seriam necessariamente suficientes para a ação da toxina em células intactas.

TOKUNAGA *et alii*, 1989 estudaram a expressão da subunidade "killer" 28 do plasmídeo pGKL de *S. cerevisiae* e identificaram-na como uma proteína "killer". *Saccharomyces cerevisiae* e outras células de leveduras possuem plasmídeos lineares de DNA de dupla fita denominados pGKL1 e pGKL2. Estes plasmídeos foram descobertos primeiramente em *Kluyveromyces lactis*. As leveduras portadoras de plasmídeos pGKL secretam no meio uma toxina "killer" composta por 3 subunidades denominadas 97K, 31K e 28K que matam uma variedade de gêneros de leveduras. Uma comparação da análise do grupamento amino terminal da toxina "killer" purificada e a seqüência de aminoácidos, deduzida a partir da seqüência de DNA do plasmídeo pGKL1, sugeriu que o gene ORF2 codificaria um polipeptídeo 128K que seria o precursor das subunidades 97K e 31K e o gene ORF4 codificaria a forma precursora da subunidade 28K. As três subunidades da toxina "killer", 97K, 31K e 28K, devem possuir funções distintas na biossíntese, maturação e secreção da toxina "killer", assim como no processo de morte da levedura sensível. A função precisa de cada subunidade e sua interação neste processo ainda é inteiramente desconhecida.

Os plasmídeos lineares pGKL1 e pGKL2 foram mantidos estáveis na linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* e os genes que codificam estes plasmídeos lineares foram expressos com sucesso (Gunge e Sakaguchi, 1981). Entretanto, o plasmídeo linear convertido à forma circular, é incapaz de produzir a toxina "killer". A explicação mais provável para este fato seria que a suposta RNA polimerase, específica para pGKL, só funcionaria no reconhecimento de promotores pGKL quando estes estão na forma linear.

A subunidade 28K da toxina "killer" foi expressa com sucesso na levedura *Saccharomyces cerevisiae* quando o suposto promotor do gene 28K (ORF4) foi trocado pelos promotores pGK ou GAL7 dos genes cromossomais. A expressão da subunidade 28K da toxina "killer" em células sensíveis resultou na morte das células hospedeiras. Esta atividade "killer" da subunidade 28K foi suprimida pela expressão da imunidade "killer", indicando que a atividade "killer" do complexo tóxico é devido à subunidade 28K. Os autores sugeriram que a subunidade 28K matou as células hospedeira por dentro e a subunidade "killer" sem as outras subunidades (97K e 31K), não conseguiram matar as células sensíveis por fora.

BUTLER *et alii*, 1991(a) analisaram a resposta de células de *S. cerevisiae* à toxina "killer" de *Kluyveromyces lactis*. A toxina deteve as células sensíveis na fase G1 do ciclo celular, visto o acúmulo de células com um conteúdo de DNA não replicado(G1) nas populações tratadas. As células tratadas com a toxina não se dividiram. Os efeitos da toxina dependiam de sua ação contínua por períodos superiores a uma hora; se fossem removidas do meio antes deste tempo a inibição não ocorria. Tratamentos seguidos com a toxina permitiam que as células aumentassem de volume e continuassem a sintetizar proteínas e RNA, sugerindo que elas eram capazes de continuar o crescimento na ausência da divisão. Entretanto, vários pesquisadores sugeriram que a toxina não bloqueava a proliferação da célula na fase G1 e sim em outras fases.

Continuando os estudos, BUTLER *et alii*, 1991(b) selecionaram um grande número de leveduras mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* que eram altamente resistentes à toxina "killer" de *Kluyveromyces lactis* para averiguar com maiores detalhes o seu modo de ação. Os autores decifraram quatro grupos de complementação. Dois grupos apresentaram mutações que proporcionaram à célula mutante resistência à toxina "killer" de *Kluyveromyces* adicionada extracelularmente. Os outros dois grupos de complementação adquiriram

tanto resistência à toxina "killer" extracelular, quanto à expressão intracelular da subunidade .

A seguir BUTLER *et alii*, 1991(c) relataram que a subunidade da toxina "killer" de *Kluyveromyces lactis* mostrava uma seqüência similar às proteínas que interagem com carboidratos contendo N-acetilquitose e por essa razão poderia mediar a interação primária da toxina "killer" de *K. lactis* com os componentes da parede celular de leveduras. A subunidade da toxina "killer" pareceu mostrar uma atividade intrínseca de quitinase *in vitro*, entretanto, ainda não havia sido demonstrado se o efeito letal observado com a adição da toxina em leveduras era devido a esta atividade .

TAKITA e VALAVICIUS, 1993 estudaram uma classe predominante de mutações em *Saccharomyces cerevisiae* que proporcionava à célula mutante um fenótipo de resistência (termosensível) à toxina "killer" de *Kluyveromyces lactis*. A análise dos componentes de parede celular revelou que as células das leveduras mutantes não possuíam quitina associada à parede. A quitina contida em células de leveduras dependiam do gene CAL1 e sua presença era necessária à ação da toxina; na ausência de quitina, as células eram completamente resistentes ao efeito letal e ao bloqueio da proliferação no estágio G1 induzido pela toxina. Estas observações e aquelas reportadas por Butler *et alii*, 1991 (c) de que a toxina "killer" de *Kluyveromyces lactis* ligava-se aos carboidratos contendo N-acetilquitose e possuía atividade de quitinase reforçam a hipótese de que a grande quantidade de quitina presente nas pontas dos brotos das células, em divisão, poderiam representar os receptores da toxina "killer".

### **2.3. Incidência de leveduras "killer"**

Desde que o fator "killer" de leveduras foi originariamente observado em certas linhagens do gênero *Saccharomyces* por Bevan e Makower em 1963, muitas pesquisas foram realizadas a fim de determinar a distribuição das linhagens "killer" no meio ambiente.

MAULE e THOMAS, 1973 isolaram linhagens de leveduras "killer" contaminantes durante a produção de cerveja em sistema de fermentação contínua. Estas linhagens produziam fatores "killer", altamente ativos na faixa de pH 3,8-4,2. Quando o nível de contaminação

alcançou 2,0 %, a concentração do fator "killer" foi suficiente para dar vantagem seletiva à levedura "killer" e a levedura de cerveja foi morta rapidamente. Com o predomínio das linhagens "killer", a cerveja adquiriu sabor e aroma desagradáveis. As linhagens floculantes e não floculantes encontradas, mostraram características de *Saccharomyces cerevisiae*, mas pareciam fermentar mais açúcares do mosto e apresentavam células pequenas e pleomorfas em cultura mista.

IMAMURA *et alii*, 1974 reportaram o aparecimento de uma linhagem "killer" de *S. cerevisiae*, denominada 78, contaminante em mosto de fermentação de saquê ("koji"). Durante a fermentação, todos os tanques que continham o mosto principal e que estavam contaminados com a levedura "killer" possuíam as seguintes características: 1) Densidade aparente (Be) maior na fase inicial da fermentação, mas com menor produção de álcool quando comparada com os tanques isentos de contaminação, 2) Acidez titulável menor que o normal na primeira metade do processo fermentativo e 3) Produção de compostos sulfurados durante o estágio inicial. A atividade do fator "killer" produzido pela levedura contaminante foi inativada pelo calor, agitação vigorosa e por tratamento com proteases. O peso molecular do fator "killer" foi estimado em 50.000 através do uso de membranas de ultrafiltração.

PHILLISKIRK e YOUNG, 1975 observaram a incidência do fator "killer" em outros gêneros de leveduras. Os autores reportaram que sete dos vinte e oito gêneros da National Collection of Yeast Culture (Redhill, Surrey) exibiram atividade "killer" contra *Saccharomyces cerevisiae*. A maior incidência de leveduras "killer" foi encontrada no gênero *Hansenula* (doze das vinte e nove linhagens examinadas). *Saccharomyces*, o maior representante da coleção, mostrou pouca incidência de atividade "killer" (trinta e oito das seiscentos e sessenta e oito linhagens examinadas). Os outros gêneros que mostraram atividade "killer" foram: *Debaryomyces*, *Pichia*, *Candida*, *Torulopsis* e *Kluyveromyces*.

STUMM *et alii*, 1977 estudaram a ocorrência do fenômeno "killer" entre linhagens de leveduras isoladas de diversas fontes da natureza como frutas, cogumelos, vegetais em decomposição e amostras de solo. Cento e cinquenta e sete linhagens de leveduras pertencentes a pelo menos nove gêneros foram estudadas quanto ao fenótipo "killer" ou sensível. Foi verificado que 17 % das linhagens isoladas apresentaram características "killer" enquanto que 11 % mostraram-se sensíveis ao fenótipo "killer". As linhagens foram divididas em dois grupos. No

primeiro grupo, os autores observaram três tipos de relações entre os gêneros:

a) As linhagens do gênero *Pichia* e *Hansenula* matavam leveduras do gênero *Candida* e *Saccharomyces*, mas não afetavam leveduras do gênero *Hanseniaspora*.

b) As linhagens do gênero *Kluyveromyces* matavam leveduras do gênero *Saccharomyces* e *Hanseniaspora* porém, não aquelas do gênero *Candida*.

c) Uma linhagem de *Debaryomyces* matava somente a linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* SCF 1717. Neste primeiro grupo, relações intragenéricas quanto a atividade "killer" só foram observadas no gênero *Saccharomyces*.

O segundo grupo, consistia de linhagens do gênero *Cryptococcus* e *Torulopsis*. O gênero *Cryptococcus*, estava representado por linhagens "killer" e linhagens sensíveis.

KITANO *et alii*, 1984 avaliaram a ocorrência de linhagens "killer" selvagens em vinícolas japonesas. As leveduras foram isoladas de mostos de fermentação de vinho e todas elas eram *Saccharomyces cerevisiae*. Vinte e sete por cento dos mostos testados foram contaminados por leveduras "killer", embora elas não predominassem em nenhuma amostra. As leveduras "killer" foram classificadas em cinco grupos. De cada um dos grupos, cinco linhagens (H-1, Y-1, Y-2, Y-6 e Y-9) foram selecionadas e submetidas a exame de cura e detecção de plasmídeo dsRNA. A linhagem H-1 foi identificada como "killer" do tipo K1. As outras linhagens, Y-1, Y-6 e Y-9 foram identificadas como três novos tipos de fenótipo "killer" não relatados até então.

SPACEK e VONDREJS, 1986 propuseram um método rápido para estimar a atividade "killer" de leveduras em poucas horas. O procedimento foi baseado no tratamento da célula sensível com a toxina "killer" e posterior coloração com rodamina B, seguida do reconhecimento das leveduras através de microscopia fluorescente. Os autores optaram pela coloração com a rodamina B pelo alto grau de resolução que este corante proporciona em baixas concentrações. As células vivas, sob lâmpada de mercúrio, adquiriam coloração azulada e se diferenciavam das colônias mortas coradas com a rodamina B.

BUSSEY *et alii*, 1988 verificaram que as linhagens "killer" de *Saccharomyces cerevisiae* tipo K1 e K2 eram mutuamente antagônicas e que competiam entre si quando misturadas e subcultivadas em série. A análise do cultivo misto das duas linhagens nas temperaturas de 18 e 30° C, nos valores de pHs 4,6 e 4,0, mostrou que a linhagem do tipo K1

competia com a linhagem do tipo K2 e predominava na maioria dos ensaios. A linhagem do tipo K2 só predominou como linhagem única em pH 4,0 a 30 ° C. Para mostrar que estes resultados dependiam apenas das toxinas, os autores conduziram um experimento utilizando uma linhagem isogênica curada (linhagem não portadora do fator "killer"). A linhagem curada foi incapaz de competir como antagonista nas mesmas condições dos parentes isogênicos, desta forma os autores concluíram que o fenótipo "killer" era importante na competição. As duas linhagens "killer" K1 e K2 não puderam existir estavelmente, uma vez que seus genomas competiam à nível replicativo. Através de metodologia de DNA recombinante, os autores construíram uma linhagem estável que competia com as linhagens K1 e K2 quando cultivadas em série e em condições onde as linhagens normalmente predominariam como cultura mista. As duas linhagens "killer" seriam úteis em fermentação comercial, onde o risco de contaminação por leveduras "killer" é alto.

CASTILHO, em 1990 isolou as linhagens *Candida* sp 9-75, *Candida* sp 15-72 e *Picchia* sp 22-90 de bebidas alcoólicas andinas "chicha de jora" e "masato" produzidas a partir de milho e mandioca respectivamente e as linhagens *Torulospora* sp 183 e 185 de mamão que apresentavam atividade "killer" contra a linhagem "killer" *Torulopsis glabrata* ATCC 15126. As linhagens *Candida* sp 9-75 e *Candida* sp 15-72 apresentaram menor capacidade fermentativa do que as linhagens padrões Itaiquara e Fleischmann a 30°C, porém maior capacidade fermentativa a 40° e 43°C. As linhagens *Torulospora* sp 183 e 185 não apresentaram capacidade fermentativa. Neste estudo de isolamento de leveduras de bebidas alcoólicas andinas e brasileiras, amostras de frutas, flores, melão e mosto de usinas de cana-de-açúcar e álcool não foram encontradas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* produtora de fator "killer" através da utilização da linhagem sensível *Torulopsis glabrata* ATCC 15126 produtora de fator "killer" K11.

VAGNOLI *et alii*, 1993 estudaram a ocorrência de leveduras "killer" em fermentação espontânea de vinho na região da Toscana, Itália. Foram encontradas leveduras "killer" em 88% das fermentações espontâneas de 18 vinícolas. A incidência de leveduras "killer" variou de acordo com o estágio da fermentação e o período da safra, aumentando sucessivamente desde a primeira safra e desde o começo até o fim da fermentação. No final da fermentação a proporção relativa das linhagens "killer" foi: menor que 25% em 15 casos, maior que 75% em 6 casos, entre 25 e 50% em 5 casos e entre 50 e 70% em 3 casos.

## **3 . MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1. Coleta de amostras**

Para o isolamento de leveduras foram coletadas amostras de frutas, sucos de frutas, mosto, bagaço, caldo e resíduos de cana-de-açúcar de diferentes regiões dos estados da Paraíba, Bahia, Alagoas e São Paulo.

As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos ou recipientes assépticos e armazenadas sob refrigeração até o momento das determinações.

### **3.2. Isolamento de leveduras**

As amostras foram colocadas em tubo de ensaio contendo 10 ml de água destilada estéril e agitadas mecanicamente por 1 minuto. Após a agitação as amostras foram inoculadas em placas contendo meio Ágar-Extrato de Malte e Levedura (YM) constituído de 0,3% de extrato de malte, 0,3% de extrato de levedura, 0,5% de peptona, 1,0% de glicose e 2,0% de ágar e incubadas a 30°C por 48 horas. As colônias de leveduras isoladas e morfologicamente diferentes foram transferidas para tubos contendo meio Ágar YM inclinado e incubados a 30°C até o desenvolvimento satisfatório das culturas. As culturas de leveduras foram reisoladas através de esgotamento em placas contendo meio Ágar YM e transferidas para tubos contendo meio Ágar GYMP inclinado constituído de 2,0% de glicose, 0,5% de extrato de levedura, 2,0% de extrato de malte, 0,2% de de fosfato de sódio monobásico, 2,0% de ágar, ajustado a pH 5,5. Posteriormente os tubos foram mantidos em geladeira.

Visando proteger a capacidade de produção do fator killer das leveduras, todas as alças de níquel-cromo utilizadas para inoculação foram esterilizadas a 121°C por 15 minutos e resfriadas a temperatura ambiente antes de sua utilização. Este cuidado foi mantido durante todo o trabalho.

### 3.3. Seleção de leveduras “killer”

A atividade killer das leveduras foi detectada através do método de Woods e Bevan, 1968, modificado. Foram usadas, as linhagens killer de *Saccharomyces cerevisiae* KL88 como padrão K1 e *Torulopsis glabrata* ATCC 15126 como padrão K11.

*Inoculação da levedura killer padrão K1 e das leveduras selvagens em placas de meio YEPD-MB.*

As leveduras selvagens isoladas como descrito no item anterior foram inoculadas em três placas de Petri contendo meio Ágar YEPD-MB constituído de 0,1% de extrato de levedura, 2,0% de peptona, 2,0% de glicose, 0,04% de azul de metileno em tampão citrato fosfato 1M, pH 4,5. A inoculação das leveduras foi feita com uma alça de níquel-cromo onde a massa celular foi inoculada na forma de ponto de aproximadamente 5mm de diâmetro. Foi mantida uma distância de 2,0cm entre as linhagens inoculadas. A parte central da placa foi reservada para a inoculação do padrão killer K1. As placas inoculadas foram incubadas a 25°C por 48 horas.

*Preparação das culturas de leveduras Fleischmann, Itaiquara e T. glabrata ATCC 15126 em meio líquido.*

As leveduras foram inoculadas separadamente, em frascos de 250 ml contendo 100 ml do meio líquido YM e incubado estaticamente a 25°C por 48 horas.

*Aspersão das culturas de leveduras Fleischmann, Itaiquara e T. glabrata sobre as placas de meio Ágar YEPD-MB*

Decorrido o período de incubação, o meio líquido fermentado das três leveduras foi diluído dez vezes e 100 ml da suspensão diluída foi transferida assepticamente para um frasco nebulizador estéril. Cada uma das três placas de meio Ágar YEPD-MB inoculadas com as leveduras selvagens foi aspergida com um tipo diferente de suspensão diluída, de modo que as leveduras fossem testadas simultaneamente frente as leveduras Fleischmann, Itaiquara e *T. glabrata*.

Após a aspersão, as placas foram incubadas novamente a 25°C por 48 horas.

## *Detecção do fator killer*

As colônias killer foram detectadas nas placas pelo aparecimento de zonas de inibição da levedura aspergida ou pelo surgimento de halos azul-escuros formados pelas leveduras mortas coradas pelo azul de metileno. As colônias que não exerceram nenhuma influência sobre as leveduras sensíveis foram chamadas de neutras.

### **3.4. Identificação e classificação das leveduras “killer”**

As linhagens que apresentaram o fator “killer” foram identificadas de acordo com Kreger-Van Rij (1984) e Barnett, Payne e Yarrow (1990).

#### **3.4.1 Obtenção de culturas puras**

Para identificação e classificação, as linhagens de leveduras foram suspensas em tubos contendo água destilada estéril e inoculadas em placas de Petri contendo meio Ágar GYP composto de 4% de glicose, 0,5% de extrato de levedura, 0,5% de peptona e 2% de ágar para obtenção de cultura pura. As placas foram incubadas a 25°C por 48 horas. Decorrido o período de incubação, uma colônia representativa de cada placa foi repicada em tubos contendo meio Ágar GYP inclinado e mantido como cultura estoque.

#### **3.4.2. Características morfológicas**

##### **3.4.2.1. Morfologia em meio líquido e sólido**

###### **3.4.2.1.1. Crescimento em meio líquido**

Para a verificação das características das leveduras quanto ao crescimento em meio líquido as linhagens foram inoculadas em frascos Erlenmeyer de 125 ml contendo 50 ml de meio GYP caldo e incubados a 25°C. Após 2-3 dias de incubação foi observada a presença de película e formação de sedimento.

### **3.4.2.1.2. Crescimento em meio sólido**

Para estudo das características morfológicas em meio sólido as culturas foram inoculadas em placas de Petri contendo meio Ágar YM. As placas foram incubadas a 30°C por 3 a 5 dias. Foram observadas a forma e o modo de reprodução das leveduras. As características das colônias em meio de cultura sólido, como textura, cor, superfície, elevação e aspecto de margens, foram observadas a olho nú, ao passo que a forma e o modo de reprodução, em microscópio, utilizando-se aumento de 1.000 vezes.

### **3.4.2.2. Formação de pseudomicélio e micélio verdadeiro**

A formação de pseudomicélio e micélio verdadeiro foi verificada de acordo com o método de Dalmau (Wickerham, citado por Kreger-van Rij, 1984). As culturas jovens das leveduras em estudo foram inoculadas na forma de estria e dois pontos bem separados na superfície do meio Ágar Farinha de Milho, composto por 1,5% de ágar e 1,7% de extrato de farinha de milho em água destilada. A parte central da estria e um dos pontos inoculados foram cobertos por uma lamínula estéril (as lamínulas foram submersas em álcool 70%, flambadas e resfriadas antes de serem colocadas sobre o meio). A formação de pseudomicélio e micélio foram verificados através de microscópio, após 7 a 10 dias de incubação a 30°C.

### **3.4.3. Características sexuais, formação de asco e ascosporos**

A formação de ascos e ascosporos foi verificada inoculando-se culturas jovens das leveduras, previamente desenvolvidas em meio Ágar YM durante 48 horas a 30°C em meios Ágar acetato de Fowell (Fowell, citado por Kreger-van Rij, 1984) e Ágar acetato de Mc Clary (Mc Clary *et alii*, citado por Kreger-van Rij, 1984). Para a preparação do meio Ágar acetato de Fowell, foram adicionados 2,0% de ágar em solução 0,5% de acetato de sódio trihidratado em água destilada e o pH ajustado para 6,5-7,0. Após a dissolução do ágar por aquecimento em banho-maria, o meio de cultura foi transferido para tubos de ensaio e esterilizado a 121°C por 15 minutos. O meio Mc Clary composto por 0,1% de glicose, 0,18% de cloreto de potássio, 0,25% de extrato de levedura, 0,82% de acetato de sódio trihidratado e 1,5% de ágar dissolvidos em água destilada foi preparado de maneira similar ao meio Ágar acetato de Fowell citado

anteriormente. As linhagens das leveduras foram inoculadas em cada um dos meios Ágar acetato e incubados a 30°C durante 3 a 4 semanas. A formação de ascósporos foi observada em microscópio através da fixação da suspensão da levedura em estudo em água destilada sobre lâmina de vidro, com aquecimento em chama de bico de Bunsen e coloração com solução 5,0% de verde de Malaquita a 80°C por 5 minutos seguida da lavagem com água destilada por 30 segundos, posterior coloração com solução 0,5% de safranina a temperatura ambiente e lavagem final com água destilada.

### **3.4.4. Características fisiológicas e bioquímicas**

#### **3.4.4.1. Resistência a cicloheximida**

As linhagens das leveduras em estudo foram inoculadas separadamente em placas contendo meio Ágar YM e 100 ou 1 000 ppm de cicloheximida, incubadas a 30°C por 24 a 48 horas. O inóculo foi preparado previamente, semeando-se cada uma das linhagens em 10 ml de caldo YM contido em frascos de 50 ml e incubados à 25°C por 24 a 48 horas. Após este período o meio fermentado foi agitado, diluído em água destilada estéril (50µl de meio fermentado em 50 ml de água destilada) e 5µl inoculados nas placas de Petri contendo Ágar YM e cicloheximida nas concentrações indicadas anteriormente.

#### **3.4.4.2. Desenvolvimento em diferentes temperaturas**

As leveduras Y-66-1, Y-161-1, Y-167-5, Y-500-4L, Y-500-7R, Y-548, Y-769-9R, Y-769-9RL, Y-769-11L e Y-1131, foram examinadas quanto à capacidade de desenvolvimento a 30, 37 e 40°C em Ágar YM durante 72 horas.

#### **3.4.4.3. Assimilação de nitrato**

O meio foi preparado dissolvendo-se 11,7 g de base de carbono para leveduras (Bacto Yeast Carbon Base) juntamente com 0,78 g de KNO<sub>3</sub> em 1.000 ml de água destilada. Aliquotas de 5 ml do meio foram distribuídas em tubos e esterilizadas a 121°C durante 15 minutos. Quatro tubos de meio de assimilação de nitrato foram inoculados com alça a partir de cultura em meio YM inclinado e testados após 3, 5, 10 e 15 dias aproximadamente. Foi utilizada a linhagem de *Hansenula anomala* IFO

0112 como padrão. Para o teste, foi adicionado ao meio de cultura, algumas gotas dos reagentes I e II. A presença do nitrato foi evidenciada pelo desenvolvimento de cor rosa ou vermelha no meio.

Reagente I: 0,4 g de ácido sulfanílico dissolvidos em 50 ml de solução de ácido acético 5 N.

Reagente II: 0,3 ml de dimetil  $\alpha$ -naftilamina dissolvidos em 50 ml de solução de ácido acético 5 N.

A ausência de nitrito na presença de bom crescimento pode indicar o consumo completo de nitrato. Por essa razão a presença de nitrato foi testada adicionando-se zinco em pó nos tubos onde os reagentes I e II foram adicionados. Após alguns minutos, quando o nitrato ainda estava presente, ele era reduzido a nitrito desenvolvendo a cor rosa característica.

#### **3.4.4.4. Produção de amônia a partir de uréia**

As linhagens de leveduras foram inoculadas em meio Ágar-Uréia e incubadas a 25°C por 5 dias. As culturas foram observadas diariamente e a reação foi dada como positiva pelo aparecimento de coloração rósea no meio.

Para a preparação do meio Ágar Uréia foram dissolvidos em 100 ml de água destilada 1 ml de solução 0,12% de vermelho de fenol, 1,0 g de glicose, 0,1 g de peptona, 0,5 g de NaCl e 0,2 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Após o ajuste do pH para 6,8 com HCl 0,1N, foi adicionado 2,0 g de ágar e o meio aquecido para a total dissolução dos reagentes. Aliquotas de 4,5 ml de meio foram distribuídas em tubos de ensaio e esterilizadas a 121°C por 15 minutos. Imediatamente após a autoclavagem adicionou-se aos tubos 0,5 ml de solução 20% de uréia previamente esterilizada por filtração em Membrana Millipore HAWP 002500 0,45 $\mu\text{m}$ . Os tubos foram levemente agitados e mantidos inclinados até completa solidificação.

#### **3.4.4.5. Fermentação de carboidratos**

A fermentação dos carboidratos glicose, sacarose, maltose, lactose, galactose e rafinose foi realizada como sugerido por Wickerham e citado por Kreger-van Rij, 1984. O meio basal de fermentação foi preparado pela dissolução de 4,5 g de extrato de levedura e 7,5 g de peptona em 1.000 ml de água destilada. Aliquotas de 4,0 ml deste meio

foram transferidas para tubos de ensaio contendo tubos de Durham e autoclavadas a 121°C por 15 minutos. Após a esterilização foi adicionado separadamente a cada um dos tubos 2 ml de solução dos açúcares a serem testados. Para a glicose, sacarose, maltose, lactose e galactose utilizou-se solução 6,0% e para a rafinose solução 12%.

*Preparação do inóculo:* uma suspensão de células de leveduras foi preparada a partir de células cultivadas por 24 a 48 horas em meio Ágar YM a 25°C. A massa celular retirada com alça dos tubos de cultura, foi ressuspensa em 1,0 ml de água destilada estéril contida em tubos Eppendorf e centrifugados em microcentrífuga a 6.000 rpm durante 1 minuto. Após a terceira lavagem, a massa celular, foi ressuspensa em 4,5 ml de água destilada estéril Os meios de cultura contendo os açúcares, foram inoculados com 0,1 ml desta suspensão e incubados a 25°C. Os tubos foram agitados regularmente e observados quanto ao acúmulo de gás nos tubos de Durham por um período de 14 dias. Dependendo do tempo requerido para a formação de quantidades perceptíveis de gás, a fermentação foi cotada como:

- + **Forte, com gás preenchendo o interior do tubo de Durham dentro de 1 a 3 dias**
- +w **Fraco, com o interior do tubo de Durham parcialmente preenchido**
- +vw **Muito fraco, com somente uma bolha formada no interior do tubo de Durham**
- +s **Lento ou demorado, mas com gás preenchendo o interior do tubo de Durham**
- **Ausente**

#### **3.4.4.6. Assimilação de compostos de carbono**

##### *Preparação do inóculo*

As leveduras “killer” Y-66-1, Y-161-1, Y-167-5, Y-500-4L, Y-500-7R, Y-548, Y-769-9R, Y-769-RL, Y-769-11L e Y-1131 foram inoculadas em meio Ágar YM inclinado e repicadas duas vezes, a intervalos de 2 a 3 dias, para que as linhagens fossem levadas ao seu estado de crescimento ativo. Uma porção de massa celular, retirada com

uma alça dos tubos de cultura foi lavada três vezes em tubos de Eppendorf de 1,5 ml com 1,0ml de água destilada e centrifugados a 6.000 rpm durante 1 minuto. As amostras de massa celular foram ressuspensas em tubos de 16 mm x 100 mm com água destilada estéril suficiente para a visualização de linhas pretas com aproximadamente  $\frac{3}{4}$  de mm, desenhadas em um cartão branco, como descrito por Kreger-van Rij, 1984. A utilização do cartão visa padronizar as suspensões de leveduras.

### *Inoculação das linhagens "killer"*

Uma amostra de 100  $\mu$ l de cada uma das suspensões preparadas conforme o item 3.4.4.6 foi adicionada assepticamente a 4,5 ml de solução contendo 100 mg de carboidrato (galactose, sacarose, maltose, lactose, rafinose e inositol). Em seguida, adicionou-se assepticamente aos tubos de ensaio 0,5 ml de solução de base nitrogenada para leveduras (YNB), dez vezes reforçada e esterilizada por filtração em Membrana Millipore HAWP 02500 0,45 $\mu$ m. Para controle, foi utilizado um tubo contendo apenas meio basal sem nenhuma fonte de carbono. Os tubos foram incubados à 25°C por 4 semanas. O grau de utilização dos compostos foi determinado utilizando novamente o cartão branco com linhas pretas descrito no item 3.4.4.6; após dispersão das leveduras por agitação dos tubos.

### **3.4.5. Análise de polimorfismo cromossomal por eletroforese de campo alternado (TAFE)**

A análise de polimorfismo cromossomal das leveduras "killer" por eletroforese de campo alternado foi realizada pelo Dr. Roberto V. Nonato.

A separação de cromossomos totais das leveduras "killer" selecionadas foi efetuada através de sistema de eletroforese de campo alternado, "gene line<sup>TM</sup> Beckman," de acordo com Avdalovic e Furst (1988).

#### **3.4.5.1. Preparação do DNA**

As leveduras Y-66-1, Y-161-1, Y-167-5, Y-500-4L, Y-500-7R, Y-548, Y-769-9R, Y-769-9RL, Y-769-11L e Y-1131 foram cultivadas em meio Ágar YM inclinado para obtenção de cultura em estado de crescimento ativo. O tratamento das células foi realizado logo

após a coleta para minimizar a degradação de DNA. As células ( $4 \times 10^9$  células) foram lavadas duas vezes com Tampão TE (Tris HCl 1 mM, pH 8,0 contendo 50 mM EDTA) e ressuspensas em 5,6 ml do mesmo tampão. A suspensão de levedura foi adicionada a uma mistura de 5,6 ml de 1% agarose L.M.P. e 0,2 ml de lyticase. Após a homogeneização, 164  $\mu$ l da suspensão foram transferidas para um molde vazado com um de seus lados cobertos por uma fita adesiva. Para evitar a formação de bolhas de ar, a ponteira da pipeta foi colocada no fundo do orifício do molde e levantada a medida em que o nível de agarose subia. O molde contendo as amostras de suspensão de leveduras foi colocado em refrigerador para solidificação. Após a formação do gel, a fita adesiva do fundo foi retirada e o excesso de agarose do topo do molde removido. Com auxílio de um bisturi foram cortadas amostras de 1 x 5 mm do gel de agarose, transferidas cuidadosamente para uma placa de petri e posteriormente para tubos de 50 ml. Em seguida adicionou-se 20 ml de tampão TE concentrado 10 vezes e 0,15 ml de lyticase. Os tubos foram incubados a 37°C. O tampão foi então substituído por outra solução tampão contendo 1% de lauroil sarcosinato de sódio e 1 mg/ml de proteinase K. Os tubos foram incubados por 48 horas a 50 ° C e o tampão com as enzimas trocados uma vez durante o período de incubação. As amostras de agarose, contendo aproximadamente 0,5 a 1g de DNA foram estocadas a 4°C em tampão TE.

### **3.4.5.2. Desenvolvimento da eletroforese de campo alternado**

Os géis contendo as amostras de DNA das leveduras, preparadas de acordo com o item anterior, foram colocadas nos orifícios do gel 1% de agarose (7,5 x 9,5 cm) e selados. Em seguida o gel foi removido do molde e transferido para a câmara com tampão TE previamente equilibrado a 10°-15°C. Para o desenvolvimento da eletroforese de campo alternado foram utilizados pulsos de 4 segundos com corrente constante de 170 mA durante 30 minutos para o primeiro estágio. No segundo estágio foram utilizados pulsos de 60 segundos com corrente constante de 150 mA durante 18 horas. Após o desenvolvimento da eletroforese, o gel foi removido da placa, corado com 0,1 g/ml de brometo de etídio durante 45 minutos e fotografado sob iluminação ultravioleta.

### **3.5. Estudo da atividade "killer" das linhagens selecionadas sobre as linhagens "killer"- padrão.**

Para o estudo da atividade "killer" das linhagens Y-66-1, Y-161-1, Y-167-5, Y-500-4L, Y-500-7R, Y-548, Y-769-9R, Y-769-9RL, Y-769-11L e Y-1131 foram utilizadas as linhagens "killer"-padrão descritas na tabela 1. As linhagens "killer" em estudo foram semeadas sob a forma de estrias em placas de petri contendo meio YEPD-MB, pH 4,5 e incubadas a 25°C por 48 horas. As linhagens "killer"-padrão foram inoculadas separadamente, em frascos Erlenmeyer de 125 ml contendo 50 ml de meio YM caldo e incubadas a 25°C por 48 horas. Decorrido o período de incubação, os meios líquidos fermentados com as linhagens "killer" padrão foram diluídos 10 vezes, sendo que 100 ml desta suspensão diluída foram transferidos assepticamente para um frasco nebulizador estéril. A suspensão, então, foi aspergida sobre a superfície do meio Ágar YEPD-MB onde as linhagens "killer" em estudo foram semeadas. Após a aspersão, as placas foram incubadas novamente a 25°C por 48 horas.

A atividade "killer" das linhagens selecionadas foi detectada pelo surgimento do halo de inibição de crescimento da linhagem "killer"-padrão em torno da linhagem "killer" testada.

### **3.6. Interação entre as linhagens "killer" selecionadas.**

A interação entre as linhagens "killer" selecionadas Y-66-1, Y-161-1, Y-167-5, Y-500-4L, Y-500-7R, Y-548, Y-769-9R, Y-769-9RL, Y-769-11L e Y-1131 foi avaliada como descrito no item 3.5. As linhagens foram semeadas em meio Ágar YEPD-MB e YM caldo e incubadas a 25°C, sendo a cultura de cada linhagem aspergida nas placas de Ágar YEPD-MB. Após aspersão as placas foram incubadas a 25°C durante 48 horas.

### **3.7. Estudo da capacidade fermentativa das leveduras “killer” isoladas e a influência destas linhagens no processo fermentativo desenvolvido pela levedura Fleischmann**

Para a determinação da capacidade fermentativa utilizou-se melaço de cana de açúcar. Os açúcares totais foram determinados pelo método de redução do ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) (Milles, 1959), após hidrólise da sacarose presente na amostra como descrito a seguir:

#### *Inversão da sacarose.*

A hidrólise ácida da sacarose presente no melaço foi realizada de acordo com Lees 1969, transferindo-se 50 ml de uma solução de melaço, contendo aproximadamente 1% de açúcares totais, para um balão volumétrico de 100ml. Após adição de 5 ml de HCl concentrado, o balão foi mantido em banho-maria por 5 minutos, contados a partir do momento em que a temperatura da solução atingiu 68-70°C. Decorrido este período o balão foi resfriado e a amostra neutralizada com uma solução de 40% de NaOH. A neutralização foi considerada satisfatória quando um pedaço de papel indicador Vermelho Congo, adicionado ao balão, adquiriu uma coloração intermediária entre o azul e o vermelho. Após a neutralização da amostra, o volume do balão foi completado. A eficiência da hidrólise foi avaliada submetendo-se uma solução padrão 1% de sacarose às mesmas condições que a amostra.

#### *Preparação do pré-inóculo*

As leveduras “killer” e Fleischmann foram inoculadas em frascos de Erlenmeyer de 250 ml contendo 50 ml de melaço com 10% de açúcares totais, 700 ppm de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ajustado a pH 5,0 e incubadas a 25°C por 24 horas.

#### *Fermentação*

Amostras de 30 ml de pré-inóculo foram transferidas assepticamente para frascos de 500 ml contendo 200 ml de melaço com 24% de açúcares totais, 700 ppm de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ajustado a pH 5,0. Após adaptação de rolhas de borracha com dispositivo de vidro na forma de U contendo ácido sulfúrico concentrado, os frascos foram incubados a 25°C

e a perda de CO<sub>2</sub> acompanhada por meio da variação de massa, como descrito por Park e Rivera, 1982.

A influência das linhagens “killer” no processo fermentativo desenvolvido pela levedura Fleischmann foi avaliada através da inoculação mista de 15 ml do pré-inóculo da linhagem “killer” e 15 ml do pré-inóculo da levedura Fleischmann. A fermentação com a cultura mista ocorreu sob as mesmas condições descritas para a cultura única.

As linhagens de leveduras predominantes no final da fermentação foram detectadas pelo estudo da produção de fator “killer” em meio YEPD-MB como descrito no item 3.3.

#### *Determinação do teor de etanol*

As alíquotas coletadas periodicamente dos frascos durante o processo fermentativo descrito no item anterior foram analisadas quanto ao teor de etanol por cromatografia líquida de alta eficiência. Para a análise, utilizou-se cromatógrafo modelo CG-480C com detector IR-CG 410, coluna CG-041-82-25 fase aminex-carboidrato com 0,78 cm de diâmetro interno e 30 cm de largura a 73,5°C. Utilizou-se água filtrada em milliQ e degaseificada como fase móvel. O fluxo utilizado foi de 0,5 ml/min. A temperatura do detector foi mantida a 50°C. Utilizou-se como padrões comparativos, etanol, glicose, frutose e sacarose.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

De acordo com os procedimentos descritos no item 3.2, foram isolados 423 linhagens de leveduras, provenientes de frutos (72), de cana-de-açúcar (bagaços, caldos e mosto) (98) e terras e flores(20). Além destas linhagens foram testadas também outras 200 linhagens de leveduras do Laboratório de Bioquímica de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, isoladas de mostos provenientes de usinas de álcool e testadas quanto a produção de fator "killer" como descrito no item 3.3. Desse total de 623 linhagens que foram testadas, 10 delas revelaram-se capazes de produzir fator "killer". As linhagens Y-161-1, Y167-5, Y500-4L, Y500-7R, Y-548, Y-769-9R, Y-769-9RL e Y-769-11L, produziram fator "killer" capazes de matar as leveduras prensadas comerciais Fleischmann e Itaiquara usadas em usinas de álcool e fábricas de aguardente.

### 4.1 Seleção de leveduras "killer".

As linhagens Y-66-1 e Y-1131 mostraram-se capazes de matar a levedura *Torulopsis grabrata* ATCC 15126 produtora de fator "killer" K11, porém não revelaram a capacidade de matar as leveduras Fleischmann e Itaiquara.

O fator "killer" foi evidenciado através do halo de inibição de crescimento da levedura sensível em torno da levedura "killer". As células de leveduras mortas devido a ação de toxina "killer" adquirem coloração azul, devida a adsorção do azul de metileno pelas células de leveduras mortas. O azul de metileno possui cargas positivas e combina fortemente com os constituintes celulares carregados negativamente (ácidos nucleicos e polissacarídeos ácidos) Borzani e Vairo, 1970. As Figuras 1A e 1B ilustram, respectivamente, a inibição do crescimento de leveduras sensíveis Fleischmann e Itaiquara pelas leveduras "killer". Os fatores "killer" das linhagens Y-161-1 e Y-167-5 e levedura "killer" padrão K1 matam as leveduras Fleischmann e Itaiquara. A levedura Y-66-1 não mata as leveduras Fleischmann e Itaiquara.

## 4.2 Identificação das leveduras "killer" selecionadas.

As linhagens de leveduras "killer" Y-161-1, Y-167-5, Y-500-4L, Y-500-7R, Y-548, Y-769-9R, Y-769-9RL, Y-769-11L foram identificadas como *Saccharomyces cerevisiae* pelas características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas, bem como pela análise do DNA de polimorfismo cromossomal por eletroforese de campo alternado.

As leveduras "killer" Y-66-1 e Y-1131 foram identificadas como *Hansenula* sp e *Candida* sp, respectivamente, de acordo com as características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas. A tabela 2 ilustra as características morfológicas e sexuais das leveduras "killer" selecionadas.

A tabela 3 mostra as características de fermentação de carboidratos, assimilação de compostos de carbono, assimilação de nitrato, resistência a cicloheximida, crescimento a 40°C e formação de película em meio líquido.

As figuras 2 a 11 ilustram as características morfológicas das colônias em meio Ágar YM incubados à 30°C por 48 horas.

As figuras 12A e 12B ilustram os padrões de bandeamento de DNA cromossomal, através de eletroforese de campo alternado, apresentadas pelas linhagens "killer". A figura 12B é uma representação gráfica fiel do gel de corrida em que a posição 1 representa o ponto de aplicação das amostras. As linhagens Y-161-1 a Y-769-11L (centrais) são semelhantes entre si e seus padrões são típicos para leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, porém muito diferentes dos padrões apresentados pelas linhagens Fleischmann ou Itaiquara de acordo com a análise do Dr. Roberto V. Nonato. Estes resultados estão de acordo com os estudos de identificação pelas características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas. As linhagens Y-66-1 e Y-1131 apresentaram padrões de bandeamento de DNA muito diferentes, indicando pertencerem a outros gêneros de levedura.

## 4.3. Estudo da atividade "killer" das linhagens selecionadas

A tabela 5 ilustra as atividades "killer" das linhagens de leveduras Y-66-1, Y-161-1, Y-167-5, Y-500-4L, Y-500-7R, Y-548, Y-769-9R, Y-769-9RL, Y-769-11L e Y-1131 sobre as leveduras "killer" padrão e as leveduras prensadas comerciais Fleischmann e Itaiquara.

A linhagem Y-66-1, identificada como *Hansenula* sp, apresentou atividade "killer" contra as leveduras padrão ( K2),

*Saccharomyces cerevisiae* FSC 5251 e *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1001, contra a levedura padrão (K4), *Torulopsis glabrata* NCYC 388 e também contra a levedura padrão (K11) *Torulopsis glabrata* ATCC 15126.

A linhagem Y-66-1 não mostrou atividade “killer” em relação as outras leveduras testadas.

As linhagens Y-161-1, Y-167-5, Y-500-4L, Y-500-7R, Y-548, Y-769-9R, Y-769-9RL e Y-769-11L, identificadas como *Saccharomyces cerevisiae*, mostraram atividade “killer” contra as linhagens padrões (K2), *S. diastaticus* NCYC 713, *S. cerevisiae* NCYC 738 e *S. cerevisiae* NCYC 1001, contra a levedura padrão (K5) *Debaryomyces vanrij* NCYC 577 e contra as leveduras prensadas comerciais Fleischmann e Itaiquara.

As linhagens Y-161-1, Y-167-5, Y-500-4L, Y-500-7R, Y-548, Y-769-9R, Y-769-9RL e Y-769-11L não apresentaram atividade “killer” contra as linhagens padrão (K1) *Saccharomyces cerevisiae* KL88, (K7) *Pichia membranaefaciens* NCYC 333, (K8) *Hansenula anomala* NCYC 435, (K9) *Hansenula mrakii* NCYC500 e (K11) *Torulopsis glabrata* ATCC 15126 e mostraram atividade “killer” variável em relação as linhagens padrão (K2) *S. cerevisiae* FSC 5251, (K4) *Torulopsis glabrata* NCYC 388, (K5) *Hansenula anomala* NCYC 438 e (K6) *Kluyveromyces marxianus* NCYC 587.

A linhagem Y-1131 identificada como *Candida* sp apresentou atividade “killer” contra as linhagens padrões (K1) *S. cerevisiae* KL88, (K2) *S. cerevisiae* FSC 5251, *S. diastaticus* NCYC 713, *S. cerevisiae* NCYC 738 e *S. cerevisiae* NCYC 1001, (K3) *S. capensis* NCYC 761, (K4) *Torulopsis glabrata* NCYC 388, (K5) *Hansenula anomala* NCYC 438 e *Debaromyces vanrij* NCYC 577, (K7) *Pichia membranaefaciens* NCYC 333 e *Torulopsis glabrata* ATCC 15126. A linhagem Y-1131 não mostrou atividade “killer” contra as linhagens padrões (K6) *Kluyveromyces marxianus* NCYC 587, (K8) *Hansenula anomala* NCYC 435, (K9) *Hansenula mrakii* NCYC 500, (K10) *Kluyveromyces drosophilaram* NCYC 575 e leveduras Fleischmann e Itaiquara.

As leveduras “killer” selecionadas, *Hansenula* sp (Y-66-1) e *Candida* sp (Y-1131), apresentaram atividade “killer” contra a levedura padrão (K11) *Torulopsis glabrata* ATCC 15126, porém não apresentaram atividade “killer” contra as linhagens das leveduras Fleischmann e Itaiquara.

#### 4.4. Interação entre as linhagens "killer" selecionadas.

A tabela 6 ilustra a interação entre as linhagens "killer" Y-66-1, Y-161-1, Y-167-5, Y-500-4L, Y-500-7R, Y-548, Y-769-9R, Y-769-9RL, Y-769-11L e Y-1131. Verificou-se que somente a linhagem Y-66-1 (*Hansenula* sp) apresenta atividade "killer" sobre a linhagem Y-1131 (*Candida* sp). As outras linhagens "killer" selecionadas, mostraram-se resistentes entre si com relação aos fatores "killer" produzidos.

#### 4.5. Estudo da capacidade fermentativa das leveduras "killer" isoladas e a influência destas linhagens no processo fermentativo desenvolvido pela levedura Fleischmann.

As figuras 13 a 22 ilustram a capacidade fermentativa das leveduras "killer" isoladas e a influência das leveduras "killer" Y-66-1, Y-161-1, Y-167-5, Y-500-4L, Y-500-7R, Y-548, Y-769-9R, Y-769-9RL, Y-769-11L e Y-1131 na fermentação à 25°C de melão de cana-de-açúcar 24% de açúcares totais pela levedura controle Fleischmann.

A tabela 7 mostra a produção de etanol a partir da fermentação de melão de cana contendo 24% de açúcares totais a 25 °C pelas leveduras "killer" selecionadas e pela levedura comercial Fleischmann em cultura única e cultura mista.

As figuras 23 a 26, ilustram o perfil de utilização dos carboidratos sacarose, glicose e frutose e produção de etanol pelas leveduras Y-66-1, Y-161-1, Y-167-5, Y-500-4L, Y-500-7R, Y-548, Y-769-9R, Y-769-9RL, Y-769-11L, Y-1131 e Fleischmann a partir de melão de cana contendo 24% de açúcares totais a 25°C.

A levedura "killer" *Hansenula* sp Y-66-1, apresentou baixa atividade fermentativa; foi obtido 5,2% v/v de rendimento de etanol. Na fermentação de melão com cultura mista da linhagem "killer" *Hansenula* sp Y-66-1 e levedura Fleischmann foi obtido 8,6% v/v de rendimento de etanol, menor comparativamente ao rendimento de 9,65% v/v obtido na fermentação de melão pela levedura Fleischmann. As figuras 13 e 23A e a tabela 7 ilustram os resultados.

As figuras 14, 16 e 18 mostram respectivamente a capacidade fermentativa das leveduras "killer" *Saccharomyces cerevisiae* Y-161-1, Y-500-4L e Y-548 e a influência das linhagens no processo fermentativo

desenvolvido pela levedura Fleischmann. As figuras 23B, 24A e 24C ilustram respectivamente, o perfil de utilização de carboidratos e produção de etanol pelas leveduras “killer” *Saccharomyces cerevisiae* Y-161-1, Y-500-4L e Y-548, similares a levedura Fleischmann (figura 26B). Na fermentação de melaço pelas linhagens Y-161-1, Y-500-4L e Y-548 foram obtidos respectivamente 9,51%, 10,95% e 9,67% v/v de etanol, enquanto que utilizando-se a levedura Fleischmann obteve-se 9,65% v/v de etanol (tabela 7). Na fermentação de melaço com cultura mista das linhagens Y-161-1+Fleischmann, Y-500-4L+Fleischmann e Y-548+Fleischmann foram obtidos 9,75%, 10,25% e 9,25% v/v de etanol, como ilustrado na tabela 7.

A figura 15 ilustra a capacidade fermentativa da levedura “killer” *Saccharomyces cerevisiae* Y-167-5 e a influência dessa linhagem “killer” na fermentação de melaço de cana pela levedura Fleischmann. A figura 23C mostra o perfil de utilização de carboidratos e produção de etanol pela linhagem Y-167-5. No meio de fermentação de melaço pela linhagem Y-167-5 observou-se maior quantidade de sacarose e menor quantidade de glicose e frutose do que no meio de fermentação de melaço pela linhagem controle Fleischmann. A linhagem *S. cerevisiae* Y-167-5 parece apresentar menor produção de invertase em comparação com a linhagem Fleischmann.

As figuras 19, 20 e 21 ilustram respectivamente a capacidade fermentativa das linhagens Y-769-9R, Y-769-9RL e Y-769-11L e a influência da levedura “killer” na fermentação a 25°C de melaço contendo 24% de açúcares totais pela levedura Fleischmann. Foram obtidos 7,4%, 7,5 % e 9,6% v/v de rendimento de etanol após fermentação de melaço pelas linhagens “killer” *S. cerevisiae* Y-769-9R, Y-769-9RL e Y-769-11L respectivamente, como mostra a tabela 7. Nas fermentações de melaço com cultura mista da linhagem “killer” Y-769-9R+Fleischmann Y-769-9RL+Fleischmann e Y-769-11L+Fleischmann, foram obtidos rendimentos de etanol de 3,71%, 6,7% e 9,4% v/v respectivamente, como ilustrado na tabela 7. Na fermentação de melaço com cultura mista da linhagem “killer” Y-769-9R+Fleischmann foi obtido menor rendimento de etanol em comparação com a fermentação mista de linhagem “killer” Y-769-11L+Fleischmann.

A linhagem “killer” *Sacharomyces cerevisiae* Y-500-7R apresentou menor capacidade fermentativa que a *Sacharomyces cerevisiae* Y-500-4L. Na fermentação de melaço pela cultura mista da linhagem Y-500-7R +Fleischmann foi obtido baixo rendimento de etanol em relação a fermentação de melaço pela cultura mista da linhagem Y-500-4L+Fleischmann (tabela 7).

A linhagem “killer” *Candida* sp Y-1131 (figura 26A) apresentou baixa capacidade fermentativa e perfil de utilização de carboidratos diferente em relação a linhagem *Hansenula* sp Y-66-1 (figura 23A).

Em todos os testes de fermentação de melaço pelas culturas mista Y-161-1+Fleischmann, Y-167-5+Fleischmann, Y-500-4L+Fleischmann, Y-500-7R+Fleischmann, Y-548+Fleischmann, Y-769-9R+Fleischmann, Y-769-9RL+Fleischmann e Y-769-11L+Fleischmann verificou-se que as linhagens “killer” predominam no meio de fermentação. A figura 27 ilustra a predominância de colônias com atividade “killer” no final da fermentação.

As linhagens *S. cerevisiae* Y-167-5 e *S. cerevisiae* Y-500-4L apresentaram maior rendimento de etanol que a levedura controle Fleischmann, enquanto as linhagens *S. cerevisiae* Y-161-1 e *S. cerevisiae* Y-548 e *S. cerevisiae* Y-769-11L, apresentaram rendimento de etanol similar a levedura controle Fleischmann. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* Y-500-4L, apresentou maior espectro de ação, maior atividade “killer” entre as leveduras estudadas e maior rendimento de etanol, a partir da fermentação de melaço a 25°C.

## 5 - CONCLUSÕES

- 5.1 Entre as 623 linhagens de leveduras isoladas de frutas, caldo e mosto de usinas produtoras de álcool foram selecionadas 10 linhagens de leveduras “killer”.
- 5.2 As linhagens “killer” Y-161-1, Y-167-5, Y-500-4L, Y-500-7R, Y-548, Y-769-9R, Y-769-9RL e Y-769-11L foram identificadas como *Saccharomyces cerevisiae* e apresentaram variada atividade “killer” contra as leveduras comerciais Fleischmann e Itaiquara.
- 5.3 As linhagens “killer” Y-66-1 e Y-1131, identificadas como *Hansenula sp* e *Candida sp* respectivamente, não apresentaram atividade “killer” contra as leveduras comerciais Fleischmann e Itaiquara e mostraram baixo rendimento de etanol em comparação com a levedura comercial Fleischmann..
- 5.4 As leveduras “killer” *S.cerevisiae* Y-167-5 e Y-500-4L apresentaram maior rendimento de etanol que a levedura Fleischmann enquanto as linhagens “killer” *S. cerevisiae* Y-161-1, Y-548 e Y-769-11L mostraram rendimento de etanol similar a levedura Fleischmann.
- 5.5 Entre as leveduras testadas, a que apresentou maior espectro de ação, maior atividade “killer” e maior produção de etanol foi a levedura *S.cerevisiae* Y-500-4L.

## 6 - SUGESTÕES PARA CONTINUIDADE DA PESQUISA

Como sugestão para continuidade da pesquisa são apresentados os seguintes tópicos:

- 6.1 Estudo das condições ótimas para a produção da toxina “killer”.
- 6.2 Separação da toxina “killer” e estudo de sua estabilidade em relação ao pH e temperatura.
- 6.3 Atividade da toxina “killer” sobre as leveduras encontradas como contaminantes em processos fermentativos.
- 6.4 Ampliação da escala para o estudo dos efeitos da levedura “killer” em processos fermentativos.
- 6.5 Avaliação da aplicação industrial da levedura “killer”.

# ***TABELAS***

Tabela 1 - Leveduras "killer" padrão.

Fenótipo "killer"	Leveduras
K <sub>1</sub>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> KL88
K <sub>2</sub>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> FSC 5251 <i>Saccharomyces diastolicus</i> NCYC713 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> NCYC738 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> NCYC1001
K <sub>3</sub>	<i>Saccharomyces capensis</i> NCYC761
K <sub>4</sub>	<i>Torulopsis glabrata</i> NCYC388
K <sub>5</sub>	<i>Hansenula anomala</i> NCYC438 <i>Debaryomyces vanriji</i> NCYC577
K <sub>6</sub>	<i>Kluyveromyces marxianus</i> NCYC587
K <sub>7</sub>	<i>Pichia membranaefaciens</i> NCYC333
K <sub>8</sub>	<i>Hansenula anomala</i> NCYC435
K <sub>9</sub>	<i>Hansenula mrakii</i> NCYC500
K <sub>10</sub>	<i>Kluyveromyces drosophilaram</i> NCYC575
K <sub>11</sub>	<i>Torulopsis glabrata</i> ATCC15126

Tabela 2 - Características morfológicas e sexuais das leveduras "killer"selecionadas

Levedura	Tipo de Reprodução	Morfologia da Célula	Número e Forma dos	Formação de Pseudomicélio
	Vegetativa		Ascosporos	
Y-66-1	brotamento multipolar	globosa	1 esférico	positivo
Y-161-1	brotamento multipolar	globosa	1 a 4 esféricos	positivo
Y-167-5	brotamento multipolar	globosa	1 a 4 esféricos	positivo
Y-500-4L	brotamento multipolar	globosa	1 a 4 esféricos	positivo
Y-500-7R	brotamento multipolar	globosa	1 a 3 esféricos	positivo
Y-548	brotamento multipolar	globosa	1 a 4 esféricos	positivo
Y-769-9R	brotamento multipolar	globosa	1 a 3 esféricos	positivo
Y-769-9RL	brotamento multipolar	globosa	1 a 4 esféricos	positivo
Y-769-11L	brotamento multipolar	globosa	1 a 3 esféricos	positivo
Y-1131	brotamento multipolar	globosa	ausente	positivo

Tabela 3 - Características morfológicas e sexuais das leveduras "killer" selecionadas

Levedura	Fermentação						Assimilação						Assimilação nitrato	Resistência cicloheximida (100 e 1000 rpm)	Desenvolvi- mento a 40°C	Formação de película em meio líquido
	glic	gal	sac	malt	lact	raf	gal	sac	malt	lact	raf	ino				
Y-66-1	+	+	w	-	-	-	+	vw	w	-	w	-	+	-	-	-
Y-161-1	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-
Y-167-5	+	+	+	vw	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-
Y-500-4L	+	+	+	-	-	+	+	+	w	-	+	-	-	-	+	-
Y-500-7R	+	+	+	-	-	+	+	+	w	-	+	-	-	-	+	-
Y-548	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-
Y-769-9R	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-
Y-769-9RL	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-
Y-769-11L	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-
Y-1131	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-

gli = glicose  
 malt = maltose  
 ino = inositol  
 gal = galactose  
 sac = sacarose  
 lact = lactose  
 raf = rafinose

+ = positivo  
 - = negativo  
 w = fraco  
 vw = muito fraco

Tabela 4 - Identificação das linhagens "killer" selecionadas

No. da linhagem da levedura "killer"	Leveduras
Y-66-1	<i>Hansenula sp</i>
Y-161-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Y-167-5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Y-500-4L	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Y-500-7R	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Y-548	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Y-769-9R	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Y-769-9RL	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Y-769-11L	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Y-1131	<i>Candida sp</i>

Tabela 5 - Atividade "killer" das linhagens selecionadas sobre as linhagens "killer" padrão e leveduras prensadas Fleischmann e Itaiquara.

			Linhagens de Leveduras Killer Y								
Leveduras		66-1	161	167-5	500-4L	500-7R	548	769-9R	769-9RL	769-11L	1131
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> KL88	K <sub>1</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> FSC 5251	K <sub>2</sub>	+	+++	+++	-	-	+	+	+++	+/-	+++
<i>Saccharomyces diastaticus</i> NCYC713	K <sub>2</sub>	-	++	+/-	+++	+++	++	+++	+++	++	++
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> NCYC738	K <sub>2</sub>	-	+	+	+++	+++	+	++	++	++	++
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> NCYC1001	K <sub>2</sub>	+	+	+	+++	+++	+	++	++	++	+
<i>Saccharomyces capensis</i> NCYC761	K <sub>3</sub>	-	+	+/-	+++	+++	+	++	++	++	+
<i>Torulopsis glabrata</i> NCYC388	K <sub>4</sub>	+	-	+/-	++	+++	-	-	+/-	-	+
<i>Hansenula anomala</i> NCYC438	K <sub>5</sub>	-	-	+/-	+/-	-	-	+/-	+	+/-	+/-
<i>Debaryomyces vanrij</i> NCYC577	K <sub>5</sub>	-	+	+/-	+++	+++	+	+++	+++	+++	+
<i>Kluyveromyces marxianus</i> NCYC587	K <sub>6</sub>	-	-	+/-	-	-	-	+/-	+/-	+/-	-
<i>Pichia membranaefaciens</i> NCYC333	K <sub>7</sub>	-	-	-	+/-	-	-	-	-	-	+/-
<i>Hansenula anomala</i> NCYC435	K <sub>8</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Hansenula mrakii</i> NCYC500	K <sub>9</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Kluyveromyces drasophilum</i> NCYC575	K <sub>10</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Torulopsis glabrata</i> ATCC15126	K <sub>11</sub>	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-
Fleischmann		-	+	+	+++	+++	+	+++	+++	+++	-
Itaiquara		-	++	++	+++	+++	++	+++	+++	+++	-

+A levedura Y-66-1 mata a levedura padrão (K<sub>2</sub>) *S. cerevisiae* FSC 5251

- A levedura Y-66-1 não mata a levedura padrão (K<sub>1</sub>) *S. cerevisiae* KL88

Tabela 6 - Interação entre as linhagens "killer" selecionadas.

	66-1	161-1	167-5	500-4L	500-7R	548	769-9R	769-9RL	769-11L	1131
Y-66-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Y-161-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Y-167-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Y-500-4L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Y-500-7R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Y-548	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Y-769-9R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Y-769-9RL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Y-769-11L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Y-1131	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+A levedura "killer" Y-66-1 mata a levedura "killer" Y-1131

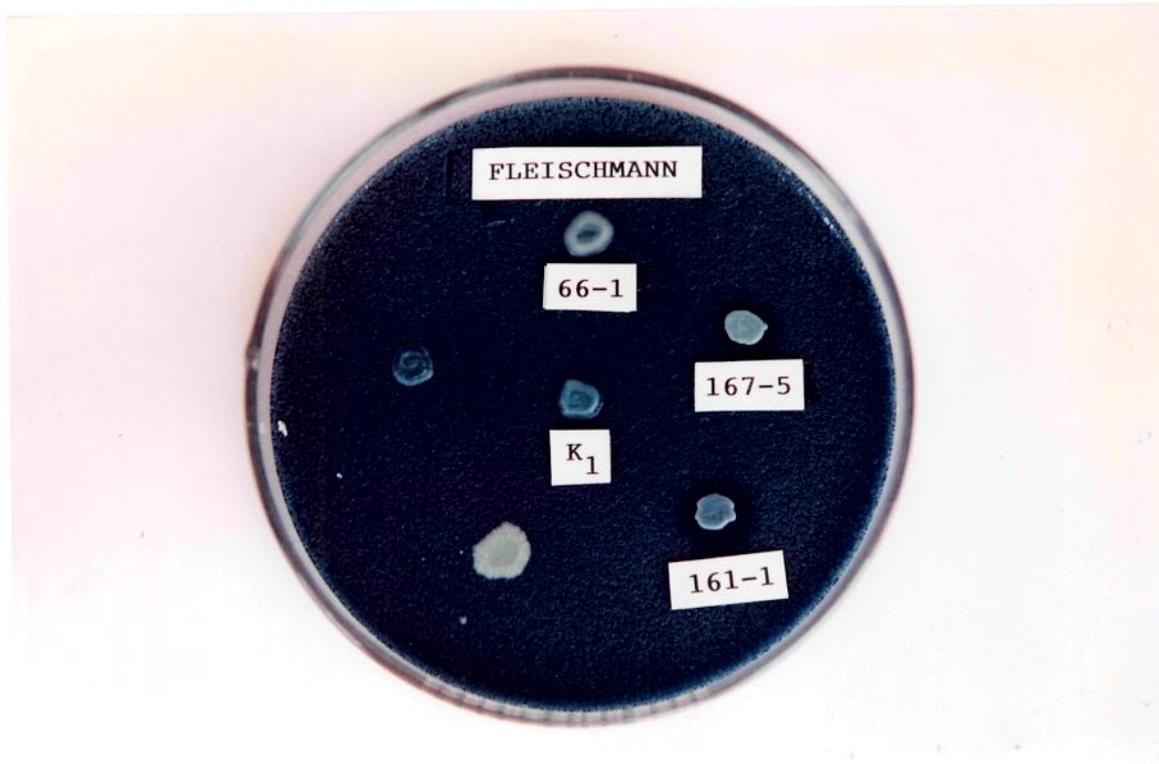
- A levedura "killer" Y-66-1 não mata as leveduras "killer" Y-161, 167-5, 500-4L, 500-7R, 548, 769-9R, 769-9RL, 769-11L

Tabela 7 - Produção de etanol a partir da fermentação de melaço de cana-de-açúcar contendo 24% de açúcares totais a 25°C pelas leveduras "killer" selecionadas e pela levedura comercial Fleischmann

Levedura	Produção de Etanol % (v/v)	
	Fermentação com cultura única de levedura	Fermentação com cultura mista: linhagem "killer" + Fleischmann
Y-66-1	5,20	8,60
Y-161-1	9,51	9,75
Y-167-5	10,75	10,00
Y-500-4L	10,95	10,25
Y-500-7R	8,05	5,65
Y-548	9,67	9,25
Y-769-9R	7,40	3,71
Y-769-9RL	7,55	6,70
Y-769-11L	9,60	9,40
Y-1131	3,50	8,25
Fleischmann	9,65	----

## ***FIGURAS***

A



B

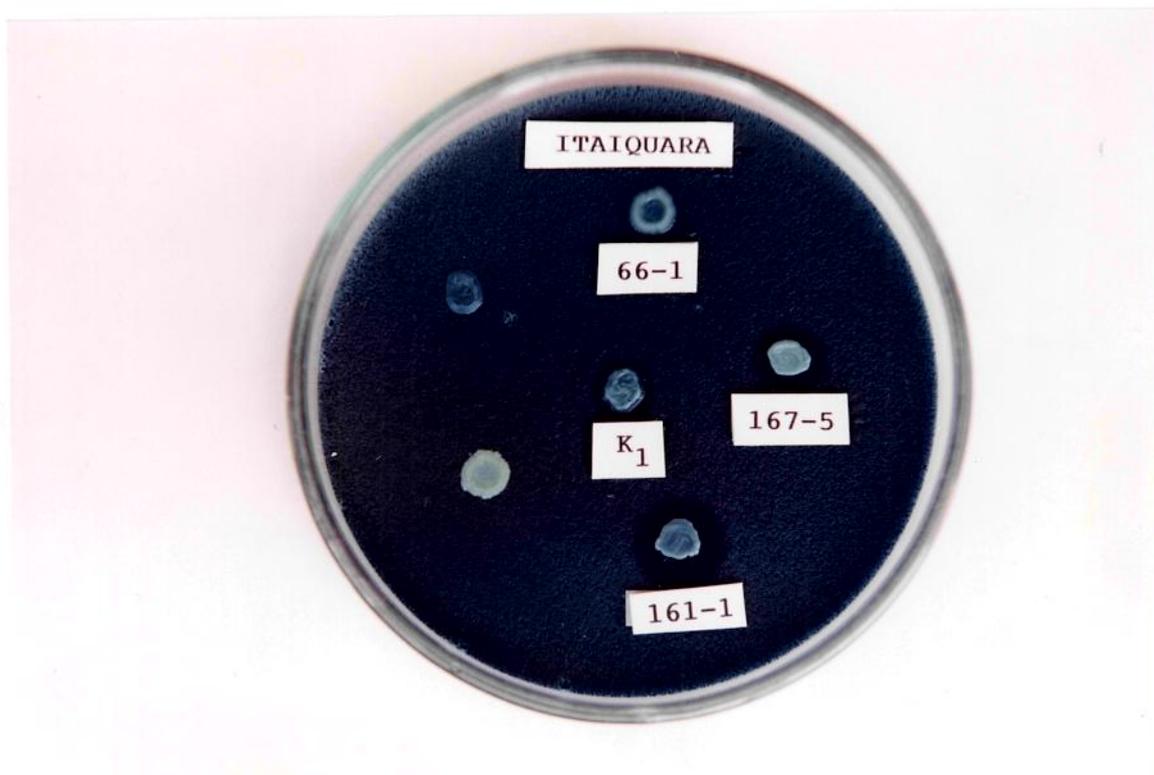


Figura 1 Halo de inibição decorrente do efeito "killer" das linhagens Y-161-1 e Y-167-5 sobre as leveduras sensíveis comerciais Fleischmann (A) e Itaiquara (B).



Figura 2 Morfologia da colônia da linhagem Y-66-1 em meio ágar YM a 30°C, 48 horas de incubação.

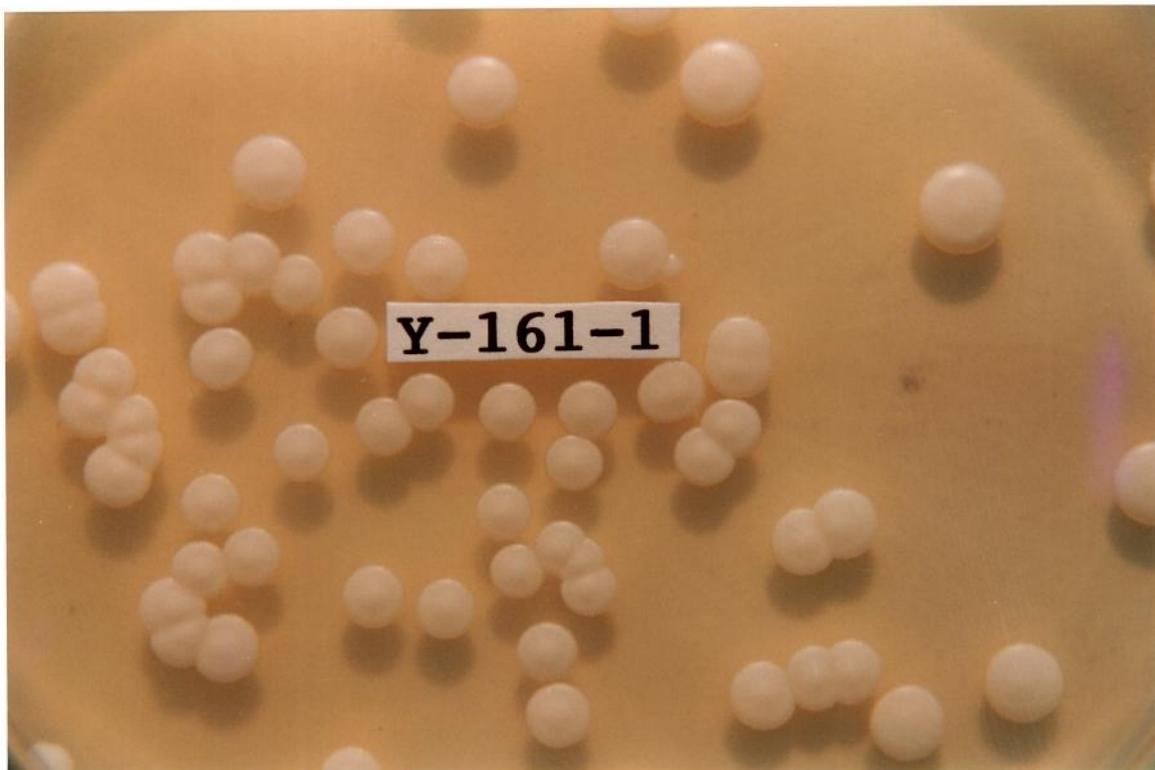


Figura 3 Morfologia da colônia da linhagem Y-161-1 em meio ágar YM a 30°C, 48 horas de incubação

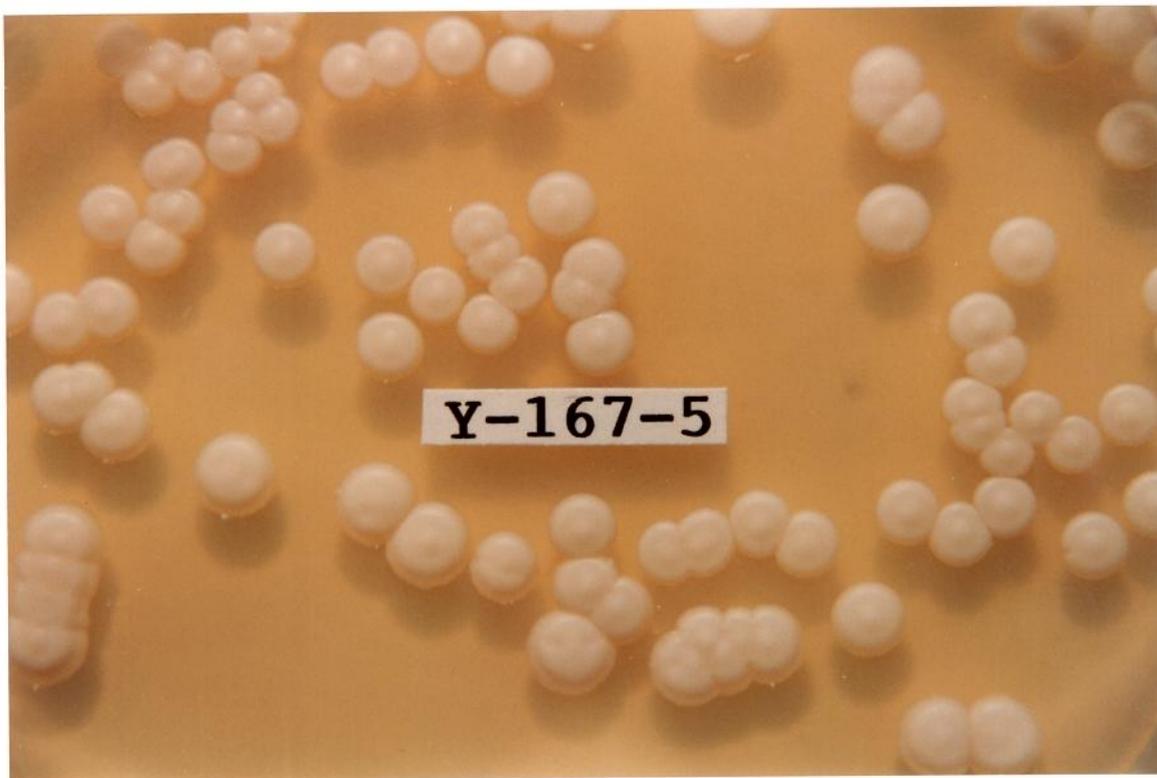


Figura 4 Morfologia da colônia da linhagem Y-167-5 em meio ágar YM a 30°C, 48 horas de incubação.

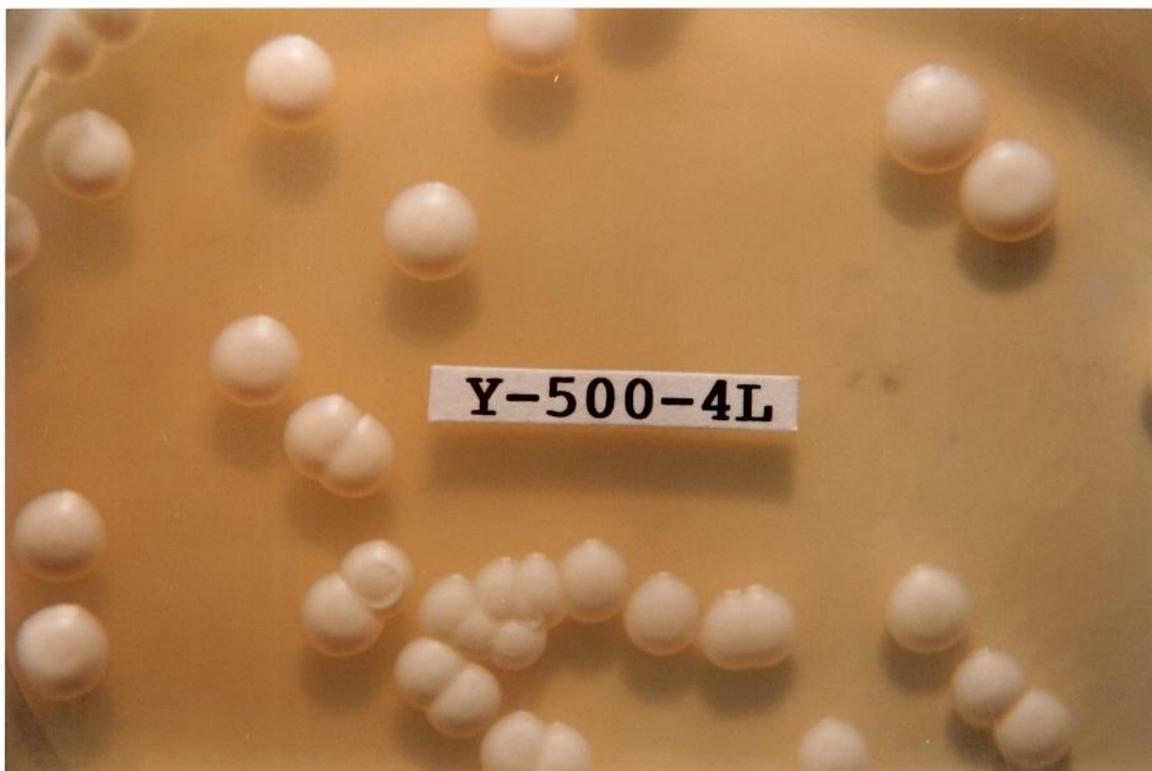


Figura 5 Morfologia da colônia da linhagem Y-500-4L em meio ágar YM a 30°C, 48 horas de incubação.

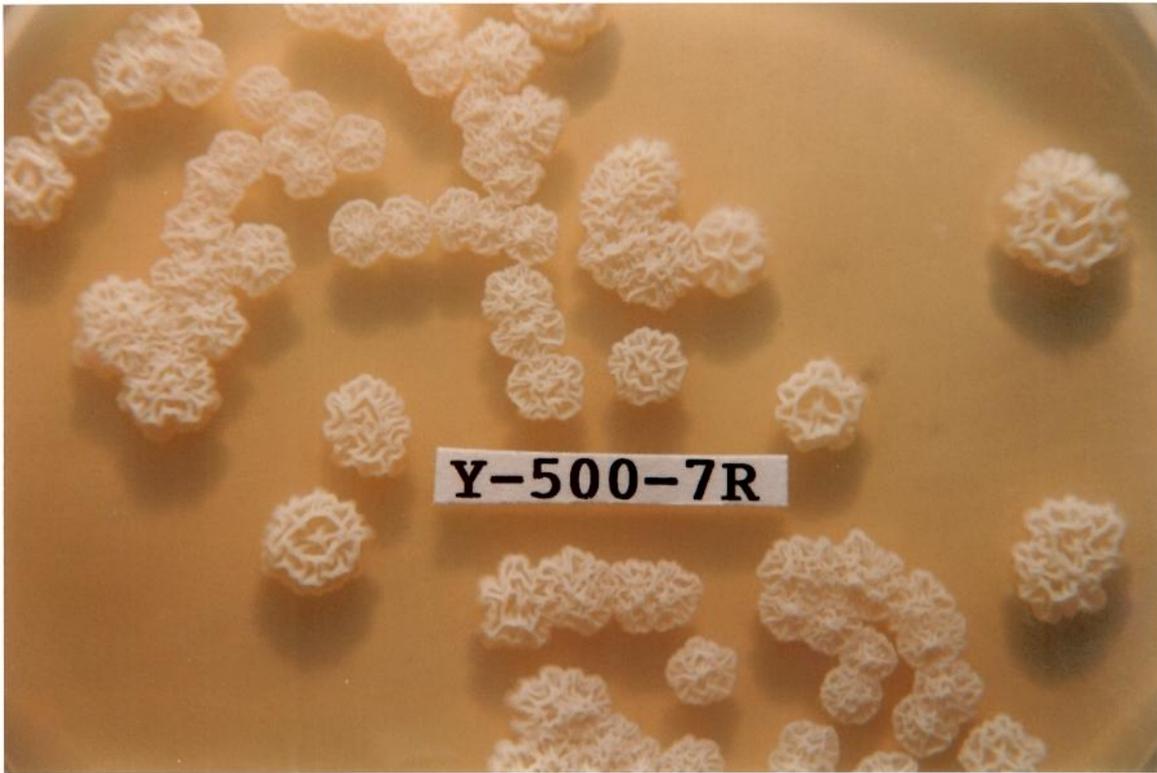


Figura 6 Morfologia da colônia da linhagem Y-500-7R em meio ágar YM a 30°C, 48 horas de incubação.

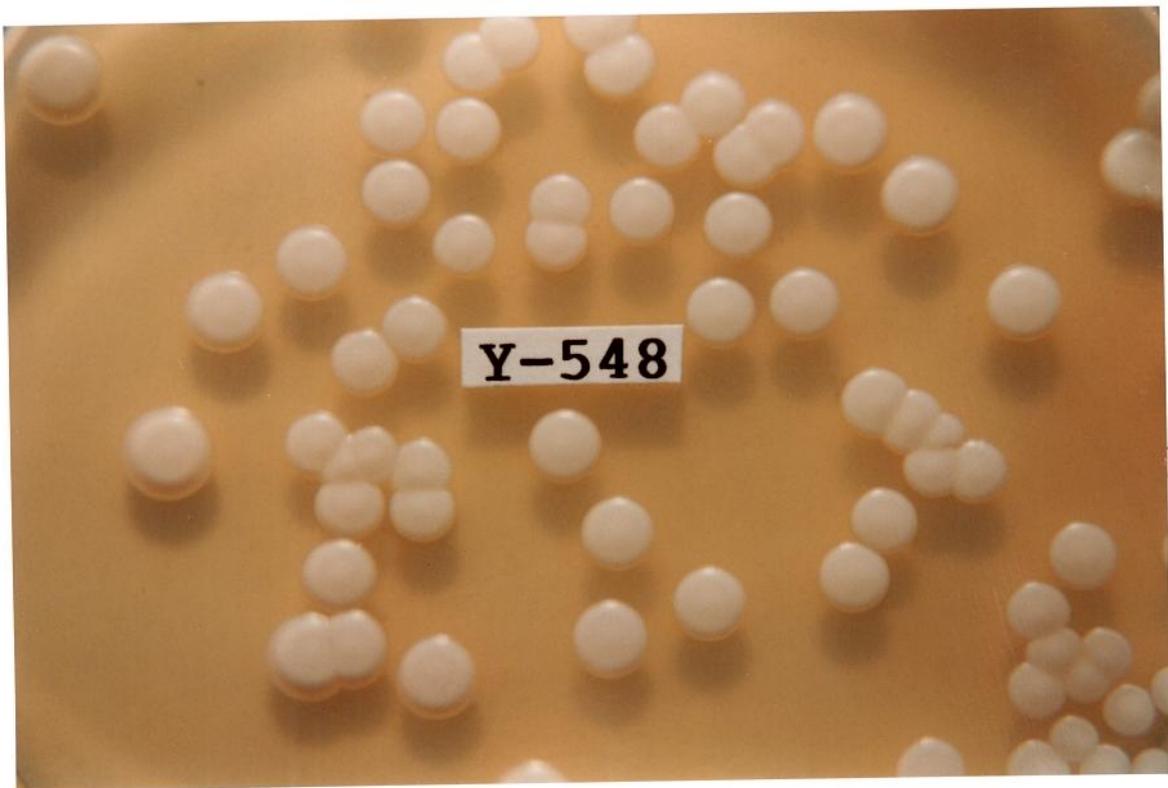


Figura 7 Morfologia da colônia da linhagem Y-548 em meio ágar YM a 30°C, 48 horas de incubação.

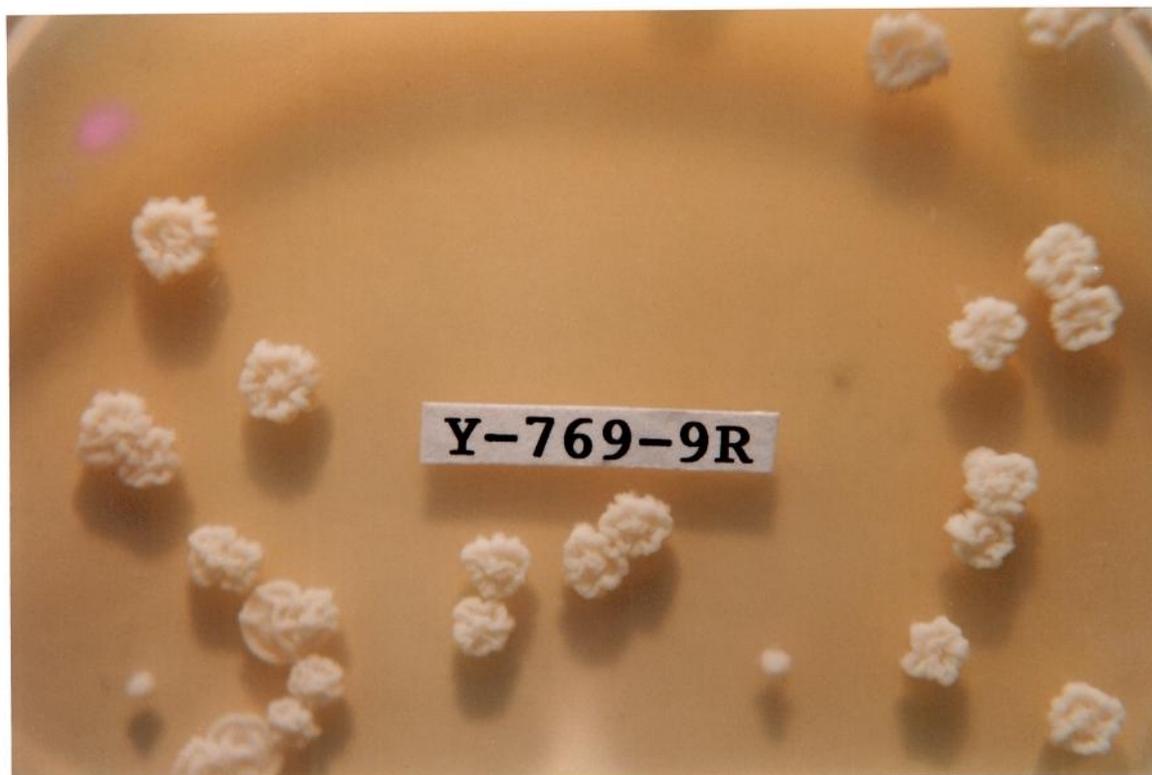


Figura 8 Morfologia da colônia da linhagem Y-769-9R em meio ágar YM a 30°C, 48 horas de incubação.

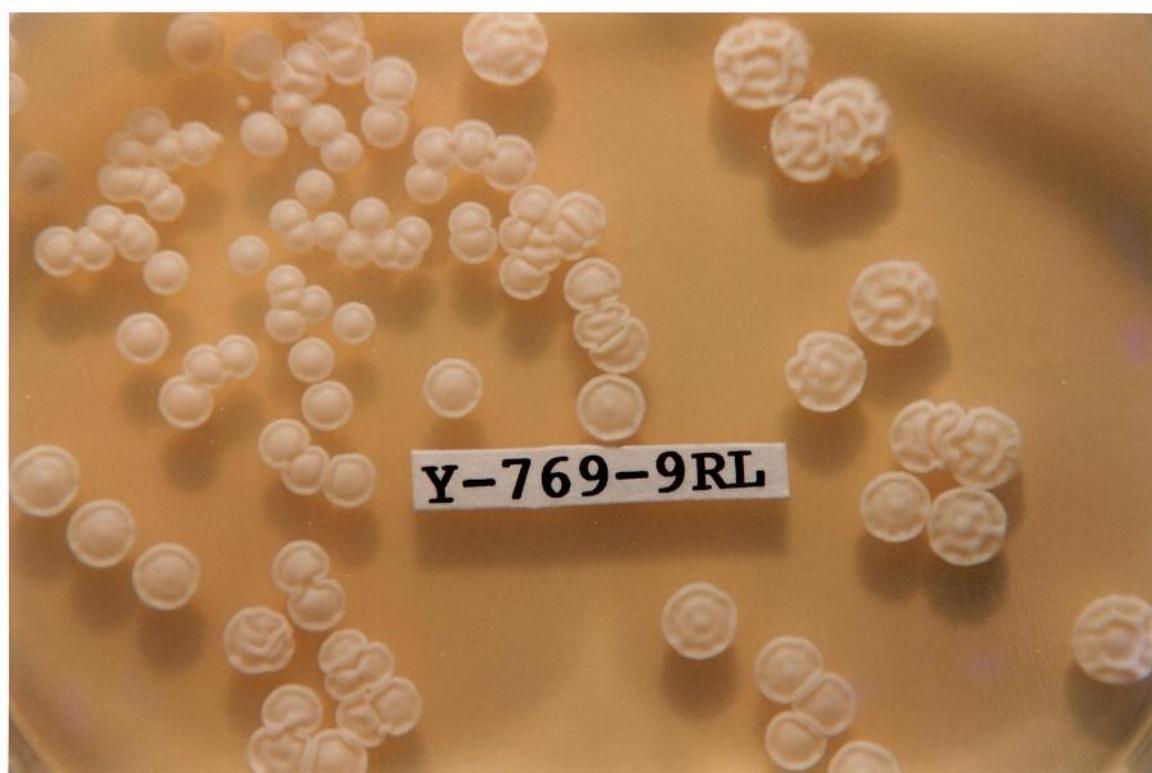


Figura 9 Morfologia da colônia da linhagem Y-769-9RL em meio ágar YM a 30°C, 48 horas de incubação.

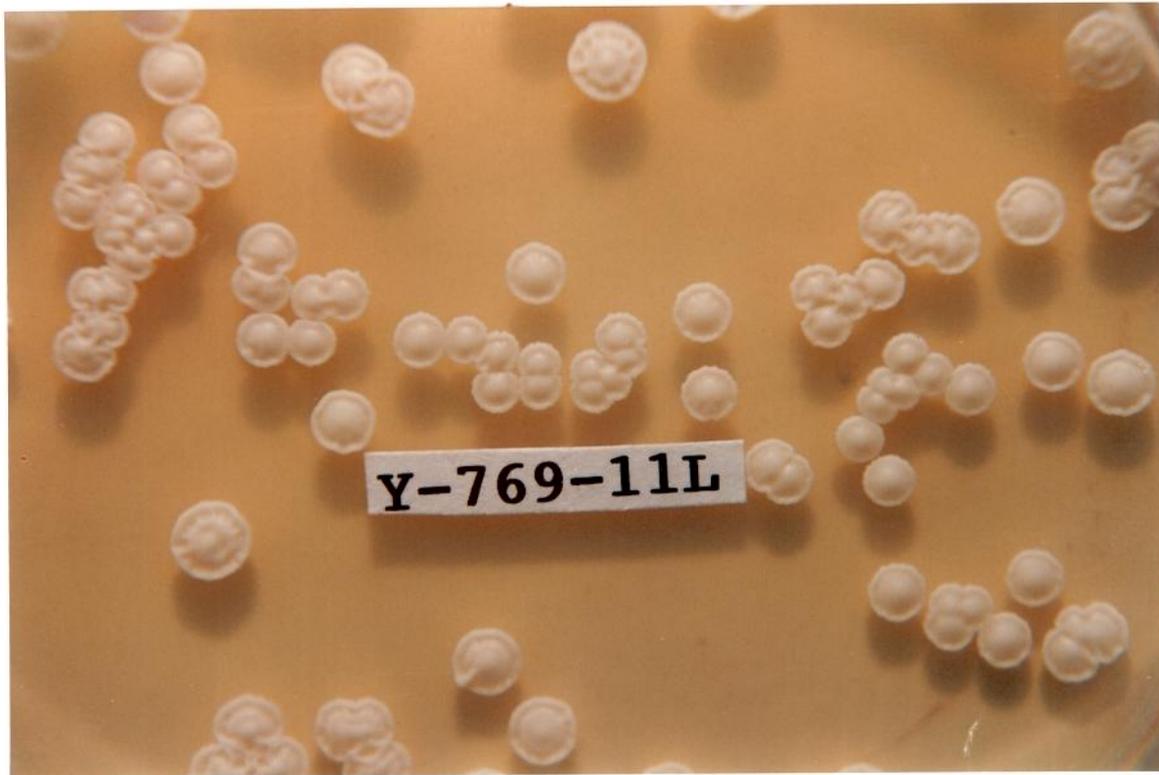


Figura 10 Morfologia da colônia da linhagem Y-769-11L em meio ágar YM a 30°C, 48 horas de incubação.

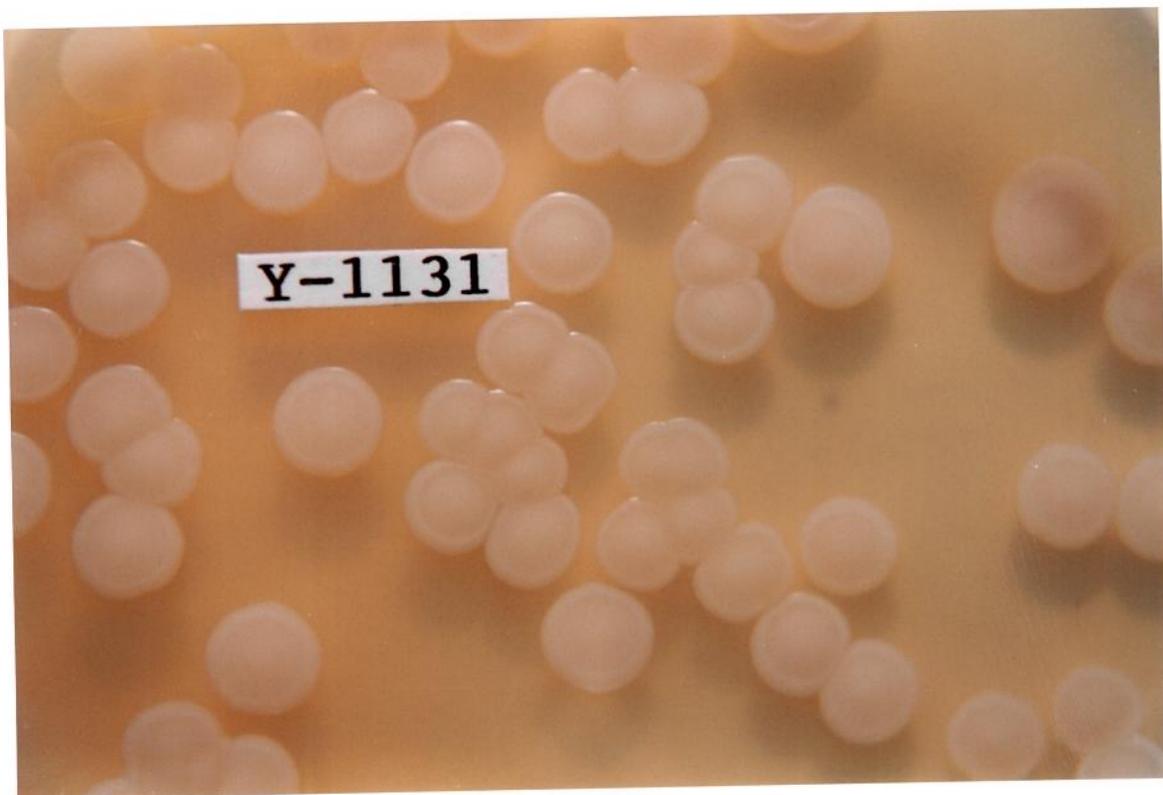
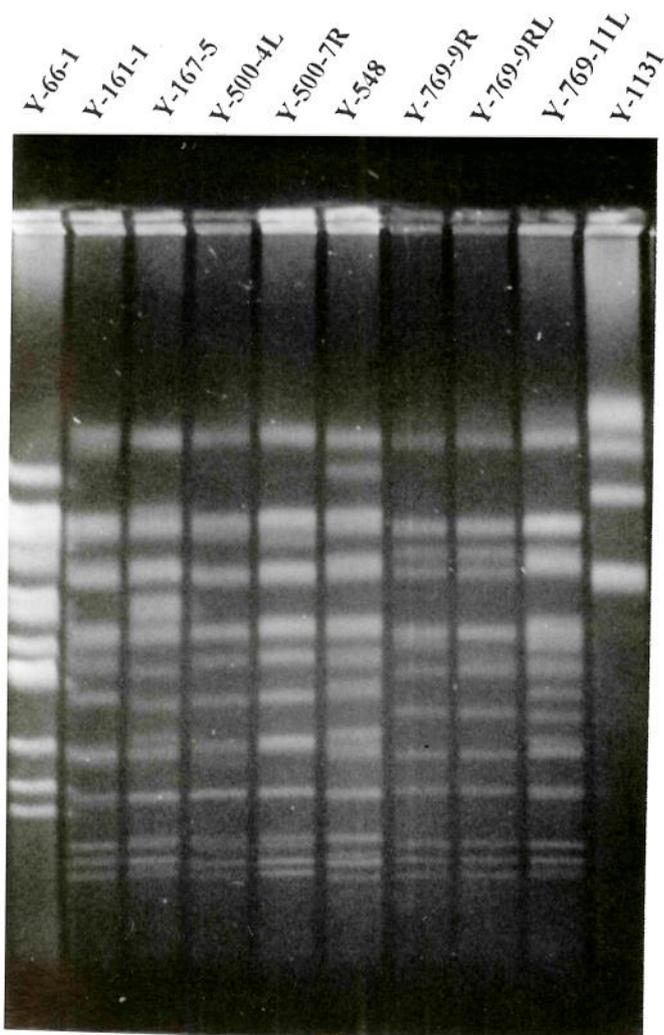


Figura 11 Morfologia da colônia da linhagem Y-1131 em meio ágar YM a 30°C, 48 horas de incubação.

A



B

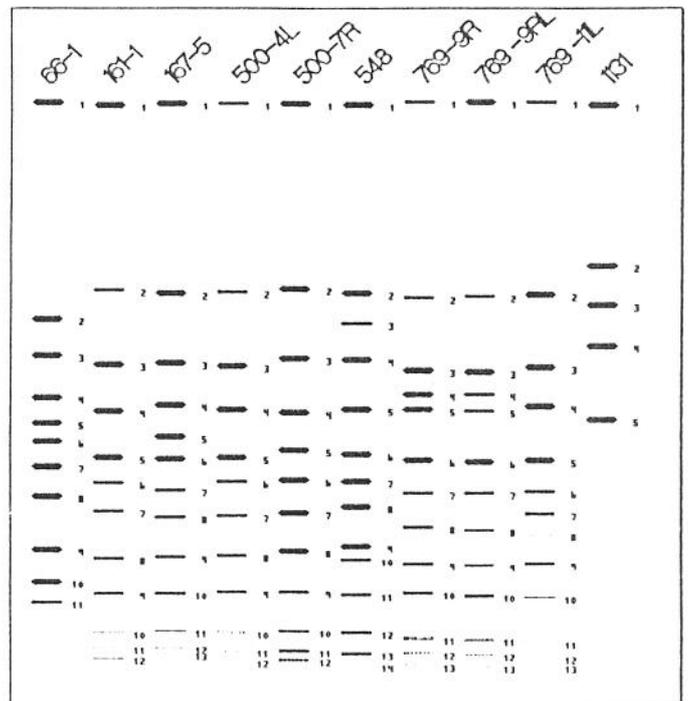


Figura 12A - Eletroforese de campo alternado de DNA Cromossomal (integral) das linhagens de leveduras "killer" selecionadas.

Figura 12B - Representação gráfica do gel de corrida da análise de DNA cromossomal (integral) das linhagens de leveduras "killer" selecionadas.

Figura 13 - Capacidade fermentativa da levedura Y-66-1 e influência da levedura "killer" na fermentação de melão de cana 24% de açúcares totais a 25oC pela levedura Fleischmann

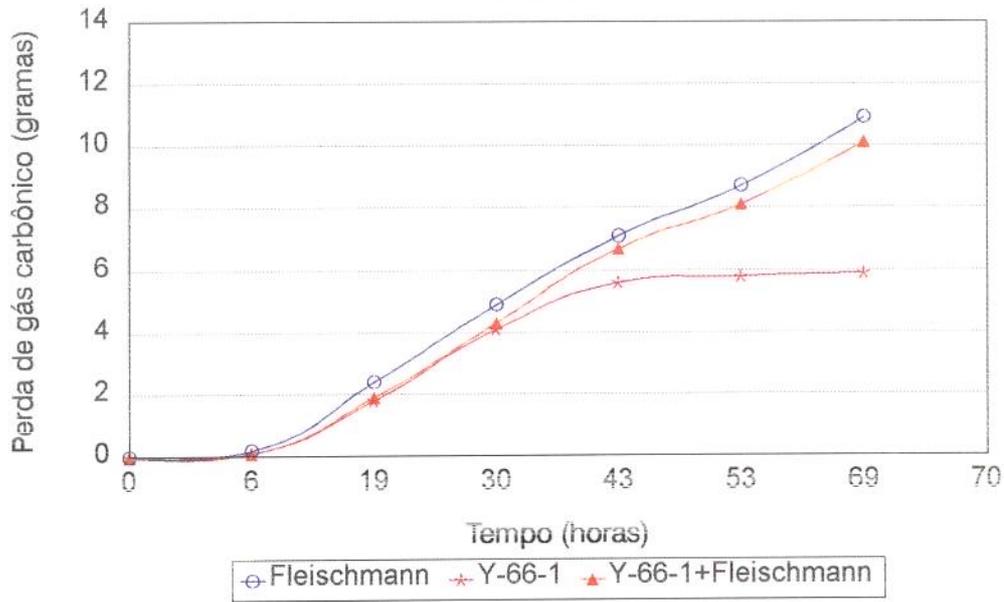


Figura 14 - Capacidade fermentativa da levedura Y-161-1 e influência da levedura "killer" na fermentação de melão de cana 24% de açúcares totais a 25oC pela levedura Fleischmann

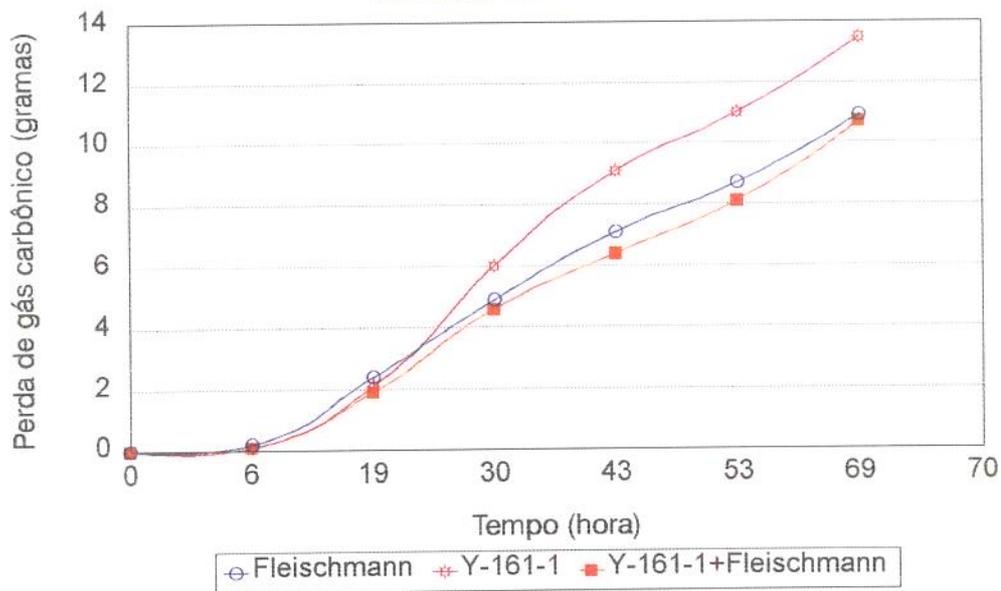


Figura 15 -Capacidade fermentativa da levedura Y-167-5 e influência da levedura "killer " na fermentação de melaço de cana 24% de açúcares totais a 25oC pela levedura Fleischmann.

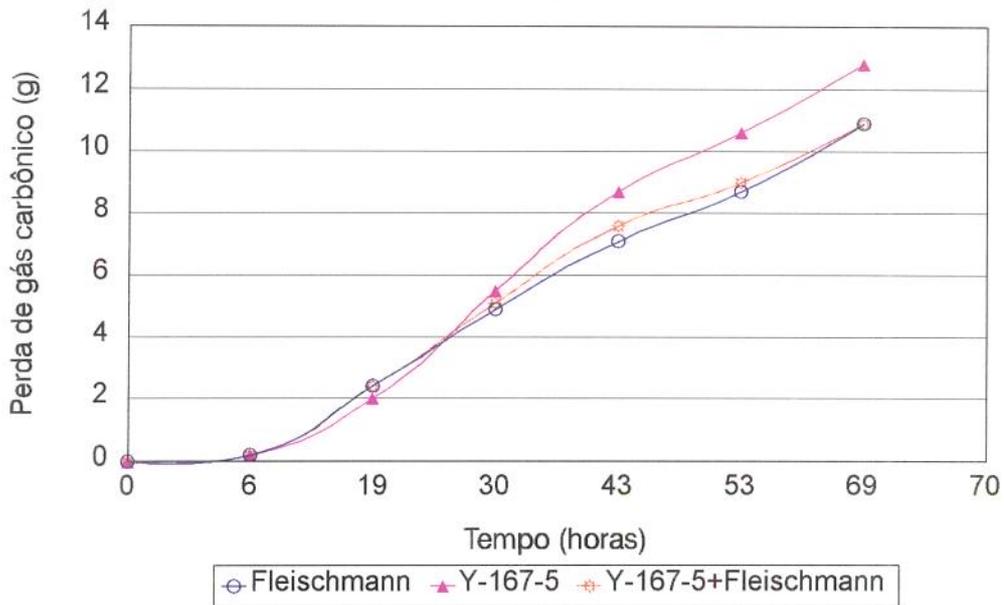


Figura 16 - Capacidade fermentativa da levedura Y-500-4L e influência da levedura "killer " na fermentação de melaço de cana 24% de açúcares totais a 25oC pela levedura Fleischmann

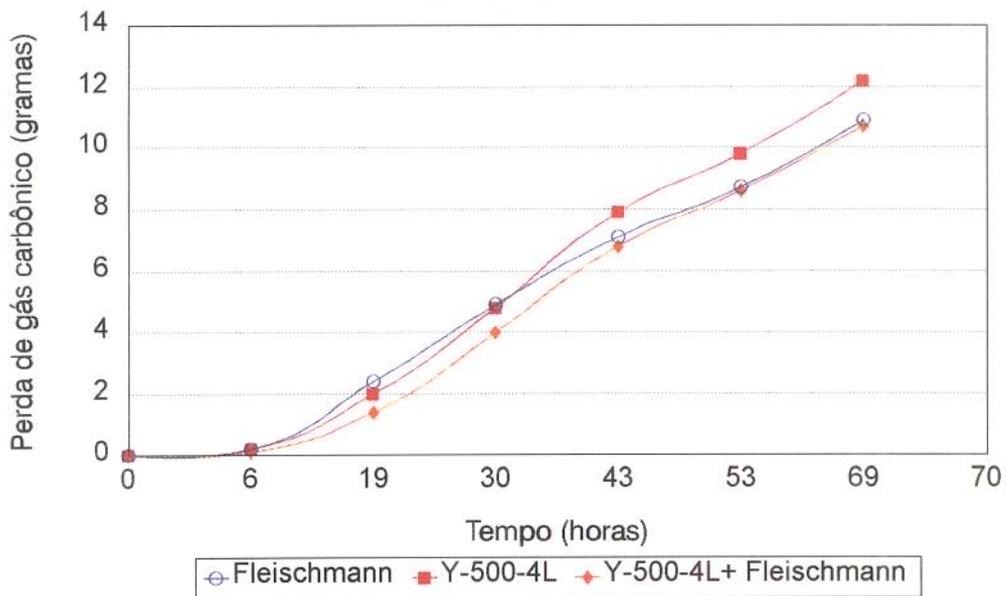


Figura 17 - Capacidade fermentativa da levedura Y-500-7R e influência da levedura "Killer" na fermentação de melaço de cana de açúcar 24% açúcares totais a 25oC pela levedura Fleischmann

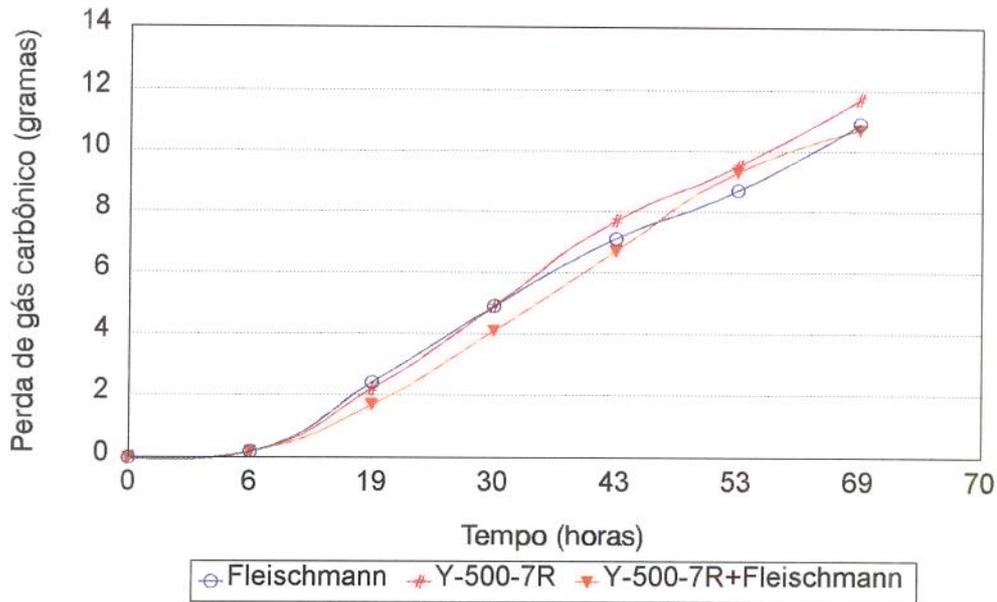


Figura 18 - Capacidade fermentativa da levedura Y-548 e influência da levedura "killer" na fermentação de melaço de cana 24% de açúcares totais a 25oC pela levedura Fleischmann

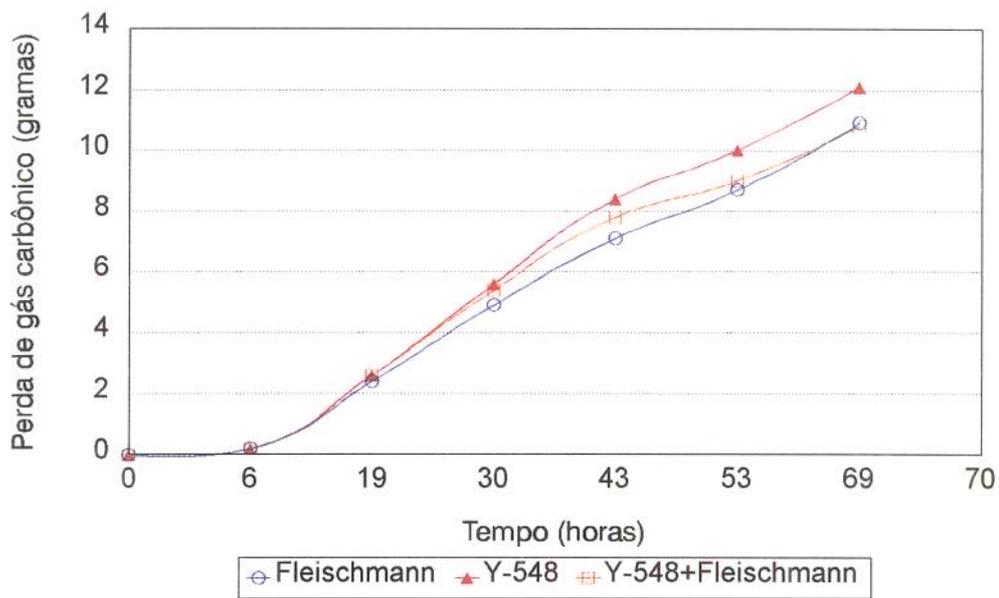


Figura 19 - Capacidade fermentativa da levedura Y769-9R e Influência da levedura "killer" na fermentação de melação de cana 24% de açúcares totais a 25oC pela levedura Fleischmann

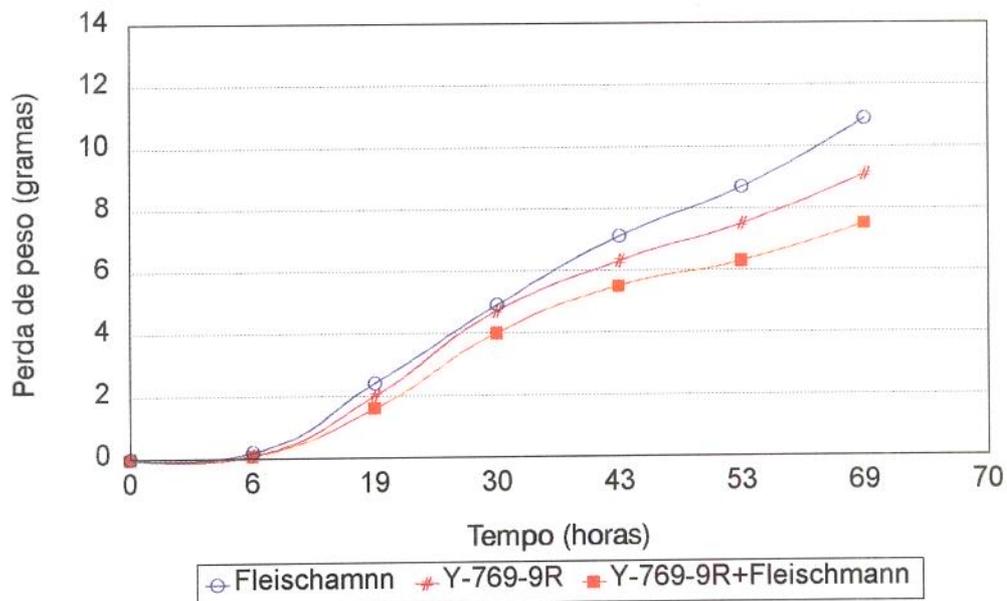


Figura 20 - Capacidade fermentativa da levedura Y-769-9RL: e influência da levedura "killer" na fermentação de melação de cana 24% de açúcares totais 25oC pela levedura Fleischmann

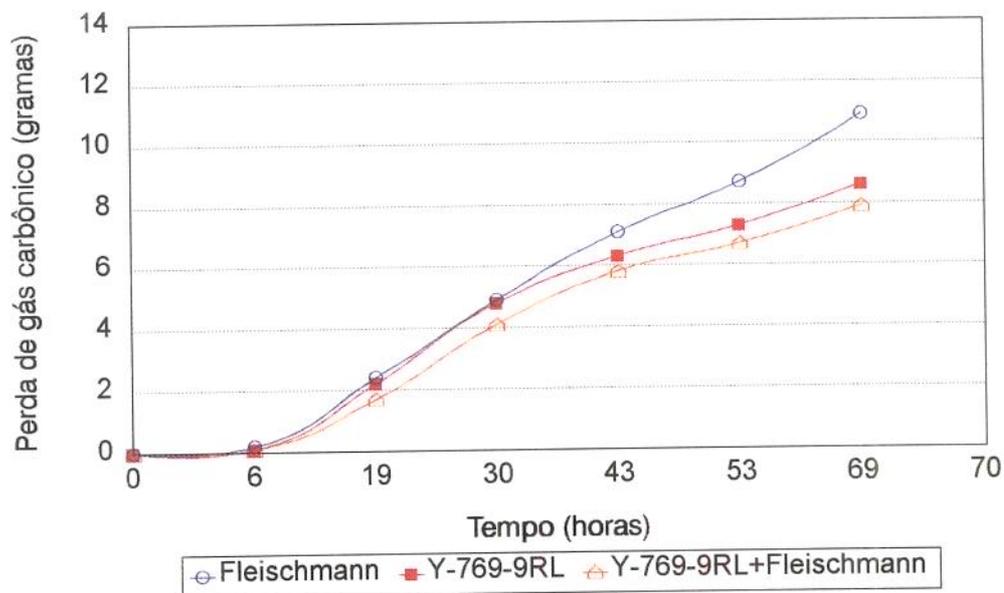


Figura 21 - Capacidade fermentativa da levedura Y-769-11L e influência da levedura "killer" na fermentação de melão de cana 24% de açúcares totais a 25oC pela levedura Fleischmann

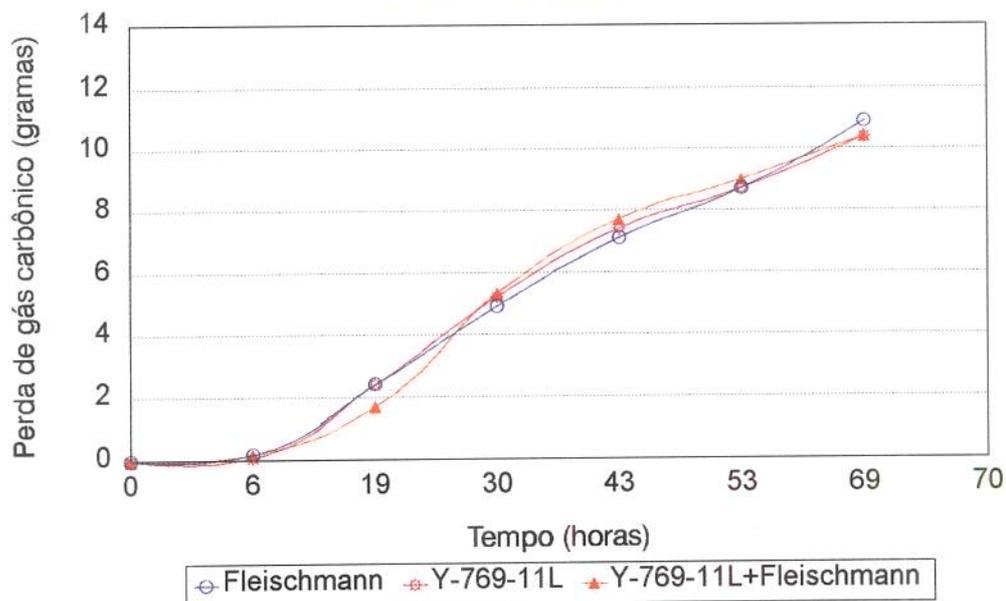


Figura 22 - Capacidade fermentativa da levedura "killer" Y-1131 e a influência da levedura "killer" na fermentação de melão de cana 24% de açúcares totais a 25oC pela levedura Fleischmann

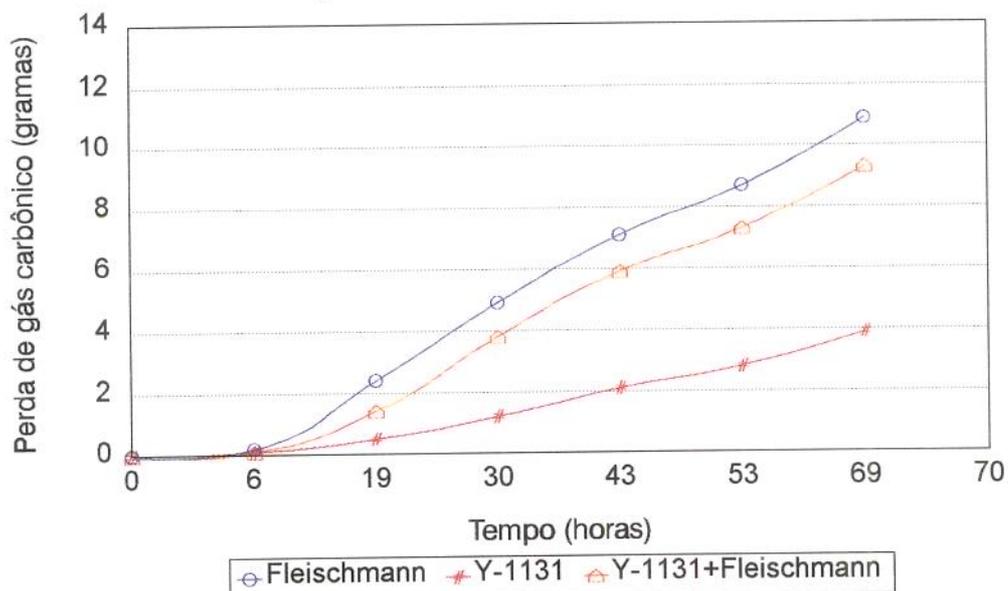


Figura 23 - Cromatogramas ilustrando o perfil de utilização dos carboidratos sacarose (a), glicose (b), e frutose (c) e produção de etanol (d) pelas linhagens Y-66-1 (A), Y-161-1 (B) e Y-167-5 (C).

63

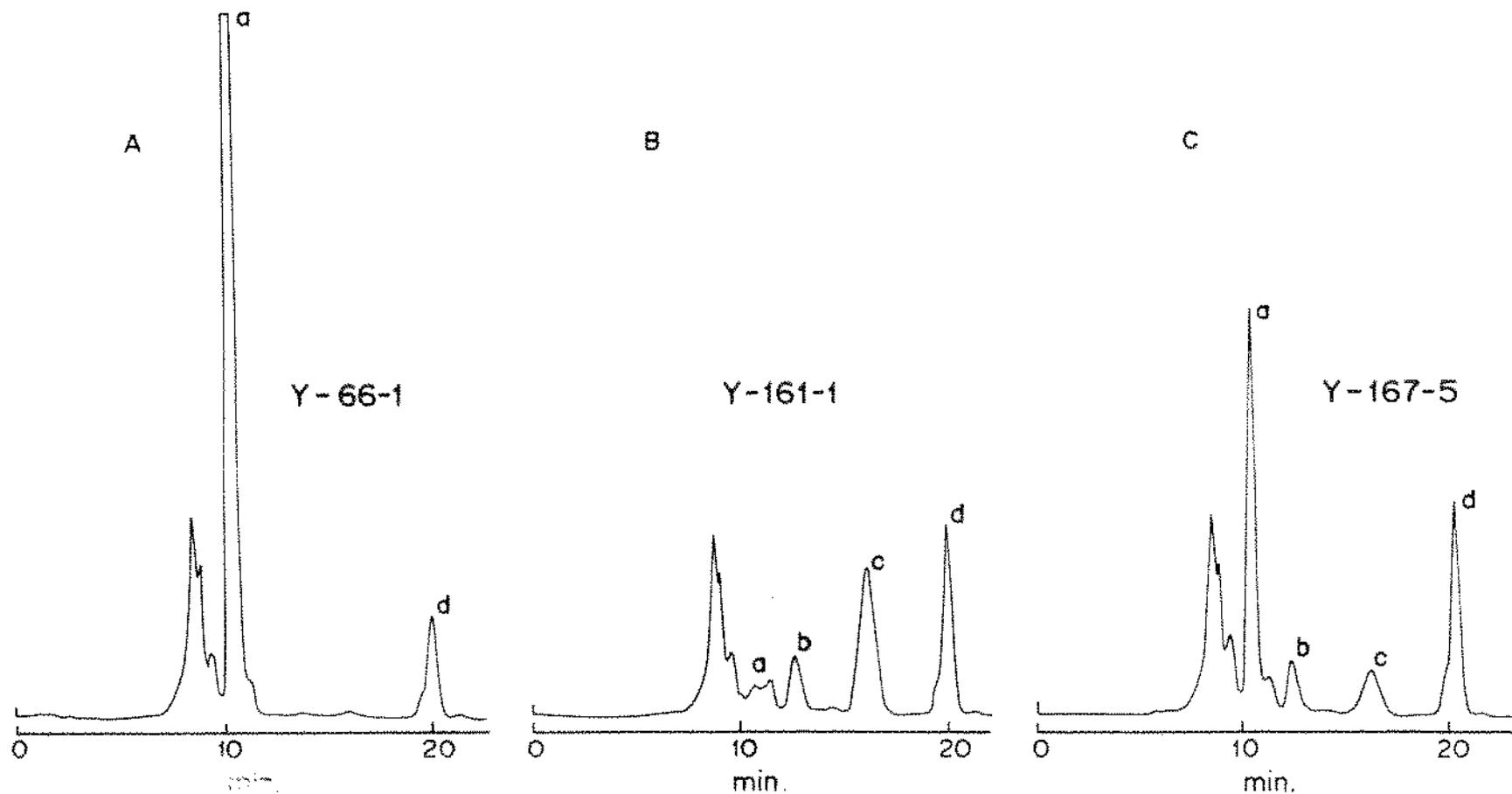


Figura 24 - Cromatogramas ilustrando o perfil de utilização dos carboidratos sacarose (a), glicose (b), e frutose (c) e produção de etanol (d) pelas linhagens Y-500-4L (A), Y-500-7R (B) e Y-548 (C).

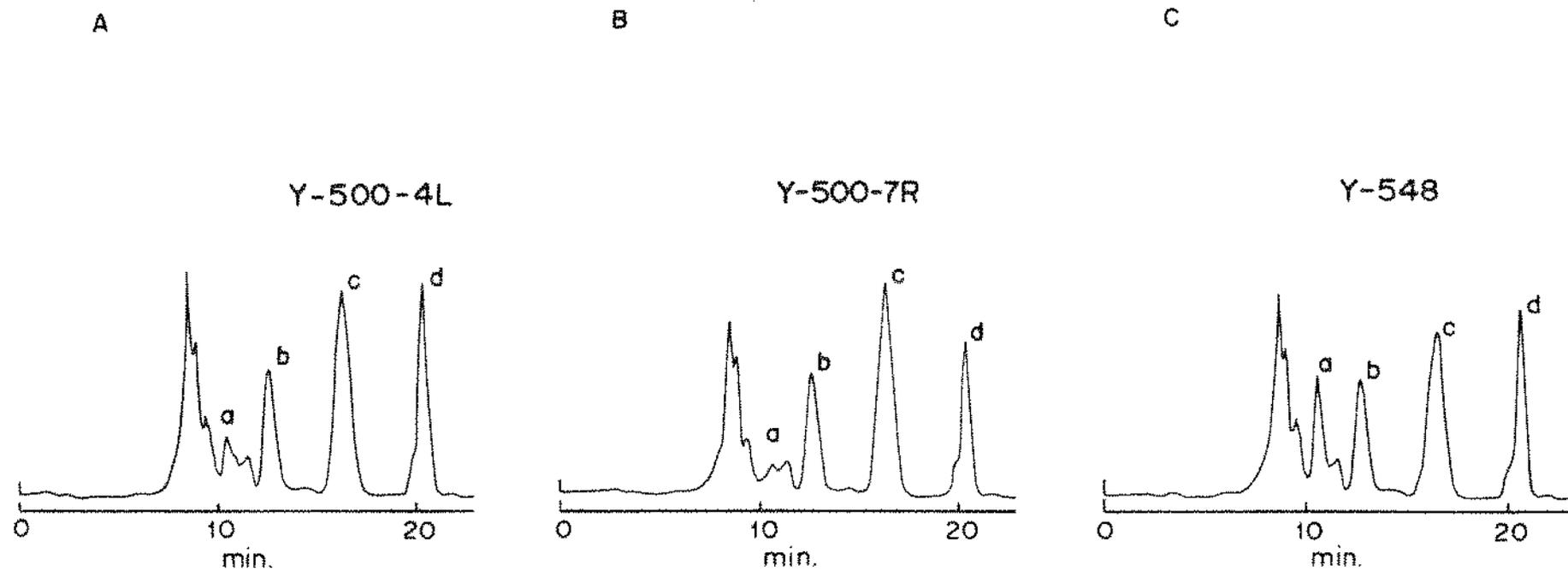


Figura 25 - Cromatogramas ilustrando o perfil de utilização dos carboidratos sacarose (a), glicose (b), e frutose (c) e produção de etanol (d) pelas linhagens Y-769-9R (A), Y-769-9RL (B) e Y-769-11L (C).

65

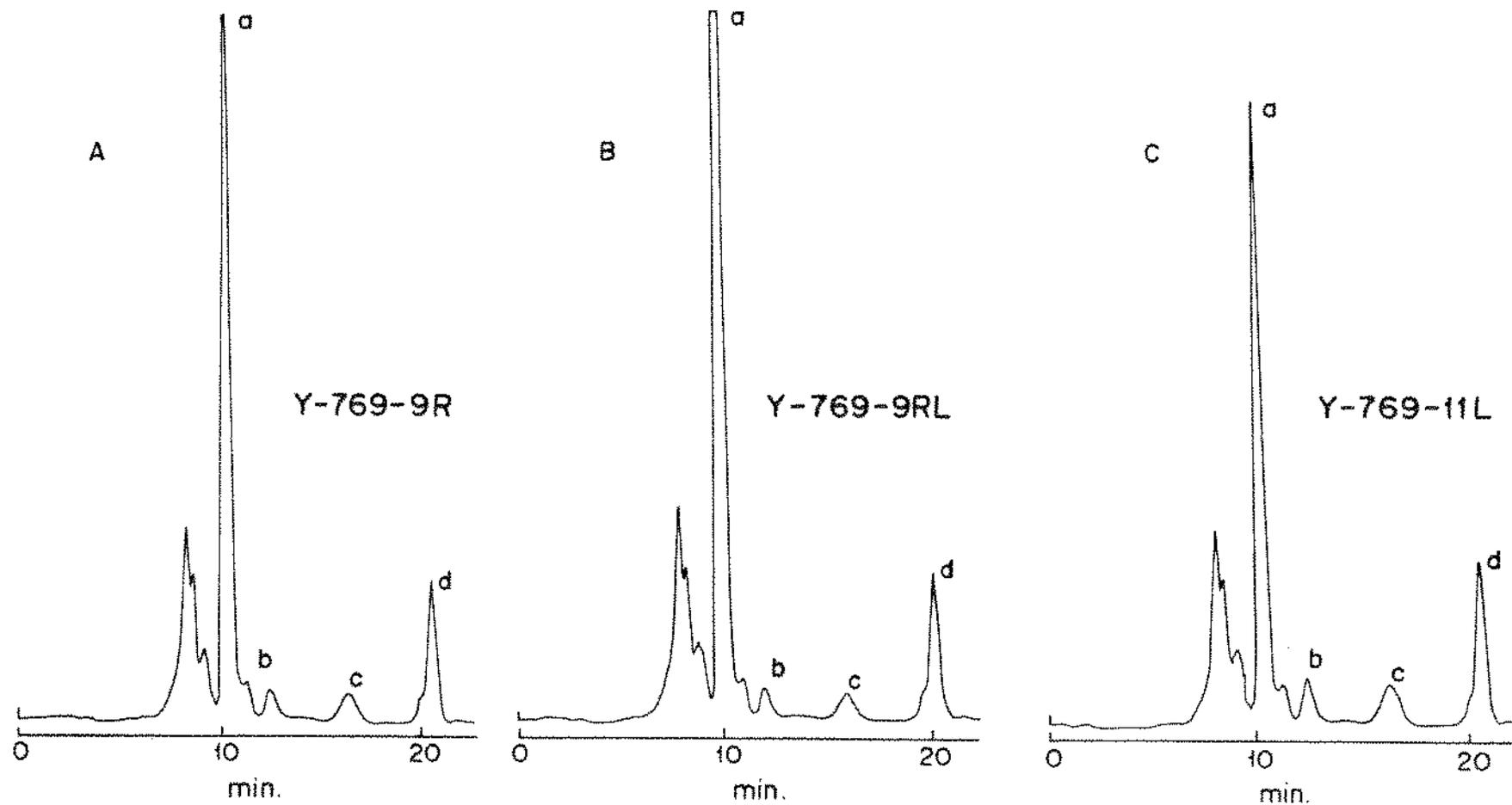
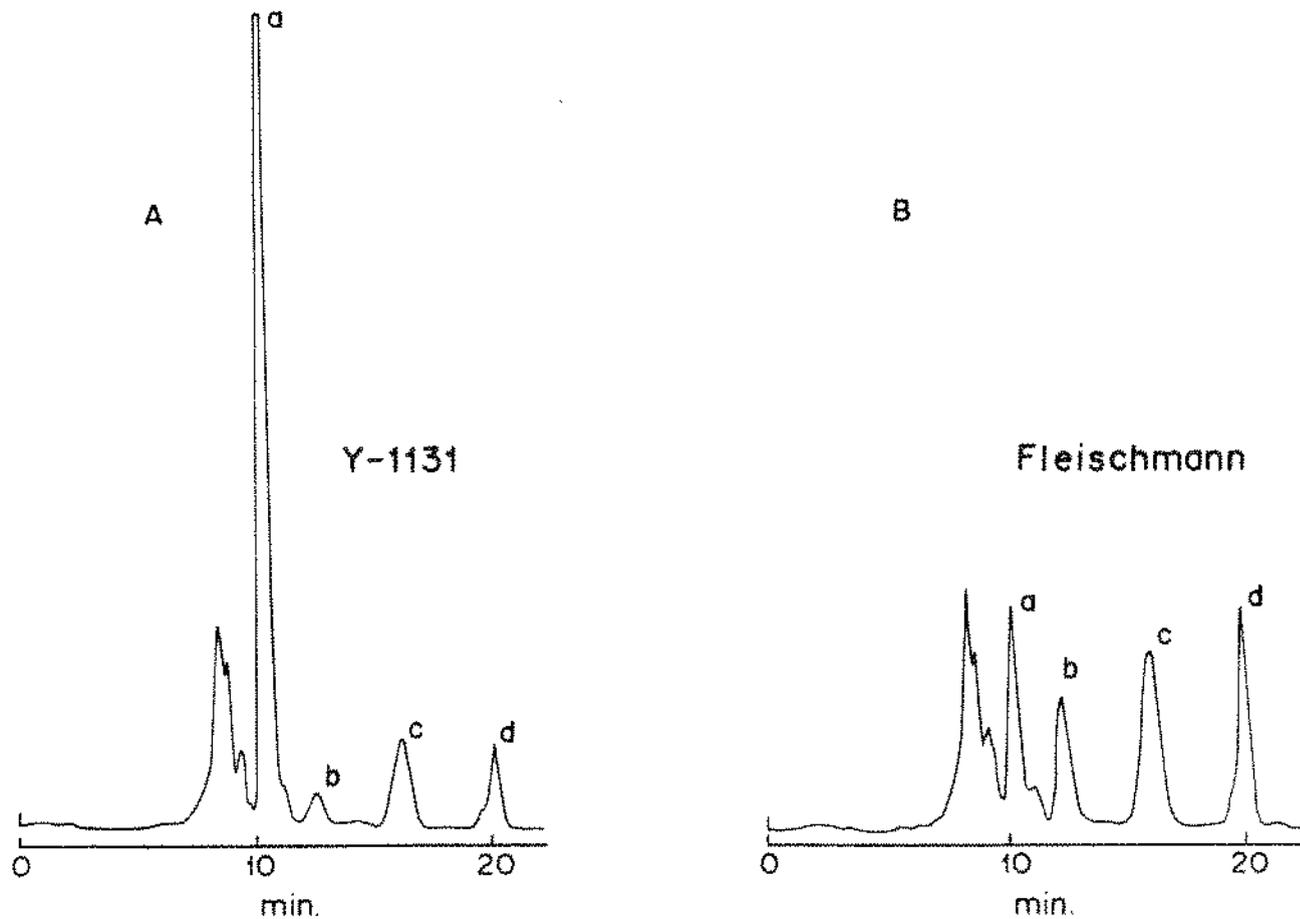
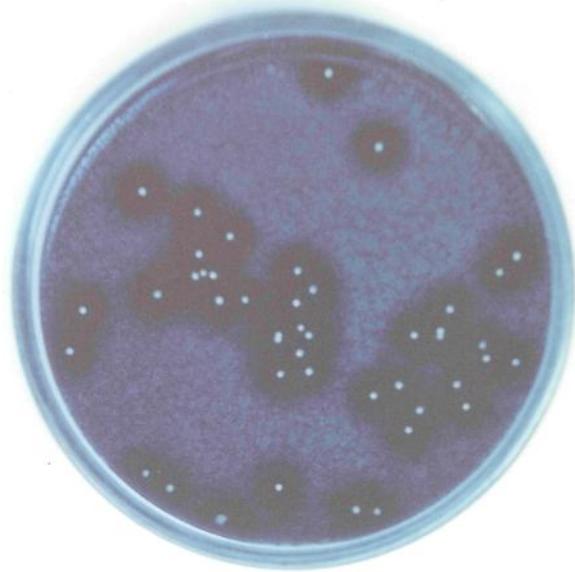


Figura 26 - Cromatogramas ilustrando o perfil de utilização dos carboidratos sacarose (a), glicose (b), e frutose (c) e produção de etanol (d) pelas linhagens Y-1131 (A) e levedura comercial Fleischmann (B).





769-9RL-Fleischmann

$10^{-4}$

Figura 27 Ilustração da predominância da levedura "killer" durante a fermentação de melaço de cana usando cultura mista de levedura "killer" e Fleischmann.

## 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AVDALOV, N., FURST, A. Gene Line™ Application Notes. GL AN 004A Spinco division of Beckman Instruments Inc, California, April, 1982.
2. BARNETT, J. A., PAYNE, R. V., YARROW, D. Yeasts characteristics and identification. Ed. Cambridge University Press, London, 1987
3. BERRY, E. A.; BEVAN, E. A. A new species of double-stranded RNA from yeast. Nature, v.239, n.29, p.279-280, sept, 1972.
4. BEVAN, E. A.; HERRING, A. J.; MITCHELL, D. J. Preliminary characterization of two species of dsRNA in yeast and their relationship to the "killer" character. Nature, v.245, n.14, p.81-86, sept, 1973.
5. BEVAN, E. A., MAKOWER, M. The physiological basis of the killer character in yeast. Proceeding of the 11th International Conference on Genetics, v.1, p.203, 1963.
6. BORZANI, W., VAIRO, M. The influence of relative dye and cell concentration on the adsorption method for the measurement of the specific areas of microorganisms. J. Ferment. Tech., v.48, p.329-333, 1970.
7. BOSTIAN, K. A.; HOPPER, J. E.; ROGERS, D. T. *et alli*. Translational analysis of the killer-associated virus-like particle dsRNA genome of *S. cerevisiae* MdsRNA encodes toxin. Cell, v.19, p. 403 -414, feb., 1980.
8. BUSSEY, H. Effects of yeast killer factor on sensitive cells. Nature New Biology .v.235, p.73-75.1972
9. BUSSEY, Howard; SHERMAN, Doreen. Yeast killer factor: ATP leakage and coordinate inhibition of macromolecular synthesis in sensitive cells. Biochim. Biophys. Acta., Amsterdam, v.298, p.868-875, 1973.

10. BUSSEY, Howard; SHERMAN, Doreen; SOMERS, J. M. Action of yeast killer factor: a resistant mutant with sensitive spheroplasts. J. Bacteriol., v.113, n.3, p.1193-1197, 1973.
11. BUSSEY, Howard. Yeast killer factor-induced turbidity changes in cell and sphaeroplasts of a sensitive strain. J. Gen. Microbiol., v.82, p.171-179, 1974.
12. BUSSEY, Howard., SKIPPER, Nigel. Membrane Mediated Killing of *Saccharomyces cerevisiae* by Glycoproteins from *Torulopsis glabrata*. J. Bacteriol., v.124, n.476-487, Oct, 1975.
13. BUSSEY, Howard; SAVILLE, Donna; HUTCHINS, Kendrick; PALFREE, Roger G. E. Binding of yeast killer toxin to a cell wall receptor on sensitive *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol., v.140, n.3, p.888-892, 1979.
14. BUSSEY, Howard; VERNET, Thierry; SDICU, Ann-Marie. Mutual antagonism among killer yeast: competition between K1 and K2 killers and a novel cDNA-based K1-K2 killer strain of *Saccharomyces cerevisiae*. Can. J. Microbiol., v.34, p.38-44, 1988.
15. BUTLER, Andrew R.; WHITE, John H.; STARK, Michael. Analysis of the response of *Saccharomyces cerevisiae* cell to *Kluyveromyces lactis* toxin. J. Gen. Microbiol., v.137, p.1749-1757, 1991(a).
16. BUTLER, Andrew R.; PORTER, Megan; STARK, Michael J. R. Intracellular expression of *Kluyveromyces lactis* toxin subunit mimics treatment with exogenous toxin and distinguishes two classes of toxin-resistant mutant. Yeast, v.7, n.6, p.617-625, 1991(b).
17. BUTLER, A. R.; O'DONNELL, R. W.; MARTIN, V. J. *et alli* *Kluyveromyces lactis* toxin has an essential chitinase activity. Eur. J. Biochem., v.199, p.483-488, 1991(c).

18. CASTILHO, Josefina Contreras Castillo. Estudos de algumas características bioquímicas de leveduras isoladas de bebidas alcoólicas andinas e brasileiras, e de amostras de flores, frutas, melão e mosto de açúcar e álcool. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, 1990.
19. DE LA PEÑA, P.; BARROS, F.; GASCÓN, S. *et alli*. Primary effects of yeast killer toxin. Biochem. Biophys. Res. Commun., v.96, n.2, p.544-550, 1980.
20. DE LA PEÑA, P.; BARROS, F.; GASCÓN, S. *et alli*. Effect of yeast killer toxin on sensitive cell of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem., v.256, n.20, p.10420-10425, 1981.
21. FINK, Gerald R.; STYLES, Cora A. Curing of a killer factor in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v.69, n.10, p.2846-2849, oct., 1972.
22. FRIED, Howard M.; FINK, Gerald R. Electron microscopic heteroduplex analysis of "killer" double-stranded RNA species from yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. v.75, n.9, p.4224-4228, Sept, 1978.
23. GOTO, K., MORIKAWA, S., SATO, H.H. *et alli*. Characteristics of the Killer Yeast nº 337 Isolated from Alcohol Fermentation Mash in Brasil. J. Brew. Soc. Japan, v.85, n.12, p.895-899, 1990 (a).
24. GOTO, K., IWASE, T., K. *et alli*. Isolation and Properties of a Chromosome-dependent KHR Killer Toxin in *Saccharomyces cerevisiae*. Agric. Biol. Chem., v.54, n.2, p.505-509, 1990 (b).
25. GUNGE, N., TAMARU, A., OZAWA, F. *et alli*. Isolation and characterization of linear deoxyribonucleic acid plasmids from *Kluyveromyces lactis* and the plasmid associated killer character. J. Bacteriol., v.145, n.1, p.382-390, jan., 1981.
26. GUNGE, Norio, SAKAGUCHI, Kenji. Intergeneric transfer of deoxyribonucleic acid killer plasmids, pGKI1 and pGKI2, from *Kluyveromyces lactis* into *Saccharomyces cerevisiae* by cell fusion. J. Bacteriol., v.147, n.1, p.155-160, july, 1981.

- 27.HARA, S.; IIMURA, Y.; OYAMA, H. *et alli*. The breeding of cryophilic killer wine yeast . Agric. Biol. Chem., v.45, n.6, p.1327-1334, 1981.
- 28.HERRING,A.J.,BEVAN,E.A. Virus-like Particles Associated with the Double-stranded RNA Species Found in Killer and Sensitive Strains of the Yeast *Sacharomyces cerevisiae*. J.gen.Virol.,v.22,p.384,1974.
- 29.HUTCHINS, Kendrick; BUSSEY, Howard. Cell wall receptor for yeast killer toxin: involvement of (1-6)- $\beta$ -D-glucan. J. Bacteriol., v.154, n.1, p.350-356, apr., 1983.
- 30.IMAMURA, Takeshi; KAWAMOTO, Masayuki; TAKAOKA, Yoshio. Characteristics of main mash infected by killer yeast in sake brewing and the nature of its killer factor. J. Ferment. Technol. v.52, n.5, p.293-299, 1974.
- 31.IMAMURA, Takeshi; KAWAMOTO, Masayuki; TAKAOKA, Yoshio. Binding of the killer factor to sake yeast cells. J. Ferment. Technol., v.7, p.417-423, 1975.
- 32.KAGAN, Bruce L. Mode of action of yeast killer toxins: channel formation in lipid bilayer membranes. Nature, v.302, n.21, p.709-711, apr., 1983.
- 33.KITANO, K.; SATO, M.; SHIMAZAKI, T. *et alli*. Occurrence of wild killer yeasts in japanese wineries and their characteristics. J. Ferment. Technol. v.62, n.1, p.1-6, 1984.
- 34.KOTANI, Hirokazu, SHINMYO, Atsukiko, ENATSU, Toshio. Killer toxin for sake yeast: properties and effects of adenosine 5'-diphosphate and calcium ion on killing action. J. Bacteriol., v.129, n.2, p.640-650, 1977.
- 35.KREGER VAN RIJ. The Yeasts, a taxonomic study. Elsevier Science Publishers B.V.,Amsterdam,1984.
- 36.LEES, R. Manual de análises de alimentos, tradução de A.M. Barrado. Editorial Acribia, Zaragoza, Espanha, 1969.

37. MAULE, A. P.; THOMAS, P. D. Strains of yeast lethal to brewery yeasts. J. Inst. Brew., v.79, p.137-141, 1973.
38. MILLES, G.L. Use of dinitrossalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem., v.31, p.426-428, 1956.
39. OLIVER, S.G., McCREADY, S.J., HOLM. *et alli*. Biochemical and Physiological Studies of the Yeast Virus-Like Particle. J. Bacteriol., v.130, n.3, p.1303-1309, June, 1977.
40. OUCHI, K.; KAWASE, N.; NAKANO, S. *et alli*. Stabilization of yeast killer factor by glycerol. Agric. Biol. Chem., v.42, n.1, p.1-5, 1978.
41. OUCHI, K.; WICKNER, R. B.; TOH-E, A. *et alli*. Breeding of killer yeasts for sake brewing by cytoduction. J. Ferment. Technol., v.57, n.6, p.483-487, 1979.
42. PALFREE, Roger G. E.; BUSSEY, Howard. Yeast killer toxin: purification and characterization of the protein toxin from *Saccharomyces cerevisiae*. Eur. J. Biochem., v.93, p.487-493, 1979.
43. PARK, Yong K., RIVERA, B. Alcohol production from various enzyme-converted starches with or without cooking. Biotechn. and Bioeng., v.24, p.495-500, 1982.
44. PFEIFFER, P.; RADLER, F. Purification and characterization of extracellular killer toxin of *Saccharomyces cerevisiae* strain 28. J. Gen. Microbiol., v.128, p.2699-2706, 1982.
45. PFEIFFER, P.; RADLER, F.; CASPRITZ, G. Effect of a killer toxin of yeast on eucariotic systems. Appl. Environ. Microbiol. v.54, n.4, p.1068-1069, apr., 1988.
46. PHILLIS, G.; YOUNG, T. W. The occurrence of killer character in yeasts of various genera. Antonie van Leeuwenhoek., v.41, p.147-151, 1975.
47. SCIMITT, M.; BRENDEL, M.; SCWARZ, R. *et alli*. Inhibition of DNA synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* by yeast killer toxin KT28. J. Gen. Microbiol., v.135, p.1529-1535, 1989.

48. SHIMIZU, K.; ADACHI, T.; KITANO, K. *et alli*. Killer properties of wine yeasts and characterization of killer wine yeasts. J. Ferment. Technol., v.63, n.5, p.421-429, 1985.
49. SKIPPER, Nigel; BUSSEY, Howard. Mode of action of yeast toxins: energy requirement for *Saccharomyces cerevisiae* killer toxin. J. Bacteriol., v.129, n.2, p.668-677, 1977.
50. SPACEK, Radim; VONDREJS, Vladimir. Rapid method for estimation of killer activity in yeasts. Biotechnol Lett., v.8, n.10, p.701-706, 1986.
51. STUMM, C.; HERMANS, J. M. H.; MIDDELBEEK, E. J. *et alli*. Killer sensitive relationship in yeasts from natural habitats. Antonie van Leeuwenhoek., v.43, p.125-128, 1977.
52. TAKITA, Marco A.; VALAVICIUS, Beatriz C. Absence of cell wall chitin in *Saccharomyces cerevisiae* leads to resistance to *Kluyveromyces lactis* killer toxin. Yeast, v.9, p.589-598, 1993.
53. TOKUNAGA, Massao; KAWAMURA, Akiko; HISHINURA, Fumio. Expression of pGKL killer 28K subunit in *Saccharomyces cerevisiae*: identification of 28K subunit as a killer protein. Nucl. Acids. Res., v.17, n.9, p.3435-3446, 1989.
54. VAGNOLI, P.; MUSMANNO, R. A.; CRESTI, S. *et alli*. Occurrence of killer yeasts in spontaneous wine fermentations from the Tuscany region of Italy. Appl. Environ. Microbiol., v.59, n., p.4037-4043, 1993.
55. VODKIN, Michael; KATTERMAN, Frank; FINK, Gerald R. Yeast killer mutants with altered double-stranded ribonucleic acid. J. Bacteriol., v.117, n.2, p.681-686, feb., 1974.
56. YOUNG, T. W.; YAGIU, M. A comparison of the killer character in different yeasts and its classification. Antonie van Leeuwenhoek., v.44, p.59-77, 1978.
57. YONG, T.W. Killer Yeasts. In: The Yeasts, A.H. Rose, and J.J. Harrison (Ed), v.2, p.1-164, Academic Press, London, 1987.

58. YOUNG, T. W. The genetic manipulation of killer character into brewing yeast. J. Inst. Brew., v.87, p.292-295, sept.-oct., 1981.
59. WICKNER, Reed B. Killer Character of *Saccharomyces cerevisiae*: curing by Growth at Elevated Temperature. J. Bacteriol., v.117, n.3, p.1356-1357, 1974 (a).
60. WICKNER, Reed B. Chromosomal and nonchromosomal mutations affecting the "killer character" of *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics. v.76, p.423-432, mar., 1974(b).
61. WOODS, D.R., BEVAN E.A. Studies on Nature of the Killer Factor Produced by *Saccharomyces cerevisiae*. J. Gen. Microbiol., v.115-126, 1968.
62. WOODS, D.R., ROSS, I.W., HENDRY, D.A. A New Killer Factor Produced by a Killer Yeast Strain. J. Gen. Microbiol. v.81, p.285-289, 1974.
63. ZHU, Hong; BUSSEY, Howard. The K1 toxin of *Saccharomyces cerevisiae* kills spheroplast of many yeast species. Appl. Environ. Microbiol., v.55, n.8, p.2105-2107, aug., 1989.