

**CARACTERIZAÇÃO DA TOXINA “KILLER” PRODUZIDA PELA  
LINHAGEM DE *Saccharomyces cerevisiae* Y500-4L**

**GISELLE ALESSANDRA MARTINS SOARES**  
Engenheira de Alimentos

PARECER

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. **HÉLIA HARUMI SATO**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por GISELLE ALESSANDRA MARTINS SOARES aprovada pela Comissão Julgadora em 13 de fevereiro de 1998.

Campinas, 13 de fevereiro de 1998.



Profa. Dra. **HÉLIA H. SATO**  
Presidente da Banca

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos, da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

**CAMPINAS**  
Estado de São Paulo - Brasil  
Fevereiro - 1998

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	
IMPRESSÃO	
VOLUME	
1.º VOLUME	33458
PÁGINAS	395/98
CODIGO	
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	14/04/98
N.º CPD	

CM-00109039-7

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

Solic

Soares, Giselle Alessandra Martins

Caracterização da toxina "Killer" produzida pela linhagem de *Sacharomyces cerevisiae* Y500-4L / Giselle Alessandra Martins Soares. – Campinas, SP: [s.n.], 1998.

Orientador: Hélia Harumi Sato

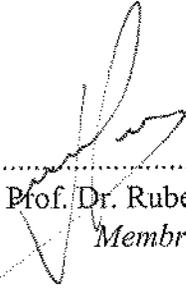
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Toxina. 2.Fermentação. 3.Álcool. 4.Saccharomyces cerevisiae. 5.Levedura. 6.Toxinas "Killer". I.Sato, Hélia Harumi. II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

**BANCA EXAMINADORA**

*Hélia Harumi Sato*

Prof. Dra. Hélia Harumi Sato  
*Orientadora*



Prof. Dr. Rubens Cruz  
*Membro*

*Lúcia Regina Durrant*

Prof. Dra. Lúcia Regina Durrant  
*Membro*

Prof. Dr. Yong Kun Park  
*Membro*

Campinas, de fevereiro de 1998.

Aos meus pais Hélio e Nair Soares, ao meu  
irmão Alysson e ao meu marido Carlos,  
pelo amor, carinho e apoio em todos os  
momentos,  
dedico.

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra. Hélia Harumi Sato, pela realização da tese, pela dedicação e apoio recebidos durante todo o trabalho e por sua valiosa amizade.

Ao Prof. Dr. Daison O. Silva, pelo exemplo de dedicação a pesquisa, por meus primeiros passos e pelos ensinamentos transmitidos, os quais foram e são importantes na minha vida.

Aos membros da Banca, Prof. Dr. Rubens Cruz, Prof.<sup>a</sup> Dra. Lúcia Durrant e Prof. Dr. Yong K. Park, por permitirem a realização de mais uma etapa na minha vida.

À Profa. da Bioquímica de Alimentos Dra. Gláucia M. Pastore.

À Profa. Dra. Hilary C. Menezes do departamento de Tecnologia de Alimentos, pelo auxílio na redação do resumo em inglês.

Ao Prof. Dr. Nelson E. Durán Caballero, do Laboratório de Química Biológica do Instituto de Química, pela solicitude no empréstimo de equipamento.

Ao meu marido, pela possibilidade de desenvolver parte desta tese, pelos conselhos, apoio e incentivo em todos os momentos.

Ao Marcolino, pelo incentivo inicial para o desenvolvimento deste trabalho.

À Eliza e a Carlos, pelo auxílio na dosagem de proteínas e pela amizade.

À técnica Liana do Laboratório Central de Bioquímica Nutricional do Departamento de Nutrição, pelo valioso auxílio na eletroforese de SDS-PAGE.

Às amigas, Fabiana, Danielle, Cristina, Lilian, Roseli, Cristine, pelas constantes conversas, incentivo e momentos agradáveis.

À Laura e Patrícia, pela amizade e companheirismo desde os tempos de Viçosa.

Aos colegas Egito, Tereza, Sandra, Evelise, Rose, Paulo, Contado, Masaharu, Vinícius, Heinz, Mercedes, Wellington, Rainério, e muitos outros que não mencionei, agradeço pela amizade e apoio.

Aos funcionários do Laboratório de Bioquímica de Alimentos, Paulo, Dora, Bia e Leonor, pelos momentos de convívio e amizade.

Ao CNPq, pela concessão de Bolsa de estudos e a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>4</b>
2.1 O EFEITO “KILLER” EM LEVEDURAS.....	4
2.2. CARÁTER GENÉTICO RESPONSÁVEL PELO FENÓTIPO “KILLER”.....	11
2.3. CURA DO FENÓTIPO “KILLER”.....	14
2.4. MODO DE AÇÃO DA TOXINA “KILLER”.....	16
2.5. PURIFICAÇÃO DA TOXINA “KILLER”.....	20
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>26</b>
3.1. LINHAGENS.....	26
3.2. MEIOS DE CULTURA.....	26
3.2.1. <i>Extrato de levedura e malte (YM)</i> .....	26
3.2.2. <i>YEPD-MB</i> .....	26
3.3. TESTE PRELIMINAR.....	27
3.3.1. <i>Inoculação das linhagens</i> .....	27
3.3.2. <i>Linhagens aspergidas</i> .....	27
3.4. PERFIL DE ATIVIDADE “KILLER”.....	28
3.4.1. <i>Inoculação das linhagens</i> .....	28
3.4.2. <i>Linhagens aspergidas</i> .....	28
3.5. EXTRAÇÃO E DETECÇÃO DE PLASMÍDIO DE RNA FITA DUPLA (DSRNA) DAS LEVEDURAS “KILLER”.....	29
3.5.1. <i>Extração do dsRNA</i> .....	29
3.5.2. <i>Preparo do gel de agarose</i> .....	30
3.5.3. <i>Soluções estoques usadas:</i> .....	30
3.5.3.1. <i>Tampão TAE (solução 50X)</i> .....	30
3.5.3.2. <i>Tampão TE</i> .....	31
3.5.3.3. <i>Solução para preparação da amostra (solução 6X)</i> .....	31
3.5.3.4. <i>Solução de Brometo de etídio a 1%</i> .....	31

3.6. CAPACIDADE DE PERDA DO FENÓTIPO “KILLER” .....	31
3.6.1. Tratamento com cicloheximida ou tratamento térmico .....	31
3.6.2. Regeneração do fenótipo “killer” .....	32
3.7. PRODUÇÃO DA TOXINA “KILLER” BRUTA .....	32
3.7.1. Concentração .....	32
3.8. CONDIÇÕES ÓTIMAS DE ATIVIDADE DA TOXINA BRUTA .....	33
3.9. EFEITO DO PH NA ESTABILIDADE DA TOXINA BRUTA .....	33
3.10. TERMOESTABILIDADE DA TOXINA BRUTA .....	34
3.11. EFEITO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO DA LINHAGEM DE <u>S. CEREVISIAE</u> Y500-4L NA PRODUÇÃO ÓTIMA DE TOXINA “KILLER” .....	34
3.12. ESTUDO DO MÉTODO DE OBTENÇÃO DA TOXINA “KILLER” DO SOBRENADANTE DO MEIO DE CULTURA .....	35
3.12.1. Precipitação da toxina “killer” com polipropileno glicol.....	35
3.12.2. Precipitação da toxina “killer” com etanol ou acetona.....	35
3.12.3. Precipitação da toxina “killer” com sulfato de amônio.....	36
3.12.4. Concentração da toxina “killer” através de ultrafiltração.....	36
3.13. PURIFICAÇÃO DA TOXINA “KILLER” DE <u>S. CEREVISIAE</u> Y500-4L.....	37
3.13.1. Produção da toxina “killer” extracelular.....	37
3.13.2. Concentração da toxina “killer” .....	37
3.13.3. Purificação da toxina “killer” .....	37
3.14. DETERMINAÇÃO DO PESO MOLECULAR DA TOXINA “KILLER” .....	38
3.14.1. Filtração em gel Sephadex G-100.....	38
3.14.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	39
3.15. CARACTERIZAÇÃO DA TOXINA “KILLER” PURIFICADA .....	39
3.15.1. Efeito do pH na estabilidade da toxina.....	39
3.15.2. Efeito da temperatura na estabilidade da toxina.....	40
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>41</b>
4.1. TESTE PRELIMINAR DE ATIVIDADE “KILLER” .....	41
4.2. PERFIL DE ATIVIDADE “KILLER” .....	41
4.3. EXTRAÇÃO E DETECÇÃO DE PLASMÍDIO DE RNA FITA DUPLA (DSRNA) NAS LEVEDURAS “KILLER” .....	43

4.4. CURA DO FENÓTIPO “KILLER” .....	44
4.4.1. <i>Tratamento com cicloheximida ou tratamento térmico</i> .....	44
4.4.2. <i>Regeneração do fenótipo</i> .....	46
4.5. CONDIÇÕES ÓTIMAS DE ATIVIDADE DA TOXINA “KILLER” BRUTA .....	47
4.6. EFEITO DO pH NA ESTABILIDADE DA TOXINA BRUTA .....	48
4.7. TERMOESTABILIDADE DA TOXINA BRUTA .....	49
4.8. EFEITO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO DA LINHAGEM <u>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</u> Y500-4L NA PRODUÇÃO ÓTIMA DE TOXINA “KILLER” .....	50
4.9. ESTUDO DO MÉTODO DE OBTENÇÃO DA TOXINA “KILLER” DO SOBRENADANTE DO MEIO DE CULTURA .....	51
4.10. PURIFICAÇÃO DA TOXINA “KILLER” DE <u>S. CEREVISIAE</u> Y500-4L.....	52
4.11. DETERMINAÇÃO DO PESO MOLECULAR DA TOXINA .....	53
4.12. CARACTERIZAÇÃO DA TOXINA “KILLER” PURIFICADA .....	55
4.12.1. <i>Efeito do pH na estabilidade da toxina</i> .....	55
4.12.2. <i>Efeito da temperatura na estabilidade da toxina purificada</i> .....	55
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>57</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>85</b>

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 -	Código e espécies correspondentes das linhagens de leveduras padrões “killer”.....	61
Tabela 2 -	Teste de atividade “killer” utilizando-se diferentes linhagens sensíveis.....	62
Tabela 3 -	Interação entre as leveduras.....	63
Tabela 4 -	Determinação do peso molecular das bandas de RNA de fita dupla.....	64
Tabela 5 -	Cura das linhagens “killer”.....	65
Tabela 6 -	Purificação da toxina “killer” da linhagem de <i>S. cerevisiae</i> Y500-4L .....	66

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 -	Atividade “killer”.....	68
Figura 2 -	Eletroforese em gel de agarose dos ácidos nucleicos extraídos das leveduras	69
Figura 3 -	Testes de cura das linhagens de <i>S. cerevisiae</i> K1 e Y500-4L.....	70
Figura 4 -	Testes de cura da linhagem de <i>S. cerevisiae</i> Y500-4L.....	71
Figura 5 -	Testes de cura da linhagem de <i>Hansenula sp</i> Y66-1.....	72
Figura 6 -	Teste de regeneração do fenótipo “killer” da levedura Y500-4L.....	73
Figura 7 -	Efeito do pH e da temperatura na atividade da toxina “killer” de <i>S. cerevisiae</i> Y500-4L.....	74
Figura 8 -	Atividade das toxinas “killer” K1 e Y500-4L nas temperaturas de 16, 22, 25 e 30°C.....	75
Figura 9 -	Efeito do pH na estabilidade da toxina “killer” bruta de <i>S. cerevisiae</i> Y500-4L.....	77
Figura 10 -	Efeito da temperatura na estabilidade da toxina “killer” bruta de <i>S. cerevisiae</i> Y500-4L.....	77
Figura 11 -	Curva de crescimento da linhagem de <i>S. cerevisiae</i> Y500-4L.....	78
Figura 12 -	Atividade “killer” das preparações de toxina de <i>S. cerevisiae</i> Y500-4L, obtidas por precipitação com acetona, polipropileno glicol e etanol.....	79
Figura 13 -	Atividade “killer” das preparações de toxina de <i>S. cerevisiae</i> Y500-4L, obtidas por ultrafiltração e precipitação com sulfato de amônia.....	80
Figura 14 -	Purificação da toxina “killer” da linhagem de <i>S. cerevisiae</i> Y500-4L, em coluna de gel Sepharose 6B.....	81
Figura 15 -	Eluição das proteínas padrões e da toxina “killer” da linhagem de <i>S. cerevisiae</i> Y500-4L e curva padrão em coluna de Sephadex G100.....	82
Figura 16 -	Representação gráfica da eletroforese da toxina “killer” da linhagem de <i>S. cerevisiae</i> Y500-4L em SDS-PAGE.....	83
Figura 17 -	Efeito do pH na estabilidade da toxina “killer” purificada de <i>S. cerevisiae</i> Y500-4L.....	84
Figura 18 -	Efeito da temperatura na estabilidade da toxina “killer” purificada de <i>S. cerevisiae</i> Y500-4L.....	84

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi caracterizar e purificar a toxina “killer” produzida pela linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* Y500-4L, previamente selecionada de mosto de fermentação de usina de álcool e com alta capacidade fermentativa. A capacidade de leveduras produzirem toxina “killer”, pode conferir uma vantagem seletiva sobre linhagens sensíveis crescendo em competição. Torna-se portanto, necessário a caracterização da toxina para o estudo da aplicação das linhagens com atividade “killer” em processos fermentativos.

A linhagem “killer” de *S. cerevisiae* Y500-4L, mostrou alta atividade “killer” contra as leveduras Fleischmann e Itaiquara, e também contra as linhagens “killer” padrões K2 (*S. diastaticus* NCYC 713), K4 (*Candida glabrata* NCYC 388) e K11 (*Torulopsis glabrata* ATCC 15126). E mostrou ser sensível as toxinas produzidas pelas leveduras padrões “killer” K8 (*Hansenula anomala* NCYC 435), K9 (*Hansenula mrakii* NCYC 500), K10 (*Kluyveromyces drosophilarum* NCYC 575) e K11 (*Torulopsis glabrata* ATCC 15126). A linhagem de *S. cerevisiae* Y500-4L, mostrou-se neutra às linhagens K1 (*S. cerevisiae* KL88), K2 (*S. diastaticus* NCYC 713), K3 (*S. capensis* NCYC 761), K4 (*Candida glabrata* NCYC 388), K5 (*Debaryomyces vanriji* NCYC 577), K6 (*Kluyveromyces marxianus* NCYC 587), K7 (*Pichia membranaefaciens* NCYC 333) e *Hansenula* sp Y66-1.

A linhagem de *S. cerevisiae* Y500-4L, não apresentou plasmídeo M-dsRNA e provavelmente o caráter genético responsável pelo fenótipo “killer” é codificado

por genes cromossomais. Em ensaios para a perda do fenótipo, a linhagem *S. cerevisiae* Y500-4L apresentou maior resistência ao tratamento com cicloheximida e temperatura elevada (40°C) do que a levedura *S. cerevisiae* padrão “killer” K1.

A produção máxima da toxina “killer” foi obtida em meio YEPD após 24 horas a 25 °C em meio estático, coincidindo com o final da fase exponencial de crescimento.

A toxina bruta de *S. cerevisiae* Y500-4L, apresentou maior atividade “killer” na faixa de pH 4,1-4,5 e temperatura de 22-25 °C; e maior estabilidade na faixa de pH 3,8-4,5 a -10 °C. A toxina “killer” foi totalmente inativada após 1 hora de incubação a 40 °C em pH 4,1 , em meio líquido.

O peso molecular da toxina purificada foi estimado em 18 a 20 kDa, através de SDS-PAGE.

## SUMMARY

The objective of this research was to characterize and purify the killer toxin produced by *Saccharomyces cerevisiae* Y500-4L, a yeast selected for its high fermentative and killer capacities. The capacity to produce killer toxin can confer a selective advantage over more sensitive strains competing to grow in the same environment. It is therefore important to characterize the toxin in order to apply killer strains in fermentative process.

The killer yeast *S. cerevisiae* Y500-4L showed considerable killer activity against the Fleischmann and Itaiquara commercial brands of yeasts and also against the standard killer yeast K2 (*S. diastaticus* NCYC 713), K4 (*Candida glabrata* NCYC 388) and K11 (*Torulopsis glabrata* ATCC 15126).

However *S. cerevisiae* Y500-4L showed sensitivity to the killer toxin produced by the standard killer yeasts K8 (*Hansenula anomala* NCYC 435), K9 (*Hansenula mrakii* NCYC 500), K10 (*Kluyveromyces drosophilarum* NCYC 575) and K11 (*Torulopsis glabrata* ATCC 15126).

The strain *S. cerevisiae* Y500-4L was resistant to the killer toxins produced by the yeast strains K1 (*S. cerevisiae* KL88), K2 (*S. diastaticus* NCYC 713), K3 (*S. capensis* NCYC 761), K4 (*Candida glabrata* NCYC 388), K5 (*Debaryomyces vanrii* NCYC 577), K6 (*Kluyveromyces marxianus* NCYC 587), K7 (*Pichia membranaefaciens* NCYC 333) and *Hansenula* sp Y66-1.

No M-dsRNA plasmid was detected in the *S. cerevisiae* Y500-4L strain, and these results suggest that the genetic basis of toxin production is encoded by

chromosomal DNA. The strain *S. cerevisiae* Y500-4L was more resistant to cycloheximide and incubation at elevated temperatures (40°C) than the killer yeast *S. cerevisiae* K1.

The maximum production of killer toxin in YEPD medium was obtained after 24 hours of incubation at 25 °C, which coincided with the end of the exponential growth phase.

The killer toxin of *S. cerevisiae* showed greatest activity between pH 4.1 and 4.5 and between 22 and 25 °C, and stability in the range from pH 3.8 to 4.5 at -10 °C. The killer toxin was inactivated by heating at 40 °C for 1 h at pH 4.1.

The molecular weight of the purified toxin was estimated at about 18 to 20 kDa by SDS-PAGE.

## 1. Introdução

---

Muitas indústrias de bebidas alcoólicas como vinho, cerveja, saquê, adicionam leveduras “starters” (fermento) com o intuito de condicionar a fermentação de forma desejável. Entretanto, durante o processo fermentativo, linhagens de leveduras melhor adaptadas às condições podem dominar a fermentação, visto que o processo de pasteurização e/ou sulfitação não elimina totalmente as leveduras selvagens. Essa sucessão microbiana pode diminuir ou eliminar a levedura principal (fermento), levando à lentidão da fermentação, aumento de acidez, surgimento de aroma e sabor desagradáveis. A consequência destes problemas, pode resultar em sérios prejuízos para a indústria de bebidas. Essas indústrias buscam portanto, leveduras “starters” com características não só desejáveis sob o ponto de vista de produzir bebidas com ótimas características sensoriais; mas também que sejam mais competitivas.

A capacidade de produzir o fator “killer” pode conferir uma vantagem seletiva sobre linhagens crescendo em competição com células sensíveis. Leveduras “killer” excretam proteínas letais às células de leveduras sensíveis de sua própria espécie e/ou de espécies e gêneros distintos. Vários estudos relatam a presença deste fenótipo em processos fermentativos. Linhagens produtoras de fator “killer”, tem sido descritas em *Saccharomyces* e pelo menos em mais oito gêneros de leveduras.

Novas linhagens com atividade “killer” vêm sendo selecionadas de mosto de fermentação de vinho, de cerveja, de melão; salmoura de azeitona; fermentação de cacau e também de frutas em decomposição. Alguns estudos relatam a construção de híbridos industriais com características “killer”, obtidos

através de técnicas de manipulação genética como fusão de protoplastos e eletroinjeção.

O fenótipo “killer” também vem sendo utilizado como uma ferramenta importante na elucidação de vias metabólicas relacionadas com a biossíntese de componentes da parede celular de leveduras. Leveduras mutantes “killer resistentes” tem sido utilizadas para o estudo dos genes relacionados com a biossíntese dos polímeros  $\beta(1-6)$ -glucana e quitina da parede celular. Esses mutantes, também tem sido utilizados na definição das vias de secreção da toxina, e estudo dos componentes do complexo de Golgi envolvidos na glicosilação de manoproteínas. O sistema “killer” em leveduras, também vem sendo um modelo interessante para a secreção de proteínas heterólogas, como por exemplo pela utilização do peptídeo sinal da toxina, na excreção de  $\alpha$ -amilase de rato clonada em *S. cerevisiae*.

Este estudo tem como objetivo caracterizar e purificar a toxina “killer” produzida pela linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* Y500-4L, isolada de mosto de fermentação de usina produtora de álcool e com alta capacidade fermentativa. Estudou-se o perfil de atividade “killer” da toxina de Y500-4L em relação às linhagens “killer” padrões e linhagens de levedura comerciais Fleischmann e Itaiquara. Estudou-se também o caráter genético responsável pelo fator “killer” e a perda deste fenótipo. Determinou-se as condições ótimas de atividade e estabilidade da proteína “killer” e sua produção. A toxina foi parcialmente purificada, determinou-se o peso molecular e as características da toxina quanto ao pH de estabilidade e termoestabilidade.

O entendimento das características genéticas responsáveis por este fenótipo “killer”, o espectro de atividade da toxina frente à outras estirpes de leveduras, os

parâmetros ótimos de atuação da toxina, contribuirão portanto, no desenvolvimento de linhagens com atividade “killer” para a aplicação industrial. Visando assim, diminuir os efeitos causados por leveduras indesejáveis em processos fermentativos.

\*

## 2. Revisão Bibliográfica

---

### 2.1 O efeito “killer” em leveduras

O fenótipo “killer” em leveduras foi relatado pela primeira vez, na década de sessenta, em linhagens de laboratório de *Saccharomyces cerevisiae* (BEVAN & MAKOWER, 1963). Os autores propuseram que as cepas podiam ser classificadas em um dos três fenótipos: “killer”, sensível ou neutro. Quando células “killer” e sensíveis eram crescidas juntas no meio de cultura, uma alta proporção destas últimas eram mortas. Células neutras não matavam as células sensíveis, nem eram mortas pelas “killer”. Verificaram também que a levedura “killer” era imune à ação do seu próprio fator “killer”.

Baseando-se no fato de que a morte das cepas sensíveis podia ocorrer sem o contato com as células “killer”, WOODS & BEVAN (1968) estudaram o agente responsável pela morte, chamado de “fator killer”. Verificaram que o efeito “killer” de *Saccharomyces cerevisiae* era causado por uma proteína, extracelular, sensível ao calor e à protease. Os resultados demonstraram que em meio líquido e em meio sólido, a toxina era inativada em temperaturas acima de 25 °C e acima de 42 °C, respectivamente, e possuía um pH ótimo de produção e estabilidade, numa faixa restrita de 4,6-4,8 a 22 °C. A proteína “killer” mostrou um espectro de ação altamente específico, dependente de pH, temperatura e condições de aeração.

Até então, o efeito “killer” só havia sido reportado em culturas de laboratório. Na década de setenta, MAULE & THOMAS (1973) relataram pela

primeira vez a presença de leveduras “killer” em processos fermentativos. Os autores verificaram a morte da cultura usada como fermento para a produção de cervejas tipo “ale” e “lager”. Com o predomínio das linhagens “killer”, a cerveja apresentou sabor e aroma desagradáveis. As cepas “killer” se mostraram altamente ativas em pH 3,8-4,2. Foram encontradas linhagens “killer” floculantes e não floculantes e estas apresentaram características de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, mas pareciam fermentar maior quantidade de açúcares que a levedura do fermento comercial e apresentavam-se pleomórficas e de pequeno tamanho em cultura mista. A presença de leveduras “killer” em mosto de fermentação de vinhos, também foi relatada por NAUMOV et al. em 1973. Ainda neste período IMAMURA et al. (1974), relataram a presença de uma linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* “killer” contaminante em mosto de fermentação de saquê. Durante a fermentação, os tanques contaminados apresentaram menor produção de álcool, acidez titulável menor que o normal na primeira metade do processo fermentativo e produção de compostos sulfurados durante o estágio inicial.

Em 1974, WOODS et al., isolaram uma linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* que apresentava um novo fenótipo “killer”, diferente das linhagens descritas por BEVAN & MAKOWER em 1963. Essa linhagem, que foi descrita como sensível ao fator “killer” (KF1) por WOODS & BEVAN em 1968, também produzia um novo fator “killer” (KF2) capaz de matar outras células sensíveis. Verificou-se também que esse fator KF2 apresentava maior termoestabilidade que o KF1.

PHILLISKIRK & YOUNG (1975), estudaram a ocorrência de leveduras “killer” em outros gêneros e espécies em uma coleção de cultura, com a finalidade de ampliar os conhecimentos a respeito deste fenótipo. Os autores analisaram as

linhagens do National Collection of Yeast Cultures (NCYC) e verificaram que sete dos 28 gêneros, exibiram atividade “killer” contra *Saccharomyces cerevisiae*. A maior incidência de leveduras “killer” foi encontrada no gênero *Hansenula*. O gênero *Saccharomyces*, apesar de ser o maior representante da coleção, apresentou pouca incidência do fenótipo “killer”. Os outros gêneros que mostraram atividade “killer” foram *Debaryomyces*, *Pichia*, *Candida*, *Torulopsis* e *Kluyveromyces*.

Em 1978, YOUNG & YAGIU propuseram uma classificação das leveduras “killer”, tendo em vista que o fenótipo se encontrava presente em gêneros e espécies diferentes. Os autores estudaram a interação entre 20 leveduras “killer” de diversos gêneros e espécies reportadas, anteriormente, em 1975, por PHILLISKIRK & YOUNG. As leveduras foram avaliadas quanto à atividade “killer” que possuíam umas frente às outras, reatividade cruzada, ou seja, interação entre as linhagens. Assim, foram classificadas em 10 grupos distintos (K1, K2...K10). As leveduras “killer” do gênero *Saccharomyces*, foram classificadas de acordo com o caráter “killer” como K1, K2 e K3. As linhagens de *S. uvarum* NCYC 190 e *S. cerevisiae* A8209B, NCYC 232, NCYC 235, NCYC 631, NCYC 663, foram classificadas como leveduras “killer” K1 porque matam as leveduras produtoras de fator “killer” K2 (*S. cerevisiae* NCYC 738 e NCYC 1001, *S. diastaticus* NCYC 713), K3 (*S. campensis* NCYC 761) e K4 (*Torulopsis glabrata* NCYC 388), como ilustra o Quadro 1. Parâmetros genéticos encontrados em linhagens de *S. cerevisiae* também foram utilizados para comparação. Concluíram então que “fatores killer” distintos, podem ser produzidos por leveduras do mesmo gênero e espécie, tanto quanto por diferentes gêneros ou diferentes espécies. A análise dos efeitos de enzimas proteolíticas, temperatura e pH na atividade “killer” do extrato bruto, 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 protéico importante para a ação “killer”. Outros pesquisadores em 1978 (ROGERS & BEVAN), também propuseram a classificação das leveduras “killer” em grupos baseando-se na reatividade cruzada.

Quadro 1- Classificação das leveduras “killer”  
(YOUNG & YAGIU, 1978)

Tipos de “killer”	Leveduras “killer”	Tipos de “killer” apresentados pelas sensíveis
K1	<i>S. uvarum</i> NCYC 190 <i>S. cerevisiae</i> A8209B, NCYC 232, 235, 631 e 663	K2, K3, K4
K2	<i>S. cerevisiae</i> NCYC 738 e 1001 <i>S. diastaticus</i> NCYC 713	K1, K4
K3	<i>S. capensis</i> NCYC 761	K1, K4
K4	<i>Torulopsis glabrata</i> NCYC 388	K1
K5	<i>Debaromyces vanriji</i> NCYC 577 <i>Hansenula anomala</i> NCYC 434 <i>H. subpelliculosa</i> NCYC 16	K1, K3, K4
K6	<i>Kluyveromyces fragilis</i> NCYC 587	K1, K2, K3, K4
K7	<i>Candida valida</i> NCYC 327 <i>Pichia membranaefaciens</i> NCYC 333	K1, K3, K4, K6
K8	<i>H. anomala</i> NCYC 435	K1, K2, K3, K4, K6
K9	<i>H. mrakii</i> NCYC 500	K1, K2, K3, K4, K5, K8
K10	<i>K. drosophilum</i> NCYC 575	K1, K2, K3, K4, K5, K6, K7, K8

PFEIFFER & RADLER (1984) compararam as características de pH ótimo de atividade e estabilidade de toxinas “killer” de *S. cerevisiae*, *Candida crusei* e *Pichia fermentans*. A toxina da linhagem *S. cerevisiae* D587-2A (K1) apresentou atividade ótima em pH 4,7, estabilidade após 1 hora de incubação a 30 °C em pH 3,5. As toxinas das linhagens “killer” K2 (*S. cerevisiae* NCYC 738, *S. cerevisiae* 396 e *S. cerevisiae* 399) mostraram atividade ótima na faixa de pH 4,2-4,4 e estabilidade em pH 3,5 após 1 hora de incubação a 25 °C, 30 °C e 35 °C, respectivamente. A toxina “killer” da linhagem *S. cerevisiae* 28, diferente das toxinas de *S. cerevisiae* descritas, apresentou atividade ótima em pH 5,8 e estabilidade após 1 hora de incubação a 40 °C, em pH 3,5. As toxinas “killer” de *Candida crusei* 392, *Pichia fermentans* 394 e *Pichia fermentans* 395, mostraram atividade ótima em pH 4,2 e estabilidade após 1 hora de tratamento a 40 °C em pH 3,5.

SHIMIZU et al. (1985) caracterizaram leveduras de vinho. Sete linhagens apresentaram caráter “killer” e foram classificadas como *S. cerevisiae* tipo K2. Houve pequena diferença de estabilidade entre as toxinas, pois foram estáveis entre os pHs 2,9 e 4,9 após 8 horas de incubação a 6 °C. Em pH 5,0, a estabilidade das toxinas diminuiu e nenhuma atividade foi verificada em pH 5,4. A estabilidade também diminuiu com o aumento da temperatura. Os autores verificaram que a toxina era estável a 6 °C e ocorria apenas uma pequena perda quando incubadas a 20 °C, após 10 dias. A 30 °C, o declínio era mais acentuado sendo que a 48 °C havia uma perda total da atividade, após 30 minutos de incubação do meio de cultura fermentado.

PANCHAL et al. (1985), ao estudarem o efeito da toxina “killer” produzida por *Kluyveromyces lactis* contra *Saccharomyces* spp., verificaram que houve um

aumento de 50% para 90% de sua atividade quando modificou-se o pH do meio de 4,5 para 6,5.

WILSON & WHITTAKER (1989) estudaram alguns fatores que afetam a atividade e estabilidade da toxina “killer” de *Kluyveromyces lactis* NRRL 1140R. A toxina era ativa na faixa de pH 4,4 a 5,8, estável em pH levemente alcalino (pH 8,0), e irreversivelmente inativada em pH inferiores a 4,4. A toxina mostrou-se estável a temperatura de 40 °C mas foi, rapidamente, inativada a 50 °C.

As diversas toxinas “killer” diferem portanto, quanto a pH e temperatura de atividade e estabilidade, dependendo da linhagem produtora (BENDOVIÁ, 1986). A toxina de *Saccharomyces* é reversivelmente inativada em pH baixo (2,0) e irreversivelmente inativada em pH acima de 5,0 (PETERING et al., 1991; citado por BENÍTEZ et al., 1996).

Desde a descoberta do fenótipo “killer”, vários estudos relataram a presença de leveduras “killer”: isoladas de diversas fontes da natureza, como frutas e vegetais em decomposição (STUMM, 1977); em processos fermentativos para obtenção de bebidas como vinho (THORNTON, 1986; PETERING et al., 1991; SULO & MICHALCÁKOVÁ, 1992; VAGNOLI et al., 1993; CARRAU et al., 1993; VAZQUEZ & TORO, 1994; HIDALGO & FLORES, 1994), seus efeitos e interações com linhagens sensíveis durante a fermentação (JACOBS & VAN VUUREN, 1991); em algumas bebidas típicas como “chicha” e “masato” (CASTILLO et al., 1990) e fermentação natural de Tequila (LACHANCE, 1995); isoladas de usinas produtoras de álcool (SATO et al., 1993) e de fermentação espontânea de cacau (GOMES et al., 1997) entre outros.

A presença de leveduras “killer” foi relatada em salmoura de azeitonas fermentadas espontaneamente (MARQUINA et al., 1992). Os autores verificaram que a maioria das leveduras possuía caráter “killer” e que as espécies dominantes eram linhagens particularmente ativas de *Pichia membranaefaciens*.

NASCIMENTO (1994) selecionou leveduras produtoras de fator “killer”, 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”. Dentre dez leveduras que apresentaram atividade “killer” contra as leveduras comerciais Fleischmann e Itaiquara, oito foram identificadas como *Saccharomyces cerevisiae*, dentre elas a linhagem Y500-4L. As leveduras foram avaliadas quanto à capacidade fermentativa em melaço de cana contendo 24% de açúcares totais a 25 °C. O autor verificou que a linhagem de *S. cerevisiae* Y500-4L apresentou maior atividade “killer”, maior espectro de ação e maior rendimento de etanol entre as leveduras testadas.

A ocorrência de leveduras “killer”, sensíveis e neutras, foi verificada em mosto de uva no sul do Brasil. A sensibilidade e a característica neutra mostrou ser dependente do meio e da linhagem “killer”. Interações entre os três fenótipos simultaneamente, revelaram que algumas estirpes neutras, pareciam proteger estirpes sensíveis contra a toxina “killer” devido a um efeito de diluição (SILVA, 1996).

LLORENTE et al. (1997) examinaram o efeito do sal no fenótipo “killer” de leveduras de salmoura de azeitona. Os autores verificaram um aumento aparente na atividade “killer” à medida que a concentração de sal aumentava, além de uma mudança no espectro de atividade sobre linhagens sensíveis.

O efeito “killer”, se encontra portanto, amplamente distribuído em leveduras presentes na natureza e em processos fermentativos, assim como naquelas que fazem parte de coleções de cultura.

## **2.2. Caráter genético responsável pelo fenótipo “killer”**

Em 1972, BERRY & BEVAN, investigando a natureza dos determinantes genéticos citoplasmáticos envolvidos no caráter “killer” de *S. cerevisiae*, detectaram RNA de fita dupla citoplasmático (dsRNA), com base na sua resistência a maiores concentrações de RNAase, mobilidade eletroforética em gel de poliacrilamida e coloração com ortotoluidina.

BEVAN et al. (1973) confirmaram a presença do dsRNA em *S. cerevisiae*. Entretanto, reportaram que em linhagens “killer” haviam duas espécies de dsRNA de pesos moleculares diferentes. Os resultados mostraram que as linhagens sensíveis possuíam apenas uma espécie de dsRNA ou nenhuma. Os autores, portanto, concluíram que as duas moléculas juntas deveriam ser o determinante genético do caráter “killer”.

Em 1974, HERRING & BEVAN mostraram que os dsRNA estavam associados a partículas semelhantes a vírus (partículas vírus-like = VLPs), o que foi confirmado em 1980 por BOSTIAN et al.(a). Estes observaram, que os dsRNAs, denominados de M e L, se encontram encapsulados separadamente no citoplasma da célula “killer” de *S. cerevisiae*. Os resultados demonstraram, também, que ambos são encapsulados pela mesma proteína capsídica, a qual é codificada por genes presentes no L-dsRNA. Os autores verificaram, portanto, a relação existente entre as duas espécies de dsRNA.

WICKNER (1976) verificou que a manutenção e replicação dos plasmídios “killer” (dsRNA) na célula de *S. cerevisiae*, requeriam pelo menos 10 genes cromossomais. O fenótipo “killer” requer, portanto, não só genes citoplasmáticos presentes nas duas espécies de dsRNA, mas também de genes cromossomais.

Em 1980, BOSTIAN et al. (a e b), isolaram L-dsRNA (2,5-3,0 X 10<sup>6</sup> Da) e M-dsRNA (1,1-1,4 X 10<sup>6</sup> Da) de linhagens de *S. cerevisiae*. Os autores verificaram que o M-dsRNA possui o gene que codifica a toxina “killer”. Também observaram que o L-dsRNA codifica uma proteína capsídica e que a encapsulação é essencial para a replicação ou expressão do M-dsRNA. Assim, concluíram que o L-dsRNA possui um papel essencial na manutenção ou expressão do fenótipo “killer”.

GUNGE et al. (1981) isolaram e caracterizaram os plasmídios associados com o fenótipo “killer” em *Kluyveromyces lactis*. Verificaram a presença de dois plasmídios lineares de DNA, os quais foram designados pGK11 e pGK12 possuindo pesos moleculares de 5,4 X 10<sup>6</sup> e 8,4 X 10<sup>6</sup> Da respectivamente. Linhagens de *K. lactis* que não apresentaram o plasmídio pGK11, não possuíam o fenótipo “killer”. Os autores também observaram que o caráter “killer” era transmitido extracromossomalmente. Nenhum plasmídio de ácido ribonucleico de fita dupla (dsRNA) foi detectado. Um gene cromossomal também foi encontrado como responsável pela resistência em linhagens de *K. lactis* “killer”.

FIELD et al. (1982) verificaram em *Saccharomyces cerevisiae* que o L-dsRNA apresentava cerca de 4,8 Kb e que o M-dsRNA cerca de 1,9 Kb. E relataram que os RNAs de fita dupla de mesmo tamanho poderiam conter sequências de nucleotídeos distintas.

Em 1984, KITANO et al. relataram, pela primeira vez, a existência de linhagens de *S. cerevisiae* “killer” em vinícolas japonesas, que apresentavam um perfil eletroforético diferente. Duas estirpes, Y-6 e Y-9, foram identificadas como novos tipos “killer” os quais não haviam sido descritos para o gênero *Saccharomyces*, pois apesar das linhagens apresentarem atividade “killer”, não possuíam o plasmídio de M-dsRNA. Em estudos posteriores, os autores verificaram que os genes que codificam estas toxinas “killer”, estavam presentes no cromossomo V e IX (GOTO et al., 1990a).

YOKOMORI et al. (1988a) isolaram uma linhagem “killer” de casca de uva, identificada como pertencente ao gênero *Candida*. Os autores concluíram que a toxina “killer” deste isolado, era codificada por genes cromossomais e não por extracromossômicos.

KAGIYAMA et al. (1988) isolaram duas linhagens “killer” de shoyu, as quais foram identificadas como *Hansenula anomala*. O espectro de atividade “killer” de ambas, foi diferente daqueles já descritos para leveduras classificadas como K1-K10. Os autores concluíram que a toxina “killer” deste gênero era codificada por genes cromossomais, visto que não foi detectada a presença de plasmídios nestas leveduras.

STARK et al. (1990) afirmaram que o caráter “killer” de *Kluyveromyces lactis*, é codificado por dois plasmídios de DNA de fita dupla, lineares, citoplasmáticos, com 8,9 e 13,4 Kb. BOLEN et al. (1994), ao isolarem e determinarem a análise sequencial do gene responsável pela codificação da toxina “killer” de *Pichia acaciae*, verificaram uma alta similaridade com o gene “killer” de *Kluyveromyces lactis*.

### **2.3. Cura do fenótipo “killer”**

A perda da capacidade “killer” de leveduras é denominada de cura. Isso pode ocorrer, quando a linhagem “killer” parental é submetida a um tratamento com cicloheximida e/ou temperaturas elevadas. E assim as células filhas podem perder a capacidade de matar outras leveduras.

A cicloheximida exerce um efeito inibitório na síntese protéica de eucariotos, afetando a iniciação da formação da cadeia polipeptídica (HARTWELL, 1970).

O primeiro relato de cura do fenótipo “killer” de leveduras foi em 1972, por FINK & STYLES. Estes verificaram que o determinante genético do fenótipo “killer” em *S. cerevisiae*, podia ser seletivamente removido. Ao submeterem a linhagem à um tratamento com cicloheximida, observaram que as linhagens “killer” tornavam-se incapazes de matar outras leveduras.

Em 1974, WICKNER observou que quando linhagens normais de *S. cerevisiae* “killer” eram crescidas em temperaturas de 37 a 40 °C, produziam quase que exclusivamente células não-killer. Na época, o autor interpretou, como sendo devido à uma possível perda ou mutação de parte do genoma “killer” não cromossomal.

CANSADO et al. (1989) verificaram o efeito de laranja de acridina na cura do caráter “killer” de *S. cerevisiae*. Laranja de acridina é um corante usado como agente intercalante empregado na cura de plasmídios bacterianos. Os resultados mostraram uma alta percentagem de cura nas linhagens de leveduras “killer” K1 e

K2, demonstrando respectivamente a perda de M1 ou M2-dsRNA após o tratamento. A percentagem de cura variou dependendo da linhagem mas não do tipo “killer”. A laranja de acridina apresentou eficiência similar quando comparada com outros agentes de cura.

LONGO et al. (1992) estudaram a influência de linhagens curadas de *S. cerevisiae* usadas em vinho e seu comportamento fermentativo. Os autores inocularam em suco de uva duas linhagens selvagens de *S. cerevisiae*, ou suas respectivas linhagens curadas por laranja de acridina. Verificaram que a produção de CO<sub>2</sub>, a taxa fermentativa e a produção de etanol e ácido acético foram maiores no mosto inoculado com a linhagem curada, particularmente, durante o estágio de fermentação ativa. Essas diferenças, entretanto, foram mínimas no final das fermentações.

WEINSTEIN et al. (1993) verificaram que a perda do M1-dsRNA, responsável pela codificação da proteína “killer”, está relacionada com a termosensibilidade caracterizada por genes presentes no L-dsRNA de algumas linhagens de *S. cerevisiae*.

CARROL & WICKNER (1995), ao estudarem genes cromossomais responsáveis pela propagação do M1-dsRNA, chegaram as seguintes conclusões: o M1-dsRNA é um satélite do vírus L-dsRNA, e portanto requer proteínas codificadas por genes deste último para poder se propagar. O mRNA transcrito dessas proteínas não apresenta cadeia poliA terminal e, portanto, a tradução destas proteínas são as primeiras a serem prejudicadas na presença de baixas concentrações de cicloheximida. Visto que, segundo os autores, na iniciação da tradução, após a subunidade 40S se ligar a estrutura cap 5' do mRNA, acredita-se que a cauda poliA facilita o acoplamento com a subunidade 60S. A ausência desta

estrutura poliA terminal compromete, portanto, a tradução e, conseqüentemente, a propagação do MI-dsRNA em leveduras. A ausência deste dsRNA em algumas linhagens de *S. cerevisiae* causa a cura do fenótipo “killer”.

Ainda em 1995, OHTAKE & WICKNER verificaram que a propagação do M-dsRNA de *S. cerevisiae* depende da concentração de subunidades 60S livres, de ribossomos. O uso de mutantes deficientes de genes cromossomais necessários à manutenção do fenótipo “killer” (MAK genes), sugere que estes afetam a propagação do M-dsRNA devido aos seus efeitos sobre o não suprimento de proteínas ribossomais, afetando assim a concentração de subunidade 60S e diminuindo a tradução do mRNA (RNA mensageiro) transcrito do L-dsRNA, o qual não possui a cauda poliA terminal.

#### **2.4. Modo de ação da toxina “killer”**

A parede celular de leveduras é uma estrutura rígida que recobre a membrana plasmática e é composta de proteínas e polissacarídeos. A parede celular de *S. cerevisiae* é composta de três componentes principais  $\beta$ -1,3 e  $\beta$ -1,6 glucanas (48-60%), manose-proteínas (20-30%) e quitina [ $\beta$ -1,4 N-acetilglucosamina (0,6-2,7%)] (FLEET, 1985).

O fato de células sensíveis de *S. cerevisiae* morrerem mais lentamente quando tinham suas paredes celulares submetidas à ação de glucanase antes do tratamento com a toxina “killer”, impulsionou vários estudos a respeito do modo de ação da toxina “killer” (BUSSEY, 1972).

Em 1973, estudos de BUSSEY et al. confirmaram a necessidade de sítios de ligação para a toxina, na parede celular das células intactas de leveduras sensíveis. Os resultados foram obtidos utilizando-se a toxina “killer” radioativa, parcialmente purificada.

Ainda neste ano, verificaram que células sensíveis tratadas com a toxina, liberavam no meio ATP intracelular e íons  $K^+$  (BUSSEY & SHERMAN, 1973). Estes resultados sugerem, portanto, a alteração da membrana celular de leveduras induzida pelo fator “killer”.

SKIPPER & BUSSEY (1977) verificaram que a ação da toxina “killer” de *S. cerevisiae* é dependente de ATP. Os ensaios foram feitos medindo-se a quantidade de  $^{46}K$  liberado após o tratamento da célula de levedura sensível com duas toxinas “killer”, como medida da ação das toxinas. Entretanto, quando este tratamento foi feito em presença de drogas que interferem com a geração ou uso de energia, não houve o efluxo de  $^{46}K$ .

Portanto, o mecanismo de ação primeiro envolve a ligação da toxina na parede da célula sensível e depois provoca dano na membrana. O mecanismo mais elucidado é o de *S. cerevisiae* e principalmente K1. Sabe-se que o receptor primário na parede, ou seja, o sítio de ligação é o  $\beta$  (1-6)D-glucana (HUTCHINS & BUSSEY, 1983). Após a toxina se ligar na parede da célula sensível, ocorre a formação de um canal iônico na membrana (KAGAN, 1983). O dano na membrana é causado pelo desbalanceamento iônico, apresentando extravazamento de íon  $K$ , ATP e conseqüente acidificação do citoplasma da célula sensível (PEÑA et al., 1981), levando assim, à inibição da síntese de macromoléculas e conseqüente morte da célula sensível sem, entretanto, causar a lise da mesma.

ZHU & BUSSEY (1989) verificaram que a toxina “killer” K1 de *S. cerevisiae* foi capaz de matar esferoplastos de vários gêneros de leveduras, cujas células intactas não são sensíveis a esta toxina. Os autores concluíram que receptores de parede celular podem definir a especificidade da toxina e que são necessários mas não suficientes para a ação da toxina em células intactas.

As pesquisas também propõem que a imunidade da célula “killer” é conferida ao precursor da toxina ou a algum produto não completamente processado, que interfere competitivamente com a ação da toxina madura. Isto pode ocorrer pela ocupação do receptor na parede ou pela interferência na formação do canal iônico (BOONE et al., 1986; TIPPER et al. citado por BROWN et al., 1994; ZHU et al., 1993).

SCHMITT & PFEIFFER (1990) verificaram, entretanto, que o receptor primário de parede da toxina produzida pela linhagem de *S. cerevisiae* KT28 não se tratava de glucana, e sim de uma manoproteína encontrada na superfície das células sensíveis.

Diversos genes responsáveis pela síntese da  $\beta$ -1,6 glucana da parede celular têm sido isolados. Mutantes que apresentam parede celular com menor conteúdo de  $\beta$ -1,6 glucana mostraram-se resistentes a toxina “killer” K1. Estes genes são designados de KRE e a introdução destes em mutantes *kre* resultam em produção normal de  $\beta$ -1,6 glucana. O KRE6 é um dos genes KRE que está envolvido na síntese de  $\beta$ -1,3 e  $\beta$ -1,6 glucana. A eliminação deste gene resulta em redução da quantidade de  $\beta$ -1,6 glucana na parede celular assim como na atividade de síntese de  $\beta$ -1,3 glucana sintetase (ROEMER & BUSSEY, 1991).

A toxina de *Kluyveromyces lactis* também foi estudada. A sua subunidade  $\alpha$ , apresenta alta homologia com quitinases, o que sugere que esta toxina se liga inicialmente em quitina presente na superfície da célula sensível (BUTLER et al., 1991; TAKITA & CASTILHO-VALAVICIUS, 1993).

YAMAMOTO, citado por KASAHARA et al. (1994a), relatou que a toxina HM-1 de *Hansenula mrakii* inibe o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae*, interferindo na síntese de  $\beta$ -1,3 glucana.

KASAHARA et al. (1994a) isolaram uma linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* resistente a toxina HM-1 de *Hansenula mrakii*. Os autores isolaram o gene denominado HKR1 que conferia resistência a toxina “killer” e codificava uma proteína de membrana, rica em serina e treonina. A superexpressão do gene HKR1 aumentava o conteúdo de  $\beta$ -glucana na parede celular sugerindo que este gene regulava a síntese desse polissacarídeo. Posteriormente, os autores estudaram o envolvimento da  $\beta$ -glucana no modo de ação da toxina HM-1 e verificaram que a toxina matava células intactas mas não protoplastos. Além disso, células que não apresentavam o alelo KRE6 e portanto continham menor conteúdo de  $\beta$ -1,6 glucana, mostraram-se resistentes a altas concentrações da toxina. Os autores observaram que a adição de  $\beta$ -1,3 e  $\beta$ -1,6 glucana no meio, bloqueava a ação “killer” da toxina enquanto que o mesmo não acontecia com a adição de  $\alpha$ -1,4 glucana e quitina. E sugeriram que a toxina HM-1 interage com a parede celular e é requerida para a atividade “killer”.

KOMIYAMA et al. (1996) estudaram o modo de ação da toxina “killer” HM-1 produzida por *Hansenula mrakii*, a qual é ativa contra células de *S. cerevisiae*. Os autores verificaram que a ação da toxina era mais eficiente quando as células da linhagem sensível estavam em ativa duplicação. Células num estágio

estacionário eram resistentes, e se tornavam sensíveis após 90 min de cultivo, o que era concomitante com o aumento do índice de brotamentos. Os resultados sugeriram, portanto, que a toxina HM-1 atua na região de brotamento das células em proliferação, resultando em formação de poro na membrana, liberação de componentes celulares e eventual morte das células sensíveis.

A ação de toxinas “killer” de diferentes gêneros de leveduras sobre linhagens de *S. cerevisiae* tem sido estudada por diversos pesquisadores (HUTCHINS & BUSSEY, 1983; BROWN & BUSSEY, 1993; CASTRO et al., 1995; WICKNER, 1996; HAMPSEY, 1997) visando o conhecimento dos mecanismos de atuação das toxinas, determinação dos compostos da parede celular envolvidos na ligação ou atuação da toxina e estudo dos genes que conferem resistência a ação da toxina.

## **2.5. Purificação da toxina “killer”**

Existem toxinas “killer” distintas (YOUNG & YAGIU, 1978), mas apenas algumas têm sua estrutura e função estudada a nível molecular. As proteínas “killer” mais conhecidas são aquelas codificadas por genes plasmidiais, produzidas por *Saccharomyces cerevisiae* (K1, K2 e KT28), *Ustilago maydis* (KP6) e *Kluyveromyces lactis*.

A toxina K1 de *Saccharomyces cerevisiae* é a mais bem caracterizada. A toxina K1 de *S. cerevisiae* T158c/S14a é heterodimérica, na qual as duas subunidades se encontram ligadas por pontes de dissulfeto e ambas possuem

massa molecular similar em torno de 11 kDa. Dados da composição de aminoácidos da toxina purificada são consistentes com o sequenciamento do gene da pré-toxina onde as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  consistem dos resíduos de aminoácidos 45-147 e 234-316 respectivamente e a massa molecular do dímero  $\alpha\beta$  é de aproximadamente 20,658 kDa (ZHU et al., 1987). Estudos de análise mutacional foram desenvolvidos nos domínios funcionais desta toxina, e os resultados indicaram que ambas as subunidades,  $\alpha$  e  $\beta$ , estão envolvidas na ligação com o receptor de parede  $\beta(1-6)$ D-glucana. Defeitos na formação do canal iônico na membrana foram conferidos à regiões hidrofóbicas localizadas na subunidade  $\alpha$  (ZHU & BUSSEY, 1991).

O primeiro estudo sobre a natureza da toxina “killer” foi reportado por WOODS & BEVAN (1968), que descreveram a purificação da toxina de *Saccharomyces cerevisiae* por precipitação com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , diálise e cromatografia de filtração em gel- Sephadex G 150. Por este método atingiu-se uma purificação da toxina de 40 vezes em relação ao sobrenadante do meio de cultura. Os autores relataram que a toxina “killer” provavelmente é adsorvida no gel de Sephadex e o peso molecular não pôde ser determinado por esta técnica.

PALFREE & BUSSEY (1979) relataram a purificação da toxina “killer” de *S. cerevisiae* através da precipitação com polietileno glicol e cromatografia em coluna de gliceril-CPG (pérolas de vidro, de porosidade controlada com radicais gliceril). Foi verificada a diminuição da atividade da toxina durante esta última etapa de purificação. A maior parte da toxina foi eluída, gradualmente, após o volume vazio da coluna e possivelmente houve interação entre a toxina e as cargas negativas do vidro. A presença de apenas uma banda foi constatada em eletroforese SDS-PAGE e a massa molecular da toxina foi estimada em 11,47 kDa, como sendo um monômero.

ZHU et al. (1987), utilizando a mesma metodologia anterior, mas modificando a técnica cromatográfica por filtração em gel de Sepharose CL-6B-Pharmacia, purificaram a toxina “killer” da linhagem de *S. cerevisiae* K1 T158c/S14a até a homogeneidade, através de processo de duas etapas de filtração em coluna. O meio de cultura livre de células foi concentrado e purificado em coluna de filtração em gel Sepharose CL-6B equilibrada com tampão de acetato de sódio. As frações contendo atividade foram dialisadas com tubos de capacidade de retenção de proteínas de 6000-8000 Da e concentradas com Aquacid II para a remoção de água. A preparação foi redissolvida em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 6,8 contendo 1% de SDS e aquecida a 100 °C por 3 minutos, e então, aplicada novamente em coluna de Sepharose CL-6B equilibrada com tampão Tris-HCl 0,1 M contendo 0.1% de SDS. Os autores verificaram que a preparação de toxina inativa obtida através deste método, mostrou-se homogênea através de SDS-PAGE. Os autores determinaram a sequência de aminoácidos carboxi terminal dos dois polipeptídios da toxina “killer” K1 de *S. cerevisiae* através de sequenciamento de proteína e análise de aminoácidos. O aminoácido carboxi terminal da cadeia  $\beta$  encontrado foi histidina (aa 316) e da cadeia  $\alpha$  a alanina (aa 147).

A toxina de *Saccharomyces cerevisiae* linhagem 28 (KT28) foi concentrada por ultrafiltração e purificada por cromatografia em coluna de troca iônica de Servacel celulose P23 (PFEIFFER & RADLER, 1982). A toxina após a purificação permaneceu ativa. A eletroforese de SDS-PAGE e a análise de aminoácidos indicou ser uma glicoproteína de massa molecular em torno de 16 kDa contendo 111 resíduos de aminoácidos. Esta toxina apresentou atividade ótima em pH 5,0 e estabilidade após 1 hora de tratamento a 40 °C e, portanto, bem distinto das toxinas de *Saccharomyces cerevisiae* já estudadas anteriormente.

SCHMITT & RADLER (1987), estudando a natureza do receptor primário de parede das células sensíveis à toxina produzida pela linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* KT28, verificaram que se tratava de manoproteína, distinto do receptor de parede à toxina K1, o qual é um glucano. A purificação parcial desta toxina KT28 foi realizada através de cromatografia de troca iônica-S-Sepharose (coluna trocadora de cátion), onde o sobrenadante havia sido concentrado inicialmente 1000 vezes através da ultrafiltração e diálise. Esta toxina tinha sido purificada inicialmente por cromatografia de troca iônica em resina de celulose P23 (PFEIFFER & RADLER, 1982), mas a purificação era dificultada pelas variações na qualidade e capacidade desta coluna. Neste trabalho, portanto, a resina de celulose P23 foi substituída por uma coluna de S-Sepharose, visto que esta toxina se liga fortemente a esta resina trocadora de cátions em condições de pH 3,5 e elui mudando-se o pH para 5,5.

SCHMITT & RADLER (1989), continuando a mesma linha de pesquisa, descreveram a purificação da toxina KT28 através de cromatografia de bioafinidade, utilizando manoproteína imobilizada no gel como receptor. Resultados demonstraram que a presença deste receptor é essencial para a separação. Esta técnica também pode ser utilizada para a purificação da toxina “killer” de *Debaryomyces hansenii*, a qual se liga na fração de manana da parede celular de leveduras.

Uma nova toxina de *S. cerevisiae*, codificada por genes cromossomais, foi purificada cerca de 80 vezes a partir do sobrenadante do meio de cultura (GOTO et al., 1990a). A purificação foi realizada por meio de cromatografia de filtração em gel (TSKgel G3000SW- Tosoh), seguida de HPLC em coluna hidrofóbica (SynCropak propyl - SynCrom). A toxina purificada apresentou-se como uma única banda em SDS-PAGE com massa molecular de 20 kDa.

A toxina “killer” de *Kluyveromyces lactis* foi purificada 320000 vezes em relação ao meio de crescimento. A toxina apresentou um rendimento de 24% através de purificação em coluna cromatográfica de hidroxiapatita, cromatofocalização e eletroforese de poliacrilamida. A proteína composta de pelo menos duas subunidades apresentou peso molecular de cerca de 100 kDa. A pré-purificação do sobrenadante concentrado em coluna de hidroxiapatita mostrou ser um processo indispensável, pois a cromatografia em coluna de Sephadex G50 não foi eficaz (SUGISAKI et al., 1984).

A toxina de *Candida* SW-55 foi purificada por YOKOMORI et al. (1988b). Inicialmente a toxina bruta foi eluída em coluna de troca-iônica- CM-Sepharose, apresentando dois picos com atividade “killer” os quais foram designados de toxina I e II. Estas foram recromatografadas em coluna de filtração em gel de Sepharose CL-6B separadamente. As toxinas I e II foram purificadas 20700 vezes e 11100 vezes a partir do sobrenadante, respectivamente. Cada toxina purificada apresentou marcadamente uma banda de glicoproteína com peso molecular de 36 kDa em gel de eletroforese SDS-PAGE.

RADLER et al. (1990) purificaram a toxina “killer” de *Hanseniaspora uvarum*. O sobrenadante foi concentrado por ultrafiltração e a toxina foi posteriormente precipitada com etanol e eluída em coluna de troca-iônica. A proteína não apresentou carboidratos em sua estrutura e a eletroforese de SDS-PAGE indicou um peso molecular de cerca de 18 kDa. Os autores também verificaram que o sítio primário de ligação desta toxina na parede celular das leveduras sensíveis, é o  $\beta(1-6)$ D-glucana.

Toxinas “killer” de duas linhagens halofílicas de *Hansenula anomala* foram purificadas por ultrafiltração, cromatografia de troca-iônica seguida de

cromatografia de filtração em gel (KAGIYAMA et al., 1988). O peso molecular das toxinas foram estimados em cerca de 300 kDa por filtração em gel Sepharose CL-6B. Ambas são glicoproteínas e apresentaram pontos isoelétricos distintos, pH 2,9 e 3,6. A composição aminoacídica também foi diferente.

KASAHARA et al. (1994a e b) purificaram a toxina “killer” HM-1 produzida por *Hansenula mrakii* IFO.0895 que inibe o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae*. O sobrenadante concentrado por ultrafiltração foi pré-purificado em coluna de Sephadex G50 e, posteriormente as frações, contendo a proteína, foram eluídas em coluna SP-2SW (4,6 mm- 25 cm) da Tosoh, em tampão fosfato de sódio 25 mM pH 5,8 utilizando cromatografia líquida de alta pressão. A preparação da toxina HM-1 mostrou-se homogênea em SDS-PAGE.

A toxina “killer” KP6 produzida por *Ustilago maydis* foi parcialmente purificada por GINZBERG & KOLTIN (1994), a partir do meio mínimo de crescimento, através de cromatografia de troca-iônica- CM Sephadex C25, seguida de cromatografia de filtração em gel- Sephadex G50 e posteriormente eluída por cromatografia líquida de alta pressão HPLC- coluna analítica de fase reversa C4 VYDAC. Esta toxina consiste de duas cadeias polipeptídicas  $\alpha$  (8,6 kDa) e  $\beta$  (9,1 kDa) sem ligações covalentes ou pontes de hidrogênio entre elas.

A toxina SMK (salt-mediated killer toxin), produzida pela levedura halotolerante *Pichia farinosa*, foi purificada por precipitação do sobrenadante com sulfato de amônio e cromatografia em coluna SP- e Butyl-Toyopearl. A eletroforese revelou dois polipeptídeos (4 kDa e 8 kDa) os quais não se encontram ligados por pontes dissulfeto na estrutura ativa da toxina (SUZUKI & NIKKUNI, 1994).

## 3. Materiais e Métodos

---

### 3.1. Linhagens

As leveduras utilizadas neste estudo, foram as linhagens “killer” *Saccharomyces cerevisiae* Y500-4L e *Hansenula* sp Y66-1, ambas isoladas por NASCIMENTO em 1994 a partir de amostras de frutas, caldo e mosto de usinas produtoras de álcool. Como linhagens sensíveis foram usadas as leveduras de fermentos comerciais Fleischmann e Itaiquara, e a levedura “killer” padrão K11 *Torulopsis glabrata* ATCC 15126. As linhagens de leveduras padrões “killer” utilizadas neste estudo estão citadas na Tabela 1.

### 3.2. Meios de cultura

#### 3.2.1. Extrato de levedura e malte (YM)

extrato de levedura	0,3%
extrato de malte	0,3%
peptona	0,5%
glicose	1,0%
acrescido ou não de ágar	2,0%

#### 3.2.2. YEPD-MB

extrato de levedura	1,0%
peptona	2,0%

glicose	2,0%
acrescido ou não de ágar	2,0%

Após esterilização do meio a 121 °C por 15 minutos, adicionou-se 10 ml de tampão citrato-fosfato 1M, pH 4,5 e 1 ml de solução 1% de azul de metileno, previamente esterilizados.

### **3.3. Teste preliminar**

A atividade “killer” das leveduras foi detectada pelo método de WOODS & BEVAN (1968) modificado, o qual se baseia no halo de inibição de crescimento da linhagem sensível causado pela produção de toxina pela linhagem “killer”.

#### **3.3.1. Inoculação das linhagens**

As leveduras padrões K1, K2, K3 e K11, os dois isolados (Y500-4L e Y66-1) e os fermentos Fleischmann e Itaiquara foram inoculados em 3 placas de petri contendo meio YEPD-MB. A inoculação foi feita com alça de níquel cromo onde a massa celular foi inoculada na forma de ponto. As placas foram incubadas por 48 horas a 25 °C.

#### **3.3.2. Linhagens aspergidas**

As leveduras usadas como sensíveis neste experimento foram os fermentos Fleischmann e Itaiquara e a levedura padrão K11. As linhagens foram inoculadas separadamente em 3 frascos Erlenmeyers de 125 ml contendo 50 ml de meio YM líquido e incubados por 48 horas a 25 °C.

Decorrido o período de incubação, cada meio líquido fermentado foi diluído 10 vezes, sendo que 100 ml da suspensão diluída foi transferida assepticamente para frasco nebulizador estéril. Cada suspensão foi aspergida sobre uma das 3 placas onde as linhagens a serem testadas haviam sido inoculadas. Neste estudo as leveduras padrões, os isolados e os fermentos comerciais foram testados simultaneamente frente uns aos outros. As placas foram incubadas por mais 48 horas a 25 °C. Foram analisados a presença ou ausência de halo “killer” típico.

### **3.4. Perfil de atividade “killer”**

(Teste de reatividade cruzada frente a padrões “killer”)

#### **3.4.1. Inoculação das linhagens**

As leveduras padrões K1 a K11 e os dois isolados (Y500-4L e Y66-1) foram inoculados em 13 placas de petri contendo meio YEPD-MB. A inoculação foi feita com alça de níquel cromo onde a massa celular foi inoculada na forma de ponto. As placas foram incubadas por 48 horas a 25 °C.

#### **3.4.2. Linhagens aspergidas**

As leveduras padrões K1a K11 e os dois isolados (Y500-4L e Y66-1) foram inoculados separadamente em 13 frascos Erlenmeyers de 125 ml contendo 50 ml de meio YM líquido e incubados por 48 horas a 25 °C.

Decorrido o período de incubação, cada meio líquido fermentado foi diluído 10 vezes, sendo que 100 ml da suspensão foi transferida para frasco nebulizador estéril. Cada suspensão foi aspergida sobre uma das 13 placas previamente

inoculadas com as leveduras a serem testadas; de modo que as leveduras padrões e os isolados fossem testados simultaneamente frente uns aos outros. As placas foram incubadas por mais 48 horas a 25 °C. Foram analisadas a presença ou ausência de halo “killer” típico.

### **3.5. Extração e detecção de plasmídeo de RNA fita dupla (dsRNA) das leveduras “killer”**

A extração foi feita pelo método de GOTO et al. (1990b) modificado, conforme descrito a seguir:

#### **3.5.1. Extração do dsRNA**

As linhagens padrões K1, K2 e K3 e os isolados Y500-4L e Y66-1 foram crescidos por 48 horas a 25 °C, em meio líquido YEPD (= YEPD-MB sem azul de metileno). Após o crescimento, as células foram separadas por centrifugação a 4000 rpm por 6 minutos. Cada massa celular foi transferida para tubos eppendorfs (1,5 ml) estéreis e lavada com 1 ml de EDTA 50 mM pH 8,0. Centrifugou-se novamente, a 5000 rpm por 10 minutos em microcentrífuga, sendo descartado o sobrenadante. A massa celular foi, em seguida, lavada com 600 µl de tampão de extração (EDTA 25 mM + 1 % SDS + Tris-HCl 200 mM, pH 8,0 + 0,25 M NaCl). Agitou-se, invertendo manualmente cada tubo eppendorf por 10 minutos. Os tubos foram incubados em banho-maria a 60 °C por 1 hora. Centrifugou-se a 5000 rpm, por 10 minutos, em microcentrífuga e transferiu-se o sobrenadante para outro tubo eppendorf. O sobrenadante foi tratado diversas vezes com solução fenólica para extração de proteínas e outras impurezas como descrito a seguir. Adicionou-se 500 µl de fenol saturado em Tris-HCl e agitou-se invertendo manualmente por 30 minutos. Centrifugou-se a 10000 rpm por 5 minutos em microcentrífuga. A parte superior foi transferida para outro tubo eppendorf e tratada novamente com 600 µl

de fenol saturado em Tris-HCl. O tubo foi agitado manualmente por 10 minutos e centrifugado mais uma vez, transferindo-se a parte superior para outro eppendorf. A mesma operação foi repetida utilizando-se 600 µl de fenol-clorofórmio (1:1) e 600 µl de clorofórmio apenas. A parte superior foi transferida para outro tubo eppendorf e adicionou-se isopropanol 1:1, agitando-se cerca de 20 vezes. Centrifugou-se a 10000 rpm, por 5 minutos, em microcentrífuga. Eliminou-se a fase líquida e verteu-se o tubo para secar. Posteriormente, as amostras foram ressuspendidas em 50 µl de tampão TE. Deixou-se durante 24 horas na geladeira.

### 3.5.2. Preparo do gel de agarose

Gel: agarose 1,0% dissolvida em tampão TAE (1X) .

Padrão molecular de bandas: λ Hind III.

Mistura: 20 µl de amostra + 4 µl de tampão de amostra para corrida (1X)

Condições de corrida: 75 Volts; 0,7 Amperes por 2 horas.

Corante: 3 µl da solução de Brometo de etídio para 100 ml de água destilada.

Corou-se por 20 minutos. O peso molecular das bandas foi estimado pela regressão linear obtida a partir das distâncias percorridas pelos fragmentos do lambda, pelo log de seus respectivos pesos moleculares.

### 3.5.3. Soluções estoques usadas:

#### 3.5.3.1. Tampão TAE (solução 50X)

Tris -base	242 g
ácido acético glacial	57,1 ml
EDTA 0,5 M, pH 8,0	100 ml

### 3.5.3.2. Tampão TE

Tris -HCl 1M, pH 8,0	1 ml
EDTA 0,5 M, pH 8,0	0,2 ml
água destilada (q.s.p.)	100 ml

### 3.5.3.3. Solução para preparação da amostra (solução 6X)

azul de bromofenol	250 mg
ficoll	15 g
água MilliQ	100 ml

### 3.5.3.4. Solução de Brometo de etídio a 1%

## **3.6. Capacidade de perda do fenótipo “killer”** (Teste de Cura)

### *3.6.1. Tratamento com cicloheximida ou tratamento térmico*

O teste de Cura foi feito por cicloheximida e/ou temperatura; pelo método de KITANO et al. (1984), conforme descrito a seguir:

As linhagens K1, Y500-4L e Y66-1 foram crescidas por 24 horas a 25 °C em frascos Erlenmeyers de 50 ml contendo 10 ml de meio YM líquido. O meio líquido fermentado foi diluído 100 vezes em tubo contendo 5 ml de água destilada estéril, obtendo-se  $10^6$  células por ml. Aliquotas de 10  $\mu$ l de cada suspensão, foram espalhadas em ágar YM contendo ou 0,2 ppm de cicloheximida ou incubadas em placas a 37, 38,5 e 40 °C (além do controle a 25 °C). Após 3 dias,

cada colônia foi transferida e incubada em ágar YM. Posteriormente, foram transferidas para o ágar YEPD-MB (replica plated), aspergindo-se a linhagem sensível Fleischmann ou K11 sobre a placa. Após 48 horas a 25°C, as linhagens curadas, que perderam a atividade “killer”, foram detectadas.

### **3.6.2. Regeneração do fenótipo “killer”**

A capacidade de regeneração do fenótipo “killer” das colônias puras isoladas durante o tratamento de “cura” da linhagem de *S. cerevisiae* Y500-4L a 40 °C e por cicloheximida, foi testada após 5 meses de manutenção a 8 °C em meio YEPD e com vaselina líquida estéril sobre o meio de cultura, como descrito no item 3.3. utilizando-se a linhagem Fleischmann como linhagem sensível. A presença de dsRNA nas linhagens curadas com tratamento térmico a 40 °C, curada por cicloheximida e linhagem parental foi testada como descrito no item 3.5.

## **3.7. Produção da toxina “killer” bruta**

As linhagens K1 e Y500-4L foram crescidas por 36 horas a 25 °C em frascos Erlenmeyers de 250 ml contendo 100 ml de meio líquido YEPD (sem azul de metileno). As células foram separadas por centrifugação a 1000 rpm, por 10 minutos a 4 °C.

### **3.7.1. Concentração**

Os sobrenadantes foram concentrados por ultrafiltração (unidade AMICON) através de membrana YM 10 (retenção acima de PM 10.000 Da) a 15°C, sob

pressão (0,36 kgf/cm<sup>2</sup>). Concentrou-se 10 vezes. As toxinas foram em seguida esterilizadas em membrana de 0,45 µm.

### **3.8. Condições ótimas de atividade da toxina bruta**

Os ensaios de pH e temperatura ótimos de atividade da toxina foram determinados como descrito a seguir:

As amostras K1 e Y500-4L obtidas de acordo com o item 3.7., foram diluídas em tampão citrato-fosfato 1M pH 3,5 , 3,8 , 4,1 , 4,5 , 4,9 e 5,4. Alíquotas de 200 µl de cada amostra foram aplicadas em cilindros de aço inox (100 mm de altura X 8 mm de diâmetro X 6 mm de diâmetro interno), dispostos em placas com 10 ml de ágar YEPD-MB aspergidas com a linhagem sensível Fleischmann, cujo meio estava no mesmo pH da amostra (método de cilindros). Foram feitas cinco placas de cada pH e incubadas a 8 , 16 , 22 , 25 ou 30 °C, por 48 horas.

### **3.9. Efeito do pH na estabilidade da toxina bruta**

A amostra concentrada de Y500-4L obtida de acordo com o item 3.7. foi titulada com NaOH ou HCl até atingir o pH 2,0 , 3,0 , 3,5 , 3,8 , 4,1 , 4,5 , 4,9 , 5,4 , 6,0 , 7,0 ou 8,0. As alíquotas foram incubadas por 24 horas nas seguintes condições: -10 °C, 8 °C e a 25 °C. Após o período de incubação, a atividade “killer” foi medida pelo método de cilindros no pH 4,1 e temperatura de 25 °C, após 48 horas de incubação como descrito no item 3.8.

### **3.10. Termoestabilidade da toxina bruta**

A amostra de toxina “killer” da linhagem de *S. cerevisiae* Y500-4L concentrada de acordo com o item 3.7., foi ajustada para pH 4,1. Alíquotas foram incubadas nas seguintes condições: 8 °C , 25 °C , 30 °C e 40 °C. Amostras foram retiradas em intervalos de 30 minutos, até 4 horas. A atividade “killer” foi medida pelo método dos cilindros no pH 4,1 e temperatura de 25 °C, após 48 horas de incubação como descrito no item 3.8.

### **3.11. Efeito do tempo de incubação da linhagem de *S. cerevisiae* Y500-4L na produção ótima de toxina “killer”**

A linhagem Y500-4L foi crescida em meio líquido YEPD (sem azul de metileno) a 25 °C . Triplicatas de 40 ml de meio de cultura fermentado, foram analisadas após 3, 9, 16, 21, 24, 27, 32, 40, 45 e 51 horas de crescimento. As amostras foram centrifugadas a 5000 rpm por 10 minutos. A atividade “killer” foi medida pelo método de cilindros no pH 4,1 e temperatura de 25 °C, após 48 horas de incubação como descrito no item 3.8. A massa celular foi submetida a três lavagens sucessivas com 40 ml de água destilada nas mesmas condições de centrifugação descritas acima e o crescimento do microrganismo foi determinado pela massa seca após 48 horas em estufa a 105 °C. O pH das amostras também foi monitorado.

### **3.12. Estudo do método de obtenção da toxina “killer” do sobrenadante do meio de cultura**

Para o estudo da concentração e recuperação da toxina “killer” do sobrenadante do meio de cultura, a linhagem de levedura *S. cerevisiae* Y500-4L foi inoculada em frasco Erlenmeyer de 250 ml contendo 100 ml de meio líquido YEPD (sem azul de metileno). Após 24 horas de incubação a 25 °C, cinco porções de 10 ml foram transferidos para 5 frascos Erlenmeyers de 250 ml contendo 90 ml de meio líquido YEPD. Os frascos foram incubados sem agitação a 25 °C durante 24 horas. As amostras foram centrifugadas a 5000 rpm por 10 min a 4 °C. Os passos subsequentes de precipitação e concentração foram desenvolvidos em temperatura baixa (8 °C). Alguns tratamentos foram estudados:

#### **3.12.1. Precipitação da toxina “killer” com polipropileno glicol**

Para o teste de precipitação da toxina “killer” do sobrenadante do meio de cultura com polipropileno glicol, usou-se a proporção 1:1 (v/v) (sobrenadante:solução 50% de polipropileno glicol em água destilada). A mistura de 200 ml, foi incubada a 8 °C, por 24 horas e em seguida centrifugada a 12000 rpm por 15 minutos. O precipitado foi então ressuspendido em 5 ml de tampão citrato-fosfato 0,1 M, pH 4,1, e a atividade “killer” foi medida pelo método de cilindros no pH 4,1 e temperatura de 25 °C, após 48 horas de incubação como descrito no item 3.8.

#### **3.12.2. Precipitação da toxina “killer” com etanol ou acetona**

A obtenção de toxina “killer” do sobrenadante do meio de cultura foi testada com etanol ou acetona na proporção 2:1(v/v) (solvente:sobrenadante). O

solvente previamente resfriado, foi adicionado a 100 ml de meio de cultura obtido no item 3.12. As amostras de 300 ml cada foram, logo em seguida, centrifugadas a 12000 rpm por 15 min. O precipitado foi então ressuspensionado em 5 ml de tampão citrato-fosfato 0,1 M pH 4,1, e a atividade “killer” foi medida pelo método de cilindros no pH 4,1 e temperatura de 25 °C, após 48 horas de incubação como descrito no item 3.8.

### *3.12.3. Precipitação da toxina “killer” com sulfato de amônio*

Foram dissolvidas, cuidadosamente, 56 g de sulfato de amônio em 100 ml do sobrenadante do meio de cultura (80% de saturação), com auxílio de um agitador magnético. Após 24 horas de repouso a 8 °C, a amostra foi centrifugada a 12 000 rpm por 15 min. O precipitado foi então ressuspensionado em 2 ml de tampão citrato-fosfato 0,1 M pH 4,1, dialisado contra água (em membrana de celulose de retenção de proteínas maiores que 12,4 kDa) durante 48 horas a 8 °C e o volume completado para 5 ml. A atividade “killer” foi medida pelo método de cilindros no pH 4,1 e temperatura de 25 °C, após 48 horas de incubação como descrito no item 3.8.

### *3.12.4. Concentração da toxina “killer” através de ultrafiltração*

Uma alíquota de 100 ml de sobrenadante do meio de cultura foi concentrada por ultrafiltração (unidade AMICON) a 8 °C através de membrana YM10 (capacidade de retenção de acima de 10 kDa). A atividade “killer” foi medida pelo método de cilindros no pH 4,1 e temperatura de 25 °C, após 48 horas de incubação como descrito no item 3.8.

### **3.13. Purificação da toxina “killer” de *S. cerevisiae* Y500-4L**

#### **3.13.1. Produção da toxina “killer” extracelular**

A linhagem de levedura “killer” Y500-4L, para a produção da toxina extracelular, foi inicialmente inoculada em 100 ml de meio líquido YEPD (sem azul de metileno) e crescida a 25 °C durante 24 horas. Inoculou-se 10% deste pré-inóculo, em 2 frascos Erlenmeyers com 300 ml de YEPD. Os frascos foram incubados sem agitação a 25 °C durante 24 horas. Em seguida as células foram removidas por centrifugação a 5000 rpm, por 10 min., a 4 °C. Este e os passos subsequentes foram desenvolvidos em temperatura baixa.

#### **3.13.2. Concentração da toxina “killer”**

O sobrenadante do meio de cultura foi filtrado em membranas Millipore de 0,45 e 0,22 µm sucessivamente, sob pressão. A amostra de 660ml foi concentrada por ultrafiltração utilizando a unidade de ultrafiltração MINITAN (Millipore) com membrana com capacidade de retenção de moléculas maiores que 10 kDa, sob pressão de 60 Kpa a 23 °C. O concentrado (aproximadamente 36 ml) foi novamente esterilizado em membrana de 0,45 µm e armazenado a -10 °C.

#### **3.13.3. Purificação da toxina “killer”**

A toxina “killer” foi purificada por cromatografia de filtração em gel de Sepharose 6B (Pharmacia), como descrito por ZHU et al., 1987. O gel foi equilibrado com tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,7. Uma amostra de 20 ml da toxina concentrada obtida pelo item 3.13.2., foi aplicada na coluna de 2,5 x 35 cm, mantida a 8 °C. Frações de 3 ml foram coletadas na vazão de 0,2 ml/min. O curso da eluição das proteínas foi acompanhado pela medida da absorbância a 280

nm no espectrofotômetro Beckman DU-70. As frações que apresentaram absorvância neste comprimento de onda, foram analisadas quanto a atividade da toxina “killer” em pH 4,1 e temperatura de 25 °C, após 48 horas de incubação como descrito no item 3.8. As alíquotas que apresentaram atividade foram concentradas novamente por ultrafiltração em membrana AMICON YM10 (capacidade de retenção de proteínas maiores que 10 kDa) até 20 ml. Essa amostra foi eluída mais uma vez na mesma coluna de Sepharose 6B.

### **3.14. Determinação do Peso Molecular da toxina “killer”**

#### **3.14.1. Filtração em gel Sephadex G-100.**

O peso molecular da toxina “killer” produzida pela linhagem de *S. cerevisiae* Y500-4L foi estimado por filtração em gel Sephadex G-100, utilizando-se coletor de frações com registrador automático da marca ISCO. O gel foi equilibrado em tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 7,5 contendo KCl 0,1M (WHITAKER, 1963). Foram dissolvidas 8 mg, 6 mg e 20 mg, respectivamente, das proteínas citocromo C (12,4 kDa), anidrase carbônica (29 kDa) e albumina bovina (66 kDa), todas padrões de peso molecular de gel filtração SIGMA MW-GF 200, em 2 ml do tampão Tris-HCl contendo 5% de glicerol. A mistura foi eluída em coluna de 2,5 X 85 cm, utilizando-se como frente de eluição 10 mg de Blue Dextran 2.000 diluído no tampão Tris-HCl com 5% de glicerol. Uma amostra de 5 ml da toxina “killer” purificada de acordo com o item 3.12.3. contendo 1,13 mg de proteína, foi eluída na mesma coluna, todos na vazão de 0,16 ml/min. Frações de 3 ml foram coletadas e monitoradas a 280 nm no espectrofotômetro Beckman DU-70. O peso molecular da proteína “killer” foi estimado pela regressão linear obtida a partir da curva de calibração  $V_e/V_o$  (volume de eluição

das proteínas padrões/volume vazio o qual é o volume de eluição do Blue Dextran) X log do peso molecular destas proteínas.

### **3.14.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida - (SDS-PAGE)**

A eletroforese da toxina “killer” foi realizada de acordo com o procedimento descrito por LAEMMLI (1970), utilizando-se gel de separação 12% e gel de concentração 5% de acrilamida. A eletroforese foi conduzida a temperatura ambiente, em cuba vertical, sistema Mini Protean II-BIORAD, empregando-se corrente de [120V], 20mA, 2W/placa de gel, por 1 hora. Foram aplicados 57 µg de amostra e utilizadas as proteínas padrões (2 µl)-padrão SIGMA SDS6: albumina bovina 66 kDa, albumina de ovo 45 kDa, Tripsinogênio 34,7 kDa, Pepsina 20 kDa, Lactoglobulina 18,4 kDa, Lisozima 14,3 kDa. Utilizou-se o corante Coomassie Blue G250 para a coloração das proteínas.

### **3.15. Caracterização da toxina “killer” purificada**

A toxina “killer” de Y500-4L, purificada de acordo com os procedimentos descritos no item 3.13. foi utilizada para o estudo de pH de estabilidade e termoestabilidade.

#### **3.15.1. Efeito do pH na estabilidade da toxina**

A toxina purificada foi incubada a -10 °C durante 24 horas nos seguintes valores de pH 2,0 , 3,0 , 3,5 , 3,8 , 4,1 , 4,5 , 4,9 , 5,4 , 6,0 , 7,0 ou 8,0. Após

o período de incubação, o pH das alíquotas foi ajustado para 4,1 e a atividade residual da toxina “killer” foi determinada como descrito no item 3.9.

### *3.15.2. Efeito da temperatura na estabilidade da toxina*

A toxina parcialmente purificada foi ajustada para pH 4,1 e as alíquotas foram incubadas a 8 °C, 25 °C, 30 °C e 40 °C. As amostras foram retiradas em intervalos de 30 minutos até 4 horas, e a atividade residual determinada como descrito no item 3.10.

## 4. Resultados e Discussão

---

### 4.1. Teste preliminar de atividade “killer”

Em teste preliminar, verificou-se que a linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* Y500-4L apresentou alta atividade “killer” contra os fermentos Fleischmann e Itaiquara, mostrando assim vantagem seletiva sobre linhagens comerciais. Também apresentou atividade “killer” contra a linhagem *Torulopsis glabrata* ATCC 15126, produtora de toxina “killer” K11. Esta última, foi capaz de matar as leveduras Fleischmann e Itaiquara. A linhagem de *Hansenula* sp. Y66-1 não foi capaz de matar as leveduras comerciais Fleischmann e Itaiquara, possuindo atividade “killer” apenas frente a linhagem “killer” padrão K11, usada neste caso como sensível. A linhagem K1 (*S. cerevisiae* KL88) foi capaz de matar as leveduras Fleischmann e Itaiquara com menor intensidade que a linhagem *S. cerevisiae* Y500-4L. Já as linhagens padrões K2 (*S. diastaticus* NCYC 713) e K3 (*S. capensis* NCYC 761) mataram apenas a levedura Itaiquara, mas não mostraram atividade “killer” contra a levedura Fleischmann e o padrão K11 (Tabela 2). A atividade “killer” foi evidenciada através do halo de inibição de crescimento da levedura sensível em torno da levedura “killer” (Figura 1).

### 4.2. Perfil de atividade “killer”

As linhagens foram avaliadas quanto a atividade “killer” que possuíam frente umas as outras como descrito no item 3.4. A Tabela 3 mostra que a linhagem de *S. cerevisiae* Y500-4L, matou as leveduras padrões “killer” K2 (*S.*

*diastaticus* NCYC 713), K4 (*Candida glabrata* NCYC 388) e K11 (*Torulopsis glabrata* ATCC 15126). Mostrou ser sensível as toxinas produzidas pelas leveduras padrões “killer” K8 (*Hansenula anomala* NCYC 435), K9 (*Hansenula mrakii* NCYC 500), K10 (*Kluyveromyces drosophilarum* NCYC 575) e K11 (*Torulopsis glabrata* ATCC 15126). A linhagem de *S. cerevisiae* Y500-4L mostrou-se neutra as linhagens K1 (*S. cerevisiae* KL88), K2 (*S. diastaticus* NCYC 713), K3 (*S. capensis* NCYC 761), K4 (*Candida glabrata* NCYC 388), K5 (*Debaryomyces vanrij* NCYC 577), K6 (*Kluyveromyces marxianus* NCYC 587), K7 (*Pichia membranaefaciens* NCYC 333) e *Hansenula* sp Y66-1. Cada linhagem “killer” foi imune a ação de sua própria toxina.

Segundo NASCIMENTO (1994), a linhagem *S. cerevisiae* Y500-4L apresentou atividade “killer” contra as linhagens K2, K3, K4, K5, Fleischmann e Itaiquara, o que está de acordo com os resultados obtidos neste trabalho.

A linhagem Y500-4L, apresentou perfil de atividade “killer” similar a linhagem padrão K1. Entretanto, a linhagem Y500-4L apresentou um perfil de sensibilidade diferente em relação a linhagem padrão K1. A Tabela 3 mostra que a linhagem Y500-4L foi morta por K8, K9, K10 e K11, enquanto que a linhagem “killer” padrão K1, foi morta pelas linhagens K2, K3, K5, K8, K9, K10 e K11. Desta forma, a linhagem Y500-4L não pode ser classificada como levedura “killer” K1. O perfil de atividade das linhagens utilizadas neste estudo não pode ser comparado com a classificação proposta por YOUNG & YAGIU em 1978, visto que algumas linhagens padrões “killer” foram diferentes e as condições experimentais de pH e temperatura também não foram iguais.

As placas aspergidas com as linhagens K3 e K5 (utilizadas como sensíveis) não cresceram de forma adequada, não tendo sido possível verificar o halo de inibição das colônias inoculadas, nas condições experimentais.

#### **4.3. Extração e detecção de plasmídeo de RNA fita dupla (dsRNA) nas leveduras “killer”**

A extração e detecção de dsRNA das leveduras “killer” foi realizada como descrito no item 3.5.

A Figura 2 mostra que as leveduras *S. cerevisiae* padrões “killer” K1, K2, K3 apresentaram duas espécies de dsRNA (L e M-dsRNA) como descrito por YOUNG & YAGIU (1978). As linhagens K1, K2 e K3 apresentaram L-dsRNA de 5,0 Kb; a linhagem K1 apresentou M1-dsRNA de 1,8 Kb enquanto que as linhagens K2 e K3 mostraram M2 e M3-dsRNA de 1,4 Kb aproximadamente (Tabela 4).

A linhagem “killer” *S. cerevisiae* Y500-4L apresentou L-dsRNA de 5,0 Kb, porém, não apresentou M-dsRNA, sendo similar às linhagens de *S. cerevisiae* isoladas de vinícolas japonesas por KITANO et al. (1994), que apesar de apresentarem atividade “killer” não possuíam plasmídeo de M-dsRNA.

Segundo FIELD et al. (1982), o plasmídeo de L-dsRNA de leveduras do gênero *Saccharomyces* apresenta cerca de 4,8 Kb e o M1-dsRNA cerca de 1,9 Kb.

Segundo a revisão feita por WICKNER em 1992, vários autores relataram que o L-dsRNA e o M-dsRNA de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* possuem cerca de 4,6 Kb e 1,0-1,8 Kb, respectivamente. BROWN et al. (1994) também citaram que o plasmídeo L-dsRNA e M1-dsRNA de *S. cerevisiae*, apresentam cerca de 4,6 Kb e 1,8 Kb, respectivamente.

A Figura 2 também ilustra que a linhagem *Hansenula* sp. Y66-1 não apresenta L-dsRNA nem M-dsRNA e mostra somente DNA total. De acordo com KAGIYAMA et al. (1988), o caráter “killer” de leveduras *Hansenula* é codificado por gene cromossomal.

#### **4.4. Cura do fenótipo “killer”**

##### **4.4.1. Tratamento com cicloheximida ou tratamento térmico**

O teste de cura do fenótipo “killer” ou perda da atividade “killer” foi realizado como descrito no item 3.6.1. A levedura Fleischmann foi utilizada como sensível para verificar a perda do fenótipo “killer” das linhagens *S. cerevisiae* KL88 (padrão K1) e *S. cerevisiae* Y500-4L, enquanto que a levedura padrão K11 *Torulopsis glabrata*, foi empregada como linhagem sensível nos testes de perda do fenótipo “killer” da linhagem *Hansenula* sp Y66-1 porque esta última não mata a linhagem Fleischmann.

A Tabela 5 ilustra que a levedura padrão “killer” K1 foi curada após tratamento térmico a 37 e 38,5 °C, sendo obtido respectivamente 75% e 95% de cura. O aumento da temperatura de 37 °C para 38,5 °C resultou em aumento da porcentagem de cura, o que era esperado tendo em vista que a levedura padrão

“killer” K1 possui plasmídios L e M-dsRNA. A Figura 3A mostra que a levedura “killer” K1 perdeu a capacidade de matar a levedura sensível, ou seja foi curada, após tratamento a 38,5 °C. A levedura não cresceu na presença de 0,2 ppm de cicloheximida e nem a 40 °C.

A linhagem de *S. cerevisiae* Y500-4L apresentou maior resistência à cicloheximida do que a linhagem de *S. cerevisiae* “killer” K1. Foi obtido 55% de cura do fenótipo “killer”, após tratamento da linhagem Y500-4L com 0,2 ppm de cicloheximida. A linhagem também mostrou maior resistência à temperatura do que K1 e *Hansenula* sp. Y66-1. A linhagem Y500-4L não foi curada após tratamento de 37 °C e 38,5 °C (Figura 3B e 4) e apresentou 40% de cura em temperatura de 40 °C (Tabela 5). Após tratamento da linhagem Y500-4L a 40 °C ou cicloheximida, o crescimento foi lento (depois de 5 dias) sendo obtido colônias pequenas em ambos os casos.

As linhagens “killer” de *S. cerevisiae* Y-6 e Y-9 descobertas por KITANO et al. (1984), as quais não possuem o plasmídio M-dsRNA como a linhagem *S. cerevisiae* Y500-4L, também foram tratadas com 0,2 ppm de cicloheximida e crescidas em temperaturas elevadas (40 °C). Ambas não apresentaram cura após 3 dias de crescimento no tratamento com cicloheximida nem a 40 °C.

A linhagem *Hansenula* sp Y66-1 não foi curada após tratamento com 0,2 ppm de cicloheximida (Tabela 5 e Figura 5). O caráter “killer” de leveduras do gênero *Hansenula* é codificado por genes cromossomais e não há perda do fenótipo após tratamento térmico ou com reagentes como cicloheximida (KAGIYAMA et al., 1988). A linhagem Y66-1 não cresceu em temperatura superior a 37 °C.

#### 4.4.2. Regeneração do fenótipo

O estudo de regeneração do fenótipo “killer” das colônias de *S. cerevisiae* Y500-4L curadas após tratamento térmico a 40 °C ou por cicloheximida, foi realizado como descrito no item 3.6.2.

A colônia tratada por temperatura alta apresentou regeneração, voltando a possuir o fenótipo “killer”. Entretanto a produção da toxina foi menor comparada a linhagem “killer” original. Em contraste, as colônias curadas com cicloheximida não mostraram regeneração do fenótipo “killer”. A Figura 6 ilustra estes resultados.

A detecção de dsRNA das culturas curadas com tratamento térmico a 40 °C ou cicloheximida e a linhagem parental, foi testada como descrito no item 3.5. A espécie L-dsRNA de maior peso molecular foi detectada nas três culturas de microrganismos examinadas, mas não foi detectado o plasmídeo “killer” M-dsRNA no gel de agarose. A linhagem de *S. cerevisiae* Y500-4L mostrou resistência a cura por tratamento térmico mas não por tratamento com cicloheximida. Este resultado sugere que a produção da toxina na linhagem Y500-4L é diferente das linhagens “killer” padrões de leveduras do gênero *Saccharomyces*, no qual a toxina “killer” é codificada por plasmídeo M-dsRNA. É muito similar à linhagem *S. cerevisiae* Y-9 descoberta por KITANO et al. (1984), que não apresenta M-dsRNA e mostra resistência à cura por tratamento com cicloheximida e incubação em temperatura alta. O gene “killer” desta linhagem Y-9 foi descrito como codificado por DNA cromossomal sendo que um gene designado KHR foi encontrado no cromossomo IX e outro, designado KHS, no cromossomo V (GOTO et al., 1990a).

BOONE et al. (1990) verificaram que é possível inserir genes que codificam a toxina K1 no genoma de leveduras “killer” classificadas como K2. Os autores integraram os genes no cromossomo da levedura K2 e demonstraram sua maior estabilidade em relação a genes presentes em plasmídios.

#### **4.5. Condições ótimas de atividade da toxina “killer” bruta**

O estudo do pH e da temperatura ótima de atividade da toxina “killer” foi determinada como descrito no item 3.8.

A Figura 7 ilustra que a atividade máxima da toxina “killer” de *S. cerevisiae* Y500-4L foi verificada em pH 4,5 a 22 °C e a Figura 8B mostra que a toxina da linhagem Y500-4L apresenta maior atividade do que a toxina da linhagem padrão K1 *S. cerevisiae* KL88. Esta última apresentou maior atividade em pH 4,1.

Na temperatura de 25 °C as toxinas da linhagem Y500-4L e do padrão K1 apresentaram maior atividade em pH 4,1, como ilustrado na Figura 8C. Na temperatura de 30°C, a toxina de Y500-4L apresentou baixa atividade “killer” em meio sólido, sendo observado maior atividade em pH 3,5 enquanto que a toxina de K1 não mostrou atividade na faixa de pH 3,5-5,4 (Figura 8D).

Observou-se que na temperatura de 16 °C a toxina de Y500-4L atuou em faixa mais ampla de pH 3,8-4,9. Nesta temperatura, a linhagem sensível Fleischmann aspergida sobre o meio de cultura mostrou menor crescimento do que a 22 °C e 25 °C (Figura 7 e 8A). A incubação a 8 °C (geladeira) não foi adequada para se avaliar a atividade das toxinas, visto que a levedura sensível Fleischmann não cresce o suficiente para visualização dos halos de inibição.

Nos experimentos de atividade “killer” da linhagem Y500-4L foram utilizadas as condições de pH 4,1 e temperatura de 25 °C de incubação por 48 horas. A temperatura de 25°C foi escolhida devido à disponibilidade de equipamentos de uso comum no laboratório e também para a comparação dos resultados descritos por KITANO et al. (1984), GOTO et al. (1991) e NASCIMENTO (1994).

MAULE & THOMAS (1973) relataram que as toxinas “killer” de leveduras de mosto de fermentação de cerveja, em que havia ocorrido a morte da cultura usada como fermento (ale e lager), mostraram-se altamente ativas em pH 3,8 - 4,2.

PFEIFFER & RADLER (1984) relataram que a toxina da linhagem *S. cerevisiae* K1 (D587-2A) apresentou atividade ótima em pH 4,7, enquanto que as toxinas das linhagens “killer” *S. cerevisiae* K2 (NCYC 738, NCYC 396 e NCYC 399), mostraram atividade ótima na faixa de pH 4,2-4,7. A toxina “killer” da linhagem *S. cerevisiae* 28 diferente das toxinas de *S. cerevisiae* descritas, mostrou atividade em pH 5,8. As toxinas “killer” de *Candida crusei* 392, *Pichia fermentans* 394 e *P. fermentans* 395 mostraram atividade ótima em pH 4,2.

A toxina “killer” de *Kluyveromyces lactis* apresentou atividade ótima na faixa de pH de 4,4 a 5,8 (WILSON & WHITTAKER, 1989).

#### **4.6. Efeito do pH na estabilidade da toxina bruta**

O efeito do pH na estabilidade da toxina bruta foi determinado como descrito no item 3.9. A Figura 9 ilustra os resultados.

A toxina apresentou estabilidade máxima na faixa de pH 3,8 a 4,5 e reteve 80% de atividade na faixa de pH de 2,0 a 3,5, após 24 horas de congelamento a -10 °C (freezer). Na temperatura de 8 °C (geladeira), a toxina reteve aproximadamente 50-60% da atividade após 24 horas de incubação na faixa de pH 2,0 a 5,4. Na temperatura de 25 °C a toxina reteve cerca de 35% de atividade após 24 horas de incubação na faixa de pH 2,0 a 4,5. A toxina foi completamente inativada em pH igual ou superior a 6,0 nas temperaturas de 8 °C e -10 °C; e em pH 5,4 após 24 horas de incubação a 25 °C. Na faixa de pH 6,0 a 8,0 a toxina foi inativada, comprovando assim sua instabilidade em pH mais alcalino. A toxina “killer” de *S. cerevisiae* Y500-4L deve ser armazenada na faixa de pH 3,8 a 4,5 em freezer (-10 °C) para evitar a desnaturação.

SHIMIZU et al. (1985) relataram que toxinas “killer” de *S. cerevisiae*, leveduras de vinho classificadas como K2, mostraram ser estáveis na faixa de pH 2,9 a 4,9, após 8 horas de incubação a 6 °C. Em pH 5,0, a estabilidade das toxinas diminuiu, e nenhuma atividade foi verificada em pH 5,4.

A toxina “killer” de *Saccharomyces* é reversivelmente inativada em pH 2,0 e irreversivelmente inativada em pH superior a 5,0. (PETERING et al., 1991, citado por BENÍTEZ et al., 1996).

#### **4.7. Termoestabilidade da toxina bruta**

O estudo referente à influência da temperatura na estabilidade da toxina bruta de *S. cerevisiae* foi realizado de acordo com o item 3.10.

A toxina “killer” de Y500-4L se manteve estável após 4 horas de incubação a 8 °C (geladeira) e a 25 °C, em pH 4,1. Na temperatura de 30 °C, a toxina reteve a atividade “killer” após 1 hora de incubação, entretanto, perdeu 50% de atividade no período de 2 horas e 30 minutos até 4 horas em pH 4,1. A toxina perdeu 80% de atividade após 30 minutos de tratamento a 40 °C em pH 4,1. A Figura 10 ilustra os resultados.

WOODS & BEVAN (1968) verificaram que a toxina “killer” produzida por leveduras do gênero *Saccharomyces* era inativada a 38 °C nos primeiros 30 minutos de incubação.

SHIMIZU et al. (1985) observaram que a estabilidade das toxinas “killer” produzida por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, isoladas de vinho, diminuía com o aumento da temperatura. Os autores verificaram que as toxinas eram estáveis a 6 °C e ocorria apenas uma pequena perda quando incubadas a 20 °C, após 10 dias. A 30 °C, o declínio era mais acentuado sendo que a 48 °C havia uma perda total da atividade após 30 minutos de incubação do meio de cultura fermentado.

#### **4.8. Efeito do tempo de incubação da linhagem *Saccharomyces cerevisiae* Y500-4L na produção ótima de toxina “killer”**

A determinação do tempo de incubação da linhagem *S. cerevisiae* Y500-4L para a produção ótima de toxina “killer” foi realizada de acordo com o item 3.11.

A Figura 11 mostra a relação entre tempo de fermentação, alteração de pH do meio de cultura, crescimento do microrganismo e produção da toxina “killer” a 25 °C.

A produção da toxina atingiu a atividade máxima (halo de 5 mm de diâmetro) após 24 horas de incubação, coincidindo com o final da fase exponencial de crescimento. Houve uma pequena diminuição do pH do meio nas primeiras 16 horas de fermentação, mantendo-se constante até as 51 horas finais.

#### ***4.9. Estudo do método de obtenção da toxina “killer” do sobrenadante do meio de cultura***

O estudo da extração da toxina “killer” do sobrenadante do meio de cultura foi realizado como descrito no item 3.12.

A ultrafiltração a baixa temperatura (8 °C), utilizando-se membrana de capacidade de retenção de proteínas maior que 10000 Da, foi o melhor método de extração da toxina “killer” do sobrenadante do meio de cultura.

As preparações de toxina obtidas por precipitação como polipropileno glicol, etanol e sulfato de amônio apresentaram atividade “killer” como ilustrado nas Figuras 12 e 13. A preparação de toxina obtida por precipitação com etanol apresentou maior atividade “killer” do que as preparações obtidas por precipitação com polipropileno glicol e sulfato de amônio, no entanto, após congelamento e posterior eluição na coluna de Sepharose 6B, não foi detectada atividade “killer”

nas frações eluídas. A preparação obtida através de precipitação com acetona, não apresentou atividade “killer” (Figura 12).

WOODS & BEVAN (1968) utilizaram sulfato de amônio para precipitar a toxina “killer” antes de ser eluída em coluna de filtração em gel. Os autores verificaram que o fracionamento com sulfato de amônio, não foi muito estável mas que podia ser estabilizado pela ressuspensão em um diluente contendo gelatina ou outras proteínas.

PALFREE & BUSSEY (1979) precipitaram a toxina “killer” com polipropileno glicol 30%, entretanto, a purificação não foi adequada. Mas ZHU et al. (1987) conseguiram resultados satisfatórios com este método de precipitação.

Alguns autores utilizaram a ultrafiltração para concentrar a toxina “killer” a partir do meio de cultura (SCHIMITT & RADLER, 1989; GOTO et al., 1990a; KAGIYAMA et al., 1988 entre outros). RADLER et al. (1990), após concentrarem o sobrenadante por ultrafiltração, utilizaram etanol para precipitar a toxina antes de eluir pela coluna cromatográfica.

#### **4.10. Purificação da toxina “killer” de *S. cerevisiae* Y500-4L**

A toxina “killer” da linhagem *S. cerevisiae* Y500-4L, foi purificada através de dois fracionamentos sucessivos em coluna de gel de Sepharose 6B como descrito no item 3.13. A Figura 14 ilustra o segundo fracionamento da toxina “killer” em coluna de gel de Sepharose 6B. A Tabela 6 ilustra que a toxina foi

purificada 215 vezes após ultrafiltração em membrana YM10 e dois fracionamentos em coluna de gel Sepharose 6B.

ZHU et al. (1987) purificaram a toxina “killer” da linhagem *S. cerevisiae* T158c/S14a, até a homogeneidade, através de duas etapas de filtração em colunas de gel Sepharose CL-6B. Na primeira etapa os autores utilizaram coluna de Sepharose CL-6B equilibrada em tampão acetato de sódio. As frações contendo a toxina foram dialisadas, concentradas e tratadas com tampão Tris-HCl 0,1M, pH 6,8 contendo 0,1% SDS. Os autores obtiveram a toxina purificada e inativa após fracionamento em segunda filtração em coluna de gel de Sepharose CL-6B.

#### **4.11. Determinação do Peso Molecular da toxina**

O peso molecular da toxina “killer” da linhagem de *S. cerevisiae* Y500-4L, foi estimado através de filtração em gel Sephadex G-100 e eletroforese em gel de SDS- poliacrilamida de acordo com o método descrito no item 3.14. As Figuras 15A e 15B ilustram respectivamente a eluição das proteínas padrões e da amostra em coluna de gel Sephadex G-100 e a relação entre  $V/V_0$  e  $\log PM$ . A Figura 16 ilustra a representação gráfica da eletroforese da toxina “killer” de Y500-4L em SDS-PAGE.

O peso molecular da toxina “killer” foi estimado em 43 kDa através de filtração em gel Sephadex G-100 e, na eletroforese da toxina “killer” em SDS-PAGE, foi observada somente uma banda de proteína de peso molecular entre 18-20 kDa. Estes resultados indicam que a toxina “killer” pode ser constituída de duas subunidades. Não foi possível registrar a eletroforese da toxina “killer” em SDS-PAGE em cópia fotográfica nem por densitometria, uma vez que a banda da

toxina “killer” corada com Coomassie Brilliant Blue G250 desapareceu de um dia para o outro. Na continuação do trabalho, este experimento será repetido. O peso molecular da toxina “killer” da linhagem *S. cerevisiae* Y500-4L, estimado por SDS-PAGE é similar ao peso molecular da toxina “killer” produzida pela linhagem *S. cerevisiae* nº 111 (KHR), codificada por genes cromossomais, estimado em 20 kDa por SDS-PAGE (GOTO et al., 1990a).

ZHU et al. (1987) estimaram o peso molecular da toxina “killer” da linhagem *S. cerevisiae* T158c/S14a (K1) em 20,658 kDa, através da análise da composição de aminoácidos da toxina purificada. Estes dados foram consistentes com o sequenciamento do gene da pré-toxina onde as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  consistem dos resíduos de aminoácidos 45-147 e 234-316 respectivamente.

Em 1979, PALFREE & BUSSEY purificaram a toxina “killer” de *S. cerevisiae* e detectaram a presença de apenas uma banda em SDS-PAGE. O peso molecular do monômero da toxina “killer” foi estimado em 11,47 kDa.

A toxina “killer” de *S. cerevisiae* 28 (KT28) foi descrita como uma glicoproteína de massa molecular em torno de 16 kDa estimado por SDS-PAGE (PFEIFFER & RADLER, 1982).

Outros gêneros de leveduras apresentaram toxina “killer” de peso molecular variando de 18 até 300 kDa. A toxina “killer” de *Kluyveromyces lactis*, descrita como uma proteína de pelo menos duas subunidades, apresentou peso molecular de cerca de 100 kDa estimado por SDS-PAGE (SUGISAKI et al., 1984). A levedura de *Candida* SW-55 apresentou duas toxinas “killer” de PM estimado em 36 kDa por SDS-PAGE (YOKOMORI et al., 1988b). O peso molecular da toxina “killer” de *Hanseniaspora uvarum* foi estimado em 18 kDa (RADLER et al.,

1990) por SDS-PAGE, enquanto que as toxina “killer” de linhagens halofílicas de *Hansenula anomala* apresentou PM de cerca de 300 kDa, determinado por cromatografia em coluna de filtração em gel Sepharose CL-6B. A toxina “killer” purificada da levedura halotolerante *Pichia farinosa* apresentou dois polipeptídios de PM estimado em 4 kDa e 8 kDa através de eletroforese de SDS-PAGE.

#### **4.12. Caracterização da toxina “killer” purificada**

A toxina “killer” purificada foi estudada quanto ao efeito do pH e da temperatura na sua estabilidade, como descrito no item 3.15.

##### **4.12.1. Efeito do pH na estabilidade da toxina**

O efeito do pH na estabilidade da toxina foi determinado como descrito no item 3.15.1.

Os resultados foram semelhantes aos obtidos para a toxina bruta incubada a -10 °C. A toxina purificada apresentou estabilidade máxima na faixa de pH 3,8 a 4,5 e reteve 80% de atividade na faixa de pH 2,0 a 3,5 após 24 horas de congelamento a -10 °C. A toxina foi totalmente inativada em pH igual ou superior a 5,4 após 24 horas de congelamento a -10 °C (Figura 17).

##### **4.12.2. Efeito da temperatura na estabilidade da toxina purificada**

O efeito da temperatura na estabilidade da toxina, foi realizado como descrito no item 3.15.2.

A toxina “killer” de *S. cerevisiae* Y500-4L purificada (Figura 18) mostrou-se mais termosensível do que a preparação bruta (Figura 10). A toxina “killer” purificada mostrou-se estável após 1 hora e 30 minutos e reteve 70% da atividade após 2 horas e 30 minutos em pH 4,1 a 8 °C, sendo completamente inativada após 3 horas nas condições descritas acima. Após 30 minutos de incubação a 40 °C, a toxina perdeu 80% da atividade sendo totalmente inativada após 1 hora.

## 5. Conclusões

---

- A linhagem “killer” de *Saccharomyces cerevisiae* Y500-4L, previamente isolada de mosto de usina de álcool e com alta capacidade fermentativa, foi capaz de matar as leveduras de fermentos comerciais Fleischmann e Itaiquara.
- A linhagem *S. cerevisiae* Y500-4L mostrou atividade “killer” contra as leveduras padrões “killer” K2 (*S. diastaticus* NCYC 713), K4 (*Candida glabrata* NCYC 388) e K11 (*Torulopsis glabrata* ATCC 15126). Mostrou-se sensível as toxinas produzidas pelas leveduras padrões “killer” K8 (*Hansenula anomala* NCYC 435), K9 (*Hansenula mrakii* NCYC 500), K10 (*Kluyveromyces drosophilum* NCYC 575) e K11 (*Torulopsis glabrata* ATCC 15126). A linhagem de *S. cerevisiae* Y500-4L mostrou-se neutra às linhagens K1 (*S. cerevisiae* KL88), K2 (*S. diastaticus* NCYC 713), K3 (*S. capensis* NCYC 761), K4 (*Candida glabrata* NCYC 388), K5 (*Debaryomyces vanrij* NCYC 577), K6 (*Kluyveromyces marxianus* NCYC 587), K7 (*Pichia membranaefaciens* NCYC 333) e *Hansenula* sp Y66-1. A linhagem *S. cerevisiae* Y500-4L apresentou perfil de atividade “killer” diferente das linhagens padrões *S. cerevisiae* “killer” K1, K2 e K3 descritas na literatura.
- A linhagem *S. cerevisiae* Y500-4L não apresentou plasmídeo de M-dsRNA, mostrou maior resistência ao tratamento com cicloheximida e ao tratamento térmico (37-40 °C) em contraste com a linhagem *S. cerevisiae* KL88, padrão K1, cuja toxina é codificada por genes plasmidiais de ds-RNA. O caráter genético responsável pelo fenótipo “killer” na linhagem Y500-4L é provavelmente, codificado por genes cromossomais.

- A toxina bruta de *S. cerevisiae* Y500-4L apresentou maior atividade “killer” na faixa de pH 4,1-4,5 a 22-25 °C. A toxina bruta mostrou maior atividade “killer” em faixa mais ampla de pH e temperatura do que a toxina bruta da linhagem padrão K1 (*S. cerevisiae* KL88).
- A preparação bruta da toxina “killer” de *S. cerevisiae* Y500-4L apresentou estabilidade máxima na faixa de pH 3,8 a 4,5 e reteve 80% de atividade na faixa de pH de 2,0 a 3,5, após 24 horas de congelamento a -10 °C (freezer). Na temperatura de 8 °C (geladeira), a toxina reteve aproximadamente 50-60% da atividade após 24 horas de incubação na faixa de pH 2,0 a 5,4. Na temperatura de 25 °C a toxina reteve cerca de 35% de atividade após 24 horas de incubação na faixa de pH 2,0 a 4,5. A toxina foi completamente inativada em pH igual ou superior a 6,0 nas temperaturas de 8 °C e -10 °C e em pH 5,4 após 24 horas de incubação a 25 °C. Na faixa de pH 6,0 a 8,0 a toxina foi inativada, comprovando assim sua instabilidade em pH mais alcalino. A toxina “killer” purificada de *S. cerevisiae* Y500-4L apresentou estabilidade máxima na faixa de pH 3,8 a 4,5, e reteve 80% de atividade na faixa de pH 2,0 a 3,5 após 24 horas de congelamento a -10 °C. A toxina foi totalmente inativada em pH igual ou superior a 5,4 após 24 horas de congelamento a -10 °C.
- A preparação bruta da toxina “killer” de *S. cerevisiae* Y500-4L mostrou-se termosensível. A toxina manteve-se estável após 4 horas de incubação a 8 °C e a 25 °C em pH 4,1. Na temperatura de 30 °C, a toxina reteve a atividade “killer” após 1 hora de incubação, entretanto, perdeu 50% de atividade no período de 2 horas e 30 minutos até 4 horas em pH 4,1. A toxina perdeu 80% de atividade após 30 minutos de tratamento a 40 °C em pH 4,1, sendo totalmente inativada após 1 hora nesta temperatura. A toxina “killer” purificada mostrou-se estável após 1 hora e 30 minutos e reteve 70% da atividade após 2 horas e 30 minutos

em pH 4,1 a 8 °C, sendo completamente inativada após 3 horas nas condições descritas acima. Após 30 minutos de incubação a 40 °C, a toxina perdeu 80% da atividade sendo totalmente inativada após 1 hora.

- A produção ótima da toxina “killer” foi verificada após 24 horas de incubação em meio YEPD composto de 1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 2% de glicose em tampão de citrato-fosfato 0,1M, pH 4,5 a 25 °C. O melhor método de obtenção da toxina de Y500-4L do sobrenadante do meio de cultura para ser utilizado na purificação foi através de ultrafiltração, pois conferiu maior estabilidade à sua molécula.
- A toxina “killer” de *S. cerevisiae* Y500-4L foi purificada através de ultrafiltração em membrana de retenção de proteínas maiores que 10 kDa e processo de filtração em duas etapas em coluna de Sepharose 6B. Na eletroforese em SDS-PAGE, a toxina purificada apresentou PM estimado em 18-20 kDa.

## TABELAS

Tabela 1- Código e espécies correspondentes das linhagens de leveduras padrões “killer”.

<b>Linhagens padrões</b>	
K1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> KL88
K2	<i>Saccharomyces diastaticus</i> NCYC 713
K3	<i>Saccharomyces capensis</i> NCYC 761
K4	<i>Candida glabrata</i> NCYC 388
K5	<i>Debaryomyces vanriji</i> NCYC 577
K6	<i>Kluyveromyces marxianus</i> NCYC 587
K7	<i>Pichia membranaefaciens</i> NCYC 333
K8	<i>Hansenula anomala</i> NCYC 435
K9	<i>Hansenula mrakii</i> NCYC 500
K10	<i>Kluyveromyces drosophilae</i> NCYC 575
K11	<i>Torulopsis glabrata</i> ATCC 15126

Tabela 2- Teste de atividade “killer” utilizando-se diferentes linhagens sensíveis

Linhagens sensíveis (aspergidas)

Linhagens inoculadas	Itaiquara	Fleischmann	K11
Itaiquara	-	-	-
Y500-4L	++++	+++	+
K3	++	-	-
K2	+	-	-
K1	+	+	+
K11	++	++	-
Y66-1	-	-	++
Fleischmann	-	-	-

A levedura Y500-4L mata as leveduras Itaiquara, Fleischmann e padrão K11

- = não foi capaz de matar

+ = matou (presença de halo de inibição)

**Onde:**

+ = ~ 3 mm de diâmetro (s/ a colônia)

++ = ~ 6 mm de diâmetro (s/ a colônia)

+++ = ~ 9 mm de diâmetro (s/ a colônia)

++++ = ~ 12 mm de diâmetro (s/ a colônia)

Tabela 3- Interação entre as leveduras

Linhagens aspergidas

Linhagens inoculadas	K1	K2	K4	K6	K7	K8	K9	K10	K11	66-1	500-4L
<b>K1</b>	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
<b>K2</b>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>K3</b>	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>K4</b>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<b>K5</b>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<b>K6</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>K7</b>	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-
<b>K8</b>	+	+	++	-	-	-	-	-	++	+	++
<b>K9</b>	++	++	++	-	-	-	-	-	++	+	++
<b>K10</b>	+	+	++	-	-	-	-	-	+	+	+
<b>K11</b>	+	++	-	-	-	-	-	-	-	++	+
<b>Y66-1</b>	-	-	++	-	-	-	-	-	++	-	-
<b>Y500-4L</b>	-	++	+	-	-	-	-	-	+	-	-

A levedura Y500-4L mata as leveduras padrões K2, K4 e K11

A levedura Y500-4L foi morta pelas leveduras padrões K8, K9, K10 e K11

- = não foi capaz de matar

+ = matou (presença de halo de inibição)

**Onde:**

+ = ~ 3 mm de diâmetro (s/ a colônia)

++ = ~ 6 mm de diâmetro (s/ a colônia)

Tabela 4- Determinação do Peso Molecular das bandas de RNA de fita dupla.

<b>X (cm)</b>	<b>Y (Kb)</b>	<b>log Y</b>
2,55	9,42	0,97
2,95	6,56	0,82
3,50	4,36	0,64
4,55	2,32	0,36
4,85	2,03	0,31

X = distância do início da corrida até a banda correspondente

Y = peso molecular dos fragmentos de  $\lambda$  clivados com HindIII (usados como padrões de pesos moleculares).

**Equação:**

$$\text{Log PM} = 1,672705 - 0,2859 X$$

**Resultados:**

<b>ds-RNAs</b>	<b>X (cm)</b>	<b>log PM</b>	<b>PM (Kb)</b>
<b>L</b>	3,40	0,70	<b>5,0</b>
<b>M1</b>	4,95	0,26	<b>1,8</b>
<b>M2</b>	5,35	0,14	<b>1,4</b>
<b>M3</b>	5,35	0,14	<b>1,4</b>

Tabela 5- Cura das linhagens “killer”

<b>Controle 25 °C</b>		<b>Tratamentos (% de cura)</b>			
<b>Linhagens</b>		Cicloheximida 0.2 ppm	Temp. 37 °C	Temp. 38,5 °C	Temp. 40 °C
<b>K1</b>	+20	ñ cresceu	75 %	95 %	ñ cresceu
<b>500-4L</b>	+20	55 %	0 %	0 %	40 %
<b>66-1</b>	+20	0 %	ñ cresceu	ñ cresceu	ñ cresceu

No controle + 20 = 20 colônias com halo “killer” típico.

Tabela 6- Purificação da toxina “killer” da linhagem de *S. cerevisiae* Y500-4L

<b>Etapa de procedimento</b>	<b>Atividade (halo em mm)</b>	<b>Proteína (mg)</b>	<b>Ativ. Específica (ativ./proteína)</b>	<b>Purificação</b>
Sobrenadante do meio de cultura	1,5	2,79	0,54	1
Concentrado por ultrafiltração	4	4,20	0,95	1,8
Cromatografia em coluna de Sepharose 6B	7	0,06	116,7	215

## **FIGURAS**

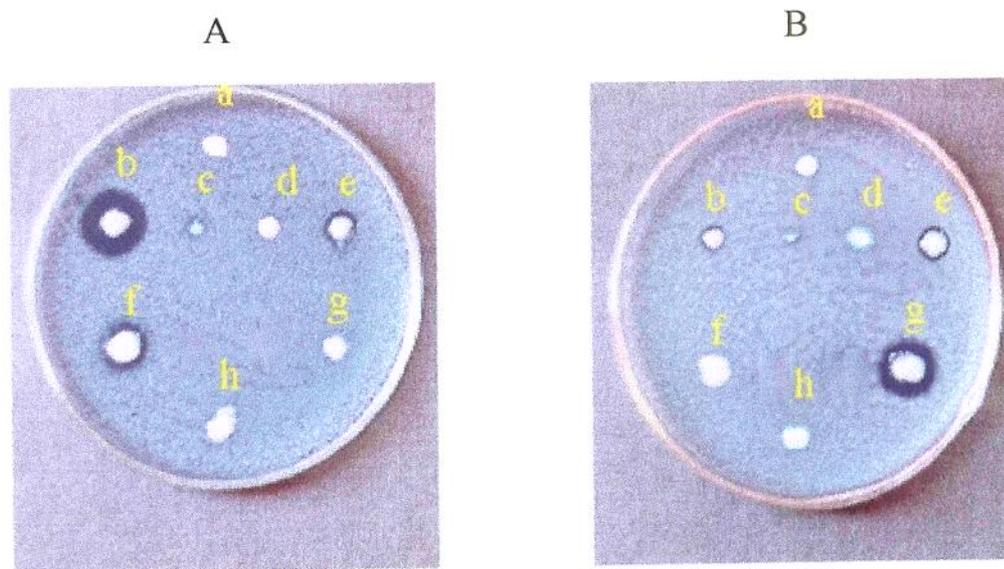


Figura 1- Atividade “killer”. Linhagens inoculadas a)Itaiquara b)Y500-4L  
 c)padrão K3 d)padrão K2 e)padrão K1 f)padrão K11 g)Y66-1 h)Fleischmann.  
 Leveduras aspergidas: Fleischmann (A) e K11 (B).

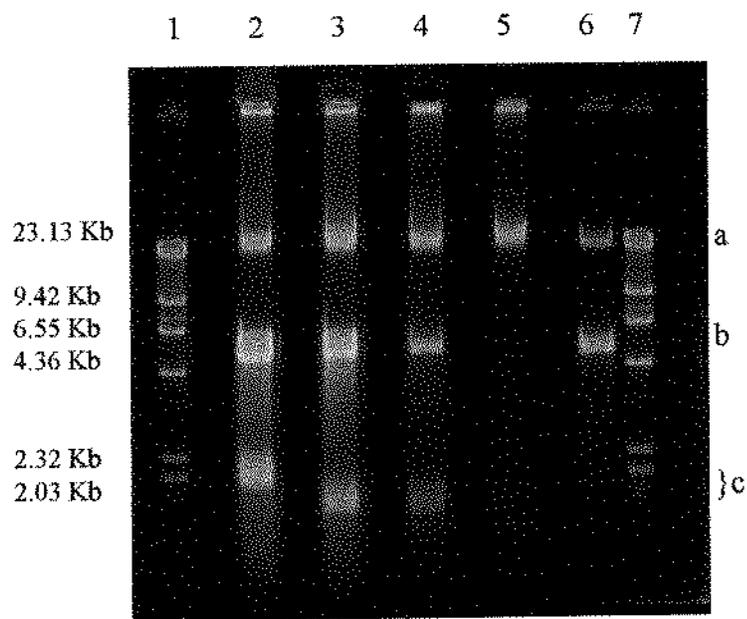


Figura 2- Eletroforese em gel de agarose dos ácidos nucleicos extraídos das leveduras. a- DNA total; b- L-dsRNA; c- M-dsRNA; 1e7- fragmentos de  $\lambda$  HindIII (padrões de pesos moleculares); 2- padrão K1; 3- padrão K2; 4- padrão K3; 5- linhagem Y66-1; 6- linhagem Y500-4L.

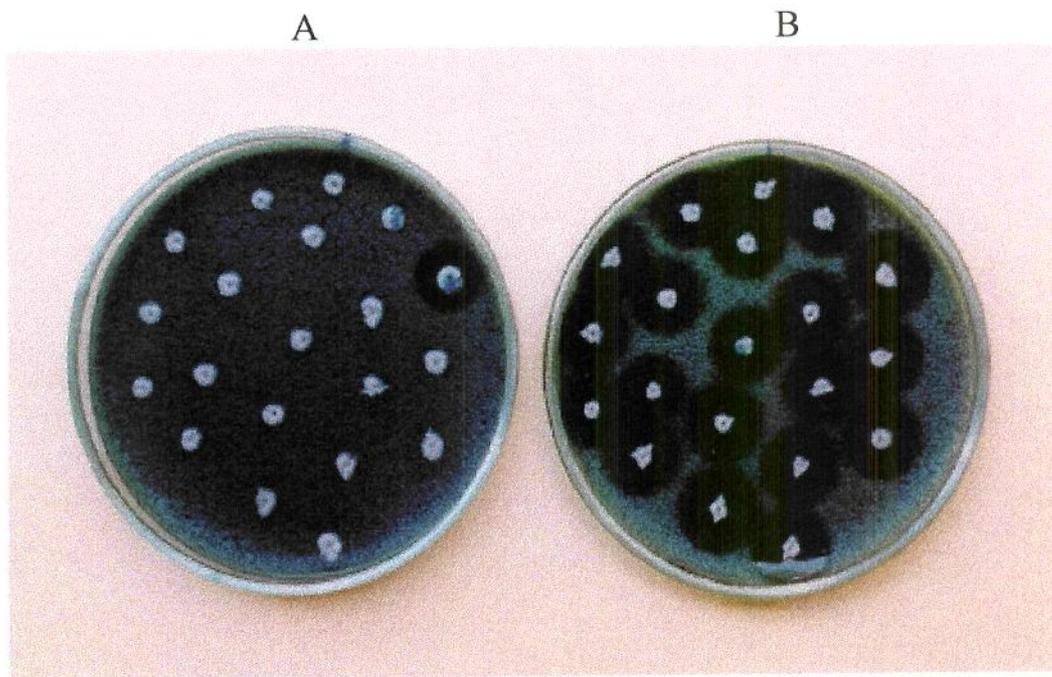


Figura 3A- Teste de cura da linhagem *S. cerevisiae* padrão “killer” K1- tratamento térmico a 38,5 °C

Figura 3B- Teste de cura da linhagem *S. cerevisiae* Y500-4L- tratamento térmico a 38,5 °C

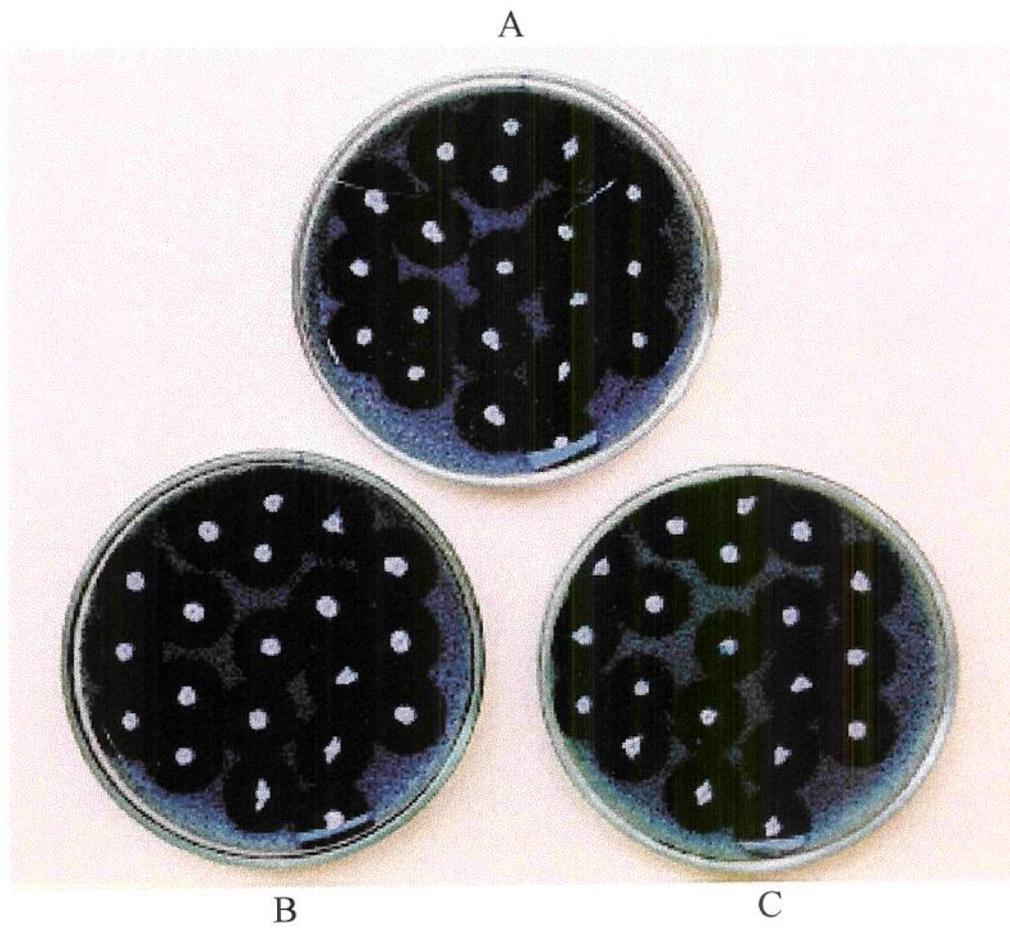


Figura 4- Teste de cura da linhagem *S. cerevisiae* Y500-4L após tratamento:  
A- controle a 25 °C ; B- crescimento a 37 °C ; C- crescimento a 38,5 °C.

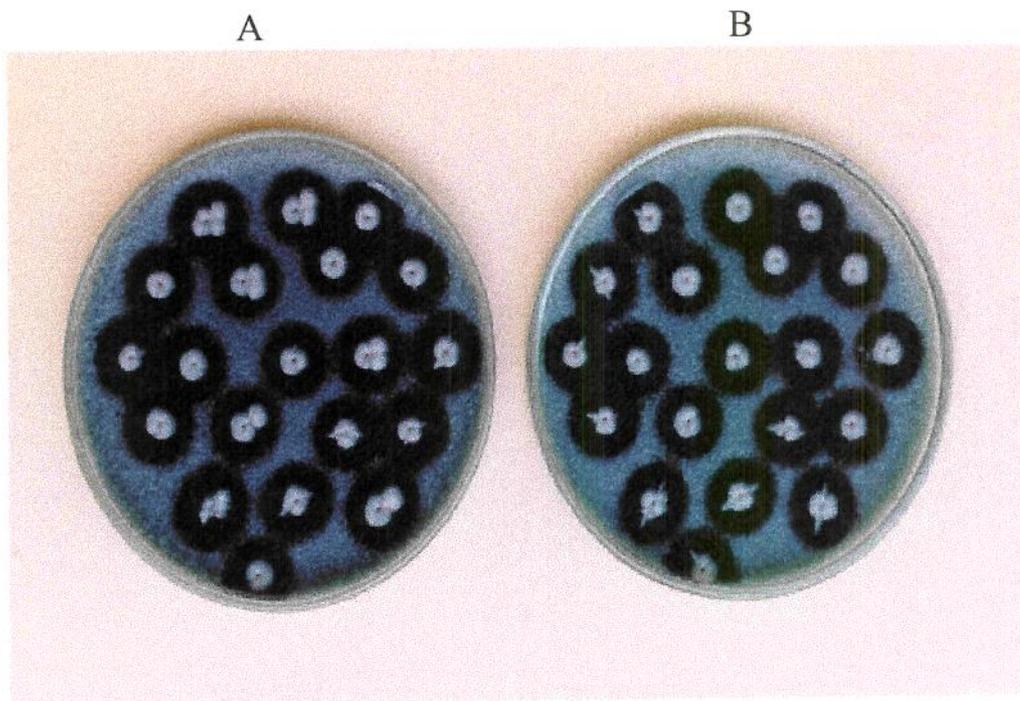


Figura 5- Teste de cura da linhagem *Hansenula* sp Y66-1 com 0,2 ppm de cicloheximida. A- Tratamento com 0,2 ppm de cicloheximida e B- Controle a 25 °C.

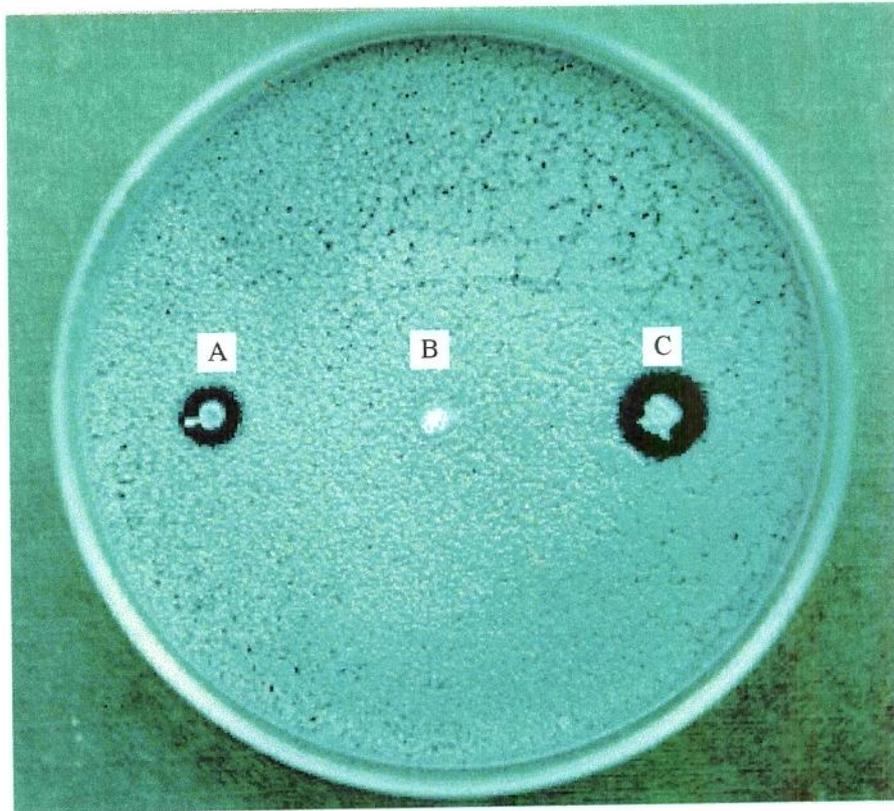


Figura 6- Teste de regeneração do fenótipo “killer” da levedura Y500-4L tratada com: A-curada por temperatura de 40 °C; B-curada por cicloheximida e C-controle “killer” original.

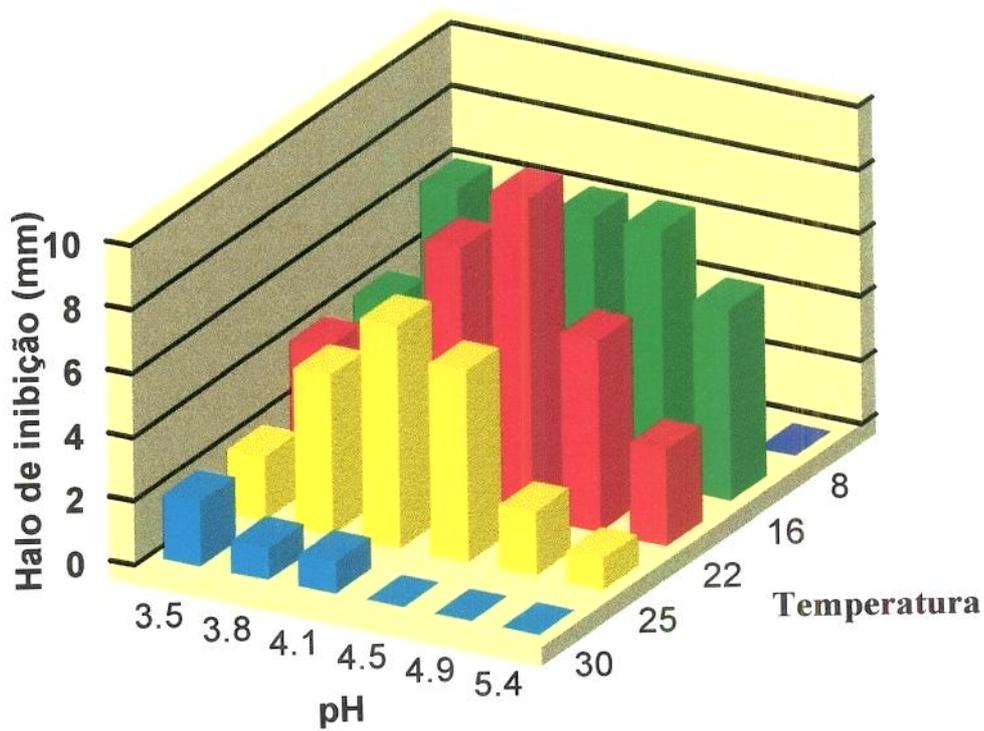


Figura 7- Efeito do pH e da temperatura na atividade da toxina “killer” da linhagem de *S. cerevisiae* Y500-4L.

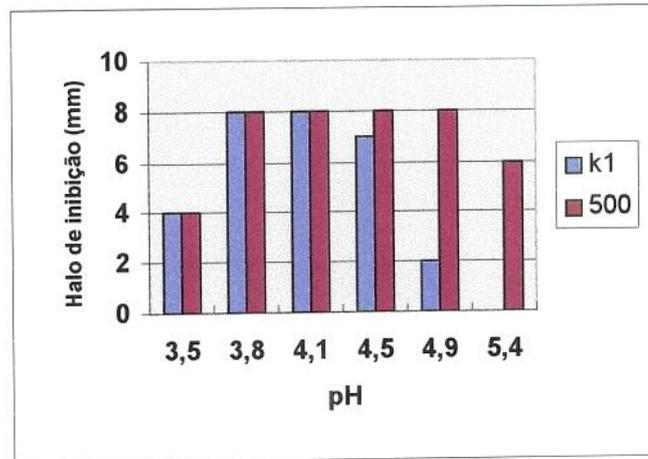


Figura 8A: Atividade das toxinas “killer” K1 e Y500-4L (halo em mm) na temperatura de 16 °C.

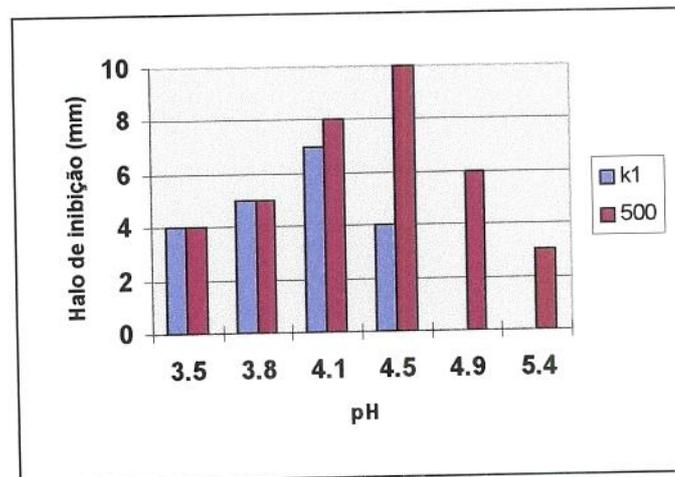


Figura 8B: Atividade das toxinas “killer” K1 e Y500-4L (halo em mm) na temperatura de 22 °C.

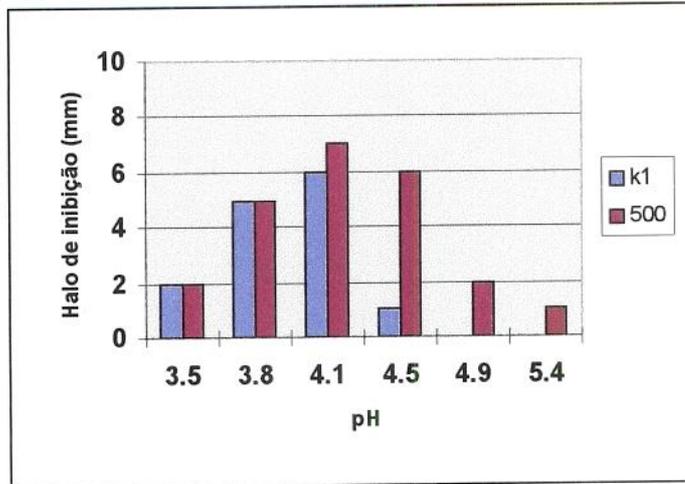


Figura 8C: Atividade das toxinas “killer” K1 e Y500-4L (halo em mm) na temperatura de 25 °C.

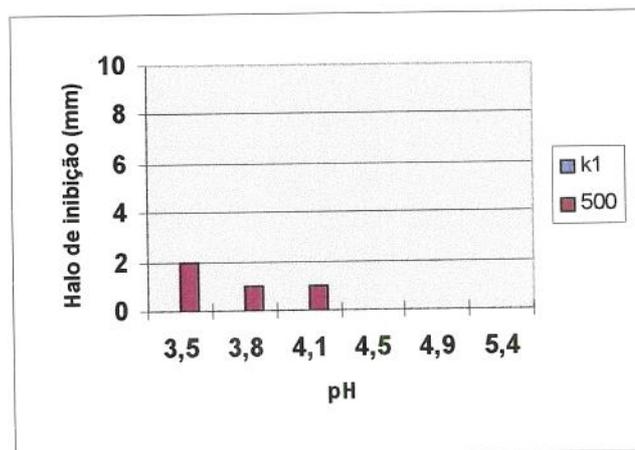


Figura 8D: Atividade das toxinas “killer” K1 e Y500-4L (halo em mm) na temperatura de 30 °C.

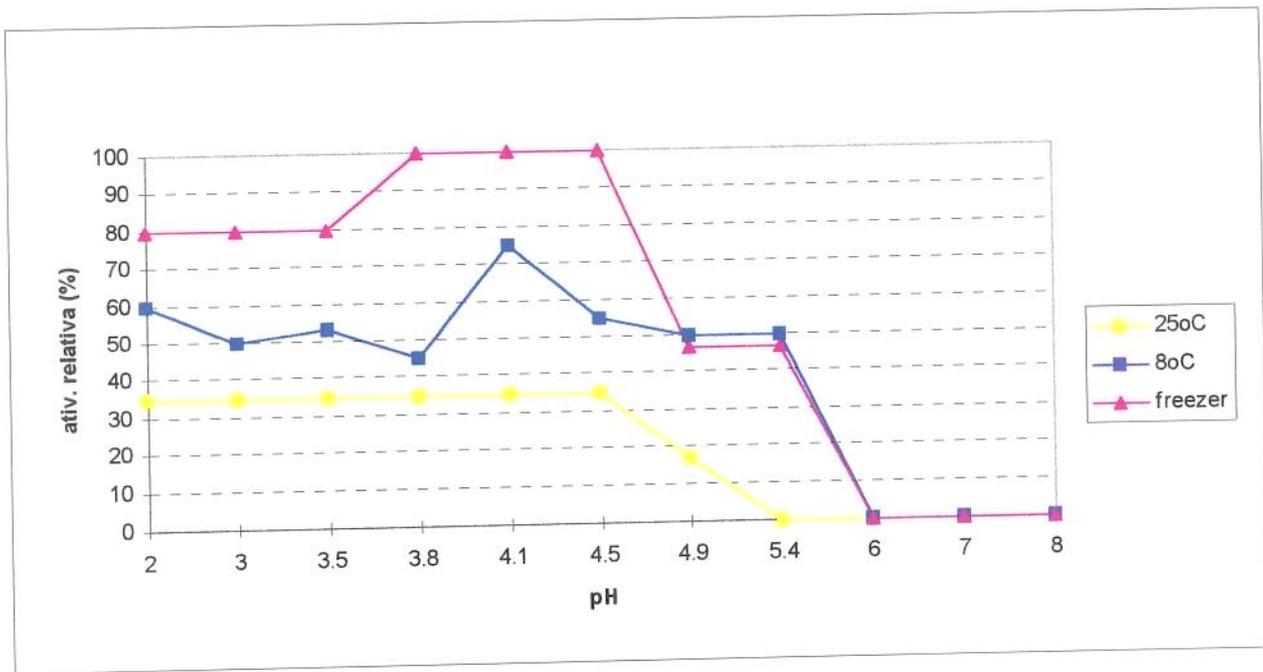


Figura 9- Efeito do pH na estabilidade da toxina “killer” bruta da linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* Y500-4L.

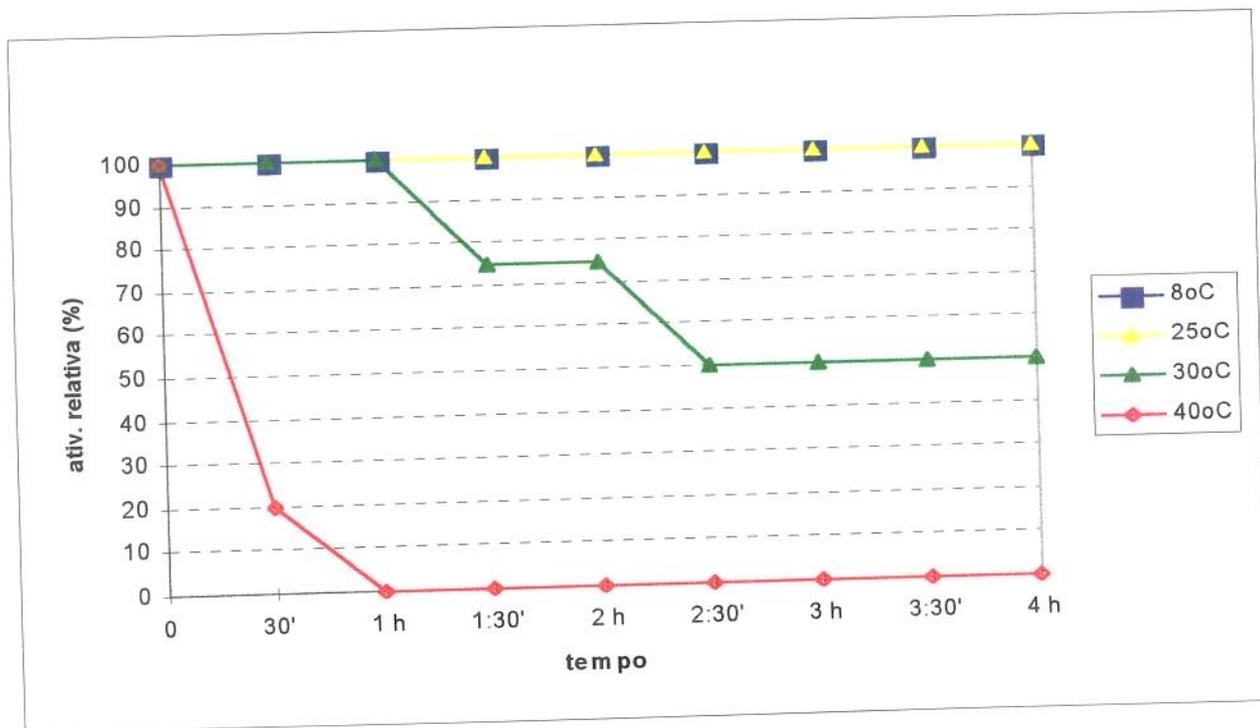


Figura 10- Efeito da temperatura na estabilidade da toxina “killer” bruta da linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* Y500-4L.

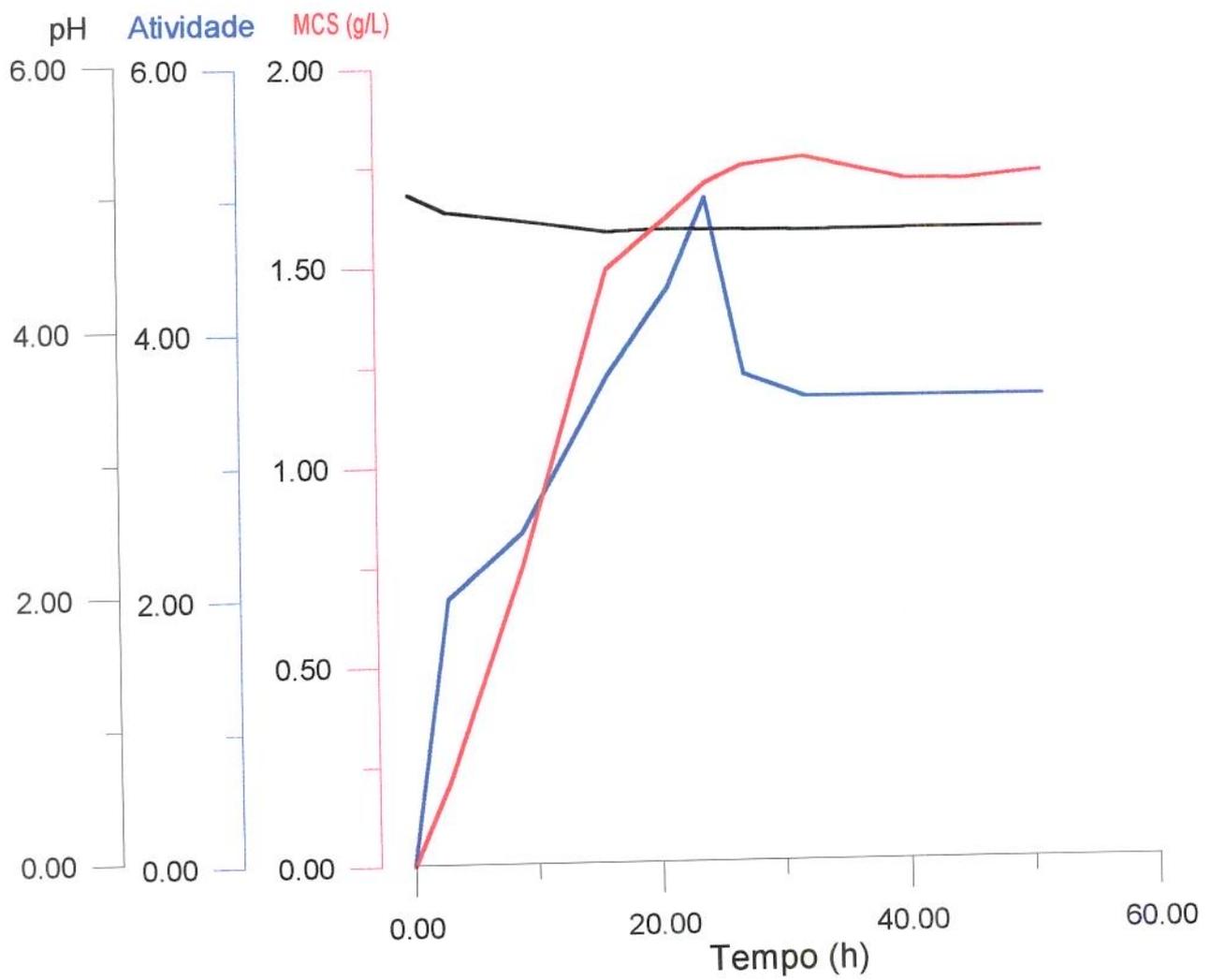


Figura 11- Curva de crescimento da linhagem Y500-4L:

- pH
- Atividade “killer” (halo em mm)
- MCS: massa celular seca (g/L)



Figura 12- Atividade “killer” das preparações de toxina de *S. cerevisiae* Y500-L, obtidas por precipitação com acetona, polipropileno glicol e etanol.

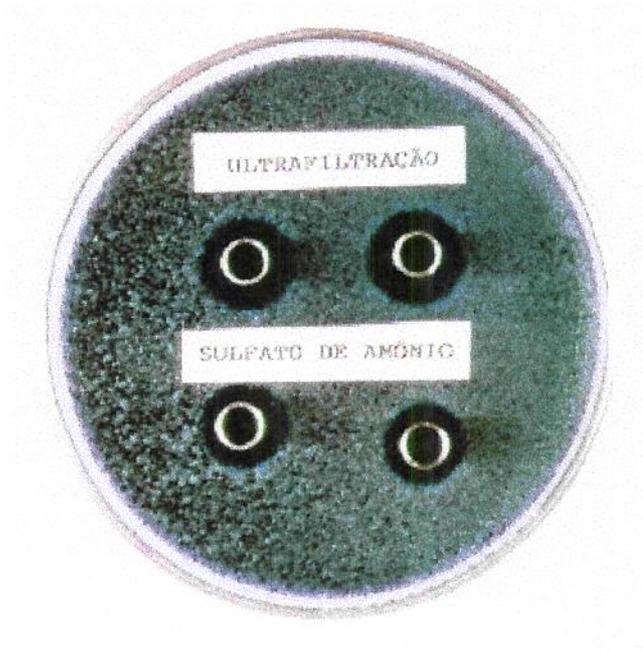


Figura 13- Atividade “killer” das preparações de toxina de *S. cerevisiae* Y500-L, obtidas por ultrafiltração e precipitação com sulfato de amônio.

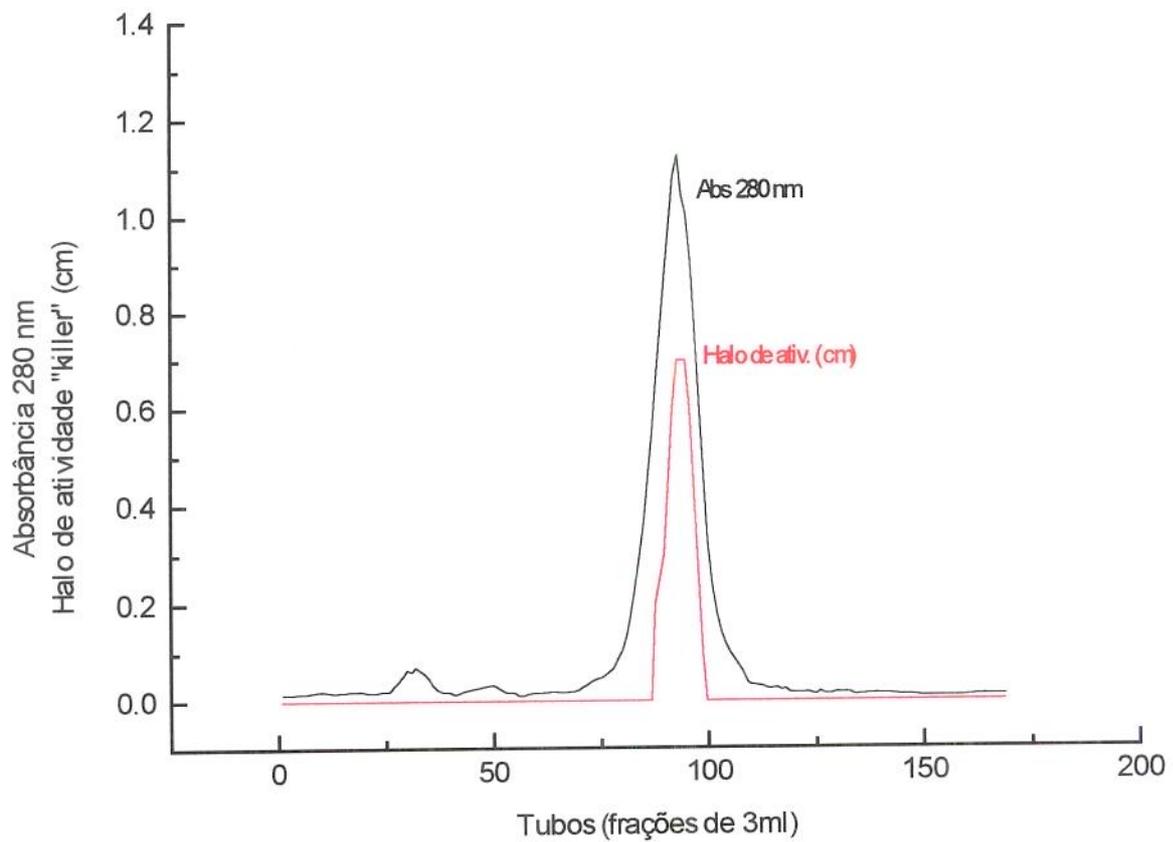


Figura 14- Purificação da toxina “killer” da linhagem de *S. cerevisiae* Y500-4L em coluna de gel Sepharose 6B.

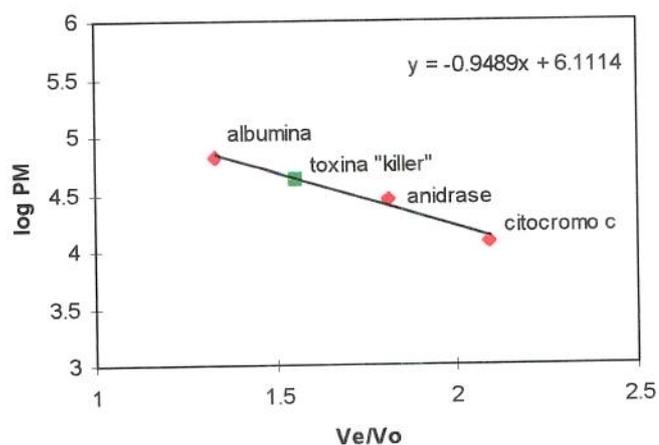
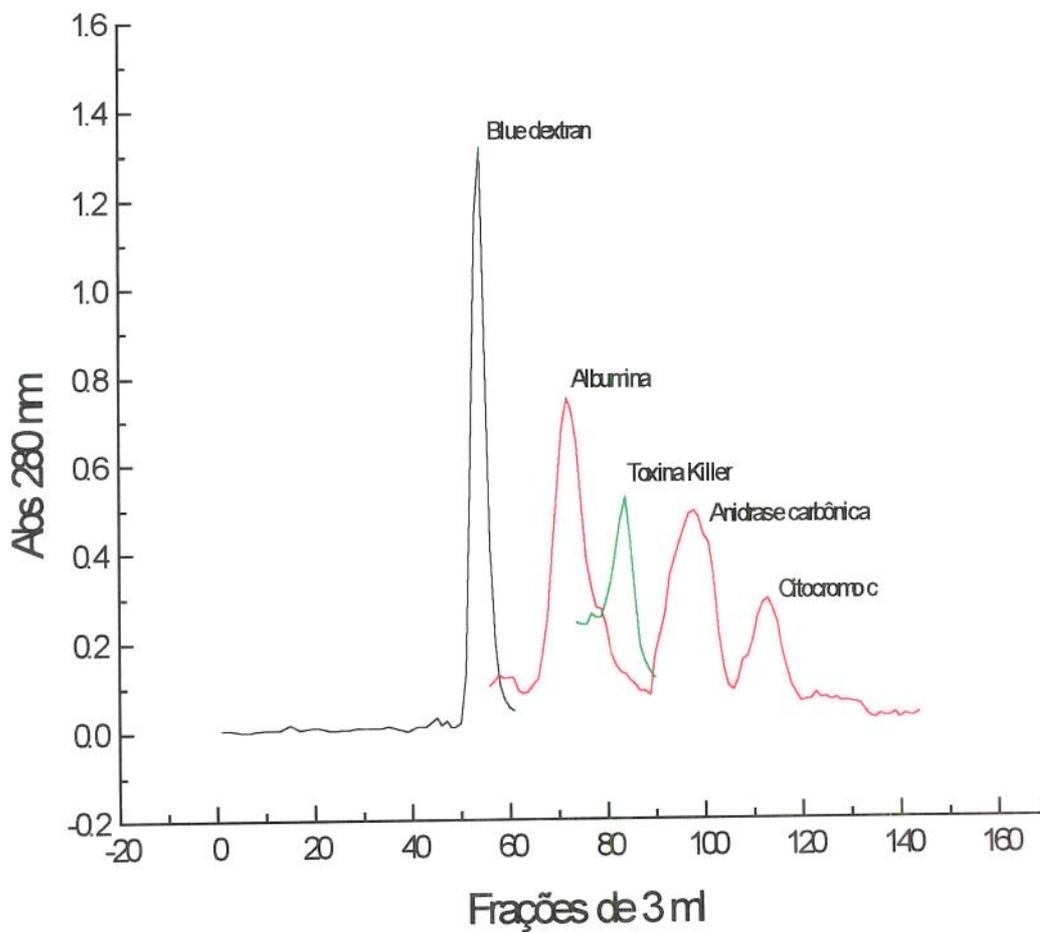


Figura 15A- Eluição das proteínas padrões e da toxina “killer” da linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* Y500-4L em coluna de gel Sephadex G-100.

Figura 15B- Curva padrão de proteínas em coluna de gel Sephadex G-100.

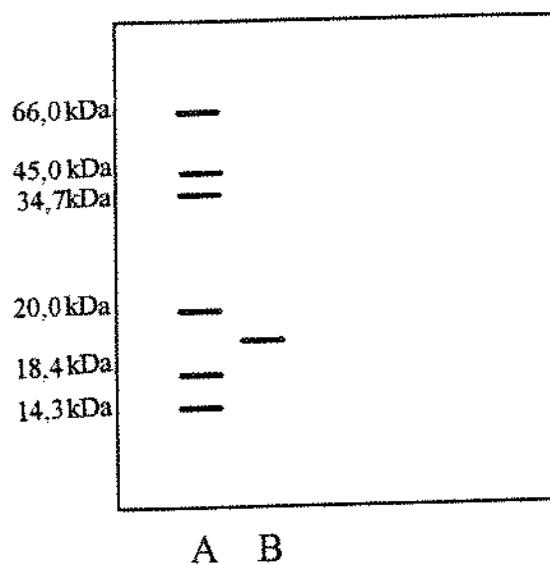


Figura 16 - Representação gráfica da eletroforese da toxina “killer” de *Saccharomyces cerevisiae* Y500-4L em SDS-PAGE.

A- proteínas padrões de peso molecular;

B- toxina “killer” purificada

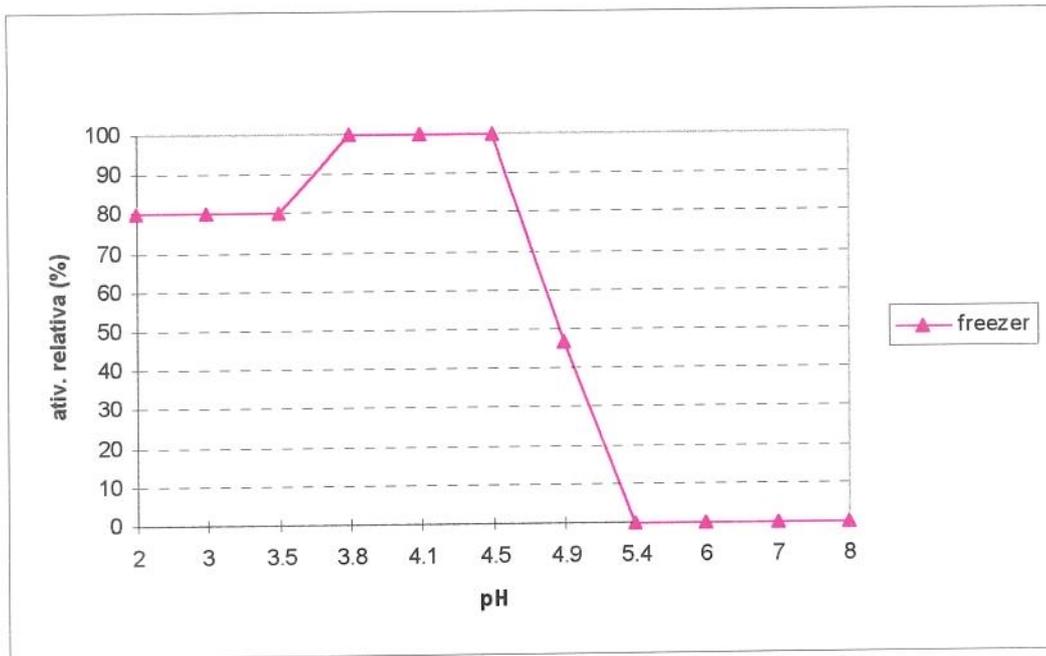


Figura 17- Efeito do pH na estabilidade da toxina “killer” purificada da linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* Y500-4L.

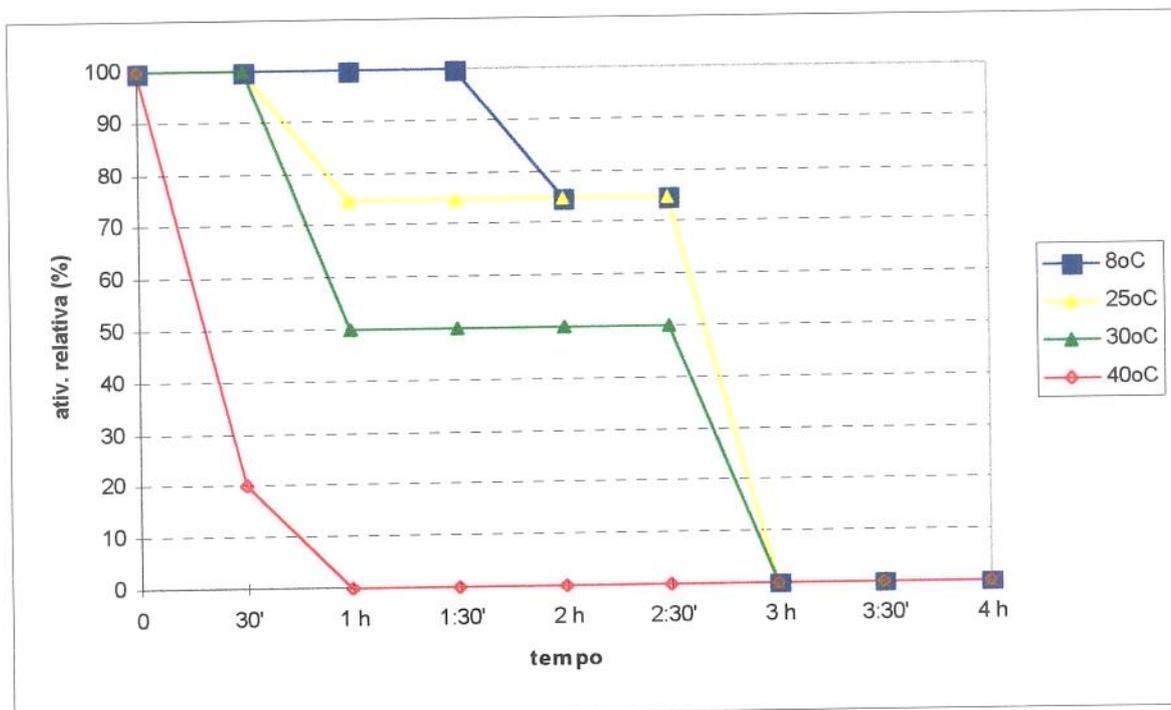


Figura 18- Efeito da temperatura na estabilidade da toxina “killer” purificada da linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* Y500-4L.

## 6. Referências Bibliográficas

---

- BENDOVIÁ, O. The killer phenomenon in yeasts. **Folia microbiol.**, v.31, p.422-433, 1986.
- BENÍTEZ, T.; GASENT-RAMÍREZ, J.M.; CASTREJÓN, F.; CODÓN, A.C. Development of new strains for the food industry. **Biotechnol. Prog.**, v.12, n.2, p.149-163, 1996.
- BERRY, E.A.; BEVAN, E.A. A new species of double-stranded RNA from yeast. **Nature**, v.239, n.29, p.279-280, 1972.
- BEVAN, E.A.; MAKOWER, M. The physiological basis of the killer character in yeast. **Proc. of the 11th International Conference on Genetics**, v.1, p.203, 1963.
- 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.81-85, 1973.
- BOLEN, P.L.; EASTMAN, E.M.; CIHAK, P.L.; HAYMAN, G.T. Isolation and sequence analysis of a gene from the linear DNA plasmid pPac1-2 of *Pichia acaciae* that shows similarity to a killer toxin gene of *Kluyveromyces lactis*. **Yeast**, v.10, p.403-414, 1994.
- BOONE, C.; BUSSEY, H.; GREENE, D.; THOMAS, D.Y.; THIERRY, V. Yeast killer toxin: site-direct mutations implicate the precursor protein as the immunity component. **Cell**, v.46, p.105-113, 1986.
- BOONE, C.; SDICU, A.M.; WAGNER, J.; DEGRÉ, R.; SANCHEZ, C.; BUSSEY, H. Integration of the yeast K1 killer toxin gene into the genome of marked wine yeasts and its effect on vinification. **Am. J. Enol. Vitic.**, v.41, n.1, p.37-42, 1990.
- BOSTIAN, K.A.; HOPPER, J.E.; ROGERS, D.T.; TIPPER, D.J. Translation analysis of the killer-associated virus-like particle dsRNA genome of *S. cerevisiae*: M dsRNA encodes toxin. **Cell**, v.19, p.403-414, 1980b.
- BOSTIAN, K.A.; STURGEON, J.A.; TIPPER, D.J. Encapsidation of yeast killer double-stranded ribonucleic acids: dependence of M on L. **J. Bacteriol.**, v.143, n.1, p.463-470, 1980a.
- BROWN, J.L.; BUSSEY, H. The yeast KRE9 gene encodes an O-glycoprotein involved in cell surface beta-glucan assembly. **Mol. Cell. Biol.**, v.13, p.6346-6356, 1993.
- BROWN, J.L.; ROEMER, T.; LUSSIER, A.M.S.; BUSSEY, H. The K1 killer toxin: molecular and genetic applications to secretion and cell surface assembly. In: JOHNSTON, J.R. **Molecular Genetics of Yeast- a practical approach**. The practical approach series, 1994, p.217-265.

- BUSSEY, H. Effects of yeast killer factor on sensitive cells. **Nature New Biology**, v.235, p.73-75, 1972.
- BUSSEY, H.; SHERMAN, D. Yeast killer factor: ATP leakage and coordinate inhibition of macromolecular synthesis in sensitive cells. **Bioch. Biophys. Acta**, v.298, p.868-875, 1973.
- BUSSEY, H.; SHERMAN, D.; SOMERS, J.M. Action of yeast killer factor: a resistant mutant with sensitive spheroplasts. **J. Bacteriol.**, v.113, n.3, p.1193-1197, 1973.
- BUTLER, A.R.; O'DONNELL, W.; MARTIN, V.J.; GOODAY, W.; STARK, J.R. *Kluyveromyces lactis* toxin has an essential chitinase activity. **Eur. J. Biochem.**, v.199, p.483-488, 1991.
- CANSADO, J.; LONGO, E.; AGRELO, D.; VILLA, T.G. Curing of the killer character of *Saccharomyces cerevisiae* with acridine orange. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.65, p.233-238, 1989.
- CARRAU, F.M.; NEIROTTI, E.; GIOIA, O. Stuck wine fermentations: effect of killer/sensitive yeast interactions. **J. Ferment. Bioeng.**, v.76, n.1, p.67-69, 1993.
- CARROL, K.; WICKNER, R. Translation and M<sub>1</sub> double-stranded RNA propagation: MAK18 = RPL41B and Cycloheximide curing. **J. Bacteriol.**, v.177, n.10, p.2887-2891, 1995.
- CASTILLO, J.C.C.; SATO, H.H.; PASTORE, G.M.; PARK, Y.K. Detecção de leveduras produtoras de fator "killer" presentes em bebidas "chicha" e "masato". **Rev. Microbiol.**, v.21, p.171-173, 1990.
- CASTRO, C.; RIBAS, J.C.; VALDIVIESO, M.H.; VARONA, R.; DEL REY, F.; DURAN, A. Papulacandin B resistance in budding and fission yeasts: isolation and characterization of a gene involved in (1,3)Beta-D-glucan synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Bacteriol.**, v.177, p.5732-5739, 1995.
- FIELD, L.J.; BOBEK, L.A.; BRENNAN, V.E.; REILLY, J.D.; BRUENN, J.A. There are at least two yeast viral double-stranded RNAs of the same size: an explanation for viral exclusion. **Cell**, v.31, p.193-200, 1982.
- FINK, G.R.; STYLES, C.A. Curing of a killer factor in *Saccharomyces cerevisiae*. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v. 69, n.10, p.2846-2849, 1972.
- FLEET, G.H. Composition and structure of yeast cell walls. In: MCGINNIS, M.R., **Curr. Top. Med. Mycol.**, v.1. Springer-Verlag, New York 1985, p.24-56.
- GINZBERG, I.; KOLTIN, Y. Interaction of the *Ustilago maydis* KP6 killer toxin with sensitive cells. **Microbiology**, v.140, p.643-649, 1994.

- GOMES, F.C.; ROSA, C.A; SCHWAN, R.F.; PATARO, C.; LINARDI, V.R. Caracterização de leveduras killer presentes no processo de fermentação espontânea de cacau. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 19. 1997, Rio de Janeiro. **Anais**. Rio de Janeiro, 1997 p.178.
- GOTO, K.; IWASE, T.; KICHISE, K.; KITANO, K.; TOTSUKA, A.; OBATA, T.; HARA, S. Isolation and properties of a chromosome-dependent KHR killer toxin in *Saccharomyces cerevisiae*. **Agric. Biol. Chem**, v.54, p.505-509, 1990a.
- GOTO, K.; MORIKAWA, S.; SATO, H.H.; PARK, Y.K. Characteristics of the killer yeast n.337 isolated from alcohol fermentation mash in Brazil. **J. Brew. Soc. Japan**, v.85, n.12, p.895-899, 1990b.
- GOTO, K.; FUKUDA, H; KICHISE, K.; KITANO, K. HARA, S. Cloning and nucleotide sequence of the *KHS* killer gene of *Saccharomyces cerevisiae*. **Agric. Biol. Chem.**, v.55, n.8, p.1953-1958, 1991.
- GUNGE, N.; TAMARU, A.; OZAWA, F.; SAKAGUCHI, K. 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, 1981.
- HAMPSEY, M. A review of phenotypes in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v.13, p.1099-1133, 1997.
- HARTWELL, L.H. The effect of cycloheximide upon polyribosome stability in two yeast mutants defective respectively in the initiation of polypeptide chain and in messenger RNA synthesis. **Mol. Gen. Genet.**, v.106, p.347-361, 1970.
- 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 *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Gen. Virol.**, v.22, p.384, 1974.
- HIDALGO, P.; FLORES, M. Occurrence of the killer character in yeasts associated with Spanish wine production. **Food Microbiol.**, v.11, p.161-167, 1994.
- HUTCHINS, K.; BUSSEY, H. Cell wall receptor for yeast killer toxin: involvement of (1-6)-B-D-glucan. **J. Bacteriol.**, v.154, n.1, p.161-169, 1983.
- IMAMURA, T.; KAWAMOTO, M; TAKAOKA, Y. Characteristics of main mash infected by killer factor. **J. Ferment. Technol.**, v.52, p.293-299, 1974.
- JACOBS, C.J.; VAN VUUREN, H.J.J. Effects of different killer yeasts on wine fermentations. **Am. J. Enol. Vitic.**, v.42, n.4, p.295-300, 1991.
- KAGAN, B.L. Mode of action of yeast killer toxins: channel formation in lipid bilayer membranes. **Nature** 302, 1983.

- KAGIYAMA, S.; AIBA, T.; KADOWAKI, K.; MOGI, K. New killer toxins of halophilic *Hansenula anomala*. **Agric. Biol. Chem.**, v.52, n.1, p.1-7, 1988.
- KASAHARA, S.; INOUE, S.B.; MIO, T.; YAMADA, T.; NAKAJIMA, T.; ICHISHIMA, E.; FURUICHI, Y.; YAMADA, H. Involvement of cell wall  $\beta$ -glucan in the action of HM-1 killer toxin. **FEBS Letters**, v.348, p.27-32, 1994b.
- KASAHARA, S.; YAMADA, H.; MIO, T.; SHIRATORI, Y.; MIYAMOTO, C.; YABE, T.; NAKAJIMA, T.; ICHISHIMA, E. & FURUICHI, Y. Cloning of the *Saccharomyces cerevisiae* gene whose overexpression overcomes the effects of HM-1 killer toxin, which inhibits  $\beta$ -glucan synthesis. **J. Bacteriol.**, v.176, n.5, p.1488-1499, 1994a.
- KITANO, K.; SATO, M.; SHIMAZAKI, T.; HARA, S. Occurrence of wild killer yeast in Japanese Wineries and their characteristics. **J. Ferment. Technol.**, v.62, n.1, p.1-6, 1984.
- KOMIYAMA, T.; OHTA, T.; URAKAMI, H.; SHIRATORI, Y.; TAKASUKA, T.; SATO, H.M. WATANABE, T.; FURUICHI, Y. Pore formation on proliferating yeast *Saccharomyces cerevisiae* cell buds by HM-1 killer toxin. **J. Biochem.**, v.119, p.731-736, 1996.
- LACHANCE, M.A. Yeast communities in a natural tequila fermentation. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.68, p.151-160, 1995.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v.227, p.680-685, 1970.
- LLORENTE, P.; MARQUINA, D.; SANTOS, A.; PEINADO, J.M.; SPENCER-MARTINS, I. Effect of salt on the killer phenotype of yeasts from olive brines. **App. Env. Microbiol.**, v.63, n.3, p.1165-1167, 1997.
- LONGO, E.; CANSADO, J.; SIERO, C.; CALO, P.; VELÁZQUEZ, J.B.; VILLA, T.G. Influence of the curing of the killer phenotype in *S. cerevisiae* wine strains on their fermentative behaviour. **World J. Microbiol. Biotech.**, v.8, p.147-150, 1992.
- MARQUINA, D.; PERES, C.; CALDAS, F.V.; MARQUES, J.F.; PEINADO, J.M.; SPENCER-MARTINS, I. Characterization of the yeast population in olive brines. **Lett. Appl. Microbiol.**, v.14, p.279-283, 1992.
- MAULE, A.P.; THOMAS, P.D. Strains of yeast lethal to brewery yeasts. **J. Inst. Brew.**, v.79, p.137-141, 1973.
- NASCIMENTO, A.M. **Isolamento e seleção de leveduras produtoras de fator killer para aplicação na produção de bebidas alcoólicas**. Campinas, 1994. 74 p. Tese de Mestrado-Fac. Eng. de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- NAUMOV, G.I., TYURINA, L.V., BURYAN, N.I., NAUMOVA, T.I. Winemaking, an ecological niche of type K2 killer *Saccharomyces*. **Bio. Nauki**, v.16, p.103-107, 1973.

- OHTAKE, Y.; WICKNER, R.B. Yeast virus propagation depends critically on free 60s ribosomal subunit concentration. **Mol. Cell. Biol.**, v.15, n.5, p.2772-2781, 1995.
- PALFREE, G.E.; BUSSEY, H. Yeast Killer Toxin: purification and characterization of the protein toxin from *Saccharomyces cerevisiae*. **Eur. J. Biochem.**, v.93, p.487-493, 1979.
- PANCHAL, C.J.; MEACHER, C.; VAN OOSTROM, J.; STEWART, G.G. Phenotypic expression of *Kluyveromyces lactis* killer toxin against *Saccharomyces* spp. **App. Env. Microbiol.**, v.50, n.2, p.257-260, 1985.
- PEÑA, P.; BARROS, F.; GASCÓN, S.; LAZO, P.S.; RAMOS, S. Effect of yeast killer toxin on sensitive cells of *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biol. Chem.**, v.256, n.20, p.10420-10425, 1981.
- PETERING, J.E.; SYMONS, M.R.; LANGRIDGE, P.; HENSCHKE, P.A. Determination of killer yeast activity in fermenting grape juice by using a marked *Saccharomyces* wine yeast strain. **App. Env. Microbiol.**, v.57, n.11, p.3232-3236, 1991.
- PFEIFFER, P.; RADLER, F. Purification and characterization of extracellular and intracellular killer toxin of *Saccharomyces cerevisiae* strain 28. **J. Gen. Microbiol.**, v.128, p.2699-2706, 1982.
- PFEIFFER, P.; RADLER, F. Comparison of the killer toxin of several yeasts and the purification of a type K2. **Arch. Microbiol.**, v.137, p.357-361, 1984.
- PHILLISKIRK, G.; YOUNG, T.W. The occurrence of killer character in yeasts of various genera. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.41, p.147-151, 1975.
- RADLER, F.; SCHMITT, M.J.; MEYER, B. Killer toxin of *Hanseniaspora uvarum*. **Arch. Microbiol.**, v.154, p.175-178, 1990.
- ROEMER, T.; BUSSEY, H. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 88, p.11295-11299, 1991.
- ROGERS, D.; BEVAN, E.A. Group classification of killer yeasts based on cross-reactions between strains of different species and origin. **J. Gen. Microbiol.**, v.105, p.199-202, 1978.
- SATO, H.H.; PASTORE, G.M.; PARK, Y.K. Study of some characteristics of newly isolated killer yeast. **Rev. Microbiol.**, v.24, n.1, p.71-72, 1993.
- SCHMITT, M.; PFEIFFER, P.C. Immunochemical analysis of the carbohydrate moiety of yeast killer toxin K28. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.58, p.277-282, 1990.
- SCHMITT, M.; RADLER, F. Mannoprotein of the yeast cell wall as primary receptor for the killer toxin of *Saccharomyces cerevisiae* strain 28. **J. Gen. Microbiol.**, v.133, p.3347-3354, 1987.
- SCHMITT, M.; RADLER, F. Purification of yeast killer toxin KT28 by receptor-mediated affinity chromatography. **J. Chromat.**, v.469, p.448-452, 1989.

- SHIMIZU, K.; ADACHI, T.; KITANO, K.; TAKAYUKI, S.; TOTSUKA, A.; HARA, S.; DITTRICH, H.H. Killer properties of wine yeasts and characterization of killer wine yeasts. **J. Ferment. Technol.**, v.63, n.5, p.421-429, 1985.
- SILVA, G.A. The occurrence of killer, sensitive, and neutral yeasts in Brazilian Riesling Italico grape must and the effect of neutral strains on killing behavior. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.46, p.112-121, 1996.
- SKIPPER, N.; BUSSEY, H. Mode of action of yeast toxins: energy requirement for *Saccharomyces cerevisiae* killer toxin. **J. Bacteriol.**, v.129, n.2, p.668-677, 1977.
- STARK, M.; BOYD, A.; MILEHAM, A.J.; ROMANOS, M.A. The plasmid encoded killer system of *Kluyveromyces lactis*: a review. **Yeast**, v.6, p.1-29, 1990.
- STUMM, C. Killer-sensitive relationships in yeasts from natural habitats. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.43, p.125-128, 1977.
- SUGISAKI, Y.; GUNGE, N.; SAKAGUCHI, K.; YAMASAKI, M.; TAMURA, G. Characterization of a novel killer toxin encoded by a double-stranded linear DNA plasmid of *Kluyveromyces lactis*. **Eur. J. Biochem.**, v.141, p.241-245, 1984.
- SULO, P.; MICHALCÁKOVÁ, S. The K3 type killer strain of genus *Saccharomyces* for wine production. **Folia Microbiol.**, v.37, n.4, p.289-294, 1992.
- SUZUKI, C.; NIKKUNI, S. The primary and subunit structure of a novel type killer toxin produced by a halotolerant yeast, *Pichia farinosa*. **J. Biol. Chem.**, v.269, n.4, p.3041-3046, 1994.
- TAKITA, M.A.; CASTILHO-VALAVICIUS, B. Absence of cell wall chitin in *Saccharomyces cerevisiae* leads to resistance to *Kluyveromyces lactis* killer toxin. **Yeast**, v.9, p.589-598, 1993.
- THORNTON, R.J. Genetic characterization of New Zealand and Australian wine yeasts. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.52, p.97-103, 1986.
- VAGNOLI, P.; MUSMANNO, R.A.; CRESTI, S.; MAGGIO, T.; CORATZA, G. Occurrence of killer yeasts in spontaneous wine fermentations from the Tuscany region of Italy. **App. Envi. Microbiol.**, v.59, n.12, p.4037-4043, 1993.
- VAZQUEZ, F.; TORO, M.E. Occurrence of killer yeasts in Argentine wineries. **World J. Microbiol. Biotech.**, v.10, p. 358-359, 1994.
- WEINSTEIN, L.A.; CAPALDO-KIMBALL, F.; LEIBOWITZ, M.J. Genetics of heat-curability of killer virus of yeast. **Yeast**, v.9, p.411-418, 1993.
- WHITAKER, J.R. Determination of molecular weights of proteins by gel filtration on Sephadex. **Anal. Chem.**, v.35, n.12, p.1950-1953, 1963.

- WICKNER, R.B. "Killer character" of *Saccharomyces cerevisiae*: curing by growth at elevated temperature. **J. Bacteriol.**, v.117, n.3, p.1356-1357, 1974.
- WICKNER, R.B. Killer of *S. cerevisiae*: a double-stranded ribonucleic acid plasmid. **Bacteriol. Rev.**, v.40, n.3, p.757-773, 1976.
- WICKNER, R.B. Double-stranded and single stranded RNA virus of *S. cerevisiae*. **Annu. Rev. Microbiol.**, v.46, p.347-375, 1992.
- WICKNER, R.B. Double-stranded RNA virus of *S. cerevisiae*. **Microbiol. Rev.**, v.60, p.250-265, 1996.
- WILSON, C.; WHITTAKER, P.A. Factors affecting activity and stability of the *Kluyveromyces lactis* killer toxin. **App. Env. Microbiol.**, v.56, n.3, p.695-699, 1989.
- WOODS, D.R.; BEVAN, E.A. Studies on the nature of the killer factor produced by *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Gen. Microbiol.**, v.51, p.115-126, 1968.
- WOODS, D.R.; ROSS, I.W.; HENDRY, D.A. A new killer factor produced by a killer/sensitive yeast strain. **J. Gen. Microbiol.**, v.81, p.285-289, 1974.
- YOKOMORI, Y.; AKIYAMA, H.; SCHIMIZU, K. Isolation of a wild *Candida* killer yeast with a novel killer property. **Agric. Biol.Chem.**, v.52, n.11, p.2791-2796, 1988a.
- YOKOMORI, Y.; AKIYAMA, H.; SCHIMIZU, K. Toxins of a wild *Candida* killer yeast with a novel killer property. **Agric. Biol.Chem.**, v.52, n.11, p.2797-2801, 1988b.
- YOUNG, T.; YAGIU, M. A comparison of the killer character in different yeasts and its classification. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.44, p.59-77, 1978.
- ZHU, H.; BUSSEY, H.; THOMAS, D.I.; GAGNON, J.; BELL, W. Determination of the carboxyl termini of the  $\alpha$  e  $\beta$  subunits of yeast K1 Killer toxin. **J. Biol. Chem.**, v.262, n.22, p.10728-10732, 1987.
- ZHU, H.; BUSSEY, H. The K1 toxin of *Saccharomyces cerevisiae* kills spheroplasts of many yeast species. **App. Env. Microbiol.**, v.55, n.8, p.2105-2107, 1989.
- ZHU, H.; BUSSEY, H. Mutational analysis of the functional domains of yeast K1 killer toxin. **Mol. Cell. Biol.**, v.11, n.1, p.175-181, 1991.
- ZHU, Y.; KANE, J.; ZHANG, X.; ZHANG, M.; TIPPER, D.J. Role of the  $\gamma$  component of preprotoxin in expression or the yeast K1 killer phenotype. **Yeast**, v.9, p.251-266, 1993.