

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

**CONDIÇÕES PARA DETECÇÃO E EXPRESSÃO DO FATOR KILLER
PRODUZIDO POR LINHAGENS de *Saccharomyces cerevisiae***

Jandora Severo Poli
Engenheira de Alimentos – UNISINOS

Porto Alegre
2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

**CONDIÇÕES PARA DETECÇÃO E EXPRESSÃO DO FATOR KILLER
PRODUZIDO POR LINHAGENS de *Saccharomyces cerevisiae***

Jandora Severo Poli
Engenheira de Alimentos – UNISINOS

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre em
Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Orientador: Patrícia Valente da Silva
Co-Orientador: Gildo Almeida da Silva

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil
Março, 2009

Catálogo na Publicação
UFRGS/ICBS/Biblioteca Setorial

P766c Poli, Jandora Severo

Condições para detecção e expressão do fator killer produzido por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* / Jandora Severo Poli – 2009.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Porto Alegre, BR-RS, 2009.

Orientação: Prof.^a Patricia Valente da Silva

Co-orientação: Prof. Gildo Almeida da Silva

1. Leveduras 2. *Saccharomyces cerevisiae* 3. Vinho 4. Toxinas I. Silva, Patrícia Valente da, orient. II. Silva, Gildo Almeida da, co-orient. III. Título.

CDU 579.2 (043)

AGRADECIMENTOS

Ao pesquisador da Embrapa Uva e Vinho, Dr. Gildo Almeida da Silva, pela confiança, oportunidade, amizade e, principalmente, pelo grande aprendizado que me transmitiu durante três anos de convivência.

À professora Dr. Patrícia Valente, pela oportunidade, pelos conhecimentos transmitidos e pelo apoio constante.

À funcionária do Laboratório da Embrapa Uva e Vinho, Maria Antonieta Luvison Morini, pela amizade e carinho, pelas risadas e chimarrão, pela ajuda técnica e conhecimentos transmitidos.

Às colegas de Laboratório, Carolina Madalozzo Poletto, Juliana Balbinotte, Sayuri Raquel Yoshida e Patrícia Shaker, pela ajuda nos trabalhos, pela amizade, rodas de chimarrão e momentos de descontração.

Ao meu namorado Jonas Bragagnolo, pela ajuda nas fórmulas matemáticas, pelo seu amor, amizade, companheirismo, apoio constante e incentivo nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais, Grey de Souza Poli e Suzana Severo Poli, pela confiança, dedicação, incentivo, apoio, amor e presença em todos os momentos da minha vida.

Aos meus familiares e amigos que, mesmo de longe, foram essenciais para mim.

À UFRGS, pela oportunidade de ensino.

À EMBRAPA Uva e Vinho, pela oportunidade de estágio e desenvolvimento da dissertação de mestrado no Laboratório de Microbiologia.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

CONDIÇÕES PARA DETECÇÃO E EXPRESSÃO DO FATOR KILLER PRODUZIDO POR linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*

Autor: Jandora Severo Poli

Orientador: Prof. Dr. Patrícia Valente

Co-orientador: Dr. Gildo Almeida da Silva

¹RESUMO

Saccharomyces cerevisiae é uma levedura que possui papel fundamental na transformação do mosto em vinho. Durante a fermentação, a levedura selecionada transfere para o meio, componentes resultantes de seu metabolismo como etanol, aldeídos, enzimas, proteínas, entre outros. Existem algumas que possuem ação definida, como a proteína killer. Este trabalho teve como objetivo determinar as condições necessárias para a detecção e expressão do fator killer produzido por linhagens de levedura *Sacch. cerevisiae* isoladas de mosto de uva. Como linhagens killer, foram utilizadas as linhagens *Sacch. cerevisiae* Embrapa 91B, *Sacch. cerevisiae* Embrapa 1B, e uma linhagem comercial *Sacch. cerevisiae* K1 (Lallemand). Como linhagem sensível, foi empregada *Sacch. cerevisiae* Embrapa 26B. Para detecção do fator killer foram avaliados meios de cultura sólidos, preparados com diferentes concentrações de mosto de uva e extrato de levedura não comercial (ELNC). Para a produção do fator killer foram avaliados meios líquidos com diferentes concentrações de mosto de uva, ELNC e sacarose. Foi avaliada a produção do fator em condições aeróbicas e anaeróbicas de crescimento. O meio de cultura definido para detecção do fator killer foi o meio contendo 80 % de mosto de uva e 20 % de ELNC em sua composição. O meio líquido que proporcionou melhores condições de síntese do fator killer foi o meio preparado com 5% de mosto e 95 % de ELNC contendo 100 g/L de sacarose. A expressão do fator killer foi inibida em condições aeróbicas, exceto quando as linhagens foram cultivadas em meio líquido com elevada concentração de sacarose.

¹Dissertação de mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (100p.) Março, 2009.

CONDITIONS FOR DETECTION AND EXPRESSION OF KILLER FACTOR PRODUCED BY *Saccharomyces cerevisiae* strains

Author: Jandora Severo Poli

Advisor: Dr. Patricia Valente

Co-Advisor: Dr. Gildo Almeida da Silva

²ABSTRACT

The yeast *Saccharomyces cerevisiae* has a key role in the process of converting must into wine. During fermentation the selected yeast transfers to the medium compounds resulting from metabolism such as ethanol, aldehyde, enzymes and proteins. Some compounds have an antibiotic effect like killer proteins. The aim of this work was to verify the conditions for detection and expression of killer factor produced by *Sacch. cerevisiae* isolated from grape must. The killer yeast strains used for the experiments were *Sacch. cerevisiae* Embrapa 91B, *Sacch. cerevisiae* Embrapa 1B and a commercial yeast *Sacch. cerevisiae* K1 (Lallemand). The yeast *Sacch. cerevisiae* Embrapa 26B was used as sensitive strain. Solid media prepared with different concentrations of grape must and non-commercial yeast extract (ELNC), were used to detect the killer factor. Culture media prepared with different concentrations of grape must, ELNC and sucrose, were employed for killer factor expression. Synthesis of killer protein was evaluated under anaerobic and aerobic growth conditions. Detection of killer protein presented better results when using a culture medium prepared with 80 % of grape must and 20 % of ELNC. The liquid medium that provided the best conditions for killer factor expression was prepared with 5 % of grape must and 95 % of ELNC supplemented with 100 g/L of sucrose. Killer factor expression was inhibited under aerobic conditions, except when strains were growth in liquid media prepared with high concentrations of sucrose.

²Master of Science dissertation in Agricultural and Environment Microbiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (100p.) March, 2009.

SUMÁRIO

SUMÁRIO	VI
RELAÇÃO DE TABELAS	IX
RELAÇÃO DE FIGURAS	X
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XII
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 DISTRIBUIÇÃO NA NATUREZA	5
2.2 BIOLOGIA DE LEVEDURAS KILLER	6
2.3 MODO DE AÇÃO DA TOXINA KILLER	7
2.4 MUTAÇÕES NO M-dsRNA	8
2.5 FATORES DE ALTERAÇÃO DA PRODUÇÃO, EXPRESSÃO E ESTABILIDADE DO FATOR KILLER	9
2.6 FATORES DE PROTEÇÃO DO FATOR KILLER	11
2.7 APLICAÇÕES.....	12
2.7.1 Alimentos	13
2.7.2 Plantas	13
2.7.3 Medicina	14
2.7.4 Produção e secreção de proteínas heterólogas.....	14
2.7.5 Vinificação.....	15
2.8 PRODUÇÃO DO FATOR KILLER	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1 LINHAGENS	19
3.2 PROCEDIMENTO PADRÃO PARA OS MEIOS DE CULTURA LÍQUIDOS PARA PROCESSOS DESCONTÍNUOS	19
3.3 PREPARO DOS INÓCULOS PARA PRODUÇÃO DO FATOR KILLER	20
3.4 PROCEDIMENTO PADRÃO PARA AS AMOSTRAS COLETADAS EM MEIO LÍQUIDO PARA PRODUÇÃO DO FATOR KILLER	20
3.5 PREPARO DOS MEIOS DE CULTURA SÓLIDOS	20
3.6 TESTE KILLER PELA TÉCNICA PROTEÍNA/CÉLULA	21
3.7 SELEÇÃO DO MEIO DE CULTURA SÓLIDO PARA DETECÇÃO DO FATOR KILLER.....	21
3.7.1 Diferentes concentrações de mosto de uva e ELNC.....	21
3.7.2 Meio de cultura sólido para detecção da toxina killer com diferentes concentrações de mosto de uva e G7c.....	22
3.7.3 Teste comparativo entre diferentes meios de cultura para detecção fator killer..	22
3.7.4 Influência da sacarose no comportamento da linhagem sensível Embrapa 26B..	23
3.7.5 Influência da glicose no comportamento da linhagem sensível Embrapa 26B.....	23

3.7.6 <i>Influência do ELNC na ação do fator killer e no comportamento da linhagem sensível</i>	24
3.8 SELEÇÃO DO MEIO DE CULTURA LÍQUIDO PARA PRODUÇÃO DO FATOR KILLER.....	25
3.8.1 <i>Diferentes concentrações de mosto de uva e ELNC</i>	25
3.8.2 <i>Reduções na concentração de mosto de uva</i>	26
3.8.3 <i>Substituição do ELNC por G7c</i>	27
3.8.4 <i>Meio de cultura preparado com G7</i>	27
3.8.5 <i>Meio de cultura preparado com G7c e diferentes concentrações de sacarose</i>	27
3.9 CRESCIMENTO DOS MICRORGANISMOS EM PROCESSO DESCONTÍNUO.....	28
3.9.1 <i>Processo aeróbico/ anaeróbico em biorreator</i>	28
3.9.1.1 <i>Preparo do meio de cultivo</i>	28
3.9.1.2 <i>Preparo do inóculo</i>	28
3.9.1.3 <i>Processo</i>	28
3.9.2 <i>Processo aeróbico em frascos de Fernbach</i>	29
3.9.2.1 <i>Preparo do meio de cultivo</i>	29
3.9.2.2 <i>Preparo do inóculo</i>	29
3.9.2.3 <i>Processo</i>	29
3.9.3 <i>Processo anaeróbico</i>	30
3.9.3.1 <i>Preparo do meio de cultivo</i>	30
3.9.3.2 <i>Preparo do inóculo</i>	30
3.9.3.3 <i>Processo</i>	30
3.9.4 <i>Processo anaeróbico com modificações</i>	30
3.9.4.1 <i>Substituição do ELNC por G7c</i>	30
3.9.4.1.1 <i>Preparo do meio de cultivo</i>	31
3.9.4.1.2 <i>Preparo do inóculo</i>	31
3.9.4.1.3 <i>Processo</i>	31
3.9.4.2 <i>Adição de sacarose</i>	31
3.9.4.3 <i>Substituição do G7c por ELNC com diferentes concentrações de sacarose</i>	32
3.9.5 <i>Processo aeróbico em frascos de Fernbach com modificações</i>	32
3.10 DETERMINAÇÃO DO CRESCIMENTO CELULAR.....	33
3.11 DETERMINAÇÃO DO PH.....	33
3.12 ETANOL.....	33
3.13 COMPOSTOS VOLÁTEIS POR GC CAPILAR.....	34
3.14 ESTABILIDADE DO FATOR KILLER.....	34
3.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	35
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1 SELEÇÃO DO MEIO DE CULTURA PARA DETECÇÃO DO FATOR KILLER.....	36
4.1.1 <i>Meio de cultura com diferentes concentrações de mosto de uva e ELNC</i>	37
4.1.2 <i>Meio de cultura com diferentes concentrações de mosto de uva e G7c</i>	40
4.1.3 <i>Teste comparativo entre diferentes meios de cultura para detecção fator killer</i> ..	42
4.1.4 <i>Influência da sacarose e glicose no comportamento da linhagem sensível Embrapa 26B</i>	44
4.1.5 <i>Influência do ELNC na ação do fator killer e no comportamento da linhagem sensível</i>	48
4.2 AVALIAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA PARA PRODUÇÃO DO FATOR KILLER.....	49
4.2.1 <i>Meio de cultura com diferentes concentrações de mosto de uva e ELNC</i>	50
4.2.2 <i>Meio de cultura com reduções na concentração de mosto de uva</i>	51

4.2.3 Meio de cultura com substituição do ELNC por G7c.....	53
4.2.4 Meio de cultura preparado com G7c e diferentes concentrações de sacarose.....	53
4.3 PRODUÇÃO DE PROTEÍNA KILLER EM PROCESSO DESCONTÍNUO.....	57
4.3.1 Determinação do número mínimo de moléculas	57
4.3.2 Efeito de transição entre as condições aeróbicas e anaeróbicas no processo de produção do fator killer.....	58
4.3.3 Alterações na composição do meio e sua influência sobre a expressão do fator killer em anaerobiose.....	65
4.3.3.1 Substituição do ELNC por G7c e aumento da concentração de sacarose	65
4.3.3.2 Redução na concentração de sacarose no meio com ELNC.....	70
4.3.4 Efeito “Crabtree” e a produção de proteína killer em meio M5 suplementado com 100 g/L de sacarose	78
5. CONCLUSÕES.....	86
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	88
7. VITA	96

RELAÇÃO DE TABELAS

Tabela 1: Análise estatística entre as médias dos diâmetros dos halos formados em meios de cultura diferentes..... 46

Tabela 2: Médias dos diâmetros dos halos formados pela linhagem 1B em meio G7c com diferentes concentrações de sacarose (10, 100, 150 e 200 g/L) e em três dias de avaliação. 54

Tabela 3: Médias dos diâmetros dos halos formados pela linhagem 91B em meio G7c com diferentes concentrações de sacarose (10, 100, 150 e 200 g/L) e em três dias de avaliação. 55

RELAÇÃO DE FIGURAS

- Figura 1: Concentração de mosto de uva na composição do meio de cultura sólido mosto/ELNC e os diâmetros dos halos formados. O sobrenadante utilizado contendo o fator killer foi o obtido com a linhagem 1B. 38
- Figura 2: Concentração de mosto de uva na composição do meio de cultura sólido mosto/G7c e os diâmetros dos halos formados. O sobrenadante utilizado contendo o fator killer foi o obtido com a linhagem Embrapa 1B..... 41
- Figura 3: Da esquerda para direita: Superior: 25 % Mosto/75 % ELNC; Mosto 80. Inferior: YEPD-MB; MA-MB. Em todos meios, o sobrenadante utilizado foi o obtido com a linhagem 1B. A linhagem sensível foi a 26B. Laboratório de Microbiologia/Embrapa CNPUV, 2008. 43
- Figura 4: Da esquerda para a direita: placa de Petri com meio sólido Mosto 80; placa de Petri com meio sólido substituindo o mosto por uma solução de sacarose (200 g/L). O sobrenadante utilizado foi o obtido com a linhagem 1B. A linhagem sensível foi a 26B. Laboratório de Microbiologia/ Embrapa CNPUV, 2008. 46
- Figura 5: Da esquerda para a direita: placa de Petri com meio sólido Mosto 80; placa de Petri com meio sólido substituindo o mosto por uma solução de glicose (200 g/L). O sobrenadante utilizado foi o obtido com a linhagem 1B. A linhagem sensível foi a 26B. Laboratório de Microbiologia/ Embrapa CNPUV, 2008. 47
- Figura 6: Concentração de mosto de uva na composição do meio de cultura líquido mosto/ELNC e os diâmetros dos halos formados em meio sólido Mosto 80. Foi utilizada a linhagem 1B para síntese do fator killer. A linhagem sensível foi a 26B..... 51
- Figura 7: Teste de poço para proteína killer da linhagem *Sacch. cerevisiae* Embrapa 1B, produzida em biorreator em meio M5 líquido, nos tempos: 8 horas (T8) e 24 horas (T24). A linhagem sensível foi a 26B. Laboratório de Microbiologia/Embrapa CNPUV, 2008. 59
- Figura 8: Crescimento celular da linhagem killer Embrapa 1B em meio M5 líquido, cultivadas em condições aeróbicas em biorreator até oito horas e em condições anaeróbicas no tempo restante; DO a 600 nm; produção de etanol (°GL); número mínimo de moléculas de toxina killer (nmmh) e acetaldéido. 62
- Figura 9: Contagem de células totais e em brotamento da linhagem 1B em meio M5 líquido, cultivadas em condições aeróbicas em biorreator. 63
- Figura 10: Crescimento celular da linhagem 1B em meio M5 líquido, cultivadas em condições anaeróbicas em frascos de Fernbach; DO a 600 nm; número mínimo de moléculas de toxina (nmm_h); produção de etanol (°GL)..... 64
- Figura 11: Contagem de células totais e em brotamento da linhagem 1B em meio M5 líquido, cultivadas em condições anaeróbicas em frascos de Fernbach. 65
- Figura 12: Crescimento celular da linhagem 1B em meio contendo 5 % de mosto e 95 % de G7c, cultivada em condições anaeróbicas; DO (600 nm); número mínimo de moléculas de toxina killer (nmm_h)..... 66
- Figura 13: Crescimento celular da linhagem 1B em meio contendo 5 % de mosto/95 % de G7c suplementado com 200 g/L de sacarose, cultivada em condições anaeróbicas; DO (600 nm); número mínimo de moléculas de toxina killer (nmm_h)..... 68
- Figura 14: Crescimento celular da linhagem 1B em meio M5 líquido suplementado com 200 g/L de sacarose, cultivada em condições anaeróbicas; DO (600 nm); número mínimo de moléculas de toxina killer (nmm_h). 69
- Figura 15: Crescimento celular da linhagem 1B em M5 líquido suplementado com 100 g/L de sacarose, cultivada em condições anaeróbicas; DO (600 nm); número mínimo de moléculas de toxina (nmm_h); produção de etanol (°GL). 72

Figura 16: Contagem de células totais e em brotamento da linhagem 1B em meio M5 líquido suplementado com 100 g/L de sacarose, cultivada em condições anaeróbicas.	72
Figura 17: Crescimento celular da linhagem 1B em meio M5 líquido suplementado com 150 g/L de sacarose, cultivada em condições anaeróbicas; DO (600 nm); número mínimo de moléculas de toxina (nmm _h); produção de etanol (°GL).	74
Figura 18: Contagem de células totais e em brotamento da linhagem 1B em meio M5 líquido suplementado com 150 g/L de sacarose, cultivada em condições anaeróbicas.	75
Figura 19: Crescimento celular da linhagem 91B em meio M5 líquido suplementado com 100 g/L de sacarose, cultivada em condições anaeróbicas; DO (600 nm); número mínimo de moléculas de toxina (nmm _h); produção de etanol (°GL).	76
Figura 20: Contagem de células totais e em brotamento da linhagem 91B em meio M5 líquido suplementado com 100 g/L de sacarose, cultivada em condições anaeróbicas.	76
Figura 21: Crescimento celular da linhagem K1 em meio M5 líquido suplementado com 100 g/L de sacarose, cultivada em condições anaeróbicas; DO (600 nm); número mínimo de moléculas de toxina (nmm _h); produção de etanol (°GL).	77
Figura 22: Contagem de células totais e em brotamento da linhagem K1 em meio M5 líquido suplementado com 100 g/L de sacarose, cultivada em condições anaeróbicas.	78
Figura 23: Crescimento da linhagem 1B em meio M5 líquido suplementado com 100 g/L de sacarose, sob condições aeróbicas; DO (600 nm); número mínimo de moléculas de toxina (nmm _h); produção de etanol (°GL).	80
Figura 24: Contagem de células totais e em brotamento da linhagem 1B em meio M5 líquido suplementado com 100 g/L de sacarose, em condições aeróbicas.	81
Figura 25: Crescimento celular da linhagem 91B em meio M5 líquido suplementado com 100 g/L de sacarose, cultivada em condições aeróbicas; DO (600 nm); número mínimo de moléculas de toxina (nmm _h); produção de etanol (°GL).	82
Figura 26: Contagem de células totais e em brotamento da linhagem 91B em meio M5 líquido suplementado com 100 g/L de sacarose, cultivada em condições aeróbicas.	83
Figura 27: Crescimento celular da linhagem K1 em meio M5 líquido suplementado com 100 g/L de sacarose, cultivada em condições aeróbicas; DO (600 nm); número mínimo de moléculas de toxina (nmm _h); produção de etanol (°GL).	84
Figura 28: Contagem de células totais e em brotamento da linhagem killer comercial K1 em meio M5 líquido suplementado com 100 g/L de sacarose, cultivada em condições aeróbicas.	84

LISTA DE ABREVIATURAS

m: Metros
cm: Centímetro
mm: Milímetros
nm: Nanômetros
L: Litro
mL: Mililitro
µL: Microlitro
g: Grama
mg: Miligrama
µg: Micrograma
M: Molar
µm: Micrometro
h: Hora
atm: Pressão atmosférica
psi: Libra por polegada quadrada (unidade de pressão)
vvm: volumes de ar/volume de meio/minuto
xg: Força gravitacional da Terra
rpm: Rotações por minuto
°GL: Graus Gay-Lussac
°C: Graus Celsius
cél: Células
pH: Logaritmo decimal do inverso da atividade de íons em uma solução
DO: Densidade Óptica
H₂S: Ácido sulfídrico
H₂: Gás hidrogênio
DNA: Ácido desoxirribonucléico
M-dsRNA: Fita dupla do Ácido ribonucléico (médio)
L-dsRNA: Fita dupla do Ácido ribonucléico (grande)
ATP: Adenosina trifosfato
ADP: Adenosina difosfato
VLP: Partículas semelhantes à vírus
q.s.p.: Quantidade suficiente para

1. INTRODUÇÃO

Leveduras são fungos de grande importância econômica. Das espécies fermentativas depende não somente a transformação do mosto em vinho, mas também outros processos fermentativos igualmente importantes. Muitos componentes resultantes do metabolismo das leveduras, como etanol, glicerol, álcoois superiores, ésteres, aldeídos e ácidos, são secretados e influenciam na qualidade do produto final. Outras substâncias com ação definida podem ser transferidas da célula para o meio. Entre estas estão as enzimas e outras proteínas.

A habilidade de matar que alguns microrganismos possuem não é um fenômeno biológico novo. Algumas leveduras podem liberar proteínas ou glicoproteínas que matam leveduras sensíveis. Estas proteínas são chamadas de fator killer. Com relação a este fator, as linhagens de leveduras são classificadas como killer (K^+R^+), sensíveis (K^-R^-) e neutras (K^-R^+). Esta toxina foi primeiramente detectada em *Saccharomyces cerevisiae* em 1963 e é uma das inúmeras toxinas produzidas por fungos. A toxina killer possui efeito letal

sobre linhagens de leveduras sensíveis da mesma espécie, de espécies diferentes e, também, de gêneros diferentes.

O fator killer é uma proteína de baixo peso molecular, de aproximadamente 9.000 Da para a toxina killer do tipo K₁ e 12.000 a 14.000 Da para a toxina do tipo K₂ (Bostian, *et al.*, 1984), que mata células de levedura sensíveis. Linhagens killer de *Sacch. cerevisiae*¹ devem possuir as partículas de RNA de dupla fita (ds) semelhantes a vírus L-dsRNA (L-grande) e M-dsRNA (M-médio). A característica killer é um dos atributos que muitos advogam ser importante na elaboração de vinho porque, se não elimina, pelo menos reduz a carga microbiológica do mosto. Como este pode conter diferentes linhagens de *Sacch. cerevisiae* com características enológicas distintas, a redução ou eliminação de linhagens selvagens não adequadas ao processo de vinificação pode resultar na melhoria da qualidade do produto final.

As leveduras killer podem apresentar características killer bastante diversificadas. Esta diversificação de comportamento pode estar relacionada com mutações no M-dsRNA, causando alterações na expressão da atividade da proteína killer. Têm sido demonstradas alterações no que tange à neutralidade (KIL-n), com fenótipo K⁻R⁺ e à imunidade (KIL-i₁), com fenótipo K⁺R^W. Em parreirais, há linhagens de *Sacch. cerevisiae* que se comportam ao mesmo tempo como killer, sensível e neutra. Isto foi observado com a linhagem *Sacch. cerevisiae* Embrapa 1B. Além disso, há linhagens, como K1, que se mostram instáveis com relação à capacidade killer.

¹ Neste trabalho foi utilizada a abreviação *Sacch. cerevisiae* sugerida por Kreger-Van Rij (1984).

A adição de linhagens killer ao mosto só se justifica se houver estabilidade de expressão desta atividade e se as referidas linhagens apresentarem componentes do metabolismo que não alterem de forma negativa a qualidade do produto final. Leveduras killer podem apresentar habilidade em formar H₂S. A capacidade killer de algumas linhagens parece depender da fase de crescimento em que as células se encontram ou de determinados produtos do metabolismo que conferem estabilidade à molécula protéica. Este trabalho teve como objetivo verificar as condições para a detecção e expressão do fator killer produzido por linhagens de levedura *Sacch. cerevisiae* isoladas de mosto de uva.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Saccharomyces cerevisiae é o agente principal da transformação do mosto em vinho. O vinho depende, entre outros fatores, dos componentes resultantes do metabolismo das leveduras. A linhagem utilizada na fermentação pode indiretamente afetar a qualidade do produto final. Bevan & Makover (1963) detectaram que algumas linhagens de *Sacch. cerevisiae* secretavam substâncias com efeito antibiótico, capazes de matar outras linhagens de leveduras. O agente liberado por determinadas células de levedura causando a morte de células sensíveis é chamado de fator killer, sendo uma das inúmeras toxinas produzidas por fungos. Este fator atua sem o contato entre células de linhagens killer e células de linhagens sensíveis (Woods & Bevan, 1968). A habilidade de matar que alguns microrganismos possuem não é um fenômeno biológico novo. As linhagens de leveduras são classificadas como killer, sensíveis e neutras. A proteína killer possui efeito letal sobre linhagens de leveduras sensíveis da mesma espécie, de espécies diferentes e, também, de gêneros diferentes (Polonelli & Morace, 1986).

Na literatura há uma vasta descrição de microrganismos produtores de toxina killer. Dentre eles, se podem destacar: *Sacch. cerevisiae* (Silva, 1996), *Williopsis mrakii* (Lowe *et al.*, 2000), *Kluyveromyces lactis* (Kitamoto *et al.*, 1992), *Hansenula anomala*, *Candida tropicalis* (Izgu *et al.*, 1997), *Ustilago maydis* (Kinal *et al.*, 1995), *Kluyveromyces phaffii* (Ciani & Fatichenti, 2001), *Pichia anomala* e *Kluyveromyces wickerhamii* (Comitini *et al.*, 2004).

2.1 Distribuição na natureza

Na natureza o número de linhagens killer de uma população heterogênea é variado. O percentual de leveduras killer, no final da fermentação, pode variar de 0 % a 100 %, dependendo da região geográfica (Cuinier & Gros, 1983). A frequência de linhagens killer, imunes e resistentes, depende do ambiente de onde foram isoladas. Ambientes promotores de maior competitividade podem exercer uma pressão de seleção de linhagens killer, “imunes” e resistentes. Meios de cultivo que permitam maior difusividade da toxina desfavorecem a permanência das linhagens sensíveis. Por outro lado, ambientes que estimulam a formação de enzimas proteolíticas por parte de linhagens sensíveis podem contribuir para a convivência pacífica entre killer, sensíveis e neutras (Silva, 1996). São comuns relatos de isolamento de leveduras sensíveis e killer utilizando o mesmo substrato e habitando o mesmo ambiente (Somers, 1973; Silva, 1996; Abranches *et al.*, 1997; Nout *et al.*, 1997, Sangorrín *et al.*, 2001). Estudos indicam que interações de sensibilidade ocorrem mais frequentemente entre leveduras isoladas de diferentes localidades e habitats. Yap *et al.*, (2000) observaram que leveduras isoladas de

ambientes que não o vinho apresentaram amplo poder de matar quando comparadas com uma linhagem conhecida como autóctone da fermentação do vinho.

2.2 Biologia de leveduras killer

A capacidade killer de *Sacch. cerevisiae* é determinada por partículas citoplasmáticas semelhantes a vírus (VLP). Estas partículas são formadas de fitas duplas de RNA dispostas linearmente. As linhagens killer de *Sacch. cerevisiae* possuem duas VLPs de diferentes tamanhos, ou seja, L-dsRNA (grande) e M-dsRNA (médio). Para que uma linhagem de *Sacch. cerevisiae* se comporte como killer é necessário que esta possua a VLP M-dsRNA. Esta é responsável pela formação da proteína killer e pela resistência da levedura ao fator killer do mesmo tipo (Young, 1981). Linhagens sensíveis não possuem M-dsRNA, mas podem conter a forma L-dsRNA (Silva, 2003). Uma característica incomum destas VLPs em leveduras é que elas geralmente não produzem efeito adverso em seu hospedeiro sendo, em alguns casos, até mesmo benéficas. Neste contexto, elas podem ser comparados com plasmídeos bacterianos, agindo como elementos extra-cromossômicos desnecessários, podendo ser úteis para seus hospedeiros (Polonelli *et al.*, 1992a).

2.3 Modo de ação da toxina killer

Linhagens distintas secretam toxinas com diferentes especificidades, apresentam reação cruzada e a secreção está, de um modo geral, vinculada à “auto-imunidade”. Atualmente, existem diferentes M-dsRNA (M1, M2, M3, M28, etc.), cada um codificando uma distinta especificidade de imunidade à toxina killer (Wickner, 1996) K_1 , K_2 , K_3 e K_{28} , respectivamente.

As toxinas do tipo K_1 e K_2 são similares no seu modo de ação, embora sejam proteínas diferentes (Marquina *et al.*, 2002). A ação do fator killer compreende dois estágios: no primeiro estágio a adsorção da toxina killer nos receptores da parede celular (1→6)- β -D-glicana é fortemente dependente do pH (Hutchins & Bussey, 1983). Esta etapa é independente de energia. O segundo estágio é dependente de energia e há alteração da membrana celular (Skipper e Bussey, 1977). A toxina killer interage com um receptor da membrana plasmática, tornando-a permeável a prótons e íons de potássio. Estas são as primeiras respostas das células sensíveis, aparentemente, devido à toxina killer agir como ionóforo e protonóforo. Mais tarde, a membrana se torna permeável a moléculas de maior peso molecular, como o ATP (Marquina *et al.*, 2002).

A toxina K_1 secretada é composta de duas subunidades distintas α e β , ligadas por pontes de enxofre. Ambas as subunidades parecem participar na ligação do receptor da parede celular. A subunidade β da toxina parece ser necessária para a ligação do receptor glicana da parede celular, enquanto a subunidade α , também envolvida na ligação da glicana (Bussey, 1991), penetra, em um processo dependente de energia, nos sítios da membrana

plasmática onde o efeito tóxico é manifestado pela liberação de íons e morte celular (de la Peña *et al.*, 1981; Polonelli *et al.*, 1992a).

A toxina killer K_{28} de *Sacch. cerevisiae* difere da toxina K_1 no seu modo de ação. A toxina K_{28} se liga à manoproteína da parede celular de leveduras. Esta toxina não se comporta como ionóforo e inibe a síntese do DNA nuclear (Tipper & Schmitt 1991).

2.4 Mutações no M-dsRNA

O vírus M-dsRNA de *Sacch. cerevisiae* pode sofrer mutações, originando linhagens killer com características particulares. Uma destas mutações pode alterar a imunidade ao fator killer. Tais células possuem um genótipo KIL-i e um fenótipo K^+R^W (Tipper & Bostian, 1984). Tem sido verificado que, na natureza, algumas leveduras se comportam como killer e formam produtos indesejáveis no vinho (Silva, 1999a). Outras são killer e apresentam sensibilidade a determinadas linhagens (Silvia, 1999b; Sangorrín *et al.*, 2001, Sangorrín *et al.*, 2007; Kapsopoulou, *et al.*, 2008). Leveduras mutantes suicidas (fenótipos K^+R^-) podem produzir quantidades normais de toxina, embora apresentem uma redução da imunidade. Linhagens K^+R^- são, de alguma maneira, defeituosas na partícula M-dsRNA que está relacionado com a imunidade (Bostian, 1983; Polonelli, *et al.*, 1991). Mutantes suicidas são linhagens que são mortas por concentrações de toxina apenas 100 vezes maior do que a requerida para matar células sensíveis (Bussey *et al.*, 1982; Tipper and Bostian, 1984). Mutantes neutros (K^-R^+) podem apresentar defeitos no gene precursor da toxina M, embora sejam normais no componente

responsável pela imunidade (Bevan & Somers, 1969; Polonelli, *et al.*, 1991). Bussey *et al.*, 1982 observaram que linhagens K⁻R⁺ podem secretar a toxina inativa.

Estudos realizados por Silva (1999b) mostraram que a linhagem Embrapa 1B, que se comporta como killer, é resistente à linhagem K1 (linhagem killer comercial), mas se mostra sensível à outra linhagem killer denominada Embrapa 91B, isolada de Vinhedos da região de Bento Gonçalves. Sangorrín *et al.*, (2001) também observaram que todas as linhagens killer autóctones, isoladas de mosto de uva das cultivares Merlot e Malbec do noroeste da Patagônia (Argentina), se comportaram como sensível a algumas toxinas killer de referência. O comportamento da linhagem Embrapa 1B e daquelas com ação semelhante a esta indica a presença de fenótipo suicida (Silva, 2003).

2.5 Fatores de alteração da produção, expressão e estabilidade do fator killer

A determinação de linhagens killer depende, entre outros fatores, do meio de cultivo, pH, temperatura e da linhagem sensível utilizada (Young and Philliskirk 1977; Silva, 1996). A linhagem K1 tem se mostrado instável com relação à capacidade killer (Silva *et al.*, 2006). Há leveduras que não são sensíveis à linhagem K1 e são sensíveis à linhagem 91B em meio sólido YEPD-MB tamponado (extrato de levedura-10 g/L, peptona-20 g/L, dextrose-20 g/L, azul de metileno-0,03 g/L, ágar-20 g/L; tampão Citrato/Fosfato (0,1M), pH 4,5), mas não são em meio MA-MB (25 % de mosto de uva, 1 % de extrato de

levedura, 0,003 % de azul de metileno e 2 % de ágar) (Silva, 1996; Silva 1999b). Além do pH do mosto possuir influência, o comportamento das linhagens nos diferentes meios de cultura se deve também a alguns fatores de proteção presentes no próprio mosto ou ainda, à formação de enzimas proteolíticas capazes de hidrolisar a toxina killer. Existe no sistema um componente interativo microrganismo/microrganismo/meio muito representativo. Além disso, existem outros fatores, como taxas volumétricas de formação da toxina e as fases nas quais os microrganismos sensíveis e killer se encontram, que podem determinar a complexidade do efeito prático do fator killer em processos industriais (Silva, 2003).

Foi observado que o extrato de levedura e a peptona, presentes no meio de cultura YEPD-MB, aumentam a produção do fator killer (Woods & Bevan, 1968). Kotani *et al.* (1977) observaram ainda que a presença de ADP neste mesmo meio aumenta a ação deste fator. No entanto, estes componentes parecem afetar apenas algumas linhagens, pois a sensibilidade de algumas e a resistência de outras não são modificadas por nenhum meio. Silva (1996) confirma esta observação. O autor verificou que a adição de extrato de levedura ao meio mosto-ágar (MA-MB) não foi suficiente para manter a ação killer das linhagens K1 (Lallemand) e Embrapa 91B contra algumas linhagens.

A capacidade killer de uma levedura depende da velocidade de formação do fator killer e das condições em que este fator é utilizado (Silva, 2003). A atividade killer permanece estável dentro de uma faixa estreita de pH ácido, é instável a temperaturas acima de 25 °C e pode ser inativada pela

agitação mecânica (Marquina *et al.*, 2002) e oxigenação (Silva, 2003). Polonelli *et al.*, (1992b) observaram que condições anaeróbicas parecem interferir mais no processo metabólico de linhagens sensíveis do que na produção de toxina por leveduras killer. A absorção da proteína killer depende das condições de crescimento, não sendo necessariamente fatal, a menos que a linhagem sensível seja exposta às condições ótimas para a estabilidade do fator killer (Woods & Bevan, 1968). Estudos realizados por Skipper & Bussey (1977) mostraram que na fase exponencial linhagens sensíveis são mais susceptíveis à toxina.

2.6 Fatores de proteção do fator killer

A toxina killer possui alguns protetores contra a inativação. Estudos mostram que o glicerol estabiliza e, até mesmo, aumenta a atividade da toxina killer (Panchal *et al.*, 1985; Sugisaki *et al.*, 1984). Sabe-se que o glicerol é formado pela levedura durante o processo de fermentação. Existem também proteínas que inibem a ação de algumas proteinases que podem inativar o fator killer. Existem proteinases, que ao invés de inativar o fator killer podem, até mesmo, estimular sua atividade, dependendo do pH (Silva, 2003).

Algumas leveduras neutras podem oferecer proteção às células sensíveis contra a toxina killer (Silva, 1996; Bussey *et al.*, 1982). Esta proteção pode ocorrer de duas formas: através de um mecanismo “competitivo” e de um mecanismo “não competitivo”. No primeiro, a linhagem neutra secreta toxina killer defeituosa (inativa) que possui afinidade pelos sítios de ligação de toxina das linhagens sensíveis, competindo com a toxina killer ativa. Como esta

proteína inativa compete com a toxina ativa pelo mesmo sítio de ligação, não há necessidade da presença de células protetoras na cultura (Silva, 1996). Bussey *et al.* (1982) observaram que dois extratos de mutantes, NLP-3 e NLP-7, competiram significativamente com a toxina ativa reduzindo a morte de linhagens sensíveis. No mecanismo “não competitivo” a linhagem neutra presente no meio fornece os sítios onde a toxina ativa se adere. Estas células não progridem do estágio 1 para o estágio 2 (os dois estágios que compreendem a ação da toxina killer) e assim, permanecem viáveis. Como a toxina ativa se liga tanto às células sensíveis como às neutras, a atividade killer se dilui (Silva, 1996). No entanto, resultados obtidos pelo autor mostram a complexidade da biologia de leveduras killer, pois uma linhagem neutra, Embrapa 68B, protege eficientemente células sensíveis contra a ação da proteína killer ativa, desde que as duas estejam presentes no meio. No entanto, o sobrenadante estéril desta mesma linhagem, ou seja, sem a presença de células da linhagem Embrapa 68B, ao invés de proteger a linhagem sensível, potencializou o efeito killer. O autor sugere que, se a toxina inativa sozinha não conserva a habilidade de se ligar aos receptores da parede celular de linhagens sensíveis, e se a presença de células da linhagem neutra é necessária, então o mecanismo não competitivo pode ser o mecanismo de proteção celular.

2.7 Aplicações

Outras possíveis aplicações das toxinas de leveduras killer têm sido alvo de estudos. Dentre elas, tem sido evidenciado o uso de toxinas killer para

prevenir deterioração em alimentos, evitar contaminação de microrganismos patogênicos em plantas, construção de microrganismos recombinantes e o emprego de leveduras killer em processos fermentativos.

2.7.1 Alimentos

Lowes *et al.* (2000) observaram os efeitos da toxina killer na contaminação de leveduras em silagem de milho e iogurte. Os autores obtiveram um microrganismo recombinante, *Aspergillus niger*, capaz de expressar o gene da toxina killer HMK da levedura *Williopsis mrakii*. Foi observado que a toxina killer produzida por *A. niger* foi capaz de inibir a contaminação por leveduras em ambos os alimentos analisados. Kitamoto *et al.* (1992) observaram que o fator killer da levedura *Kluyveromyces lactis* IFO 1267 pode prevenir a deterioração aeróbica em silagem. Existem relatos de linhagens de leveduras killer de *Sacch. cerevisiae* e *Hansenula anomala* utilizadas para prevenir contaminações por outra linhagem de levedura killer *Candida tropicalis* em uma indústria de panificação (Izgu *et al.*, 1997).

2.7.2 Plantas

Uma possível aplicação do fator killer tem sido estudada através da produção de plantas de tabaco transgênicas que expressam a toxina killer do fungo patogênico *Ustilago maydis*, com o objetivo de matar outras linhagens sensíveis de *U. maydis* (Kinal *et al.*, 1995). Donini *et al.* (2005) verificaram a atividade antimicrobiana da toxina killer na inibição do crescimento e

germinação de esporos de importantes fungos e bactérias patogênicas de plantas. Os autores observaram uma forte atividade da proteína killer, *in vitro*, contra *Pseudomonas syringae* e *Erwinia carotova*, assim como uma inibição de 50 e 62 % na germinação de esporos de *Botrytis cinerea* e *Fusarium oxysporum*, respectivamente. Quando foram utilizadas partículas virais purificadas (PVX-KP), *in vitro*, a inibição da germinação dos esporos de *B. cinerea* e *F. oxysporum* alcançou 90 e 95 %, respectivamente e, *in vivo*, plantas infectadas com estas mesmas partículas apresentaram uma redução de 90 % no crescimento de *P. syringae*.

2.7.3 Medicina

Tem sido evidenciado o uso de leveduras killer contra patógenos humanos. Foi observado que, *in vitro*, partículas virais purificadas (PVX-KP) inibiram o crescimento dos patógenos humanos. O crescimento de *Candida albicans* foi inibido em 86 % e o de *Staphylococcus aureus* em 80 % (Donini *et al.*, 2005). Foi verificado que a toxina killer de *Pichia anomala* foi efetiva contra algumas bactérias Gram-positivas, como *Staphylococcus aureus*, *S. haemolyticus*, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium* e *Streptococcus pneumoniae* (Conti *et al.*, 2000).

2.7.4 Produção e secreção de proteínas heterólogas

Estudos também vêm sendo realizados na área de produção e secreção de proteínas heterólogas em *Schizosaccharomyces pombe*, que não

apresenta o fenótipo killer (Heintel *et al.*, 2001). Os autores demonstraram que esta levedura recombinante foi capaz de secretar a proteína killer K₂₈ de *Sacch. cerevisiae*.

2.7.5 Vinificação

O efeito antibiótico da toxina tem induzido pesquisadores a utilizar industrialmente leveduras killer em processos fermentativos não estéreis, ou seja, sem contaminantes (Mitchell & Bevan, 1987). Longo *et al.* (1992) realizaram uma fermentação mista, utilizando uma linhagem de levedura killer e outra sensível. Os autores observaram que o número de células viáveis, no início e na fase exponencial desta fermentação foi maior para células curadas (sensíveis) comparado a células killer. A coexistência entre leveduras killer, sensíveis e neutras nas cubas de fermentação foi observada por Sangorrín *et al.*, (2007). Os autores verificaram ainda que a toxina killer de *Sacharomyces cerevisiae* não foi capaz de matar a maioria das leveduras não-*Saccharomyces* isoladas nas cubas de fermentação.

Estudos têm sido realizados utilizando, não a levedura killer no processo fermentativo, mas sim a sua toxina. Foi verificado que o fator killer da levedura *Kluyveromyces phaffii* DBVPG 6076 exibiu grande potencial na inibição de leveduras apiculadas durante a fermentação de suco de uva (Ciani & Fatichenti, 2001). Comitini *et al.* (2004) observaram resultados semelhantes na inibição das leveduras apiculadas em vinhos Sangiovese. Os autores verificaram que as toxinas killer das leveduras *Pichia anomala* e *Kluyveromyces wickerhamii* mantiveram sua ação por dez dias e, neste

período, reduziram drasticamente o número de células de *Dekkera bruxellensis* contaminantes.

Na elaboração de vinhos, a levedura selecionada killer pode exercer um importante papel na redução do número de microrganismos do mosto. Para tal, é necessário que a linhagem em questão seja estável como a linhagem EMBRAPA 91B, não se comporte como a linhagem comercial K1, que apresenta falhas na ação killer (Silva *et al.*, 2006), e muito menos como a linhagem EMBRAPA 1B, que, além de killer, pode se comportar como uma levedura sensível (Silva, 1996). Linhagens killer do tipo K_2 , ao contrário de linhagens K_1 , possuem o pH mais próximo ao pH do vinho, e por este motivo são escolhidas para o processo de vinificação. Silva *et al.*, (2006) observaram diferenças entre linhagens $K_2^+R_2^+$ no que se refere à capacidade de matar células sensíveis. O tratamento dado ao mosto de uva também pode influenciar na ação de leveduras killer (Silva, 1996). Tem sido observado que a toxina killer pode ser adsorvida pela bentonita, utilizada em vinhos brancos, quando em concentração de 0,1 % (Silva, 2003). A linhagem de levedura utilizada durante a vinificação deve ser selecionada por suas características enológicas e não por sua atividade killer. A desvantagem de usar linhagens killer é que elas fornecem aos viticultores uma falsa segurança com relação à predominância destas linhagens durante o processo de elaboração de vinhos (Silva, 1996).

2.8 Produção do fator killer

Palfree & Bussey (1979) monitoraram o crescimento celular e atividade killer de uma linhagem de levedura K^+R^+ . Os autores observaram que, à medida que o número de células aumentou, a atividade killer também aumentou, nivelando a produção quando a cultura alcançou a fase estacionária. No entanto, as curvas do crescimento celular e da atividade killer não foram paralelas, o que indica que a taxa de produção da toxina não foi simplesmente proporcional ao número de células. Os autores sugerem ainda que a toxina pode ter sido inativada a uma taxa não simplesmente proporcional à sua concentração. Estes padrões podem sofrer pequenas mudanças quando a fonte de carbono do meio de cultivo for galactose, lactose ou sacarose ao invés de glicose ou, ainda, quando o meio for suplementado com extrato de levedura e peptona.

Ao monitorar a produção da toxina killer de *P. anomala* (Pikt) e *K. wickerhamii* (Kwkt), Comitini *et al.* (2004) observaram diferenças com relação ao início da síntese da toxina de cada levedura. Os autores verificaram que *P. anomala* iniciou a produção da toxina após seis horas de incubação, enquanto *K. wickerhamii* requereu um tempo de incubação maior. Esta última iniciou a síntese da proteína killer apenas no final da fase exponencial. Os autores observaram ainda que, enquanto a produção da Pikt foi estável durante a fase estacionária, a produção da Kwkt diminuiu com o tempo. Existem estudos mostrando que a ação killer também possui uma fase lag (Pommier *et al.*, 2005). Como se sabe que há uma concentração mínima necessária de moléculas para matar uma única célula, que é $2,8 \times 10^4$ (Bussey *et al.*, 1979), a

fase lag da ação killer representa o período de acumulação da toxina no meio, e assim, sua concentração torna-se elevada com relação à população de linhagens sensíveis (Pommier *et al.*, 2005).

A utilização de leveduras killer e de suas toxinas abrange uma vasta área que vai desde a medicina até o uso industrial na produção de cervejas e vinhos. Sua aplicação, no entanto, não é tão simples, pois a ação killer depende de muitos fatores que podem interferir na produção, na eficiência da atividade da proteína e na sensibilidade da linhagem alvo. Como a ação das linhagens killer depende da formação de proteína killer funcional, da estabilidade desta produção, e da vulnerabilidade das linhagens sensíveis, este trabalho teve como objetivo verificar as condições para a detecção e expressão do fator killer produzido por linhagens de levedura *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de mosto de uva.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Linhagens

Foram utilizadas as linhagens killer *Saccharomyces cerevisiae* Embrapa 91B (K⁺ R⁺), *Sacch. cerevisiae* Embrapa 1B (K⁺ R^w) e uma linhagem comercial *Sacch. cerevisiae* K1 (K⁺ R⁺) (Lallemand), referidas aqui como 91B, 1B e K1, respectivamente. Como linhagem sensível, foi empregada uma suspensão de células com uma concentração de 10⁷ cél/mL da linhagem *Sacch. cerevisiae* Embrapa 26B (K⁻ R⁻), aqui referida como 26B.

3.2 Procedimento padrão para os meios de cultura líquidos para processos descontínuos

Os meios de cultura líquidos (descritos no item 3.8) preparados para os processos descontínuos em frascos de Fernbach foram esterilizados em autoclave horizontal (FABBE, modelo 104) a 121 °C durante 30 minutos. O mosto de uva utilizado em todos os meios de cultura foi da cultivar BRS

Lorena, obtida por meio de cruzamento entre as cultivares 'Malvasia Bianca' e 'Seyval' (Camargo & Guerra, 2001).

3.3 Preparo dos inóculos para produção do fator killer

Os meios de cultura preparados para inóculo foram esterilizados em autoclave horizontal (FABBE, modelo 104) a 121 °C durante 30 minutos. As culturas inoculadas com as respectivas linhagens killer foram transferidas para incubadora giratória (G27- New Brunswick, USA) e mantidas a 18 °C, 150 rpm por 15 horas. Os inóculos foram padronizados de modo a atingir concentrações entre 10^6 cél/mL e 10^7 cél/mL. O mosto utilizado em todos os meios de cultura foi da cultivar BRS Lorena.

3.4 Procedimento padrão para as amostras coletadas em meio líquido para produção do fator killer

Em todas as amostras coletadas em meio líquido, as células foram removidas do meio por centrifugação a 10000 x g (Eppendorf Centrifuge 5415C, Germany), submetidas à filtração esterilizante com poros de 0,22 µm (Millipore, JBR610021, USA) e armazenadas em tubos de eppendorf a -18 °C para posteriores análises.

3.5 Preparo dos meios de cultura sólidos

A cada meio de cultura foram adicionados 10 g/L de ágar (Difco) e 0,6 mL/L de uma solução 0,003 % de azul de metileno (Merck). O pH do ágar

foi ajustado para 6,5. O restante do meio foi ajustado para pH 4,5 e esterilizados separadamente em autoclave horizontal (FABBE, modelo 104) a 121 °C durante 30 minutos e transferidos para placas de Petri. O mosto utilizado em todos os meios de cultura foi da cultivar BRS Lorena.

3.6 Teste killer pela técnica proteína/célula

A técnica proteína/célula consistiu em transferir 30 µL do sobrenadante, submetido à filtração esterilizante por membrana com poros de 0,22 µm (Millipore, JBR610021, USA), para três poços de 0,5 cm de diâmetro feitos nos meios sólidos em placas de Petri de 9 cm de diâmetro com a suspensão de células da linhagem de levedura sensível previamente semeada. As placas foram mantidas em estufa incubadora Lab-line Imperial II (Radiant Incubator, Illinois, USA) a 25 °C por 48 horas.

3.7 Seleção do meio de cultura sólido para detecção do fator killer

3.7.1 Diferentes concentrações de mosto de uva e ELNC

Foram preparados meios de cultura com crescentes concentrações de mosto de uva (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 e 90 %) combinada com decrescentes concentrações de extrato de levedura não comercial (ELNC) (90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 e 10 %) (Silva e Almeida, 2006), denominados, respectivamente, ME10, ME20, ME30, ME40, ME50, ME60, ME70, ME80 (aqui denominado Mosto 80), ME90.

A produção da toxina killer das linhagens 1B, K1 e 91B foi realizada em meio líquido preparado com 85 % de mosto e 15 % de ELNC. O pH do meio foi ajustado para 4,5. A avaliação dos diferentes meios de cultura foi efetuada pela técnica proteína/célula.

3.7.2 Meio de cultura sólido para detecção da toxina killer com diferentes concentrações de mosto de uva e G7c

Foram preparados meios de cultura com crescentes concentrações de mosto de uva (10, 20, 30, 40, 50, 60 70, 80 e 90 %) combinada com decrescentes concentrações de meio G7c (Silva e Almeida 2006) (90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 e 10 %) denominados, respectivamente, MG10, MG20, MG30, MG40, MG50, MG60, MG70, MG80 e MG90. A avaliação dos diferentes meios de cultura foi efetuada pela técnica proteína/célula. Foi utilizado o sobrenadante contendo o fator killer da linhagem 1B.

3.7.3 Teste comparativo entre diferentes meios de cultura para detecção fator killer

Foram preparados os meios de cultura YEPD-MB (10 g/L de extrato de levedura comercial, 20 g/L de peptona (Difco), 20 g/L de dextrose (Difco), tampão Citrato/Fosfato 0,1M (Merck)), Mosto ágar (MA-MB) preparado com 25 % de mosto e 10 g/L de extrato de levedura comercial (ELC – Difco) (Silva, 1996), Mosto 80 (já mencionado no item 3.7.1), e um meio de cultura

preparado com 25 % de mosto de uva e 75 % de ELNC. A avaliação dos diferentes meios de cultura foi efetuada pela técnica proteína/célula.

3.7.4 Influência da sacarose no comportamento da linhagem sensível Embrapa 26B

Foram preparados os meios descritos abaixo, sendo que, nos três últimos, o mosto foi substituído por uma solução de 200 g/L de sacarose (Difco). Esta concentração de sacarose foi utilizada com o objetivo de mimetizar a concentração de açúcar presente no mosto de uva, que é 200 g/L.

- Mosto 80;
- MA-MB;
- 25 % mosto de uva; 75 % ELNC;
- 80 % solução de sacarose; 20 % ELNC;
- 25 % solução de sacarose; 10 g/L de ELC (Difco); água destilada q.s.p.;
- 25 % solução de sacarose; 75 % ELNC.

A influência da sacarose foi testada pela técnica proteína/célula.

3.7.5 Influência da glicose no comportamento da linhagem sensível Embrapa 26B

Foram preparados os meios descritos abaixo, sendo que, no último o mosto foi substituído por uma solução de 200 g/L de glicose (Difco). Esta

concentração de glicose foi utilizada com o objetivo de mimetizar a concentração de açúcar presente no mosto de uva, que é 200 g/L.

- Mosto 80;
- 80 % solução de glicose; 20 % ELNC.

O comportamento sensível da linhagem foi avaliado pela técnica proteína/célula.

3.7.6 Influência do ELNC na ação do fator killer e no comportamento da linhagem sensível

Para medir a influência do ELNC na ação do fator killer foram preparadas duas soluções a partir do sobrenadante contendo a proteína killer, descritas abaixo.

- *Solução 1 (toxina/ELNC)*: Uma solução de 80 % de ELNC foi preparada e esterilizada em autoclave horizontal (FABBE, modelo 104) a 121 °C durante 30 minutos. Uma alíquota de 1 mL desta solução foi misturada em 1 mL do sobrenadante submetido à filtração esterilizante com poros de 0,22 µm (Millipore, JBR610021, USA) contendo o fator killer da linhagem 1B.
- *Solução 2 (toxina/H₂O destilada)*: Outra solução foi preparada misturando 1 mL de água destilada esterilizada em autoclave horizontal (FABBE, modelo 104) à 121 °C durante 30 minutos e 1 mL do sobrenadante submetido à filtração esterilizante

com poros de 0,22 μm (Millipore, JBR610021, USA) contendo o fator killer da linhagem 1B.

- *Controle*: Foi utilizado o sobrenadante puro submetido à filtração esterilizante com poros de 0,22 μm (Millipore, JBR610021, USA) contendo o fator killer da linhagem 1B.

A técnica proteína/célula foi efetuada em meio sólido Mosto 80.

Para avaliar a influência do ELNC no comportamento da linhagem sensível, duas soluções foram preparadas como descritas a seguir.

- Solução A (Mosto/ELNC): 80 % de mosto de uva/20 % de ELNC;
- Solução B (ELNC): 80 % de ELNC/20 % de água destilada;
- Controle: Água destilada.

As soluções e o controle foram esterilizadas em autoclave horizontal (FABBE, modelo 104) a 121 °C durante 30 minutos e utilizadas para preparar suspensões de células da linhagem sensível (10^7 cél/mL). Cada suspensão foi semeada em meio sólido Mosto 80 separadamente e a influência do ELNC foi verificada pela técnica proteína/célula.

3.8 Seleção do meio de cultura líquido para produção do fator killer

3.8.1 Diferentes concentrações de mosto de uva e ELNC

Foram preparados meios de cultura com crescentes concentrações de mosto de uva (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 e 90 %) combinada com decrescentes concentrações de ELNC (90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 e 10 %), denominados, respectivamente, M10, M20, M30, M40, M50, M60, M70, M80 e M90 líquido.

O pH de todos os meios foi ajustado para 4,5. Cada meio foi preparado em um tubo de ensaio com tampa rosqueada e esterilizado em autoclave horizontal (FABBE, modelo 104) a 121 °C durante 30 minutos. Uma suspensão de células da linhagem 1B, com concentração de 10^7 cél/mL foi preparada e 1 mL foi transferido para cada tubo de ensaio. As culturas foram mantidas a 18 °C por 72 horas. A produção do fator killer foi avaliada pela técnica proteína/célula em meio sólido Mosto 80.

3.8.2 Reduções na concentração de mosto de uva

Foram preparados três meios de cultura líquidos para o inóculo das linhagens killer:

- M2,5 líquido: 2,5 % de mosto de uva/ 95 % de ELNC
- M5 líquido: 5 % de mosto de uva / 95 % de ELNC
- M10/ELC líquido: 10 % de mosto de uva/ 1 % de extrato de levedura comercial (ELC)/ q.s.p. 100 mL de água destilada.

Foram avaliadas as linhagens 1B, 91B e K1. O pH de todos os meios foi ajustado para 4,5. A produção da toxina killer foi detectada pela técnica proteína/célula em meio Mosto 80.

3.8.3 Substituição do ELNC por G7c

Foram preparados dois meios de cultura para os inóculos em frascos de Erlenmeyer. O meio A foi preparado com 5 % de mosto de uva e 95 % de G7c e o meio B com 5 % de mosto de uva e 95 % de ELNC. O pH dos meios foi ajustado para 4,5. Uma suspensão de células da linhagem killer 1B, contendo 10 mL (10^7 células/mL), foi inoculada em cada meio de cultura, separadamente. A formação da toxina foi avaliada pela técnica proteína/célula em meio sólido preparado com 80 % de mosto e 20 % de G7c.

3.8.4 Meio de cultura preparado com G7

Foram preparados meios de cultura para os inóculos em tubos de ensaio com tampa rosqueada com meio G7 (Silva e Almeida, 2006), para as três linhagens killer em estudo. O pH dos meios foi ajustado para 4,5. Os inóculos permaneceram a 18 °C por 42 horas. A detecção da proteína killer foi efetuada pela técnica proteína/célula em meio Mosto 80.

3.8.5 Meio de cultura preparado com G7c e diferentes concentrações de sacarose

Foram preparados quatro meios de cultura G7c. Em cada meio, foram adicionadas diferentes concentrações de sacarose (10, 100, 150 e 200 g/L). O pH dos meios foi ajustado para 4,5 e esterilizado a 121 °C durante 30 minutos. Cada meio de cultura foi inoculado com as três linhagens, separadamente. As culturas permaneceram a 18 °C, sem agitação. Amostras

foram coletadas após 16, 40 e 64 horas. A produção da proteína killer foi avaliada pela técnica proteína/célula em meios MG30 e Mosto 80.

3.9 Crescimento dos microrganismos em processo descontínuo

3.9.1 Processo aeróbico/ anaeróbico em biorreator

3.9.1.1 Preparo do meio de cultivo

Foram preparados 16,4 L do meio de cultura M5 líquido e transferidos para o biorreator de 50 L (BiolaFitte, France). O meio de cultura foi esterilizado *“in situ”* a 121-123 °C, 1 atm, por 30 minutos.

3.9.1.2 Preparo do inóculo

Seis frascos de Fernbach com 600 mL de meio M5 líquido foram usados para o preparo do inóculo. O pH do meio foi determinado, mas não controlado. A linhagem 1B foi inoculada.

3.9.1.3 Processo

Ao adicionar o inóculo (10^6 cél/mL), o biorreator de 50 L operou com um volume inicial de trabalho de 20 L. As condições de cultivo foram: 25 °C; 300 rpm; 2 volumes de ar/volume de meio/minuto (vvm de ar). Após oito horas, a aeração e a agitação mecânica foram desligadas. Amostras foram coletadas de hora em hora até oito horas de crescimento. Após 24 horas do processo, já em condições de anaerobiose, uma nova amostra foi retirada do biorreator.

3.9.2 Processo aeróbico em frascos de Fernbach

3.9.2.1 Preparo do meio de cultivo

Foi preparado 2.050 mL do meio M5 líquido em um frasco de Fernbach. O pH do meio foi determinado mas não controlado.

3.9.2.2 Preparo do inóculo

Foi preparado 450 mL de meio M5 líquido e transferido para frasco de Fernbach. A linhagem 1B foi inoculada.

3.9.2.3 Processo

O inóculo, com concentração de 10^7 cél/mL, foi transferido para o frasco de Fernbach contendo 2.050 mL de meio de cultivo estéril, totalizando 2,5 L. O processo de crescimento foi realizado sem agitação mecânica, e um conjunto estéril composto por uma mangueira conectada em um filtro esterilizante hidrófobo com poros de $0,2 \mu\text{m}$ (Millipore-Millex FG₅₀) foi acoplado na tampa do frasco para injeção de ar (fluxo de ar de $56,8 \text{ cm}^3/\text{s}$). Amostras foram retiradas de hora em hora até oito horas de crescimento. A aeração foi desligada e uma amostra foi retirada após 24 horas do início do processo.

3.9.3 Processo anaeróbico

3.9.3.1 Preparo do meio de cultivo

O meio M5 líquido foi preparado em frascos de Fernbach. O experimento foi efetuado com três repetições, cada uma contendo 1.640 mL.

3.9.3.2 Preparo do inóculo

Em um frasco de Fernbach, 1,08 L de meio M5 líquido foi preparado. O pH do meio foi medido, mas não controlado. A linhagem 1B foi inoculada.

3.9.3.3 Processo

Uma quantidade de 360 mL de inóculo, com concentração de 10^6 cél/mL, foi transferida para cada uma das repetições. Os frascos permaneceram em temperatura ambiente e amostras foram coletadas de hora em hora até oito horas de fermentação. Após, 24 horas do processo, uma nova coleta foi efetuada.

3.9.4 Processo anaeróbico com modificações

3.9.4.1 Substituição do ELNC por G7c

Foi realizado um processo anaeróbico no meio líquido selecionado e tido como indutor da produção da proteína killer. A composição do meio, já descrito no item 3.8.3, foi: Mosto 5 %/ G7c 95 %. Este trabalho foi efetuado com duas linhagens killer, 1B e 91B.

3.9.4.1.1 Preparo do meio de cultivo

O meio de cultura descrito foi preparado em uma quantidade de 1640 mL, em um frasco de Fernbach. O experimento foi efetuado com uma repetição.

3.9.4.1.2 Preparo do inóculo

O inóculo foi preparado em frascos de Fernbach com o meio de cultivo descrito. O pH do meio foi medido, mas não controlado. A quantidade preparada foi de 360 mL. A linhagem killer foi inoculada.

3.9.4.1.3 Processo

Uma quantidade de 360 mL do inóculo (10^7 cél/mL) foi transferida para frasco de Fernbach contendo o meio de cultivo. O volume inicial de trabalho foi de 2 L. O frasco permaneceu em temperatura ambiente, sem agitação mecânica e amostras foram coletadas de hora em hora até oito horas de fermentação e em 24 horas.

3.9.4.2 Adição de sacarose

Foi preparado o meio de cultura já descrito no item 3.9.4.1, preparado 5 % de mosto e 95 % de G7c, mas suplementado com 200 g/L de sacarose. O preparo do meio de cultivo, do inóculo e o processo estão descritos nos itens 3.9.4.1.1, 3.9.4.1.2 e 3.9.4.1.3, respectivamente. Este trabalho foi realizado com a linhagem 1B (10^7 cél/mL).

3.9.4.3 Substituição do G7c por ELNC com diferentes concentrações de sacarose

Foi preparado o meio descrito no item 3.9.4.2, mas com substituição do G7c por ELNC, aqui denominado M5 líquido suplementado com 200 g/L de sacarose. Este mesmo meio (5 % de mosto/ 95 % de ELNC) foi preparado com menores concentrações de sacarose (150 e 100 g/L), denominados aqui, M5 líquido suplementado com 250 g/L de sacarose e M5 líquido suplementado com 100 g/L de sacarose, respectivamente. O preparo do meio de cultivo, do inóculo e o processo estão descritos nos itens 3.9.4.1.1, 3.9.4.1.2 e 3.9.4.1.3, respectivamente. Este trabalho foi realizado com a linhagem 1B (10^7 cél/mL).

Do meio de cultura selecionado acima, processos em condições anaeróbicas também foram realizados com as linhagens 91B e K1, ambas com concentrações de 10^7 cél/mL.

3.9.5 Processo aeróbico em frascos de Fernbach com modificações

Este trabalho foi efetuado com o meio selecionado no item 3.9.4.3. O preparo do meio de cultivo, do inóculo, e o processo estão descritos nos itens 3.9.4.1.1, 3.9.4.1.2 e 3.9.4.1.3, respectivamente, sendo que, neste caso, um conjunto estéril composto por uma mangueira conectada em um filtro esterilizante hidrófobo com poros de 0,2 μm (Millipore-Millex FG₅₀) foi acoplado na tampa do frasco para injeção de ar (fluxo de ar de 56,8 cm^3/s). O trabalho foi realizado com as três linhagens killer 1B, 91B e K1, separadamente, ambas com concentração de 10^7 cél/mL.

3.10 Determinação do crescimento celular

A determinação de crescimento celular foi estabelecida com base na densidade óptica (DO) segundo Pringle and Mor (1975). A DO foi determinada a 600 nm em espectrofotômetro Lambda Bio (Perkin Elmer-USA). O valor da densidade óptica medida foi ajustado de modo a fornecer unidades arbitrárias compreendidas entre 0,1 a 0,2. A contagem de células totais e em brotamento foi efetuada em câmara de Neubauer melhorada, visualizada em microscópio Zeiss (Universal III, Alemanha) equipado com Condensador ACHR. APL. 1,4, Objetivas de Plan 2,5/0,08; Plan 6,3/0,16; Plan 16/ 0,35; Plan 40/0,65; Plan 100/1,25 oil e Ocular de 10x/18.

3.11 Determinação do pH

A determinação do pH foi efetuada em instrumento pHmetro Marconi (PA 200).

3.12 Etanol

A determinação do teor alcoólico foi efetuada segundo metodologia definida por Ribéreau-Gayon *et al.* (1982). As amostras foram alcalinizadas e destiladas em aparelho Destilador Eletrônico Enoquímico (GIBERTINI). O grau alcoólico foi medido por densimetria, utilizando o densímetro ANTON PAAR DMA45 com módulo SP2 (Áustria), equipado com sistema de refrigeração HAAKE G e com controle de temperatura HAAKE D3 (Alemanha).

3.13 Compostos voláteis por GC capilar

Os compostos voláteis foram determinados por meio de cromatógrafo de gás Perkin Elmer AutoSystem XL, com detector de ionização de chama; coluna capilar Chrompack Capillary Column, modelo CP-Wax 57 CB (comprimento de 50 m, diâmetro externo de 0,25 mm e diâmetro interno de 0,2 µm). As amostras foram destiladas e uma solução de cada amostra foi preparada transferindo 1 mL do destilado para tubos de Eppendorf e 100 µL de uma solução de padrão interno (4-metil-2-pentanal) a 810 µg/mL. As amostras foram homogeneizadas e 1 µL foi utilizado para injeção na coluna, de acordo com as condições descritas abaixo:

- Temperatura inicial: 40 °C por 5 minutos;
- Rampa de aquecimento: 2 °C /min por 10 minutos até atingir 60 °C;
- Rampa de aquecimento: 15 °C /min por 17,5 minutos até atingir 220 °C;
- As condições de análise foram as seguintes: gás de arraste: hélio (30 psi, vazão 1,8 mL/min); comburente: ar sintético (85,7 mL/minuto); combustível: H₂ (53,1 mL/minuto); temperatura do injetor: 160 °C; temperatura do detector: 210 °C.

3.14 Estabilidade do fator killer

Foi avaliada a estabilidade da toxina killer da linhagem 1B armazenada a -18 °C. A ação do fator killer foi detectada pela técnica proteína/célula em meio sólido definido no item 3.7.

3.15 Análise estatística

Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado, com três repetições. Os resultados foram submetidos à análise de variância e a comparação das médias foi efetuada utilizando o programa `anvartukey.txt`, gentilmente cedido por Dr. Gildo Almeida da Silva, por meio do R program (Venables & Smith, 2004). Foram efetuadas ainda análise de regressão entre as variáveis DO e tempo e número mínimo de moléculas de toxina killer (n_{mm_t}) e DO.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Seleção do meio de cultura para detecção do fator killer

O meio de cultura usualmente utilizado para efetuar a detecção do fator killer é o YEPD-MB (Bostian e Hopper, 1980; Longo *et al.*, 1992; Silva, 1999a; Sangorrín *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2006). O meio contendo mosto ágar (MA-MB) foi utilizado por Silva (1996) para detecção de linhagens killer, sensíveis e neutras de leveduras isoladas de mosto de uva. O autor mostrou que há linhagens sensíveis em YEPB-MB que se comportam como resistentes ao mesmo fator killer se estas linhagens forem avaliadas em MA-MB. Se a expressão do fator killer apresenta esta dependência de forma tão acentuada, todos os testes para detecção de linhagens killer e sensíveis para fins enológicos, segundo o autor, devem ser efetuados em meio contendo mosto de uva. Silva (1996) usou a técnica de expressão e detecção simultânea, ou seja, célula killer/célula sensível, inoculando a célula killer sobre a linhagem sensível previamente plaqueada. Neste caso é difícil saber se o comportamento da sensível foi provocado pela falta de produção do fator killer ou se o mosto

presente no meio de cultura utilizado exerceu alguma forma de proteção. Percebe-se, portanto, que o procedimento para a determinação de linhagens killer e sensíveis nem sempre é reprodutível. Assim, torna-se necessário investigar as condições necessárias para se obter a detecção do fator killer de forma mais confiável.

4.1.1 Meio de cultura com diferentes concentrações de mosto de uva e ELNC

Para avaliar a influência de diferentes concentrações de mosto de uva e ELNC na detecção do fator killer, crescentes concentrações de mosto de uva (10 a 90 %) e decrescentes concentrações de ELNC (90 a 10 %) foram usadas. Os resultados mostraram que, dependendo da concentração de ELNC no meio, a proteína formada atuou como fator killer. A proteína só iniciou sua ação killer quando a concentração de ELNC atingiu 50 % e, mesmo assim, apenas a toxina killer da linhagem 1B pôde ser detectada. A proteína da linhagem 91B só se comportou como killer na concentração de 30 % de ELNC ou inferior a este valor. A Figura 1 mostra a relação entre a concentração de mosto de uva na composição do meio mosto/ ELNC e os diâmetros dos halos formados pela ação da toxina killer da linhagem 1B. Efetuando uma análise de regressão entre os valores de 40 a 70 % de mosto, verificou-se que o diâmetro do halo aumentou conforme a seguinte equação:

$$D_h = -0,00125x^2 + 0,1645x - 4,535$$

$$r^2 = 0,9134$$

Observa-se que a partir de 70 % de mosto de uva, os valores dos diâmetros se estabilizaram. Como foi empregada a técnica proteína/célula, ficou estabelecido que a toxina killer formada por linhagens killer pode estar presente no meio sem exercer sua função killer. Pode haver, portanto, expressão de formação e não haver expressão de sensibilidade. Silva (1996) observou linhagens sensíveis e neutras ao mesmo fator killer, mas em meios com composição química diferentes. Sangorrín *et al.* (2001) observou linhagens neutras em meio YEPD-MB pela técnica célula/célula. Neste caso, não se sabe se os resultados obtidos pelos autores se deveram à falta de produção ou a problemas na detecção. A ação killer vai depender não apenas do pH do meio como amplamente divulgado, mas também da composição química do meio de cultura.

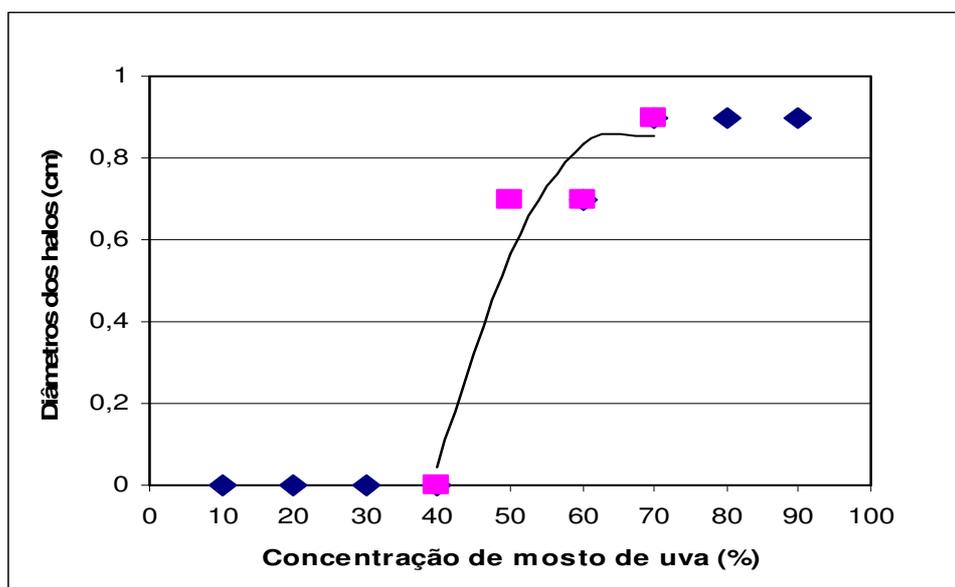


Figura 1: Concentração de mosto de uva na composição do meio de cultura sólido mosto/ELNC e os diâmetros dos halos formados. O sobrenadante utilizado contendo o fator killer foi o obtido com a linhagem 1B.

Como o fator killer atua sobre a parede e a membrana celular, a proteção do ELNC pode estar vinculada a substâncias que agem sobre esta última. Além do fato de que tem sido enfatizado que meios de cultura suplementados com extrato de levedura aumentam a viabilidade celular (Rensburg *et al.*, 2004), a insensibilidade adquirida da linhagem sensível ao fator killer também pode estar relacionada com o estresse provocado pelo ELNC em elevadas concentrações. Silva e Almeida (2006) mostraram que este componente do meio de cultura possui características quelantes. Assim sendo, a levedura sensível estaria sob estresse por indisponibilidade de cátions, especialmente o Fe^{+++} . Nestas circunstâncias, a célula seria estimulada a produzir trealose. Há evidências sugerindo que a trealose presente nas células de levedura funciona como agente protetor de estresse (Wiemken, 1990) e estabilizador da membrana (Crowe *et al.*, 1988, Crowe *et al.*, 2001). Estas evidências explicam a dependência da ação da proteína formada com relação à capacidade de comprometer a viabilidade celular. O acúmulo de trealose foi verificado em situações outras de estresse como calor (Hottinger *et al.*, 1987; Lewis *et al.*, 1995, Alexandre, *et al.*, 1998), pressão (Iwahashi *et al.*, 2000), etanol (Alexandre, *et al.*, 1998), cobre, sulfato, peróxido de hidrogênio (Attfield, 1987) e pressão osmótica (Hounsa, *et al.*, 1998). Os agentes estressantes do ELNC não são, como já demonstrado por Silva e Almeida (2006), termolábeis.

Conforme demonstrado, ficou evidente que uma linhagem pode expressar a proteína killer sem que sua ação seja detectada. A detecção depende do estado fisiológico da linhagem sensível que pode ser imposto pelas condições de cultivo. O meio contendo 80 % de mosto, aqui denominado

Mosto 80, se mostrou reprodutível para detecção do fator nas condições avaliadas.

A redução da concentração de mosto no meio de cultivo se justifica pela sazonalidade da cultura de uva. O meio selecionado nesta avaliação, tido como o ideal para a expressão do fator killer, denominado Mosto 80, possui 80 % de mosto em sua composição. Seria de interesse, portanto, reduzir a concentração de mosto no meio. Como elevadas concentrações de ELNC influenciam na detecção do fator killer, avaliou-se a combinação da sua forma diluída, denominada G7c (Silva e Almeida 2006), com mosto de uva, afim de obter um meio de cultura igualmente confiável, mas com concentrações inferiores de mosto.

4.1.2 Meio de cultura com diferentes concentrações de mosto de uva e G7c

Na avaliação em que o ELNC foi substituído por G7c, na qual os meios de cultura foram preparados com crescentes concentrações de mosto de uva (10 a 90 %) e decrescentes concentrações de G7c (90 a 10 %), pôde-se observar que em MG10 e MG20, com baixa concentração de mosto, mesmo havendo expressão da toxina killer, esta foi menos detectada quando comparada com os demais meios. Os diâmetros, de todos os meios, variaram de 0,83 a 1,53 cm. Como em todas as placas foi utilizado o mesmo sobrenadante estéril contendo o fator killer da linhagem 1B, a redução na detecção da atividade killer encontrada nas concentrações de 90 e 80 % de

G7c se deve a este componente do meio. A Figura 2 apresenta a relação entre os diâmetros dos halos e a concentração de mosto de uva presente no meio.

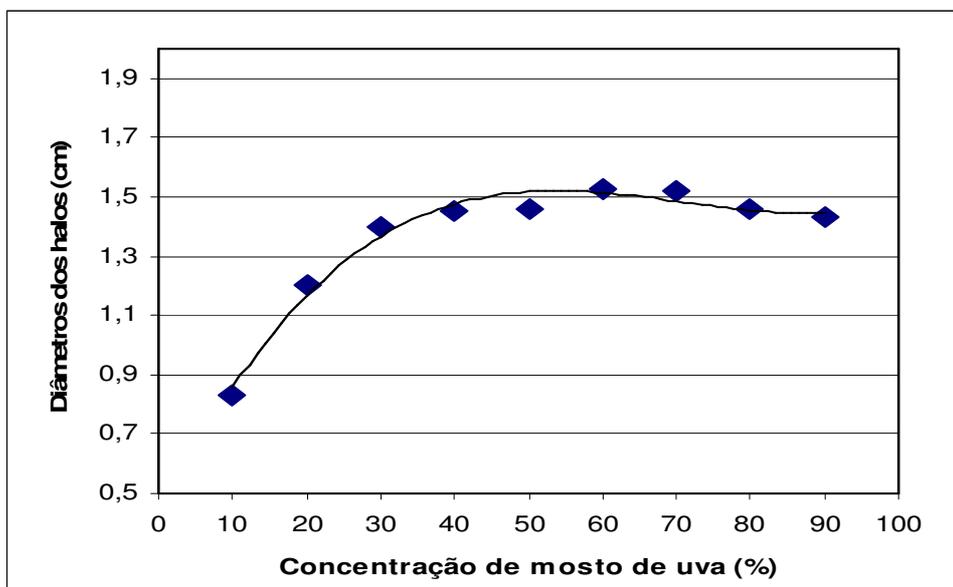


Figura 2: Concentração de mosto de uva na composição do meio de cultura sólido mosto/G7c e os diâmetros dos halos formados. O sobrenadante utilizado contendo o fator killer foi o obtido com a linhagem Embrapa 1B.

Efetuada uma análise de regressão, verificou-se que o diâmetro do halo aumentou conforme a seguinte equação:

$$D_h = 4 \times 10^{-6} x^3 - 0,0008x^2 + 0,0518x + 0,4109$$

$$r^2 = 0,9782$$

Pode-se observar que, a partir de 30 % de mosto, os valores dos diâmetros tendem a se estabilizar. Com isso, o meio contendo 30 % de mosto e 70 % de G7c, denominado aqui como MG30, propicia de forma reprodutível a detecção deste fator, e permite o uso de quantidades inferiores de mosto de uva em sua composição. Estes resultados confirmam o efeito protetor do ELNC, quando usado em altas concentrações.

A atividade killer pode depender da adição de determinados componentes que, possivelmente, fragilizem as células sensíveis. Kono e Himeno (1992) verificaram que a toxina killer de *Kluyveromyces*, cuja síntese é controlada por genes nucleares, possuía atividade contra *Zygosaccharomyces rouxii* na presença de NaCl e que esta atividade variava de acordo com a linhagem de *Kluyveromyces*. O efeito do ELNC sobre a linhagem sensível pode também estar relacionado com a síntese de enzimas proteolíticas capazes de degradar a proteína killer produzida. Kono e Himeno (1997) mostraram que a proteína killer, na presença das proteinases tipo IV de *Streptomyces caespitosus*, tripsina tipo I de boi, α -quimiotripsina tipo I de boi e papaína tipo IV, se tornavam inativas. Comitini *et al.* (2004) também observaram inativação completa da atividade da proteína killer formada por *K. wickerhammi* e *P. anomala* quando exposta à ação de proteases.

4.1.3 Teste comparativo entre diferentes meios de cultura para detecção fator killer

Ao comparar os meios YEPD-MB, Mosto 80, MA-MB e um meio de cultura preparado com 25 % de mosto de uva e 75 % de ELNC foi verificado que o meio Mosto 80 potencializou a ação killer quando comparado com o meio tradicional de detecção YEPD-MB e o meio MA-MB usado por Silva (1996) (Figura 3). Estes dois últimos meios, ao contrário dos demais aqui usados que têm ELNC em sua composição, possuem extrato de levedura comercial (ELC).

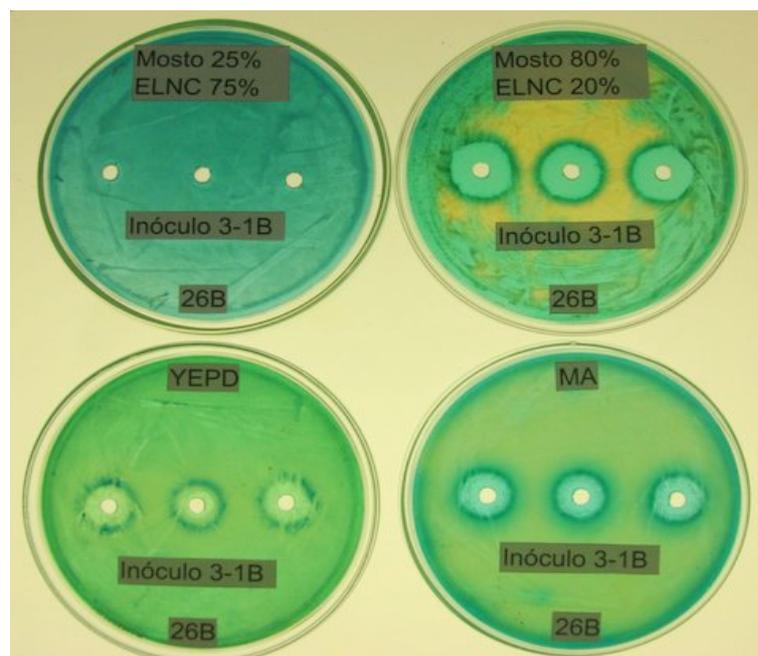


Figura 3: Da esquerda para direita: Superior: 25 % Mosto/75 % ELNC; Mosto 80. Inferior: YEPD-MB; MA-MB. Em todos meios, o sobrenadante utilizado foi o obtido com a linhagem 1B. A linhagem sensível foi a 26B. Laboratório de Microbiologia/Embrapa CNPUV, 2008.

Os diâmetros dos halos formados nos meios com ELC foram 0,96 cm e 1,23 cm para o YEPD-MB e o MA-MB, respectivamente. A análise de variância não revelou diferença significativa entre estes valores de halo ($P>0,05$). Aqueles exibidos em meio Mosto 80 possuíam em média 1,6 cm, com diferença significativa ($P<0,01$) com relação aos halos formados nos demais meios. O comportamento da linhagem sensível no meio contendo 25 % de mosto e 75 % de ELNC confirma a ação protetora do ELNC, uma vez que, embora a proteína esteja presente, não foi verificado halo de inibição. O ELNC e o ELC são aditivos de meio de cultura que possuem a mesma origem, mas o comportamento dos microrganismos sob efeito destes dois aditivos são completamente diferentes. Silva e Almeida (2006) também verificaram importantes diferenças no metabolismo de *Pseudomonas fluorescens* crescida

em meio G7c, que possui ELNC na sua composição, e em ELC. Mostraram que a ausência de sideróforo no sobrenadante proveniente de culturas mantidas em ELC não era devido ao bloqueio no transporte deste metabólito para o sobrenadante, mas à falta de síntese. Fica claro que a diferença encontrada no comportamento da linhagem sensível depende da composição química do aditivo usado. O extrato de levedura pode apresentar 20 g/L de proteína e 430 mg/L de RNA (Revillion *et al.*, 2003), dependendo do processo de produção e levedura usada. Os principais aminoácidos presentes nestes produtos de autólise de levedura são fenilalanina, leucina, alanina, arginina e ácido glutâmico, com diferenças de concentrações dependentes do gênero empregado (Hernawan & Fleet, 1995). O extrato de levedura comercial apresenta uma variação importante na composição de elementos minerais. De 18 elementos analisados por Grant e Pramer (1962), os valores mais elevados foram o cobre, ferro, zinco e magnésio. Segundo estes autores, pode haver diferenças elevadas de um determinado elemento entre os lotes diferentes de extrato, como para o molibdênio, onde em um lote foram encontrados 2,6 µg/g (peso seco) e em outro foram obtidos 9,1 µg/g (peso seco).

4.1.4 Influência da sacarose e glicose no comportamento da linhagem sensível Embrapa 26B

Para avaliar a influência da sacarose no comportamento da linhagem sensível, o mosto de uva utilizado na composição de alguns meios de cultura foi substituído por uma solução de 200 g/L de sacarose. Foi verificado que o fator killer não pôde ser detectado em meio com 25 % de mosto e 75 %

de ELNC. Este mesmo resultado foi obtido no meio com 25 % de solução de sacarose e 75 % de ELNC. No meio MA-MB (25 % de mosto e 10 g/L de ELC) e no meio com 25 % de solução de sacarose e 10 g/L de ELC houve detecção do fator killer. Nestes dois últimos houve a formação de halos com diâmetros semelhantes, 1,27 cm e 1,23 cm, respectivamente. A análise de variância não revelou diferença significativa entre estes valores de halo ($P>0,05$).

O meio com Mosto 80 apresentou grande diferença no que se refere aos diâmetros dos halos (Figura 4), pois foram detectados halos com diâmetros de 1,63 cm, com diferença significativa ($P<0,01$) com relação aos halos formados nos demais meios. O meio com 80 % de solução de sacarose apresentou diâmetro inferior, de 0,8 cm. Além disso, pôde-se observar, ainda neste meio, o aparecimento de pequenas colônias da linhagem sensível 26B dentro dos halos, o que não ocorreu em Mosto 80. A análise de variância revelou diferença significativa ($P<0,01$) deste meio (80 % de solução de sacarose) com relação aos halos formados em MA, mas não revelou diferença significativa entre os valores de halo do meio com 25 % de solução de sacarose e 10 g/L de ELC ($P>0,05$).

Observou-se que nos meios com alta concentração de ELNC (75 %) não foi possível a detecção do fator killer. Este só ocorreu quando o ELNC foi substituído por ELC ou quando sua concentração foi reduzida para 20 %. Este resultado reforça a ação protetora do ELNC. No entanto, quando a concentração deste componente foi de 20 %, e o mosto substituído pela solução de sacarose (200 g/L) no meio de cultivo, a linhagem sensível se tornou menos vulnerável. Isto mostra que não é a concentração de açúcar ou a

pressão osmótica, que está envolvida com a vulnerabilidade. Os resultados indicam que a interação mosto/ELNC atua na sensibilidade da linhagem sensível ou potencializa a ação do efeito killer.

Tabela 1: Análise estatística entre as médias dos diâmetros dos halos formados em meios de cultura diferentes.

	MA-MB	25% Sac./ELC	Mosto 80	80% Sac./ELNC
MA-MB	-	ND	DIF	DIF
25 % Sac./ELC		-	DIF	ND
Mosto 80			-	DIF
80 % Sac./ELNC				-

A sigla ND entre as linhas e colunas significa que os valores não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P > 0,05$). DIF significa que os valores diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P < 0,01$).

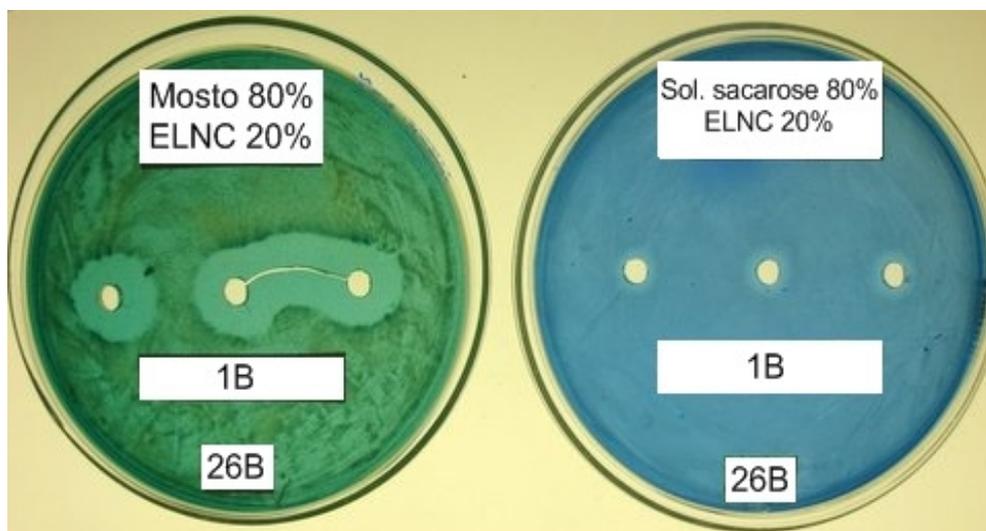


Figura 4: Da esquerda para a direita: placa de Petri com meio sólido Mosto 80; placa de Petri com meio sólido substituindo o mosto por uma solução de sacarose (200 g/L). O sobrenadante utilizado foi o obtido com a linhagem 1B. A linhagem sensível foi a 26B. Laboratório de Microbiologia/ Embrapa CNPUV, 2008.

Para avaliar a influência da glicose sobre a vulnerabilidade da linhagem sensível, o mosto do meio Mosto 80 foi substituído por uma solução

de glicose contendo 200 g/L. Foi observado que no meio Mosto 80 os halos obtiveram em média 1,7 cm de diâmetro. O meio preparado com 80 % da solução de glicose e 20 % de ELNC apresentou halos pequenos ao redor dos poços, com média de apenas 0,7 cm de diâmetro. A análise de variância revelou diferença significativa ($P < 0,01$) entre estes dois meios. Neste último, pôde-se observar, como no meio com sacarose, o aparecimento de pequenas colônias da linhagem sensível 26B dentro dos halos. Este resultado reforça a importância do mosto ou sobre a potencialização do fator killer ou sobre a sensibilidade sobre a linhagem sensível. Pode ser por este motivo, que o meio de cultura tradicional YEPD-MB, que possui, entre outros componentes, glicose e ELC em sua composição (Bostian and Hopper, 1980; Longo *et al.*, 1992; Silva, 1999a; Sangorrín *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2006, Lopes *et al.*, 2007, Sangorrín, *et al.*, 2007) não esteja proporcionando condições necessárias para a detecção do fator killer.

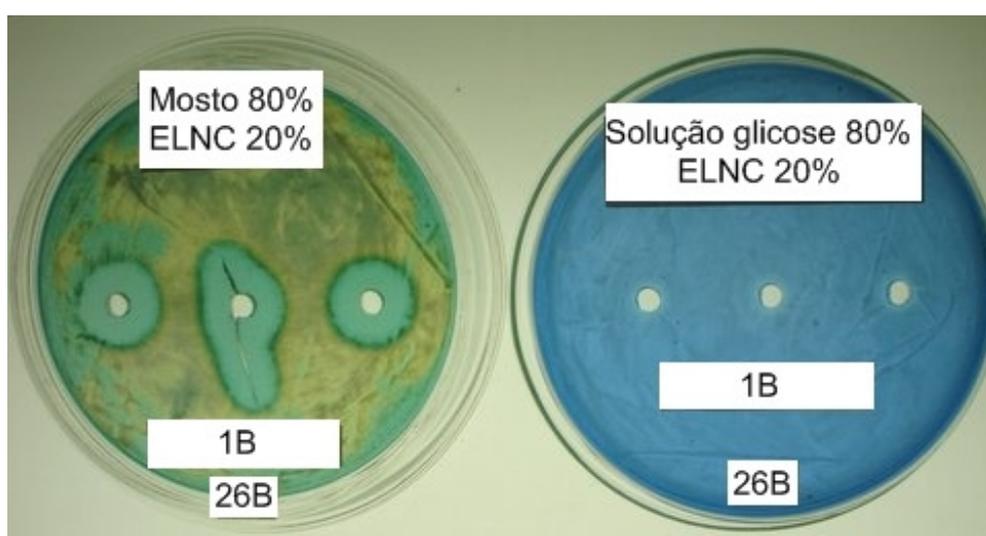


Figura 5: Da esquerda para a direita: placa de Petri com meio sólido Mosto 80; placa de Petri com meio sólido substituindo o mosto por uma solução de glicose (200 g/L). O sobrenadante utilizado foi o obtido com a linhagem 1B. A linhagem sensível foi a 26B. Laboratório de Microbiologia/ Embrapa CNPUV, 2008.

4.1.5 Influência do ELNC na ação do fator killer e no comportamento da linhagem sensível

Para averiguar a influência do ELNC na atividade do fator killer, foram preparadas duas soluções do sobrenadante estéril contendo o fator killer. A Solução 1 e a Solução 2 foram preparadas diluindo o sobrenadante contendo o fator killer nas mesmas proporções em ELNC e em água, respectivamente. Foi utilizado como controle o sobrenadante estéril puro. As soluções e o controle foram transferidos para poços em placas de Petri contendo a linhagem sensível previamente plaqueada. Os resultados mostraram que a mistura com ELNC não interferiu na detecção. Isto mostra que o ELNC não altera a ação da proteína já formada. As duas soluções preparadas do sobrenadante contendo a toxina killer apresentaram halos semelhantes aos formados pelo controle. O diâmetro deste último foi de 1,8 cm, o mesmo foi observado no halo formado pela mistura do sobrenadante estéril com uma solução de ELNC (80 %). Quando o fator killer foi diluído em água, o diâmetro foi, como já esperado, de 1,7 cm. Estes resultados mostraram que o ELNC não influenciou na ação do fator killer, mas pode interferir com as células sensíveis, reduzindo sua vulnerabilidade.

Para avaliar a ação do ELNC sobre a sensibilidade da linhagem 26B, três suspensões de células da linhagem sensível foram preparadas: 80 % de mosto de uva e 20 % de ELNC (Solução A); 80 % de ELNC e 20 % de água destilada (Solução B); água destilada (Controle). O comportamento da linhagem sensível permaneceu o mesmo em todas as soluções investigadas. A proteína killer, atuando contra a suspensão de células sensíveis preparadas

com a Solução A, formou halos com média de diâmetro de 1,4 cm, o mesmo observado no controle. Quando a suspensão de células foi preparada com uma concentração maior de ELNC (Solução B), o diâmetro do halo foi, inesperadamente, de 1,5 cm, ou seja, praticamente igual ao formado pela Solução A e pelo controle.

Foi observado que o ELC aumenta a produção do fator killer (Woods & Bevan, 1968). Como já mencionado anteriormente o ELNC, dependendo de sua concentração, interfere na detecção do fator killer. Os resultados obtidos aqui, no entanto, mostraram que este componente não possui influência na ação deste fator quando a proteína já estiver formada, assim como na linhagem sensível. Os resultados indicam que o ELNC interfere na ação do fator killer, somente quando presente na composição do meio de cultivo.

Os meios de cultura Mosto 80 e MG30 se mostraram adequados para a detecção do fator killer. Ambos os meios poderão ser utilizados nas etapas seguintes durante a avaliação de meios de cultura líquidos para a produção do fator killer.

4.2 Avaliação de meios de cultura para produção do fator killer

Como a ação do fator killer depende, entre outros fatores, da produção da proteína killer funcional, torna-se necessário definir um meio de cultura adequado que propicie a produção desta proteína de forma reprodutível. Para tal, foram avaliados diferentes meios de cultura líquidos para síntese deste fator.

4.2.1 Meio de cultura com diferentes concentrações de mosto de uva e ELNC

No experimento realizado com crescentes concentrações de mosto de uva (10 a 90 %) e decrescentes concentrações de ELNC (90 a 10 %), todos os meios de cultura avaliados proporcionaram condições para a produção do fator killer funcional com atividades letais semelhantes. A variação dos diâmetros foi pequena, ficando entre 1,6 e 1,8 cm. A Figura 6 apresenta a relação entre estes diâmetros e a concentração de mosto de uva utilizado na composição do meio de cultivo. Pode-se observar pela equação de regressão uma tendência à estabilidade de produção. Este fato sugere a presença de agentes estimulantes de produção nas duas fontes complexas e que estes estão de alguma maneira em excesso ou se comportam de forma complementar. Os resultados mostram ainda que o efeito ELNC recai sobre a sensibilidade da linhagem sensível e não sobre a produção do fator killer. Testes célula/célula não revelam esta ação discriminante. A síntese de proteínas killer é extremamente dependente de composição do meio de cultura (Panchal *et al.*, 1985, Middelbeek *et al.*, 1979). Embora a composição do meio tenha sido modificada de forma significativa, a produção de proteína ativa não foi afetada. Os componentes comuns às duas fontes (mosto/ELNC) referem-se a proteínas e peptídeos. Provavelmente, o perfil de aminoácidos prontamente assimiláveis presentes nas duas fontes esteja complementando as exigências de síntese.

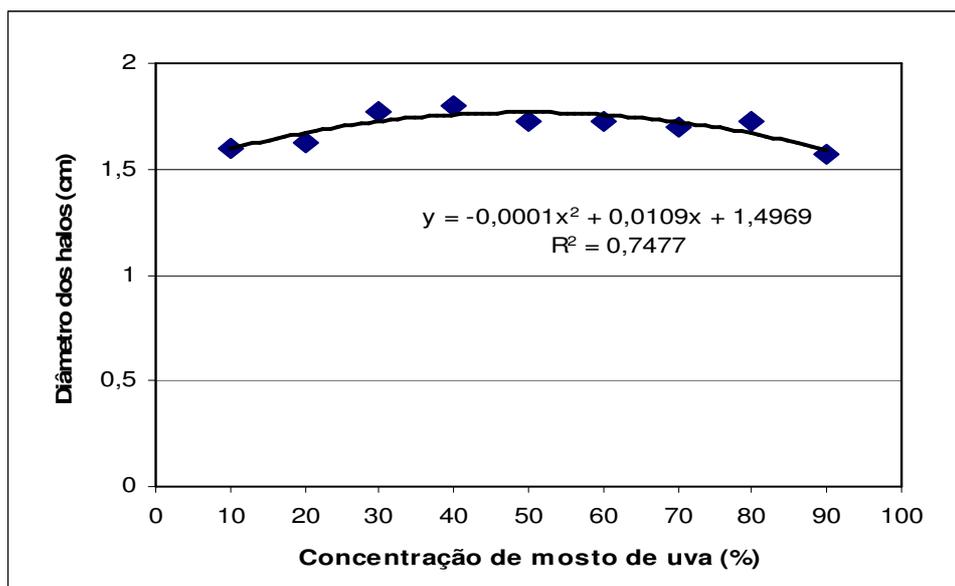


Figura 6: Concentração de mosto de uva na composição do meio de cultura líquido mosto/ELNC e os diâmetros dos halos formados em meio sólido Mosto 80. Foi utilizada a linhagem 1B para síntese do fator killer. A linhagem sensível foi a 26B.

O meio com menor concentração de mosto de uva (10 %) e 90 % de ELNC se mostrou adequado para a produção da proteína killer. Ao contrário dos resultados obtidos nas avaliações para a escolha do meio para detecção, foi observado que baixas concentrações de mosto de uva, assim como elevadas concentrações de ELNC, não interferiram na produção do fator killer. Por este motivo, uma nova avaliação foi efetuada diminuindo ainda mais a concentração de mosto de uva no meio de cultura para produção deste fator.

4.2.2 Meio de cultura com reduções na concentração de mosto de uva

Para avaliar a produção do fator killer em meios com menores concentrações de mosto de uva foram preparados dois meios de cultura contendo 2,5 % de mosto de uva e 97,5 % de ELNC (M2,5 líquido) e outro com

5 % de mosto de uva e 95 % de ELNC (M5 líquido). Foi preparado, também, um meio com 10 % de mosto de uva e 1 % ELC (M10/ELC líquido). As linhagens 1B e 91B formaram fator killer nos meios M2,5 e M5 líquido. Das três linhagens killer testadas, apenas a K1 não formou toxina em nenhum dos meios avaliados. No meio M10/ELC líquido, mesmo com maior concentração de mosto, mas ELC em sua composição, nenhuma das linhagens expressou a proteína killer. Este resultado parece mostrar que o ELC, além de não ser o mais adequado para a detecção do fator killer, como já mencionado anteriormente (item 4.1.3), também não proporcionou as condições mínimas para a expressão do fator killer. Woods & Bevan (1968) ressaltaram a importância do extrato de levedura no processo de produção da proteína killer. Os resultados aqui obtidos não confirmam esta ação quando o extrato de levedura utilizado foi o ELC. Este resultado mostra que a combinação do mosto de uva com ELNC proporciona condições adequadas para a expressão da toxina killer, mesmo quando o mosto de uva estiver em baixas concentrações. O ELNC em elevadas concentrações, neste caso, não parece interferir de forma negativa na produção do fator killer, definindo, assim, sua relação de proteção com a linhagem sensível. O meio M5 líquido se mostrou confiável para a produção do fator.

Assim como no meio para detecção, o ELNC foi substituído por sua forma diluída para verificar se a produção do fator killer se mantém estável nestas condições.

4.2.3 Meio de cultura com substituição do ELNC por G7c

Para avaliar a produção da toxina killer substituindo o ELNC por G7c foram preparados dois meios de cultura com 5 % de mosto de uva e 95 % de G7c (meio A) e 5 % de mosto de uva e 95 % de ELNC (meio B). Foi observado que os dois meios testados permitiram a formação da proteína killer da linhagem 1B, apresentando diâmetros de 1,1 e 1 cm, respectivamente. A diluição do ELNC no meio de cultura líquido parece não afetar a produção da toxina killer. De acordo com Silva e Almeida (2006) o meio G7c possui uma concentração equivalente a 3 g/L de extrato de levedura comercial. Este último componente, no meio YEPD é utilizado em uma concentração de 10 g/L. Sendo assim, o G7c possui menor concentração de extrato de levedura que o existente no YEPD e mesmo assim propicia boas condições para a síntese do fator killer.

Como o G7c pode ser utilizado para produção do fator killer, assim como concentrações muito baixas de mosto de uva, uma nova avaliação foi realizada removendo o mosto, substituindo-o por G7c com diferentes concentrações de sacarose.

4.2.4 Meio de cultura preparado com G7c e diferentes concentrações de sacarose

Para a produção do fator killer, foi avaliado o meio G7c com diferentes concentrações de sacarose (10, 100, 150 e 200 g/L). Para a detecção, foi utilizado o meio MG30 (citado no item 4.1.2). Os resultados

mostraram que nos três dias de avaliação não houve formação da proteína killer em nenhuma das linhagens e em nenhum dos meios.

O fato da suposta falta de expressão da proteína killer nos meios de cultura poderia estar relacionado com o meio de cultura sólido MG3. Assim, novos testes de detecção foram efetuados utilizando os mesmos sobrenadantes estéreis, armazenados a -18 °C, em meio de cultivo para detecção Mosto 80 (citado no item 4.1.1). Os resultados mostraram que a linhagem 1B produziu a proteína killer em todos os meios preparados com as diferentes concentrações de sacarose desde o primeiro dia de avaliação. Os diâmetros dos halos da linhagem 1B dos diferentes experimentos nos três dias de avaliações podem ser observados na Tabela 2.

Tabela 2: Médias dos diâmetros dos halos formados pela linhagem 1B em meio G7c com diferentes concentrações de sacarose (10, 100, 150 e 200 g/L) e em três dias de avaliação.

<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Embrapa 1B			
Sacarose (g/L)	Médias – 16h (cm)	Médias – 40h (cm)	Médias – 64h (cm)
10	1,07	1,10	1,10
100	1,10	1,20	1,20
150	1,17	1,20	1,17
200	1,13	1,30	1,30

Pode-se observar na Tabela 3 que a linhagem 91B formou a proteína killer a partir do segundo dia apenas nas concentrações de 150 e 200 g/L de sacarose. Na concentração de 100 g/L de sacarose, a linhagem produziu a proteína apenas no terceiro dia de fermentação, mesmo assim,

todos os halos foram tênues. A linhagem K1 não formou a proteína killer em nenhum dos meios de cultivo.

Tabela 3: Médias dos diâmetros dos halos formados pela linhagem 91B em meio G7c com diferentes concentrações de sacarose (10, 100, 150 e 200 g/L) e em três dias de avaliação.

<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Embrapa 91B			
Sacarose (g/L)	Médias – 16h (cm)	Médias – 40h (cm)	Médias – 64h (cm)
10	-	-	-
100	-	-	0,60
150	-	0,63	0,67
200	-	0,70	0,70

Os resultados mostraram que a produção do fator killer pela linhagem Embrapa 1B foi estável, pois além dela ter sido capaz de sintetizar a proteína killer em todos os inóculos testados, a quantidade de toxina, observada através dos diâmetros dos halos, foi semelhante em todos estes meios. Nota-se que o aumento de sacarose no meio não parece influenciar a produção da toxina killer. Foi constatado ainda que, embora os meios G7c/sacarose apresentem boas condições para a síntese de proteína killer, o inóculo preparado com ELNC combinado com mosto de uva (nas avaliações anteriores) se mostrou mais adequado para a formação da toxina killer. Sabe-se que a síntese de proteína killer possui forte dependência com relação à composição do meio (Panchal *et al.*, 1985, Middelbeek *et al.*, 1979), e observando que a substituição do mosto pela sacarose não forneceu os nutrientes para uma boa síntese, este fato sugere que a combinação entre mosto e ELNC, diluído ou não, estejam complementando as exigências de

síntese. Michalcáková & Repová (1992) também observaram melhores condições proporcionadas pelo suco de uva com relação à tolerância de etanol. Os autores mostraram que linhagens killer toleraram melhor a presença de elevadas concentrações de etanol quando inoculadas em suco de uva com pH 3,1 do que em meio YEPG com pH ótimo.

Os resultados aqui obtidos mostraram também a superioridade do meio Mosto 80 (80 % de mosto/ 20 % de ELNC) com relação ao meio MG3 (30 % de mosto/ 70 % de G7c) para detectar o fator killer. Definitivamente, o meio de cultura sólido Mosto 80 deverá ser o utilizado para todos os testes de detecção do fator killer.

Convém salientar que a técnica empregada para a detecção do fator killer foi a técnica proteína/célula. Nesta técnica, usa-se o fator killer presente no sobrenadante estéril proveniente de um meio líquido onde a linhagem killer foi inoculada. Ao armazenar este sobrenadante da linhagem 1B a uma temperatura de -18 °C foi verificada a viabilidade da toxina killer. Os resultados mostraram que esta temperatura foi capaz de manter a ação da toxina por pelo menos nove meses. Os diâmetros dos halos apresentaram média de 1,77 cm.

Com a escolha dos meios adequados para a produção e detecção do fator killer foram realizadas avaliações em crescimento descontínuo para averiguar a produção da proteína killer funcional em diferentes condições de cultivo.

4.3 Produção de proteína killer em processo descontínuo

Foram efetuadas avaliações para verificar o comportamento de linhagens de leveduras no que se refere à síntese do fator killer em diferentes meios de cultura e em diferentes condições de cultivo em biorreator e em frascos de Fernbach.

4.3.1 Determinação do número mínimo de moléculas

Para obter o número mínimo de moléculas de toxina killer presentes no halo, (nmm_h), torna-se necessário fazer algumas observações: as placas de Petri utilizadas possuem 9 cm de diâmetro; foi semeada uma quantidade de 0,1 mL de uma suspensão de células sensíveis com concentração de 10^7 cél/mL; o diâmetro do poço efetuado no meio sólido foi de 0,5 cm. De acordo com Bussey *et al.* (1979), são necessárias $2,8 \times 10^4$ moléculas de toxina killer para matar uma célula da linhagem sensível. Sendo assim, pode-se calcular o nmm_h sintetizado no processo fermentativo. O número mínimo de moléculas de toxina killer (nmm_h) foi calculado pela seguinte fórmula:

$$nmm_h = K_1 \times \left\{ \left[\left(\frac{D_{halo}}{D_{placa}} \right)^2 \times 10^7 \times 0,1 \right] - K_2 \right\}$$

Onde,

D_{halo} = Refere-se ao diâmetro do halo de morte;

D_{placa} = Refere-se ao diâmetro da placa de Petri;

$K_1 = 2,8 \times 10^4$, e refere-se ao número mínimo de moléculas necessárias para matar uma célula de uma linhagem sensível (Bussey *et al.*, 1979).

$$K_2 = \left[\left(\frac{D_{poço}}{D_{placa}} \right)^2 \times 10^7 \times 0,1 \right], \text{ e refere-se ao número de células}$$

sensíveis presentes na área da superfície do poço retirado do meio.

$D_{poço}$ = Refere-se ao diâmetro do poço.

4.3.2 Efeito de transição entre as condições aeróbicas e anaeróbicas no processo de produção do fator killer

Durante o crescimento da linhagem 1B em biorreator com meio M5 líquido, pôde-se verificar que a linhagem testada neste trabalho não formou proteína killer durante a fase aeróbica de crescimento. Em oito horas de crescimento (T8) a proteína killer funcional ainda não tinha sido formada (Figura 7). Depois de 24 horas (T24), ou seja, 16 horas após ter sido desligado o sistema de aeração e agitação mecânica, houve a síntese do fator killer. Estes halos apresentaram média de 1,2 cm de diâmetro. O número mínimo de moléculas presentes na zona de inibição foi estimado em $4,11 \times 10^8$. Após 48 horas (T48), ou seja, 40 horas sob condições anaeróbicas, houve um aumento da síntese da toxina killer, promovendo halos de 1,5 cm de diâmetro. O número mínimo de moléculas presentes na zona de inibição foi estimado em $6,91 \times 10^8$. Comitini, *et al.* (2004) obtiveram resultados diferentes com a levedura *K.*

wickerhamii e *P. anomala* crescendo em condições aeróbicas. O início da síntese da proteína killer ocorreu apenas no final da fase exponencial, em 24 horas para *K. wickerhamii*. *P. anomala* formou toxina killer desde o início da fase exponencial, atingindo a estabilidade durante a fase estacionária.

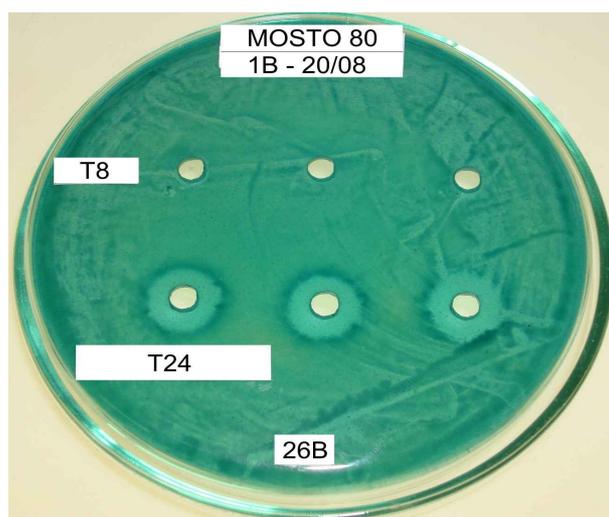


Figura 7: Teste de poço para proteína killer da linhagem *Sacch. cerevisiae* Embrapa 1B, produzida em biorreator em meio M5 líquido, nos tempos: 8 horas (T8) e 24 horas (T24). A linhagem sensível foi a 26B. Laboratório de Microbiologia/Embrapa CNPUV, 2008.

Pode-se observar na Figura 8, que a curva de crescimento não evoluiu muito até oito horas de trabalho. A toxina killer funcional não foi formada nestas condições. Observou-se que nas primeiras oito horas também não houve produção de etanol. A taxa de crescimento máximo na fase exponencial (de três a seis horas) é dada pela fórmula:

$$DO = 0,0427e^{0,3598t}$$

$$r^2 = 0,9915$$

Quando as condições de crescimento foram modificadas para anaerobiose, em 24 horas, houve um aumento na curva de crescimento, assim

como no número de células totais e em brotamento (Figura 9). Em T24 pôde-se observar a produção de etanol e da proteína killer. E após 48 horas, momento em que houve uma queda na curva de crescimento, a produção de etanol, assim como a síntese de toxina killer, aumentou. O pH de todos os tempos avaliados não variou muito, alternando entre 3,36 e 3,70 (Figura 9), provavelmente pelo poder tampão que apresenta o meio ELNC.

Uma nova avaliação foi conduzida com a mesma linhagem e o mesmo meio de cultivo em frascos de Fernbach com a agitação proveniente apenas da aeração. Não foi também detectada a produção da proteína killer durante as primeiras sete horas. No entanto, após oito horas de crescimento aeróbico foi observada a formação de um número mínimo de moléculas de 35×10^8 . Em T24 (16 horas em anaerobiose), o número mínimo de moléculas de toxina presentes na zona de inibição foi o mesmo que em biorreator ($4,11 \times 10^8$). A diferença entre o resultado obtido em biorreator e do observado em frascos se deve, provavelmente, à maior disponibilidade de oxigênio para as células devido à agitação no biorreator. Portanto, existe evidência de que a aerobiose ou um mecanismo relacionado a esta condição esteja envolvido na regulação da síntese de proteína killer. Convém salientar que a formação da proteína killer se dá em condições de agitação sem a injeção de ar.

Como já mencionado anteriormente, não houve produção de etanol e nem da proteína killer durante o processo aeróbico em biorreator. Este resultado indica haver uma certa incompatibilidade entre o metabolismo aeróbico e a síntese de proteína killer. Observou-se ainda que os valores de acetaldeído aumentaram durante a fase aeróbica de crescimento e diminuiram

durante a fase anaeróbica (Figura 8). O etanol e o acetaldeído estão intimamente relacionados com a glicólise. A síntese do etanol, mas não a do acetaldeído, depende da oxidação do NADH. Se o ácido pirúvico fosse direcionado ao ciclo de Krebs, o que ocorre em aerobiose, as concentrações de etanol e acetaldeído deveriam ser, se não nulas, insignificantes. A concentração de etanol foi nula, o que, interessante, não ocorreu com acetaldeído. Estes resultados mostram que a enzima pirúvico descarboxilase (PDC) permaneceu em atividade durante a fase aeróbica mesmo sem a formação de etanol. Postma *et al.* (1989) argumentam que, provavelmente, a PDC também opera sob condições em que a fermentação alcoólica está ausente. As enzimas acetaldeído desidrogenase e acetil-CoA sintetase podem oxidar o acetaldeído para formar acetil-CoA, e este é oxidado posteriormente na mitocôndria. O acetaldeído é acumulado quando a atividade da enzima acetil-CoA sintetase é baixa.

A evolução do acetaldeído durante a fase aeróbica é dada pela equação:

$$\text{Acetaldeído} = -0,2011t^2 + 8,2092t + 49,3111$$

$$r^2 = 0,9038$$

Pôde-se observar (Figura 8) que em aerobiose, embora não tenha havido a inibição da produção de acetaldeído, não houve a formação de etanol e da toxina killer. Este fato sugere que a expressão destes dois últimos produtos do metabolismo pode ser controlada de forma similar. As condições de aerobiose ou de anaerobiose podem modificar a expressão de algumas proteínas, tanto em eucariotos quanto em procariotos. Em leveduras, o sinal

envolvido na indução de determinados genes ligados à cadeia respiratória pode ser gerado sob condições anaeróbicas (Kwast *et al.*, 1999). A síntese de algumas proteínas de membrana de *Neisseria gonorrhoeae* é induzida quando seu metabolismo é modificado de aerobiose para anaerobiose (Clark *et al.*, 1987). A modificação imposta pela transição que afeta a produção de etanol também influi na produção da proteína killer funcional.

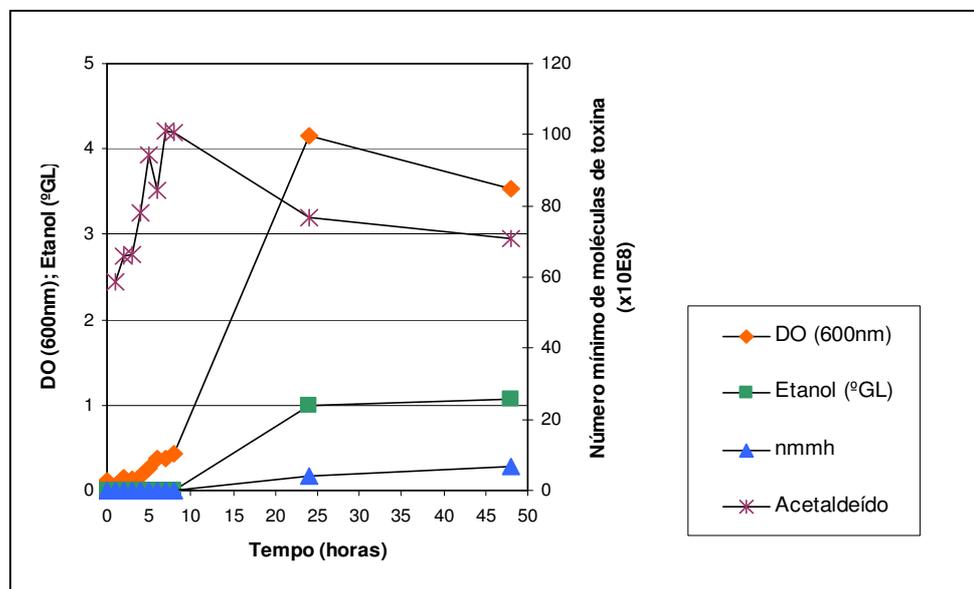


Figura 8: Crescimento celular da linhagem killer Embrapa 1B em meio M5 líquido, cultivadas em condições aeróbicas em biorreator até oito horas e em condições anaeróbicas no tempo restante; DO a 600 nm; produção de etanol (°GL); número mínimo de moléculas de toxina killer (nmmh) e acetaldeído.

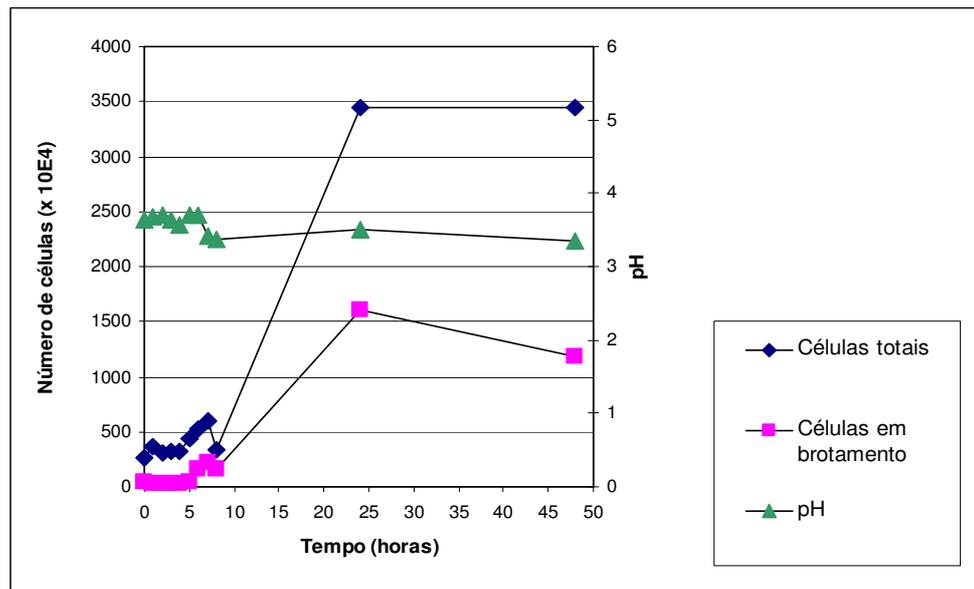


Figura 9: Contagem de células totais e em brotamento da linhagem 1B em meio M5 líquido, cultivadas em condições aeróbicas em biorreator.

Foi realizada uma nova avaliação utilizando a mesma linhagem de levedura e o mesmo meio de cultura, porém em condições anaeróbicas de crescimento. A proteína killer foi detectada no início da avaliação. Isto mostra que durante o preparo do inóculo houve formação da toxina. Neste tempo, pôde ser observado um nm_h de 5×10^7 . Após três horas de fermentação, sua produção foi mais intensa. O valor do nm_h aumentou ao longo do tempo, atingindo, em T24, o valor máximo de $4,11 \times 10^8$, o mesmo valor obtido nos experimentos anteriores. Pode-se observar na Figura 10 que o aumento da DO foi menos acentuado em condições anaeróbicas quando comparado às condições aeróbicas. A DO apresenta um comportamento exponencial entre três a oito horas. A velocidade está expressa na fórmula:

$$DO = 0,3645e^{0,2062t}$$

$$r^2 = 0,9912$$

Os valores de pH da fermentação foram semelhantes aos observados no processo aeróbico, se mantendo estável e alternando entre 3,3 e 3,4 (Figura 11), confirmando o poder tampão do meio.

Polonelli, L., *et al.* (1992b) comentam que as condições anaeróbicas causam maior interferência sobre a linhagem sensível do que sobre a produção de toxina killer. No entanto, os resultados aqui obtidos parecem mostrar que o metabolismo anaeróbico está envolvido com a síntese da toxina killer na linhagem analisada.

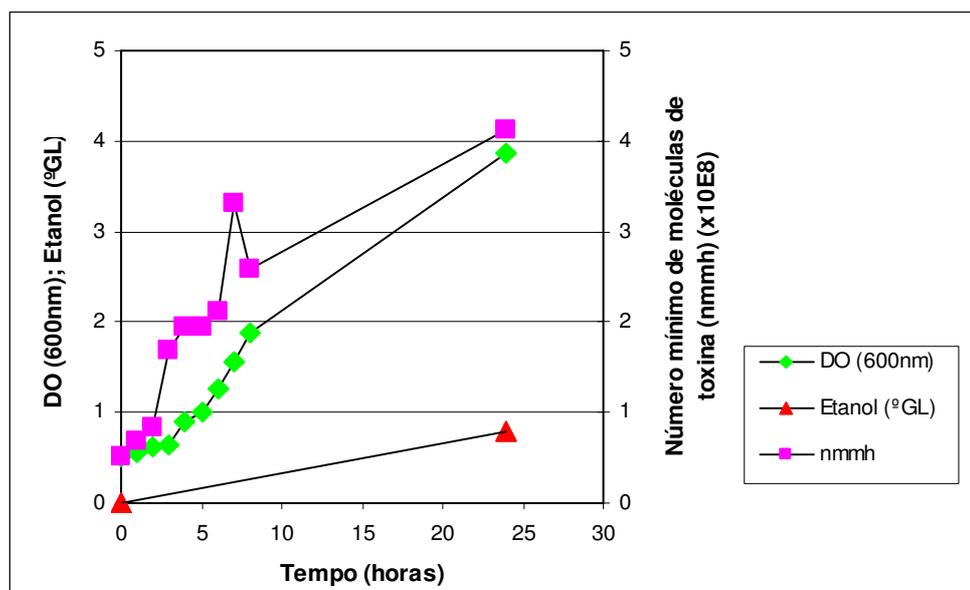


Figura 10: Crescimento celular da linhagem 1B em meio M5 líquido, cultivadas em condições anaeróbicas em frascos de Fernbach; DO a 600 nm; número mínimo de moléculas de toxina (nmm_h); produção de etanol (°GL).

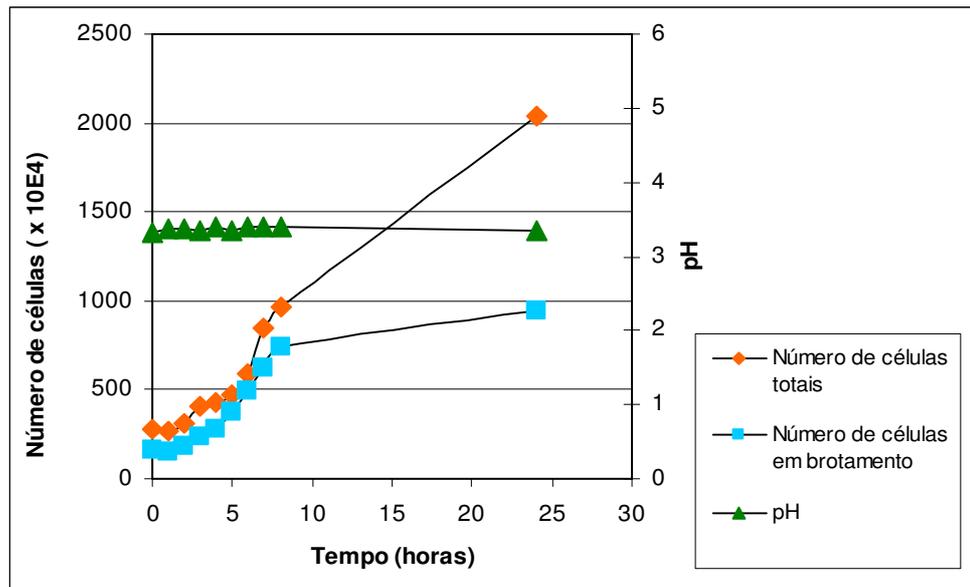


Figura 11: Contagem de células totais e em brotamento da linhagem 1B em meio M5 líquido, cultivadas em condições anaeróbicas em frascos de Fernbach.

4.3.3 Alterações na composição do meio e sua influência sobre a expressão do fator killer em anaerobiose

4.3.3.1 Substituição do ELNC por G7c e aumento da concentração de sacarose

A substituição do ELNC no meio de cultura pela sua forma diluída, o G7c, mostrou resultados diferentes daqueles efetuados no item 4.2.3. A substituição do ELNC por G7c aqui pareceu interferir na síntese do fator killer. Mesmo em condições anaeróbicas durante todo o processo, e observando que houve crescimento celular através da curva da DO (600 nm), não houve produção de toxina durante as oito horas de fermentação (Figura 12). A DO apresentou uma fase exponencial entre cinco e oito horas com uma velocidade de aumento máximo de $0,2144 \text{ h}^{-1}$.

$$DO = 0,3877e^{0,2144t}$$

$$r^2 = 0,9706$$

A síntese só pôde ser observada no tempo de 24 horas (T24). O nmm_h foi estimado em $1,35 \times 10^8$. A mesma interferência foi observada com a linhagem 91B. Com esta linhagem não foi observada a síntese da toxina killer funcional em nenhum dos tempos avaliados.

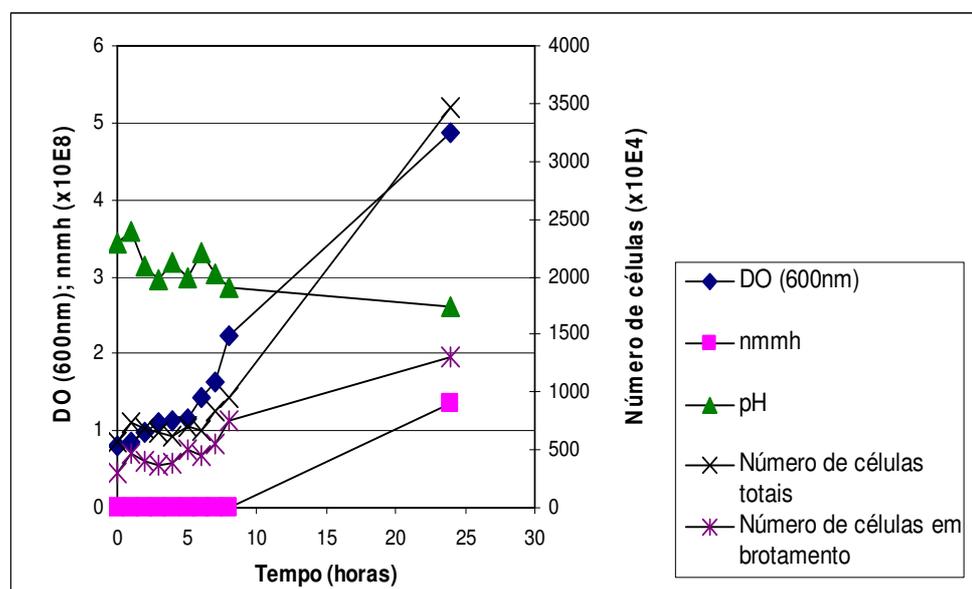


Figura 12: Crescimento celular da linhagem 1B em meio contendo 5 % de mosto e 95 % de G7c, cultivada em condições anaeróbicas; DO (600 nm); número mínimo de moléculas de toxina killer (nmm_h).

Estes resultados mostram que o G7c combinado com mosto de uva não propicia a síntese do fator killer funcional. O ELNC combinado com concentrações baixas de açúcar (5 % de mosto) fornece os nutrientes necessários para que esta síntese ocorra. Mas pode ser que apenas a combinação entre o G7c com baixa concentração de açúcar (5 % de mosto) tenha sido o motivo da falta de expressão.

Quando o meio de cultura G7c foi suplementado com 200 g/L de sacarose, nas mesmas condições de crescimento, foi observado através das curvas da DO (600 nm) e número de células totais que não houve crescimento da linhagem 1B durante as primeiras oito horas de fermentação (Figura 13).

Uma importante consideração em fermentações com elevadas concentrações de sacarose é que a levedura é submetida a um considerável estresse osmótico, o que resulta na redução do crescimento e um aumento da perda da viabilidade celular (Thomas & Ingledew, 1992; Bai *et al.*, 2008; Theerarattananoon *et al.*, 2008). Uma explicação para este crescimento ter sido lento, pode ser o estresse provocado pela elevada quantidade de sacarose presente no meio de cultura (200 g/L). Provavelmente a concentração do substrato no meio de cultivo inibiu o crescimento da levedura e, conseqüentemente, não houve síntese da toxina killer nas primeiras horas de fermentação. Foi somente em T24, quando o número de células aumentou, que pôde ser visualizado um halo tênue ao redor dos poços, com nm_h de $1,13 \times 10^8$. O pH se manteve estável e foi apenas após 24 horas que pôde ser observado um ligeiro declínio.

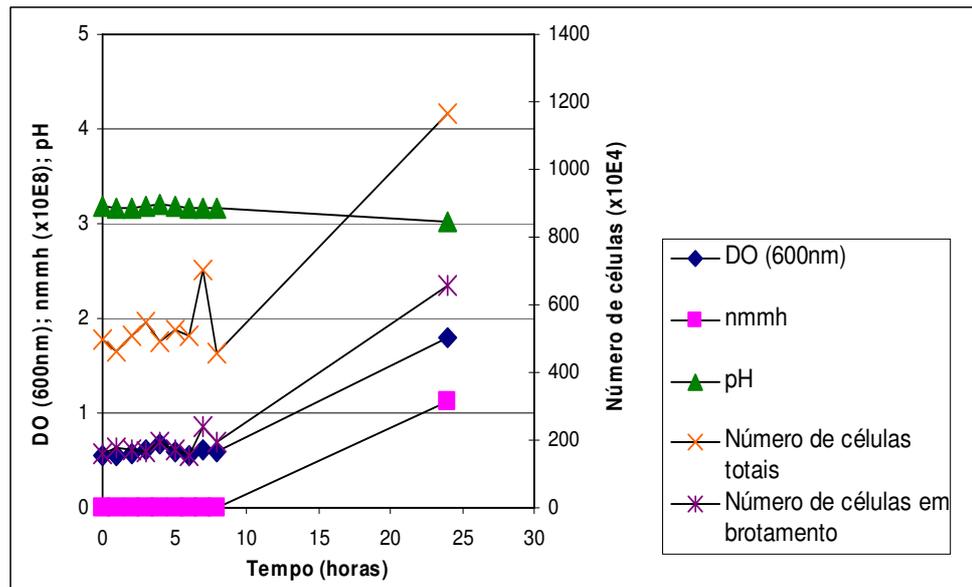


Figura 13: Crescimento celular da linhagem 1B em meio contendo 5 % de mosto/95 % de G7c suplementado com 200 g/L de sacarose, cultivada em condições anaeróbicas; DO (600 nm); número mínimo de moléculas de toxina killer (nmm_h).

Para confirmar que a inibição do crescimento ocorreu por causa da elevada concentração de sacarose e não pelo uso do ELNC diluído (G7c), foi realizado um novo experimento mantendo a concentração deste componente no meio, mas substituindo o G7c pelo ELNC. Esta avaliação foi realizada com a linhagem 1B. Foi observado que os resultados foram os mesmos obtidos com a forma diluída (Figura 14). A síntese da proteína killer ocorreu, assim como na avaliação anterior, no tempo de 24 horas, com valor de nmm_h de $4,11 \times 10^8$.

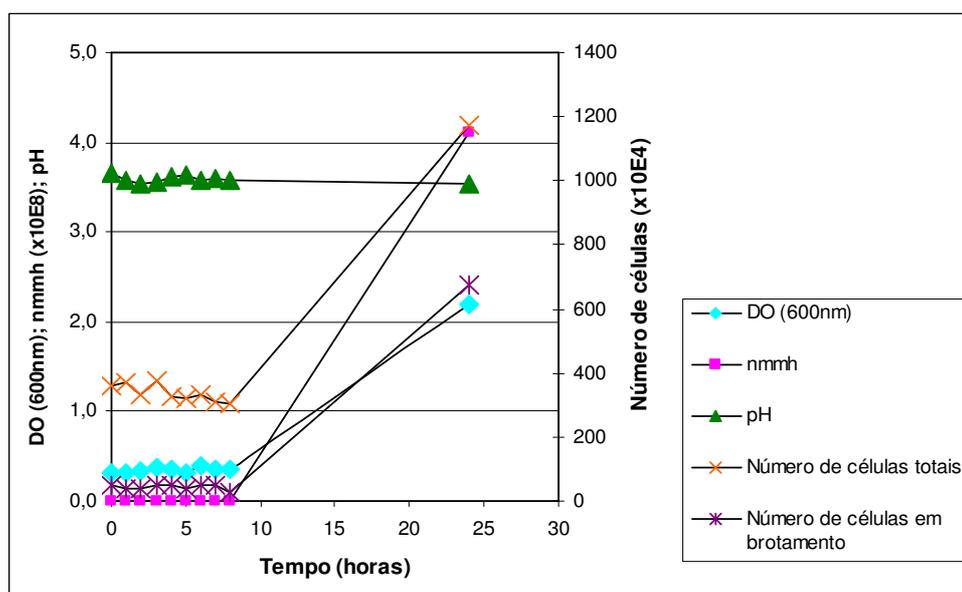


Figura 14: Crescimento celular da linhagem 1B em meio M5 líquido suplementado com 200 g/L de sacarose, cultivada em condições anaeróbicas; DO (600 nm); número mínimo de moléculas de toxina killer (nmm_h).

Comparando os resultados obtidos nas diferentes fermentações anaeróbicas com modificações para a linhagem 1B realizadas até aqui, verificou-se que o meio com G7c e 5 % de mosto em sua formulação foi o que proporcionou melhores condições de crescimento (observado pela DO a 600 nm e número de células totais). Em todos os meios, a linhagem de levedura sintetizou o fator killer após 24 horas de fermentação. No entanto, não foi no meio que proporcionou melhores condições de crescimento que a linhagem killer sintetizou maiores quantidades da proteína. Comparando o nmm_h nestes três meios, a síntese foi mais efetiva quando a linhagem foi inoculada no meio com ELNC + 200 g/L de sacarose, apresentando $4,11 \times 10^8$ moléculas. Portanto, o ELNC possui fatores que estimulam a produção do fator killer, mas pode ser que a elevada concentração de sacarose, por inibir o crescimento da levedura, esteja comprometendo a síntese deste fator. Foi por este motivo que

novas avaliações foram realizadas, mantendo o ELNC, mas diminuindo a concentração da sacarose na composição do meio de cultivo.

4.3.3.2 Redução na concentração de sacarose no meio com ELNC

A avaliação da produção do fator killer com a linhagem 1B, utilizando o meio M5 líquido, suplementado com 100 e 150 g/L de sacarose, revelou que a síntese da proteína killer ocorreu mais cedo. Até cinco horas de fermentação a linhagem killer Embrapa 1B não sintetizou a proteína killer nas duas concentrações de sacarose (100 e 150 g/L de sacarose). No experimento com 100 g/L de sacarose, pôde-se observar através da Figura 15 que a curva da DO (600 nm), diferentemente das avaliações com elevadas concentrações de sacarose, aumentou desde o início da fermentação. A DO apresentou um comportamento exponencial com uma velocidade máxima de aumento de $0,2147 \text{ h}^{-1}$. A velocidade máxima do aumento da DO está expressa na fórmula:

$$DO = 0,1419e^{0,2147t}$$

$$r^2 = 0,9902$$

Embora a proteína killer não tenha sido sintetizada desde o início, esta síntese ocorreu em seis horas (T6) de fermentação. Neste tempo, o número mínimo de moléculas de toxina presentes no halo (nmm_h) foi estimado em $2,38 \times 10^8$, alcançando em 24 horas, o valor máximo de $1,03 \times 10^9$. De acordo com Pommier *et al.* (2005), existe uma fase lag para a produção do fator killer que representa o período de acumulação da toxina no meio de cultura antes do início do seu efeito. Pode ser que as primeiras cinco horas de

fermentação tenha sido o período necessário para que a proteína killer acumulasse em quantidades suficientes para que o efeito antibiótico da toxina pudesse afetar as linhagens sensíveis. Convém lembrar que o número mínimo de moléculas de toxina killer necessárias para matar uma única célula de levedura sensível foi definido por Bussey *et al.* (1979) como sendo $2,8 \times 10^4$. A produção de etanol, nesta fermentação foi de $0,34 \text{ }^\circ\text{GL}$ (Figura 15).

É evidente que à medida que o número de células aumenta no meio, o número de moléculas de toxina tende a ser proporcional a este número de células. Isto ocorre se as condições metabólicas das células recém formadas permitirem. No entanto, pode-se observar ainda que nos tempos oito, nove e dez horas de fermentação, embora a DO evolua, a formação do fator killer se mantém estável, voltando a aumentar em onze horas. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Palfree & Bussey (1979). Os autores observaram que a produção da toxina killer não é proporcional apenas ao número de células. A análise de regressão mostrou que o nmm_h nos tempos de seis a 24 horas se relaciona com a DO de forma logarítmica conforme a seguinte equação:

$$nmm_h = 3,0809 \ln(t) + 4,9267$$

$$r^2 = 0,9681$$

Na Figura 16 se pode observar que o número de células totais foi coerente com o crescimento celular monitorado em espectrofotômetro (DO a 600 nm), observado na Figura 15. O número de células em brotamento também aumentou. O pH se manteve estável durante a fermentação, alternando entre os valores de 3,9 e 4,3.

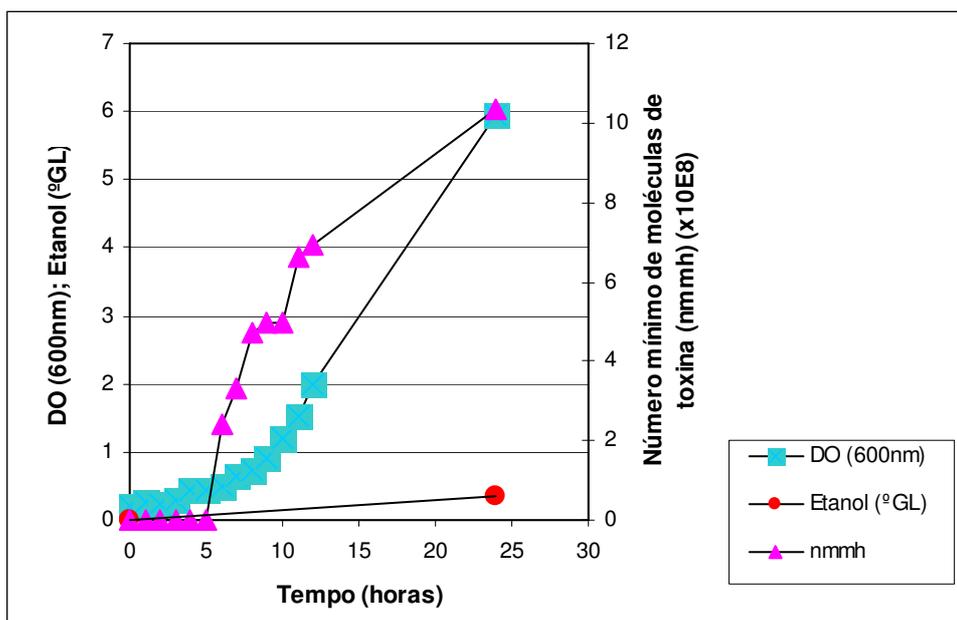


Figura 15: Crescimento celular da linhagem 1B em M5 líquido suplementado com 100 g/L de sacarose, cultivada em condições anaeróbicas; DO (600 nm); número mínimo de moléculas de toxina (nmh); produção de etanol (°GL).

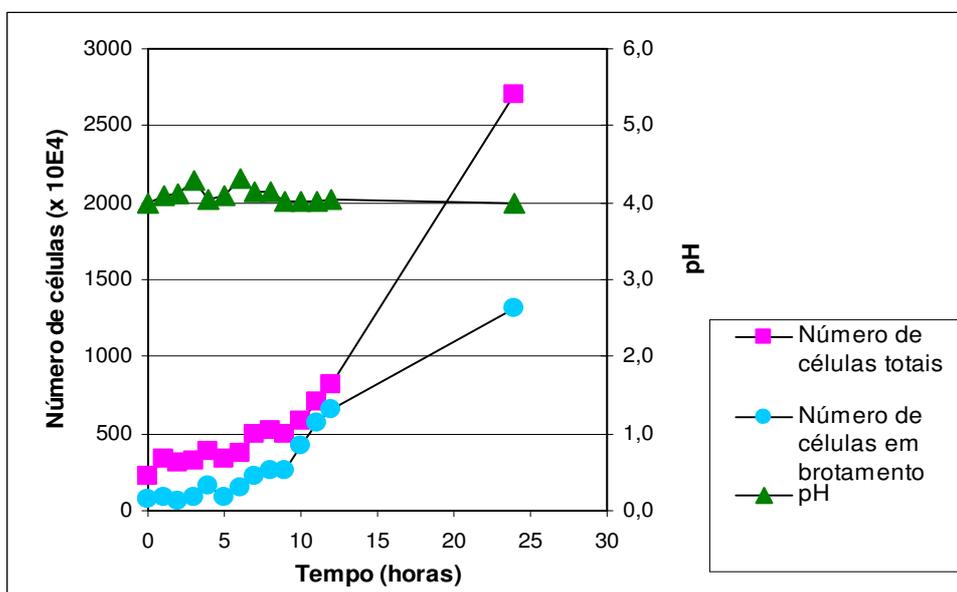


Figura 16: Contagem de células totais e em brotamento da linhagem 1B em meio M5 líquido suplementado com 100 g/L de sacarose, cultivada em condições anaeróbicas.

Na avaliação com 150 g/L de sacarose, a linhagem killer Embrapa 1B iniciou a produção da toxina killer também em T6 (Figura 17). Ao verificar os

tempos de seis a doze horas de fermentação, mais uma vez é evidenciado o fato de a produção do fator killer não ser simplesmente proporcional ao número de células, pois neste intervalo de tempo, a produção se manteve estável, aumentando em 24 horas. A análise de regressão mostrou que o nmm_h nos tempos de seis a 24 horas, se relaciona com a DO de forma linear conforme a seguinte equação:

$$nmm_h = 0,6303t + 1,7012$$

$$r^2 = 0,9467$$

Embora o comportamento da linhagem tenha sido semelhante nos dois meios de avaliação testados, pode-se notar que a menor concentração de sacarose apresentou melhores condições para a produção do fator killer. No início da síntese, em T6, ambos os meios (100 e 150 g/L) apresentaram valores próximos de nmm_h , $2,38 \times 10^8$ e $2,12 \times 10^8$, respectivamente. Já no final da fermentação, em 24 horas, o número mínimo de moléculas de toxina killer presentes no halo, no meio com 150 g/L de sacarose foi estimado em $5,62 \times 10^8$, valor este inferior ao calculado, neste mesmo tempo, na fermentação com 100 g/L, estimado em $1,03 \times 10^9$. A DO teve um comportamento exponencial com uma velocidade máxima de aumento de $0,2764 \text{ h}^{-1}$. A velocidade máxima do aumento da DO está expressa na fórmula:

$$DO = 0,0541e^{0,2764t}$$

$$r^2 = 0,9759$$

A produção de etanol no meio com 150 g/L de sacarose foi de 0,48 °GL.

A combinação entre os três componentes do meio (Mosto/Sacarose/ELNC), nestas concentrações, parece favorecer a síntese da proteína killer. A concentração de 100 g/L de sacarose, adicionada ao meio de cultura, mostrou proporcionar melhores condições para a síntese da proteína killer quando comparada aos meios com elevadas quantidades de sacarose (150 e 200 g/L), assim como no meio contendo apenas 5 % de mosto. As modificações feitas nas concentrações dos componentes do meio de cultura alteram de forma importante o comportamento da linhagem killer Embrapa 1B, assim como, a síntese da proteína killer.

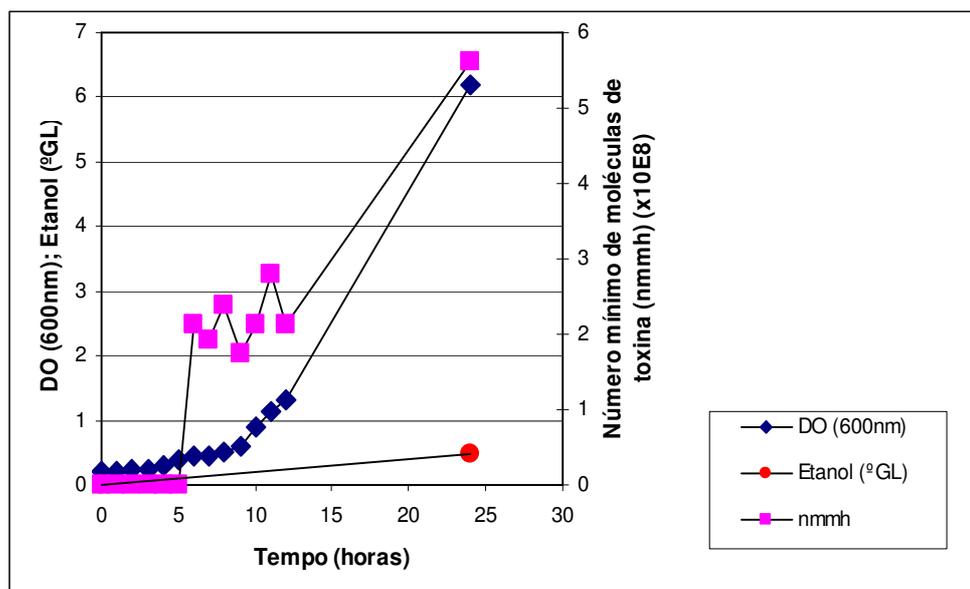


Figura 17: Crescimento celular da linhagem 1B em meio M5 líquido suplementado com 150 g/L de sacarose, cultivada em condições anaeróbicas; DO (600 nm); número mínimo de moléculas de toxina (nmm_h); produção de etanol (°GL).

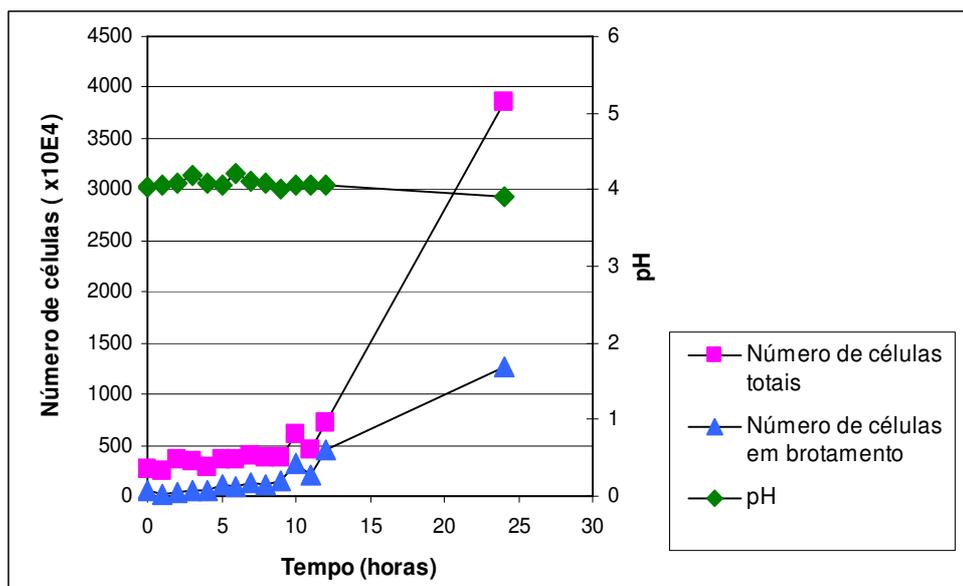


Figura 18: Contagem de células totais e em brotamento da linhagem 1B em meio M5 líquido suplementado com 150 g/L de sacarose, cultivada em condições anaeróbicas.

O meio M5 líquido suplementado com 100 g/L de sacarose, devido a estes resultados, foi o escolhido para avaliar a produção do fator killer pelas linhagens 91B e K1. Pode-se observar no gráfico da Figura 19 que a DO do meio contendo linhagem 91B evoluiu desde o início da fermentação apresentando uma fase exponencial. A velocidade do aumento máximo da DO foi $0,2262 \text{ h}^{-1}$. A velocidade máxima do aumento da DO está expressa na fórmula:

$$DO = 0,1140e^{0,2262t}$$

$$r^2 = 0,9786$$

No entanto, a síntese da proteína killer iniciou somente em oito horas, aumentando até 24 horas. Os valores de nm_h foram estimados em $1,69 \times 10^8$ e $4,62 \times 10^8$, respectivamente. A produção de etanol foi de $0,41 \text{ }^\circ\text{GL}$. O pH se manteve estável de T0 a T11, alternando entre 3,98 e 3,91 (Figura 20).

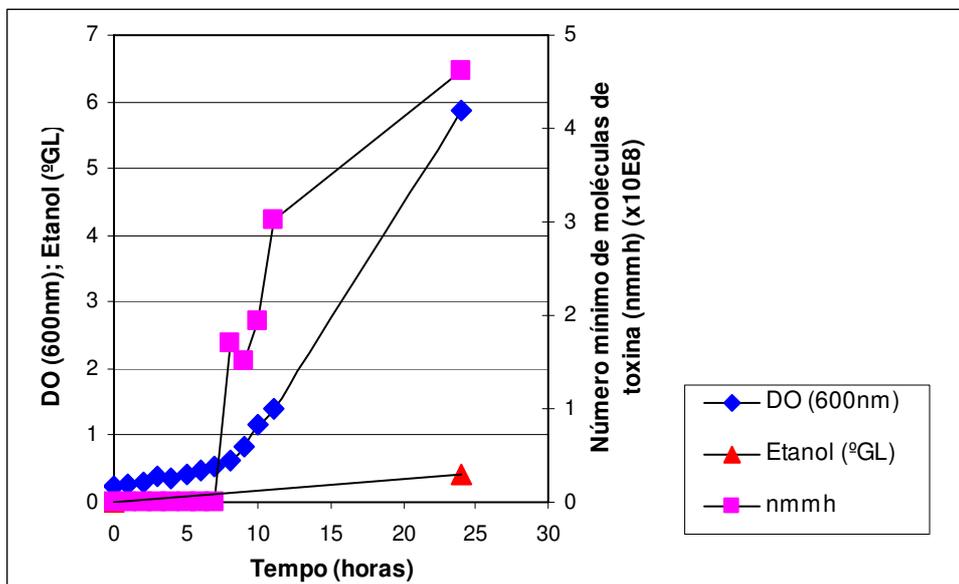


Figura 19: Crescimento celular da linhagem 91B em meio M5 líquido suplementado com 100 g/L de sacarose, cultivada em condições anaeróbicas; DO (600 nm); número mínimo de moléculas de toxina (nmm_h); produção de etanol (°GL).

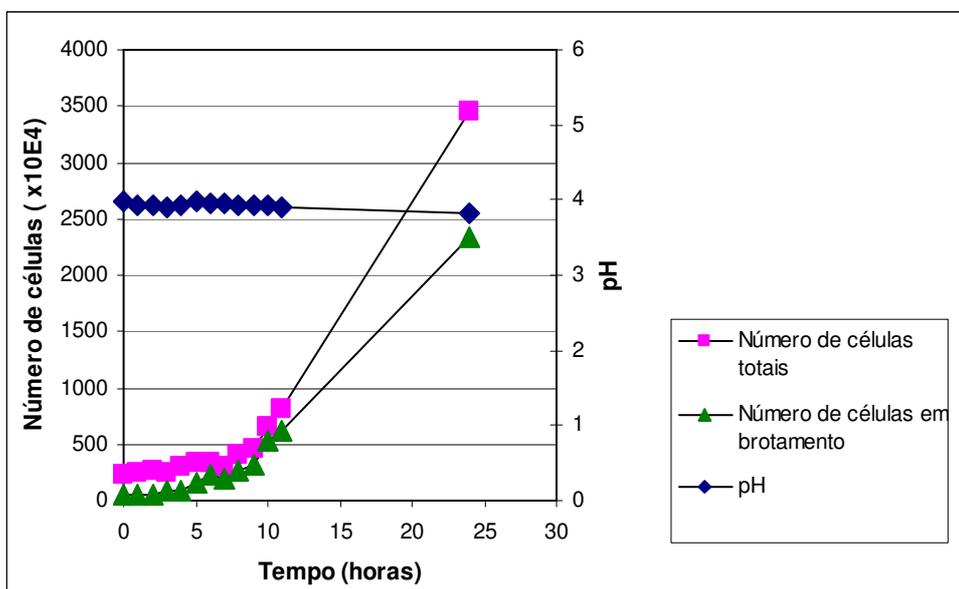


Figura 20: Contagem de células totais e em brotamento da linhagem 91B em meio M5 líquido suplementado com 100 g/L de sacarose, cultivada em condições anaeróbicas.

Com relação à linhagem comercial K1, o crescimento celular ocorreu desde o início da fermentação. A DO teve um comportamento exponencial com

uma velocidade máxima de aumento de $0,2031 \text{ h}^{-1}$. A velocidade máxima do aumento da DO está expressa na fórmula:

$$DO = 0,3065e^{0,2031t}$$

$$r^2 = 0,9925$$

Mesmo havendo um crescimento acentuado, observou-se que esta linhagem não produz fator killer de forma eficiente. A síntese da proteína pôde ser observada somente em 24 horas, apresentando um valor de nm_h de $0,8 \times 10^8$ (Figura 21). A Figura 22 mostra que a produção de etanol foi $0,81 \text{ }^\circ\text{GL}$. O pH se manteve estável de T0 a T11, alternando entre 3,95 e 3,88, respectivamente, apresentando um ligeiro declínio em T24.

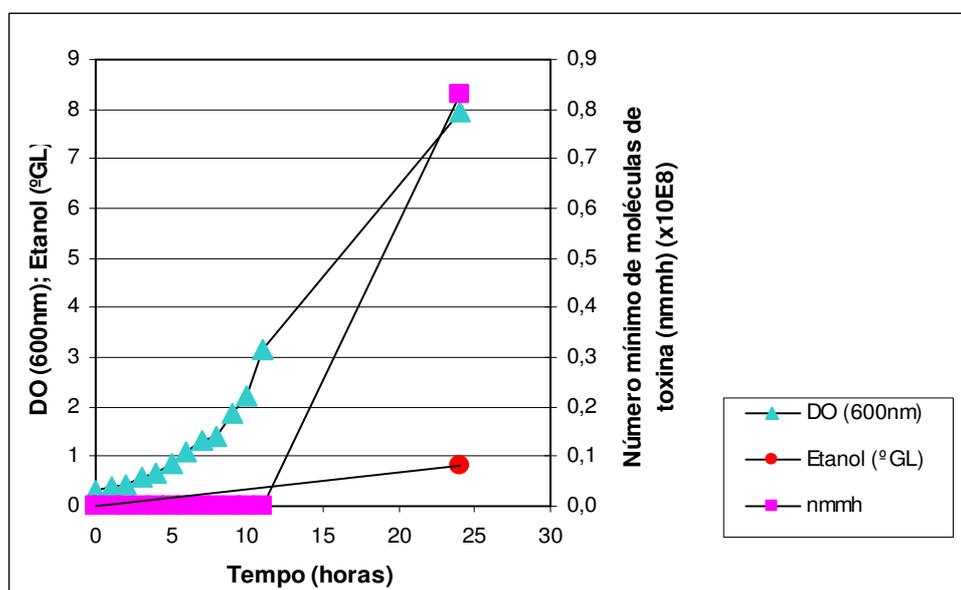


Figura 21: Crescimento celular da linhagem K1 em meio M5 líquido suplementado com 100 g/L de sacarose, cultivada em condições anaeróbicas; DO (600 nm); número mínimo de moléculas de toxina (nm_h); produção de etanol ($^\circ\text{GL}$).

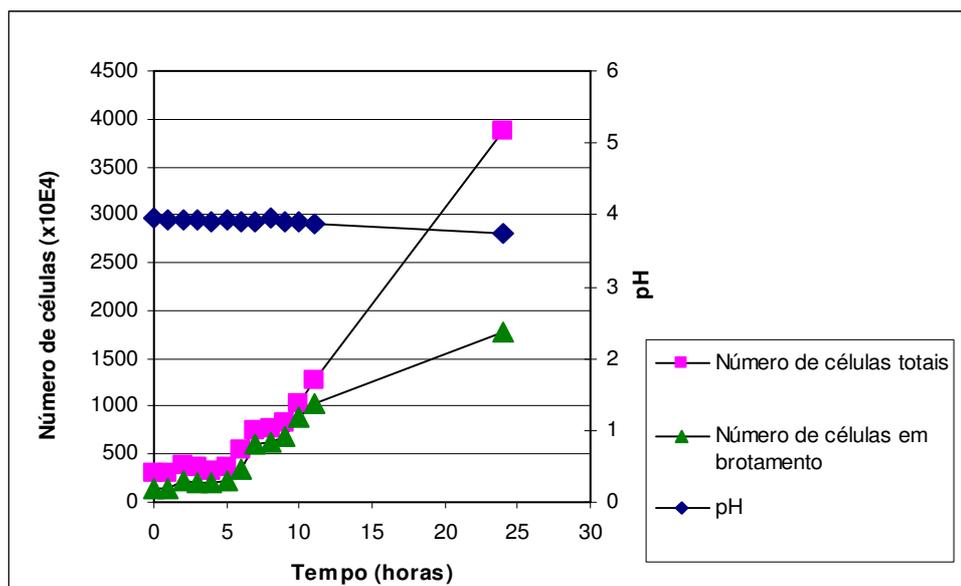


Figura 22: Contagem de células totais e em brotamento da linhagem K1 em meio M5 líquido suplementado com 100 g/L de sacarose, cultivada em condições anaeróbicas.

Os resultados mostraram que o meio M5 líquido suplementado com 100 g/L de sacarose não exerceu efeito inibitório de crescimento provocado pela pressão osmótica, como foi observado na avaliação com 200 g/L. Este meio, assim como as condições de cultivo, também foi favorável no que se refere à síntese do fator killer em condições anaeróbicas de crescimento.

4.3.4 Efeito “Crabtree” e a produção de proteína killer em meio M5 suplementado com 100 g/L de sacarose

A linhagem 1B foi mantida em condições aeróbicas com meio M5 líquido suplementado com 100 g/L de sacarose. Os resultados mostraram crescimento, tanto expresso em DO como em número total de células, desde o início do processo (Figura 23). Foi observado que o etanol foi produzido já nas primeiras horas de crescimento (Figura 23), o que não foi observado em

biorreator (item 4.3.2). A síntese do fator killer não apresentou fase lag. A produção deste fator ocorreu desde o início do crescimento. O número mínimo de moléculas killer (n_{mm_h}) produzidos aumentou com o tempo, seguindo o crescimento celular. A concentração de etanol e o n_{mm_h} , em 24 horas (T24) foram de 3,26 °GL e de $9,84 \times 10^8$, respectivamente. De acordo com Bai *et al.* (2008), o etanol é metabólito primário cuja produção está fortemente relacionada com o crescimento celular. A DO teve um comportamento exponencial de T0 a T7. A velocidade máxima do aumento da DO está expressa na fórmula:

$$DO = 1,305e^{0,16t}$$

$$r^2 = 0,9541$$

$$tg = \frac{\ln 2}{0,16} = 4,3h$$

A velocidade máxima de aumento da DO foi $0,16 \text{ h}^{-1}$ com um tempo necessário para dobrar a DO de, aproximadamente, 4,3 horas.

A concomitante produção de etanol e toxina killer na presença ou ausência de ar parece indicar que a síntese destes dois produtos do metabolismo é governada por mecanismos relacionados. O sistema da síntese de proteína killer de *Sacch. cerevisiae* pode estar intimamente relacionado com o processo de produção de etanol. A aerobiose, por si só, não interfere nem na sua atividade biológica e nem na sua produção, somente se a concentração de açúcar ultrapassar os valores críticos. Linhagens que produzem etanol em concentrações elevadas de açúcar, mesmo em condições aeróbicas, são ditas

“Crabtree” positivas (Postma *et al.*, 1989; Van Urk *et al.*, 1990; Thierie, 2004). A linhagem 1B se enquadra neste grupo de linhagens.

Estes resultados sugerem que a expressão da proteína killer funcional depende do estresse imposto às células pela composição do meio de cultivo ou pelas condições de cultivo. Breierova (1997) observou que leveduras, quando induzidas a situações de estresse, produziram glicoproteínas crioprotetoras. O grau do estresse osmótico pode ter estimulado, como no caso do etanol, a síntese do fator killer.

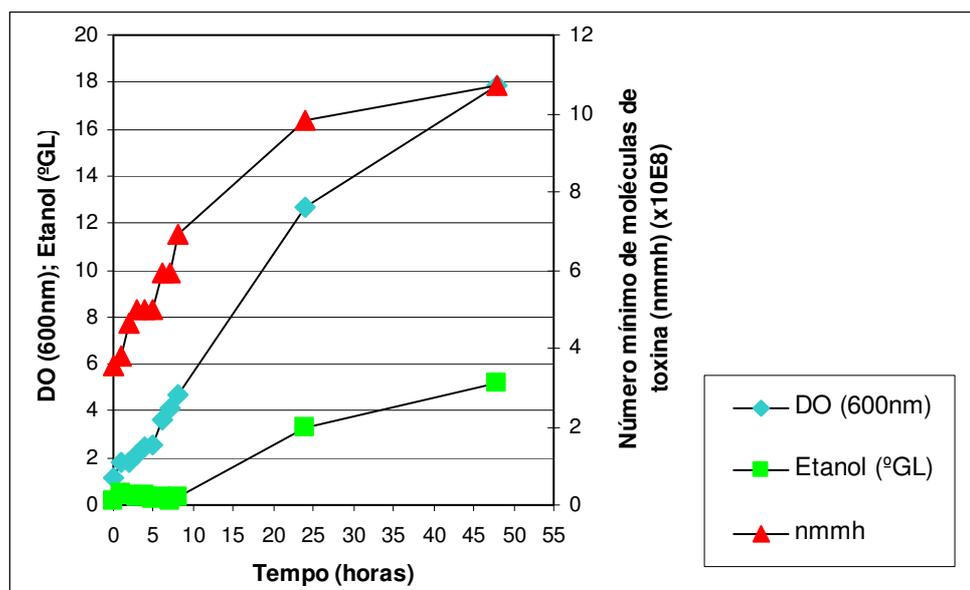


Figura 23: Crescimento da linhagem 1B em meio M5 líquido suplementado com 100 g/L de sacarose, sob condições aeróbicas; DO (600 nm); número mínimo de moléculas de toxina (nmm_h); produção de etanol (°GL).

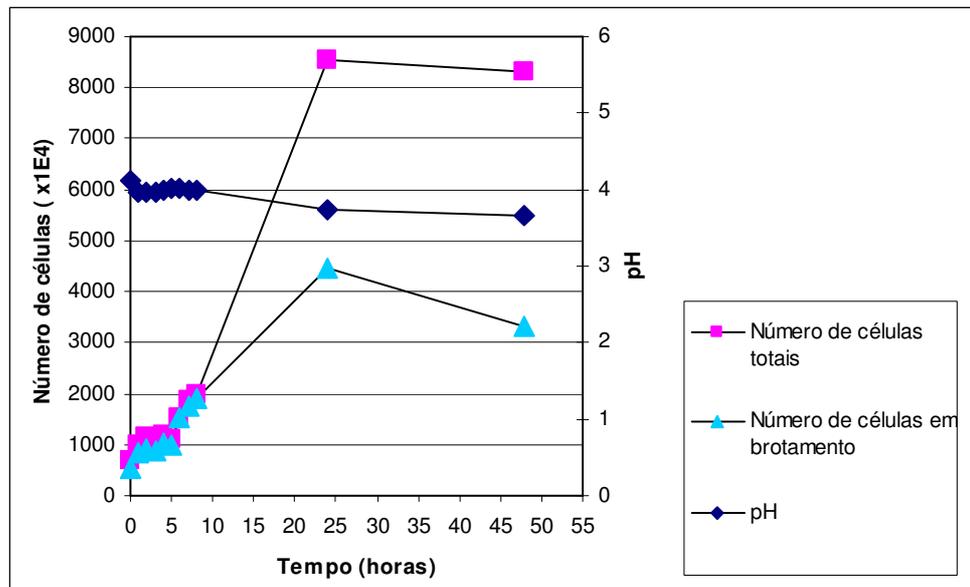


Figura 24: Contagem de células totais e em brotamento da linhagem 1B em meio M5 líquido suplementado com 100 g/L de sacarose, em condições aeróbicas.

Resultados semelhantes foram observados com a linhagem 91B. A DO teve um comportamento exponencial entre zero e sete horas. A velocidade máxima do aumento da DO está expressa na fórmula:

$$DO = 0,9931e^{0,2038t}$$

$$r^2 = 0,9882$$

A produção da proteína killer, ocorreu desde o tempo zero (T0) do crescimento até 24 horas, permanecendo estável até 48 horas (Figura 25). Em T0, o número mínimo de moléculas killer foi estimado em $1,69 \times 10^8$ e em 24 e 48 horas, este número aumentou para $5,91 \times 10^8$.

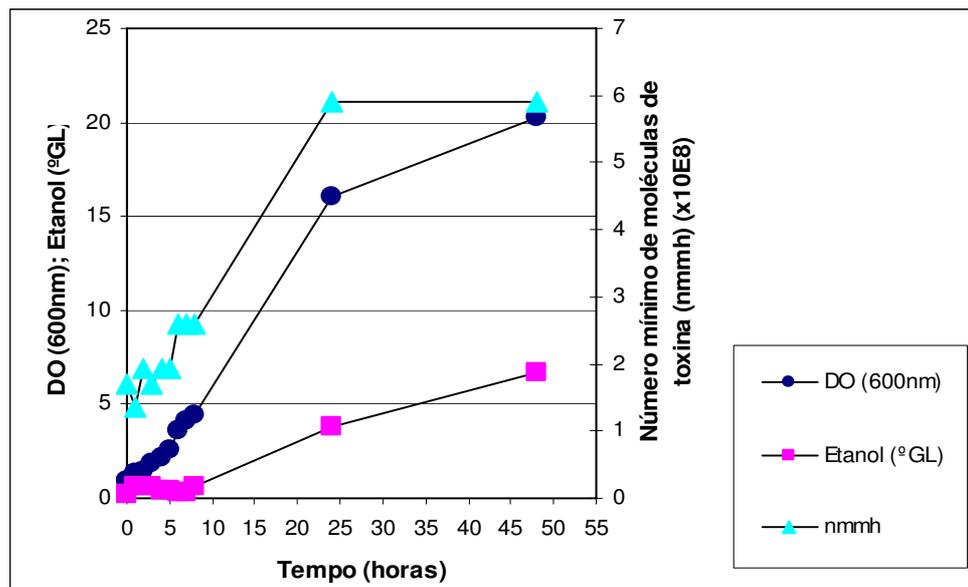


Figura 25: Crescimento celular da linhagem 91B em meio M5 líquido suplementado com 100 g/L de sacarose, cultivada em condições aeróbicas; DO (600 nm); número mínimo de moléculas de toxina (nmm_h); produção de etanol (°GL).

O pH das amostras de T0 até T8 não apresentou muita variação, alternando entre 4,0 e 4,09, ocorrendo um ligeiro declínio em T24 e T48 para 3,76 e 3,74, respectivamente (Figura 26).

A linhagem 91B se comportou de forma semelhante à linhagem 1B no que se refere à produção de etanol e síntese de proteína killer em condições aeróbicas e em concentrações elevadas de açúcar, embora a quantidade de proteína sintetizada pela 91B tenha sido inferior àquela produzida pela 1B. Estes resultados mostram que a linhagem 91B também é “Crabtree” positiva e, que nesta linhagem, o mecanismo que governa a síntese de etanol está relacionado com o da síntese da toxina killer.

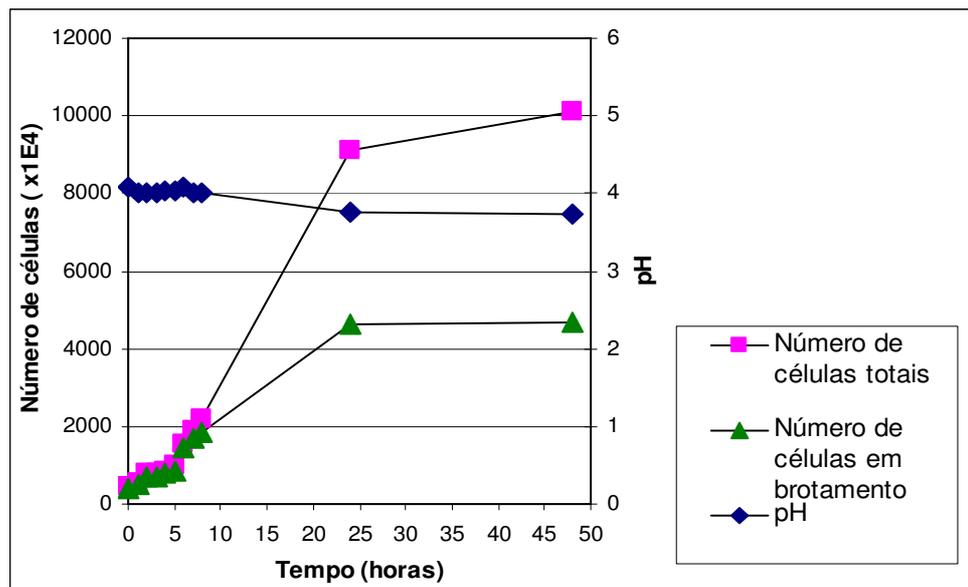


Figura 26: Contagem de células totais e em brotamento da linhagem 91B em meio M5 líquido suplementado com 100 g/L de sacarose, cultivada em condições aeróbicas.

A linhagem comercial não obteve o mesmo comportamento das linhagens referidas acima. Esta levedura apresentou um bom crescimento (Figura 27). A DO teve um comportamento exponencial entre uma e oito horas. A velocidade máxima do aumento da DO está expressa na fórmula:

$$DO = 0,9901e^{0,2957t}$$

$$r^2 = 0,9895$$

Esta linhagem também produziu etanol em aerobiose com elevadas concentrações de açúcar. Estes resultados mostram que a linhagem comercial K1 também é “Crabtree” positiva. No entanto, não houve síntese da proteína killer durante todo o processo.

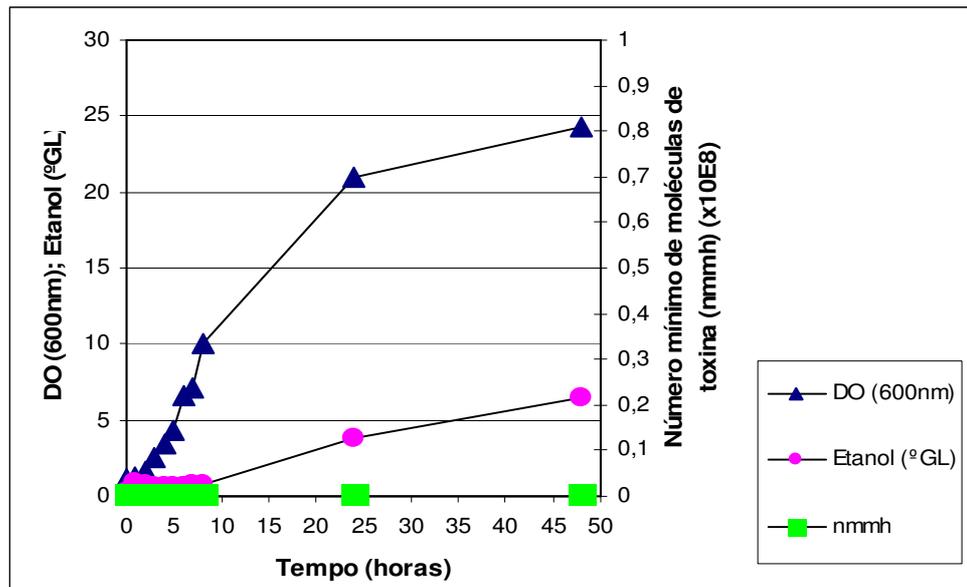


Figura 27: Crescimento celular da linhagem K1 em meio M5 líquido suplementado com 100 g/L de sacarose, cultivada em condições aeróbicas; DO (600 nm); número mínimo de moléculas de toxina (nmm_h); produção de etanol (°GL).

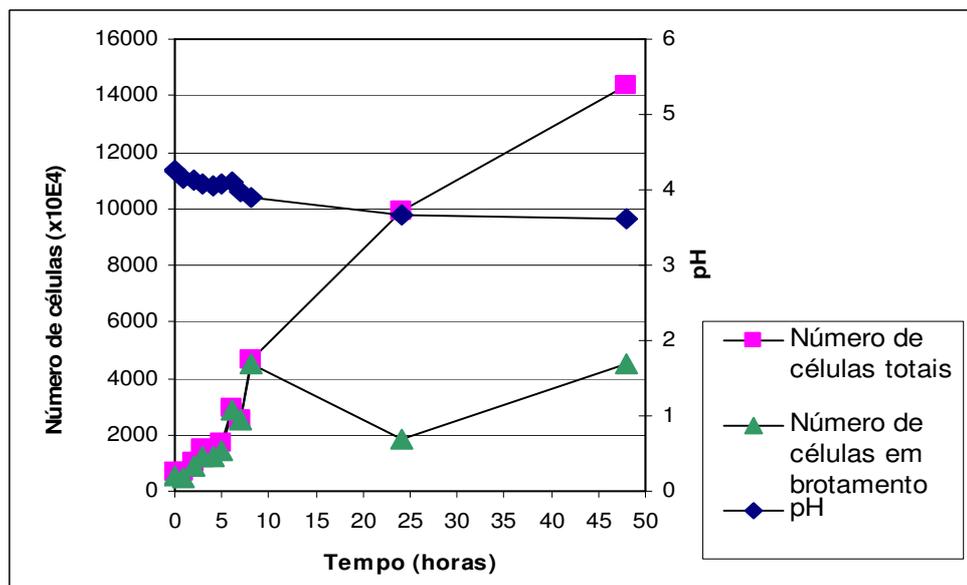


Figura 28: Contagem de células totais e em brotamento da linhagem killer comercial K1 em meio M5 líquido suplementado com 100 g/L de sacarose, cultivada em condições aeróbicas.

Silva *et al.*, (2006) observaram diferenças entre linhagens $K_2^+R_2^+$ no que se refere à capacidade de matar células sensíveis. Embora as três linhagens aqui avaliadas sejam do tipo K_2 , elas apresentam características

distintas no que se refere à síntese do fator killer no mesmo meio de cultivo tanto para condições anaeróbicas quanto para condições aeróbicas de crescimento. Pode-se observar que pequenas alterações nos componentes do meio de cultura e nas condições de cultivo influenciam a produção da proteína killer. O meio de cultivo que proporcionou estabilidade de produção da proteína killer funcional foi o meio M5 líquido suplementado com 100 g/L de sacarose. Convém salientar que, mesmo em condições aeróbicas, por serem as linhagens 91B e 1B “Crabtree” positivas, nesta concentração de sacarose, o fator killer é formado em quantidade mais elevada, até mesmo em relação às condições anaeróbicas. Isto se deve provavelmente ao maior número de células formadas na condição aeróbica.

5. CONCLUSÕES

A proteína killer, mesmo presente, pode não possuir ação contra a linhagem sensível, pois o ataque depende das condições fisiológicas da linhagem sensível que está sendo utilizada. O ELNC apresentou comportamento duplo. Este componente, dependendo da concentração que for empregado em meio sólido para detecção, age como protetor da linhagem sensível, impedindo o ataque do fator killer na célula alvo. Em meio líquido, induz a síntese deste fator.

A utilização de uma linhagem killer no processo de vinificação pode não possuir o efeito esperado. Devido a grande instabilidade do fator killer, a seleção da linhagem para estes fins não deve ser baseada apenas por possuir efeito killer, mas sim nas suas características enológicas, pois pode conferir uma falsa segurança aos usuários da tecnologia. A aplicação apenas da toxina no processo de vinificação, como também tem sido evidenciado, vai depender do meio de cultivo que a cultura será inoculada e das condições de crescimento empregadas. Ficou estabelecida a grande instabilidade com

relação à produção da proteína killer funcional. Linhagens $K_2^+R_2^+$ possuem características distintas com relação à síntese da proteína. A síntese do fator killer esta intimamente relacionada com o processo de produção de etanol e a aerobiose em si não interfere nem na atividade biológica, nem na produção do fator killer.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRANCHES, J.; MORAIS, P.B.; ROSA, C.A.; MENDONÇA-HAGLER, L.C.; HAGLER, A. N. The incidence of killer activity and extracellular proteases in tropical yeast communities. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, n. 4, p.328-336, 1997.

ALEXANDRE, H., PLOURDE, L., CHARPENTIER, C., FRANÇOIS, J. Lack of correlation between trehalose accumulation, cell viability and intracellular acidification as induced by various stresses in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology**, v.144, p.1103-1111, 1998.

ATTFIELD, P.V. Trehalose accumulates in *Saccharomyces cerevisiae* during exposure to agents that induce heat shock response. **FEBS Letters**, v.225, n.1-2, 259-263, 1987.

BAI, F.W., ANDERSON, W.A., MÔO-YOUNG, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnology Advances**, v.26, p.89-105, 2008.

BEVAN, E.,A.; MAKOVER, M. The physiological basis of the killer character in yeast. **Genetics today** (ed Geerts SJ). XIth International Congress of Genetics. (Pergamon, Oxford), p.202-203, 1963.

BEVAN, E.A. AND SOMERS, J. M. Somatic segregation of the killer (K) and neutral (n) cytoplasmic genetic determinants in yeast. **Genet. Res.**, v.14, p.71-77, 1969.

BOSTIAN, K.A. AND HOPPER, J. Translational analysis of the killer-associated virus-like particle dsRNA genome of *S. cerevisiae*: M dsRNA encodes toxin. **Cell**, v.19, p.403-414, 1980.

BOSTIAN, K.A. A glycosylated protoxin in killer yeast: Models for its structure and maturation. **Cell**, v.32, p.169-180, 1983.

BOSTIAN, K.A., ELLIOT, Q., BUSSEY, H., BURN, V., SMITH, A., TIPPER, D.J. Sequence of the preprotoxina dsRNA gene of type I killer yeast: multiple processing events produce a two-component toxin. **Cell**, v.36, p.741-751, 1984.

BREIEROVA, E. Yeast exoglycoproteins produced under NaCl-stress conditions as efficient cryoprotective agents. **Lett. Appl. Microbiol.**, v.25, n.4, p.254-256, 1997.

BUSSEY, H., SAVILLE, D., HUTCHINS, K., PALFREE, R.G.E. Binding of Yeast killer toxin to a cell wall receptor on sensitive *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bacteriology**, v.140, n.3, p.888-892, 1979.

BUSSEY H.; SACKS W.; GALLEY, D.; SAVILLE, D. Yeast killer plasmid mutations affecting toxin secretion and activity and toxin immunity function. **Molecular and Cellular Biology**, v.2, n.4, p.346-354, 1982.

BUSSEY, H. K1 killer toxin, a pore-forming protein from yeast. **Molecular Biology**, v.5, n.10, p. 2339-2343, 1991.

CAMARGO, U.A., GUERRA, C.C. **BRS Lorena-Cultivar para a elaboração de vinhos aromáticos**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2001. 4p. (Embrapa Uva e Vinho. Comunicado Técnico).

CIANI, M., FATICHENTI, F. Killer toxin of *Kluyveromyces phaffii* DBVPG 6076 as a biopreservative agent to control apiculate wine yeasts. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, n.7, p.3058-3063, 2001.

CLARK, V.L., CAMPBELL, L.A., PALERMO, D.A., EVANS, T.M., KLIMPEL, K. W. Induction and repression of outer membrane proteins by anaerobic growth of *Neisseria gonorrhoeae*. **Infection and Immunity**, v.55, n.6, p.1359-1364, 1987.

COMITINI, F.; DE, J.I.; PEPE, L.; MANNAZZU, I.; CIANI, M. *Picchia anomala* and *Kluyveromyces wickerhamii* killer toxins as new tools against *Dekkera/Brettanomyces* spoilage yeasts. **FEMS Microbiology Letters**, v.238, p.235-240, 2004.

CONTI, S., MAGLIANI, W., ARSENI, S., DIECI, D., FRAZZI, R., SALATI, A., VARALDO, P.E., POLONELLI, L. In vitro activity of monoclonal and recombinant yeast killer toxin-like antibodies against antibiotic-resistant Gram-positive cocci. **Molecular Medicine**, v.6, n.7, p.613-619, 2000.

CROWE, J.H.; CROWE, L.M.; CARPENTER, J.F.; RUDOLPH, A.S.; WISTROM, C.A.; SPARGO, B.J.; ANCHORDOGUY, T.J. Interactions of sugars with membranes. **Biochim Biophys Acta**. v.947, p.367-384, 1988.

CROWE, J.H.; CROWE, L.M.; OLIVER, A.E.; TSVETKOVA, N.; WOLKERS, W.; TABLIN, F. The trehalose myth revisited: introduction to a symposium on stabilization of cells in the dry state. **Cryobiology**, v.43, p.89-105, 2001.

CUINIER, M.C. ; GROS, M.C. Enquete sur la repartition des levures killer en France. **Vigne et Vins**, v.318, p.25-27, 1983.

DE LA PEÑA, P., BARROS, F., GASCÓN, S., LAZO, P.S., RAMOS, S. Effect of yeast killer toxin on sensitive cells of *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Biological Chemistry**, v.256, n.20, p.10420-10425, 1981.

DONINI, M., LICO, C., BASCHIERI, S., CONTI, S., MAGLIANI, W., POLONELLI, L., BENVENUTO, E. Production of an engineered killer peptide in *Nicotiana benthamiana* by using a Potato virus X expression system. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.10, p.6360-6367, 2005.

GRANT, L. AND PRAMER, D. Minor element composition of yeast extract. **J. Bacteriol.** v.82, p.869-870, 1962.

HEINTEL, T., ZAGORC, T., SCHMITT, M. J. Expression, processing and high level secretion of a virus toxin in fission yeast. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.56, p.165-172, 2001.

HERNAWAN, T. AND FLEET, G. Chemical and cytological changes during the autolysis of yeast. **Journal of Industrial Microbiology**, v.14, p.440-450, 1995.

HOTTINGER, T.; SCHMUTZ, P.; WIEMKEN, A. Heat-induced accumulation and futile cycling of trehalose in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bacteriology**, v.169, n.12, p.5518-5522, 1987.

HOUNSA, C.G., BRANDT, E.V., THEVELEIN, J., HOHMANN, S., PRIOR, B.A. Role of a trehalose in survival of *Saccharomyces cerevisiae* under osmotic stress. **Microbiology**, v.144, p.671-680, 1998.

HUTCHINS, K., BUSSEY, H. Cell wall receptor for yeast killer toxin: involvement of (1→6)- β -D-glucan. **Journal of Bacteriology**, v.154, n.1, p.161-169, 1983.

IWAHASHI, H.; NWAKA, S.; OBUCHI, K. Evidence for contribution of neutral trehalase in barotolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.5182-5185, 2000.

IZGU, F., ALTINBAY, D., YUCELIS, A. Identification and killer activity of a yeast contaminating starter cultures of *Saccharomyces cerevisiae* strains used in the Turkish baking industry. **Food Microbiology**, v.14, p.125-131, 1997.

KAPSOPOULOU, K., BAROUTI, E., MAKRIONITI, A., KOSTAKI, K. Occurrence of *Saccharomyces cerevisiae* killer yeasts in wine-producing areas of Greece. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v.24, p.1967-1971, 2008.

KINAL, H., PARK, C.M., BERRY, J.O., KOLTIN, Y., BRUENN, J.A. Processing and secretion of a virally encoded antifungal toxin in transgenic tobacco plants: evidence for a Kex2p pathway in plants. **The Plant Cell**, v.7, p.677-688, 1995.

KITAMOTO, H.K., OHMOMO, S. Selection of killer yeasts (*Kluyveromyces lactis*) to prevent aerobic deterioration in silage making. **J. Dairy Sci.**, v.76, p.803-811, 1992.

KONO, I., HIMENO, K. *Kluyveromyces* yeast having killer activity against *Zygosaccharomyces rouxii*. **Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi**, v.39, n.12, p.1135-1139, 1992.

KONO, I., HIMENO, K. A novel killer yeast effective on *Schizosaccharomyces pombe*. **Biosci. Biotech. Biochem.**, v.61, n.3, p.563-564, 1997.

KOTANI, H., SHINMYO, A., ENATSU, T. Killer toxin from sake yeast: properties and effects to adenosine 5'-diphosphate and calcium ion on killing action. **J. Bacteriol.**, v.129, p.640-650, 1977.

KREGER-VAN RIJ, N.J.W. **The yeasts a taxonomic study**. Amsterdam, 1984, 1082.

KWAST, K.E., BURKE, P.V., STAAHL, B.T., POYTON, R.O. Oxygen sensing in yeast: Evidence for the involvement of the respiratory chain in regulation the transcription of a subset oh hypoxic genes. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.96, p.5446-5451, 1999.

LEWIS, J.G.; LEARMONTH, R.P.; WATSON, K. Induction of heat, freezing and salt tolerance by heat and salt shock in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology**, v.141, p.687-694, 1995.

LONGO, E.; CANSADO, J.; SIERO, C.; CALO, P.; VELÁZQUEZ, J. B.; VILLA, T. G. Influence of curing of the killer phenotype in *Saccharomyces cerevisiae* wine strains on their fermentative behavior. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.8, p.147-150, 1992.

LOPES, C.A.; RODRÍGUEZ, M.E.; SANGORRÍN, M.; QUEROL, A.; CABALLERO, A. Patagonian wines: the selection of an indigenous yeast starter. **Journal and Microbiol. Biotechnol**, v.34, p.539-546, 2007.

LOWES, K.F., SHERMAN, C.A., PAYNE, J., MACKENZIE, D., ARCHER, D.B., MERRY, R.J., GASSON, M.J. Prevention of yeast spoilage in feed and food by yeast mycocin HMK. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.3, p.1066-1076, 2000.

MARQUINA, D.; A. SANTOS, J.M. PEINADO. Biology of killer yeasts. **Int. Microbiol.**, v.5, p.65-71, 2002.

MICHALCÁKOVÁ, S.; REPOVÁ, L. Effect of ethanol, temperature and pH on the stability of killer yeast strains. **Acta Biotechnology**, v.12, n.3, p.163-168, 1992.

MIDDELBEEK, E. J.; HERMANS, J. M. & STUMM, C. Production, purification and properties of a *Pichia kluyveri* killer toxin. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v.45, p.437-450, 1979.

MITCHELL, D., J.; BEVAN E., A. **dsRNA killer systems in yeast**. Yeast Biotechnology. Edited by D.R. Berry, I. Russel, G.G. Stewart, London, p.104 - 155, 1987.

NOUT, M.J.R.; PLATIS, C.E.; WICKLOW, D.T. Biodiversity of yeasts from Illinois maize. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, p.262-267, 1997.

PALFREE, R.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.; OOSTROM, J.V.; STEWART, G.G. Phenotypic expression of *Kluyveromyces lactis* killer toxin against *Saccharomyces* spp.. **Appl. Environ. Microbiol**, v.50, p.257-260, 1985.

POLONELLI, L., MORACE, G. Reevaluation of the Yeast killer phenomenon. **Journal of Clinical Microbiology**, v.24, n.5, p.866-869, 1986.

POLONELLI, L.; CONTI, S.; GERLONI, M.; MAGLIANI, W.; CHEZZI, C. Interfaces of the yeast killer phenomenon. **Critical Reviews in Microbiology**, v.18, n.1, p.47-87, 1991.

POLONELLI, L.; MORACE, G.; CONTI, S.; GERLONI, M.; MAGLIANI, W.; CHEZZI, C. Killer System Interactions. **Cur. Top. Med. Micol.**, v. 4, p.137-157, 1992a.

POLONELLI, L., MENOZZI, M.G., CAMPINI, L., GERLONI, M., CONTI, S., MORACE, G., CHEZZI, C. Anaerobic yeast killer systems. **European Journal of Epidemiology**, v.8, n.3, p.471-476, 1992b.

POMMIER, S.; STREHAIANO, P.; DÉLIA, M.L. Modelling the growth dynamics of interacting mixed cultures: a case of amensalism. **International Journal of Food Microbiology**, v.100, p.131-139, 2005.

POSTMA, E., VERDUYN, C., SCHEFFERS, W.A., DIJKEN, J.P.V. Enzymic analysis of the Crabtree effect in glucose-limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.55, n.2, p.468-477, 1989.

PRINGLE, J.R. AND MOR, J.R. Methods for monitoring the growth of yeast cultures and for dealing with the clumping problem. **Methods Cell Biol.**, v.91, p.131-68, 1975.

RENSBURG, E. VAN, PREEZ, J.C.DU, FILIAN, S.G. Influence of the growth phase and culture medium on the survival of *Mannheimia haemolytica* during storage at different temperatures. **Journal of Applied Microbiology**, v.96, p.154-161, 2004.

REVILLION, J.P.DE P., BRANDELLI, A., AYUB, A.Z. Production of yeast extract from whey using *Kluyveromyces marxianus*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.46, p.121-127, 2003.

RIBÉREAU-GAYON, J.; PEYNAUD, E.; SUDRAUP, P.; RIBÉREAU-GAYON, P. **Traité d'Oenologie Sciences et Techniques du Vin**. 2.ed. Bordas, Paris: Dunod, 1982.

SANGORRÍN, M.P., ZAJONSKOVSKY, I.E., LOPES, C.A., RODRÍQUEZ, M. E., DE VAN BROOCK, M.R.G., CABALLERO, A.C. Killer behavior in wild wine yeasts associated with Merlot and Malbec type musts spontaneously fermented from Northwestern Patagonia (Argentina). **J. Basic Microbiol.**, v.41, n.2, p.105-113, 2001.

SANGORRÍN, M.; LOPES, C.A.; GIRAUDO, M.R.; CABALLERO, A.C. Diversity and killer behavior of indigenous yeasts isolated from the fermentation vat surfaces in four Patagonian wineries. **International Journal of Food Microbiology**, v.119, n.3, p.351-357, 2007.

SILVA, G.A.da. The occurrence of killer, sensitive, and neutral yeasts in Brazilian Riesling Italic grape must and the effect of neutral strains of killing behaviour. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.46, p.112-121, 1996.

SILVA, G.A.da. **Comportamento de leveduras isoladas no Vale dos Vinhedos em Bento Gonçalves, RS, com relação à atividade killer**. In: XI CONGRESSO BRASILEIRO DE VITICULTURA E ENOLOGIA. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 1999a.

SILVA, G.A.da. **Evidência de uma linhagem de levedura com característica killer, neutra e sensível**. In: XI CONGRESSO BRASILEIRO DE VITICULTURA E ENOLOGIA. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 1999b.

SILVA, G.A.da. **Elaboração de Vinho: Aspectos Microbiológicos**. Uva para processamento Pós-colheita, Frutas do Brasil. Embrapa Uva e Vinho, v.36, p.36-48, 2003.

SILVA, G.A. da; ALMEIDA, E. A. de. Production of yellow-green fluorescent pigment by *Pseudomonas fluorescens*. **Brazilian Archives Biology and Technology**, v.49, p.411-419, 2006.

SILVA, G.A.da.; BALBINOTTE, J.; POLI, J.S.; BONA, G.S., de.; MORINI, M.A.L. **Ação do SO₂ sobre a sensibilidade ao fator killer de linhagens K⁻ R⁻ e à capacidade killer de linhagens K⁺ R⁺**. In: 52^o Congresso Brasileiro de Genética, Foz do Iguaçu/PR, p.745, 2006.

SKIPPER, N., BUSSEY, H. Mode of action of yeast toxins: energy requirement for *Saccharomyces cerevisiae* e killer toxin. **Journal of Bacteriology**, v.129, n.2, p.668-677, 1977.

SOMERS, M.J. Isolation of suppressive mutants from killer and neutral strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v.74, p.571-579, 1973.

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.

THEERARATTANANOON, K., LIN, Y.H., PENG, D.Y. Metabolic heat evolution of *Saccharomyces cerevisiae* grown under very-high-gravity conditions. **Process Biochemistry**, v.43, p. 1253-1258, 2008.

THIERIE, J. Modeling threshold phenomena, metabolic pathways switches and signals in chemostat-cultivated cells: the Crabtree effect in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Theoretical Biology**, v.226, p.483 – 501, 2004.

THOMAS, K.C., AND INGLEDEW, W.M. Production of 21 % (v/v) ethanol by fermentation of very high gravity (VHG) wheat mashes. **J. and Microbiol.**, v.10, p.61-68, 1992.

TIPPER, D.J.; BOSTIAN, K.A. Double-stranded ribonucleic acid killer systems in yeasts. **Microbiological Reviews**, p.125-156, 1984.

TIPPER, D.J., SCHMITT, M.J. Yeast dsRNA viruses: replication and killer phenotypes. **Molecular Microbiology**, v.5, n.10, p.2331-2338, 1991.

VAN URK, H., VOLL, W.S.L., SCHEFFERS, W.A., DIJKEN, J.P.V. Transient-state analysis of metabolic fluxes in Crabtree-positive and Crabtree-negative yeasts. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, n.1, p.281-287, 1990.

VENABLES, W.N., SMITH, D.M. The R development core team. **An introduction to R**. ed. 2.0.1, p.1-90, 2004.

YAP, N.A.; LOPES, M. DE B.; LANGRIDGE, P.; HENSCHKE, P.A. The incidence of killer activity of non-*Saccharomyces* yeasts towards indigenous yeast species of grape must: potential application in wine fermentation. **Journal of Applied Microbiology**, v.89, p.381-389, 2000.

YOUNG, T.W., PHILLISKIRK, G. The production of a Yeast killer Factor in the chemostat and the effects of killer yeasts in mixed continuous culture with a sensitive strain. **Journal of Applied Bacteriology**, v.43, p.425-436, 1977.

YOUNG, T.W. The genetic manipulation of killer character into brewing yeast. **Journal of the Institute of Brewing**, v.87, p.292-295, 1981.

WICKNER, R.B. Double-stranded RNA viruses of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiological Reviews**, v.60, p.250-265, 1996.

WIEMKEN, A. Trehalose in yeast, stress protectant rather than reserve carbohydrate. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v.58, p.209-217, 1990.

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.

7. VITA

Dados Pessoais

Nome: Jandora Severo Poli
Nascimento: 05/08/1981, Santana do Livramento/RS – Brasil
Filiação: Grey de Souza Poli e Suzana Severo Poli
Email: jandora.poli@gmail.com

Formação acadêmica

2007-2009 – Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS,
RS, Brasil.

1999-2005 – Graduação em Engenharia de Alimentos
Universidade do Vale do Rio dos Sinos, UNISINOS,
RS, Brasil.

1996-1998 – Ensino Médio (2º Grau)
Colégio Santa Teresa de Jesus

1988-1995 – Ensino Fundamental (1º Grau)
Colégio Santa Teresa de Jesus

Produção científica, tecnológica

Trabalhos completos em anais de congressos

- SILVA, G. A.; BRANDOLT, S. D.; **POLI, J. S.**; POLETTO, C. M.; MELLO, L. M. R.; ZANUS, M. C.; CAMARGO, U. A.. Polyphenols and Antioxidant Content in Grape Juice. In: 31º Congresso Mondiale Della Vigna e del Vigno, 2008, Verona. 31º Congresso Mondiale Della Vigna e del Vigno, 6º Assemblea Generale Dell'O.I.V., 15-20 Giugno 2008 - Verona - Italia, 2008.
- **POLI, J. S.**; SILVA, G. A.; GURAK, P. D.; POLETTO, C.; WENZEL, G. E.. Influência da concentração de levedura na concentração de polifenóis em vinhos tintos Cabernet Sauvignon. In: XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos-Sinaferm, 2007, Curitiba. Anais do XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2007.
- SILVA, G. A.; CHAVARRIA, G.; SANTOS, H. P.; GURAK, P. D.; **POLI, J. S.**; CROCOLI, C.. Cultivo de videira protegido com cobertura plástica e sua relação com a fermentação do mosto. In: XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos-Sinaferm,

2007, Curitiba. Anais do XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2007.

Resumos em anais de eventos

- SILVA, G. A.; **POLI, J. S.**; POLETTO, C. M.; BALBINOTTE, J.; VALENTE, P.. Composição do meio e sua relação com a expressão killer. In: XII Congresso Brasileiro de Viticultura e Enologia, 2008, Bento Gonçalves. Anais do XII Congresso Brasileiro de Viticultura e Enologia, Bento Gonçalves, RS, 22 a 24 de setembro de 2008, 2008.
- SILVA, G. A.; POLETTO, C. M.; **POLI, J. S.**; BALBINOTTE, J.; CARBONERA, A. S.; BARBOSA, E. S.; LOCATELLI, C.; VALENTE, P.. Comportamento de diferentes linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* na presença da levedura *Brettanomyces custersianus* durante a fermentação tumultuosa da vinificação em tinto. In: XII Congresso Brasileiro de Viticultura e Enologia, 2008, Bento Gonçalves. Anais do XII Congresso Brasileiro de Vitivinicultura e Enologia, Bento Gonçalves, RS, 22 a 24 de setembro de 2008.
- SILVA, G. A.; BARBOSA, E. S.; POLETTO, C. M.; **POLI, J. S.**; LOCATELLI, C.; LEITE, S. G. F.. Potencialidades de linhagens de levedura *Saccharomyces cerevisiae* durante a fermentação tumultuosa da cv. Cabernet Sauvignon. In: XII Congresso Brasileiro de Viticultura e Enologia, 2008, Bento Gonçalves. Anais do XII Congresso Brasileiro de Viticultura e Enologia, Bento Gonçalves, RS, 22 a 24 de setembro de 2008.
- **POLI, J. S.**; SILVA, G. A.; POLETTO, C. M.; VALENTE, P.. Composição do meio e sua influência na detecção do fator killer em *Saccharomyces cerevisiae*. In: 2º Encontro de Pós-graduandos da Embrapa Uva e Vinho, 2008, Bento Gonçalves. Resumos do 6º Encontro de Iniciação Científica de Embrapa Uva e Vinho e 2º Encontro de Pós-Graduandos da Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS, 21 a 22 de outubro de 2008.
- **POLI, J. S.**; SILVA, G. A.; POLETTO, C. M.. Estabilidade do perfil de linhagens killer, sensíveis e neutras. In: 2º Encontro de Pós-Graduandos da Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS, 21 a 22 de outubro de 2008., 2008, Bento

Gonçalves. Resumos do 6º Encontro de Iniciação Científica de Embrapa Uva e Vinho e 2º Encontro de Pós-Graduandos da Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS, 21 a 22 de outubro de 2008.

- POLETTO, C. M.; SILVA, G. A.; **POLI, J. S.**; BALBINOTTE, J.; CARBONERA, A. S.; BARBOSA, E. S.; LOCATELLI, C.; VALENTE, P.. Inibição do metabolismo de diferentes linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* induzida por *Brettanomyces custersianus*. In: 2º Encontro de Pós-Graduandos da Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS, 21 a 22 de outubro de 2008. Resumos do 6º Encontro de Iniciação Científica de Embrapa Uva e Vinho e 2º Encontro de Pós-Graduandos da Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS, 21 a 22 de outubro de 2008.
- POLETTO, C. M.; SILVA, G. A.; **POLI, J. S.**.. Repicagens sucessivas e sua influência sobre o perfil metabólico de leveduras. In: 2º Encontro de Pós-Graduandos da Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS, 21 a 22 de outubro de 2008. Resumos do 6º Encontro de Iniciação Científica de Embrapa Uva e Vinho e 2º Encontro de Pós-Graduandos da Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS, 21 a 22 de outubro de 2008.
- SILVA, G. A.; **POLI, J. S.**; POLETTO, C. M.; VALENTE, P.. Composição do meio e sua influência na produção do fator killer. In: I Encontro Gaúcho de Micologia, 2008, Porto Alegre. Anais do I Encontro Gaúcho de Micologia - Porto Alegre/RS, 2008.
- SILVA, G. A.; POLETTO, C. M.; **POLI, J. S.**; VALENTE, P.. Tolerância de *Saccharomyces cerevisiae* e *Brettanomyces custersianus* a diferentes concentrações de dióxido de enxofre. In: I Encontro Gaúcho de Micologia, 2008, Porto Alegre. Anais do I Encontro Gaúcho de Micologia - Porto Alegre/RS, 2008.
- BERNARDI, T. L.; LANDELL, M.; POLETTO, C.; **POLI, J. S.**; VALENTE, P.. Inibição de *Dekkera/Brettanomyces* por leveduras killer isoladas de produtos lácteos. In: 5º Congresso Brasileiro de Micologia, 2007, Recife. Programação e resumos do 5º Congresso Brasileiro de Micologia, 2007.
- BERNARDI, T. L.; POLETTO, C.; **POLI, J. S.**; LONDERO, L. G.; VALENTE, P.. Desenvolvimento de meio de cultivo diferencial para o isolamento de leveduras *Dekkera/Brettanomyces* em vinhos. In: 5º Congresso

Brasileiro de Micologia, 2007, Recife. Programação e resumos do 5º Congresso Brasileiro de Micologia, 2007.

- SILVA, G. A.; BALBINOTTE, J.; **POLI, J. S.**; BONA, G.; MORINI, M. A. L.. Ação do SO₂ sobre a sensibilidade ao fator killer de linhagens K⁻R⁻ e a capacidade killer de linhagens K⁺R⁺. In: 52º Congresso Brasileiro de Genética, 2006, Foz do Iguaçu. Resumos do 52º Congresso Brasileiro de Genética, 2006.
- SILVA, G. A.; CAMARGO, U. A.; ZANUS, M. C.; **POLI, J. S.**; BONA, G.; GURAK, P. D.; MORINI, M. A. L.. Cultivares de uva para suco e sua relação com os teores de polifenóis e com a capacidade antioxidante. In: XIX Congresso Brasileiro de Fruticultura, 2006, Cabo Frio. Palestras e Resumos do XIX Congresso Brasileiro de Fruticultura, 2006.
- **POLI, J. S.**; SILVA, G. A.; CAMARGO, U. A.; ZANUS, M. C.; BONA, G.; GURAK, P. D.; MORINI, M. A. L.. Teores de polifenóis, antocianinas, capacidade antioxidante e intensidade de cor em diferentes cultivares e seleções de uva para suco. In: 4º Encontro de Iniciação Científica da Embrapa Uva e Vinho, 2006, Bento Gonçalves. Resumos do 4º Encontro de Iniciação Científica da Embrapa Uva e Vinho, 2006.
- **POLI, J. S.**; ZANUS, M. C.; ZORZAN, C.. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de vinhos brancos varietais e vinho base de espumante. In: 4º Encontro de Iniciação Científica da Embrapa Uva e Vinho, 2006, Bento Gonçalves. Resumos do 4º Encontro de Iniciação Científica da Embrapa Uva e Vinho, 2006.
- BALBINOTTE, J.; SILVA, G. A.; **POLI, J. S.**; POLETTO, C.; MORINI, M. A. L.. SO₂ e a estabilidade de leveduras K+R+ com relação à capacidade killer. In: 4º Encontro de Iniciação Científica da Embrapa Uva e Vinho, 2006, Bento Gonçalves. Resumos do 4º Encontro de Iniciação Científica da Embrapa Uva e Vinho, 2006.
- SILVA, G. A.; POLETTO, C. M.; GURAK, P. D.; **POLI, J. S.**. Avaliação de meios de cultura para o isolamento de leveduras em vinhos. In: X Congresso Latino-Americano de Viticultura e Enologia, 2005, Bento Gonçalves-RS. Anais do X Congresso Latino-Americano de Viticultura e Enologia, 2005. p. 345-345.

Apresentações de trabalhos em eventos

- **POLI, J. S.;** SILVA, G. A.; POLETTO, C. M.; VALENTE, P.. Composição do meio e sua influência na detecção do fator killer em *Saccharomyces cerevisiae*. 2008.
- **POLI, J. S.;** SILVA, G. A.; CAMARGO, U. A.; ZANUS, M. C.; BONA, G.; GURAK, P. D.; MORINI, M. A. L.. Teores de polifenóis, antocianinas, capacidade antioxidante e intensidade de cor em diferentes cultivares e seleções de uva para suco. 2006.
- **POLI, J. S.;** ZANUS, M. C.; ZORZAN, C.. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de vinhos brancos varietais e vinho base de espumante. 2006.

Participação em eventos

- II Simpósio de Microbiologia Aplicada. 2008.
- 6º Encontro de Iniciação Científica de Embrapa Uva e Vinho e 2º Encontro de Pós-Graduandos da Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS, 21 a 22 de outubro de 2008..Composição do meio e sua influência na detecção do fator killer em *Saccharomyces cerevisiae*. 2008.
- I Encontro Gaúcho de Micologia.Composição do meio e sua influência na produção do fator. 2008.
- XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos-Sinaferm.Influência da Concentração de levedura na concentração de polifenóis em vinhos tintos Cabernet Sauvignon. 2007.
- 4º Encontro de Iniciação Científica da Embrapa uva e Vinho.Teores de polifenóis, antocianinas, capacidade antioxidante e intensidade de cor em diferentes cultivares e seleções de uva para suco. 2006.
- V Simpósio Gaúcho de Tecnologia de Alimentos: Inovações no Setor de Alimentos. 2005.
- 3º Encontro de Iniciação Científica da Embrapa Uva e Vinho. 2005.
- I Semana Acadêmica de Nutrição e Engenharia de Alimentos. 2002.