BIOTIPAGEM DE LEVEDURAS INDUSTRIAIS ATRAVÉS DO SISTEMA *KILLER*

CHRISTIANN DAVIS TOSTA

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências, Área de Concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos

P I R A C I C A B A

Estado de São Paulo - Brasil

Outubro - 2004

BIOTIPAGEM DE LEVEDURAS INDUSTRIAIS ATRAVÉS DO SISTEMA *KILLER*

CHRISTIANN DAVIS TOSTA

Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. **JORGE HORII**

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências, Área de Concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos

P I R A C I C A B A

Estado de São Paulo - Brasil

2004

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Tosta, Christiann Davis

Biotipagem de leveduras industriais através do sistema Killer / Christiann Davis Tosta. - -
Piracicaba, 2004.
78 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2004.
Bibliografia.

1. Biologia molecular 2. Indústria sucro-alcooleira 3. Levedura industrial 4. Microbiologia 5. Reação em cadeia por polimerase 6. Toxinas I. Título

CDD 660.62

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

*“Senhor, Tu fizeste o homem dominar
sobre as obras das Tuas mãos”*

Salmo 8:6

Ao meu pequeno Christiann D. Tosta Filho
que tem sido o motivo de ânimo na vida,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Prof^a Dr^a Sandra Regina Ceccato Antonini, pela orientação, amizade, carinho e confiança;

Ao Prof. Dr. Jorge Horii, pela orientação, dedicação e sugestões;

À minha família que sempre me apoiou na escalada: mamãe Maria Ighes do Carmo, papai João Garcia Tosta, manos Giceli do Carmo Tosta, Gislainni do C. T. Wieneke, João G. Tosta Junior, Daisy D. Tosta, José Alves Tosta Neto, Sandro Carvalho Tosta, sobrinhos Luiza, Phillip, Lucas e Antonio Paulo; cunhados(as), Sandra Ap. de Carvalho e Jair Simões;

À Rita de Cássia Pereira Costa, por me apoiar e cuidar de nosso filho com tanto amor;

Ao José Márcio, Roberto Gonçalves, Rodrigo Ritter e Paulo R. Gagliardi, por serem mais que meus amigos, meus irmãos;

Aos irmãos da Igreja Aliança do Paraíso, pelo amor e orações tão eficazes;

À Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - ESALQ/USP pela oportunidade de crescimento intelectual e humano;

Ao Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de São Carlos - UFSCar onde a parte experimental deste trabalho foi conduzida;

À Prof^a Silvana P. Meneghin, pela amizade e apoio imprescindível;

Aos amigos de convivência no LAMAM: Viviane S. Miranda, Guilherme T. Vancetto, Heloísa G. Brunetto, Kelly Fernandes, Márcia Rosa, Gláucia Malvestiti, Germano Bisson e Rafael Galbieri;

À prof^a Dr^a Dejanira de Franceschi de Angelis, pelas valiosas sugestões;

Aos professores das disciplinas do mestrado: André Alcarde, Cláudio Gallo, Ernani Porto, Marília Oeterrer, Marisa D`Arce, Marta Spoto, novamente Jorge Horii, Silene Sarmento e Solange Brazaca, pela transferência de conhecimento que tanto tem subsidiado minhas conquistas;

Aos professores do CCA/UFSCar: Alfredo Urashima, A. Bassinello, A. C. A. Gheller, Caetano Brugnaro, Carlito, Celso Gemente, Cláudio Lopes, Clóvis Parazzi, Davi Ruas, Hideto Arizono, Hermann Hoffmann, Jorge Lopes, José C. Casagrande, José C. Rolim, José Geanini, J. R. Araújo, Jozivaldo Moraes, Luciana, Marcos Sanches, Margarido, Marineide Aguilera, Norberto Lavorenti, Paulo Beskow, Rosélis, Sizuo Matsuoka, Solande Ribeiro e Yodiro Masuda pela transferência de conhecimento que tanto tem subsidiado minhas conquistas;

Aos companheiros de jornada Márcia Harada, Vanessa da Rosa, Cristiane Fenimam, Nilo, Juliana, Camila, Aelsom, José Giampan e demais amigos da vila da pós-graduação;

Aos técnicos Lúcia T. Picollo, Chitão e Renato Menegasso, pelo grande apoio;

À Eliana Garcia, Silvia Zinsly e Iara Ismael da biblioteca da ESALQ/USP, pela revisão da dissertação e às meninas da biblioteca do CCA/UFSCar, Sonia T. dos Reis, Gisele Ap. Zutin e M^a Lúcia Ziani C. Luz pelo carinho e prestatividade ímpar;

À Regina Lourenço, pelo apoio na secretaria da pós-graduação;

À Vânia M^a de Oliveira, pela amizade tão importante;

Aos amigos do PMGCA/UFSCar, Carlão, Claudinho, Cruz, Ciça, Daniela, Fernanda, José Ciofi, Gustavo, Luiza, Plínio, Rafaela, Regina, Regininha, Tiago e Varlene pelo apoio;

Aos colaboradores e amigos Irineu Paiva, Reginaldo Jacovetti, Raimundo, Edvaldo, Rosangela, Patelli, Ronaldo e Maria Rita Silva Costa;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPQ pela concessão da bolsa;

À FAPESP pela concessão do auxílio pesquisa (03/09417-0).

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	x
SUMMARY	xii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	5
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1 MATERIAL BIOLÓGICO	17
3.2 IDENTIFICAÇÃO SEGUNDO A TAXONOMIA CLÁSSICA	20
3.2.1 Formação de esporos sexuais	20
3.2.2 Assimilação de compostos de carbono	21
3.2.3 Assimilação de compostos de nitrogênio.....	22
3.2.4 Resistência ao actidione.....	22
3.2.5 Fermentação da glicose.....	23
3.2.6 Crescimento a 37°C.....	23
3.2.7 Formação de pseudomicelio	23
3.2.8 Produção de ácido	24
3.2.9 Teste do DBB (Diazonium Blue B Salt).....	24
3.3 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR.....	25
3.3.1 Obtenção de DNA genômico	25
3.3.2 PCR	28
3.3.3 RAPD.....	29
3.4 ATIVIDADE KILLER	31
3.5 MEIOS E SOLUÇÕES UTILIZADOS PARA CULTIVOS E ENSAIOS	33
3.5.1 MEIO MYPG PARA ATIVAÇÃO DAS LEVEDURAS	34
3.5.2 MEIO YEPD PARA MANUTENÇÃO DE LEVEDURAS	34
3.5.3 MEIO YEPD-AZUL DE METILENO PARA TESTES DE ATIVIDADE KILLER	34
3.5.4 MEIO GORODKOWA PARA ESPORULAÇÃO	34

3.5.5 MEIO YM UTILIZADO ESPORULAÇÃO	35
3.5.6 MEIO ACETATO PARA ESPORULAÇÃO	35
3.5.7 MEIO BASAL PARA FERMENTAÇÃO DE GLICOSE.....	35
3.5.8 MEIO CARBONATO DE CÁLCIO PARA TESTE DE PRODUÇÃO DE ÁCIDO	35
3.5.9 TAMPÃO TBE 10X PARA PREPARO DOS GÉIS DE AGAROSE.....	35
3.5.10 TRIS-HCL 1M PH 8.....	36
3.5.11 TAMPÃO TE (TRIS-EDTA) 10X	36
3.5.12 CLOROFANE.....	36
3.5.13 CIA	36
3.5.14 SDS 10%.....	36
3.5.15 RNASE.....	37
3.5.16 SOLUÇÃO DE AZUL DE METILENO	37
3.5.17 MEIO CORN MEAL AGAR.....	37
3.5.18 SOLUÇÃO DE VERDE-MALAQUITA 5%	37
3.5.19 SOLUÇÃO DE SAFRANINA 0,5%	37
3.5.20 MEIO YEAST NITROGEN BASE	37
3.5.21 MEIO YEAST CARBON BASE	37
3.5.22 SOLUÇÃO DE DBB.....	38
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1 IDENTIFICAÇÃO DAS LINHAGENS DE LEVEDURAS.....	39
4.1.1 Taxonomia clássica	39
4.1.2 PCR.....	47
4.2. ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DAS LINHAGENS DE LEVEDURAS.....	50
4.2.1 RAPD	50
4.2.2 Biotipagem através da sensibilidade às toxinas Killer	54
5 CONCLUSÕES	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

BIOTIPAGEM DE LEVEDURAS INDUSTRIAIS ATRAVÉS DO *SISTEMA KILLER*

Autor: CHRISTIANN DAVIS TOSTA

Orientador: Prof. Dr. JORGE HORII

RESUMO

O setor agropecuário responde atualmente por cerca de 9,2% do Produto interno bruto (PIB) brasileiro, sendo que a cana-de-açúcar ocupa cerca de 9% da área cultivada, fato que lhe confere especial relevância com relação ao desenvolvimento nacional. Os dois produtos mais importantes desta cultura são o açúcar e o álcool etílico produzido por fermentação com leveduras. Durante o processo de fermentação alcoólica, o fermento sofre inúmeras reciclagens e interferências externas advindas do caldo, do ambiente e de outras fontes, tornando-se vulnerável à contaminação por outros microrganismos e mesmo leveduras indesejáveis. Métodos de monitoramento microbiológico que possibilitem a discriminação das linhagens de forma rápida e inequívoca, além de baratos, são altamente desejáveis. A

utilização de meios diferenciais e seletivos, métodos bioquímicos e análise molecular tem se mostrado eficientes, porém são demorados e dispendiosos. A reação 'killer' é um fenômeno descoberto há 40 anos em *S. cerevisiae*, e resultados satisfatórios já foram obtidos na caracterização de leveduras, considerando-se o perfil de sensibilidade 'killer'. O padrão de sensibilidade às toxinas *killer* foi utilizado nesse projeto em leveduras industriais (isoladas de processo fermentativo para produção de etanol). Os dados gerados com os testes de sensibilidade às toxinas *Killer* geraram polimorfismos entre as linhagens, mesmo em nível intra-específico, validando a metodologia na biotipagem das leveduras. As informações obtidas subsidiam o desenvolvimento de uma metodologia de biotipagem aplicável para o monitoramento microbiológico na indústria sucro-alcooleira, com a seleção de nove leveduras *killer* contra as quais as leveduras industriais apresentaram um perfil característico de sensibilidade, dependendo do grupo ao qual pertencem (*S. cerevisiae* ou não *Saccharomyces*). Finalmente, vale citar que os testes foram corroborados pelos resultados obtidos com a taxonomia clássica e pelos métodos de biologia molecular com reações de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e RAPD (*Random Amplified Polimorphism DNA*).

BIOTYPING OF INDUSTRIAL YEASTS BY THE KILLER SISTEM

Author: CHRISTIANN DAVIS TOSTA

Adviser: Prof. Dr. JORGE HORII

SUMMARY

Agriculture is an important sector in the economy of Brazil. The sugar cane occupies 9% of the cultivated area in this country. The most important products from the sugar cane industry are sugar and alcohol, the latest produced by fermentative process by yeasts. During the fermentation the yeast population changes due to the interferences coming from the sugar cane juice or other sources, turning the process susceptible to undesirable contaminations. In this way, fast, reliable and cheap methods for microbiological monitoring can be helpful. Selective culture media, biochemical tests and molecular analyses have been used but they are time-consuming or expensive. The killer phenomenon discovered initially in *Saccharomyces cerevisiae* have shown interesting results to yeast

biotyping. The sensibility pattern to different killer toxins was used to make a "fingerprinting" and successfully separate different strains of yeasts. This method was corroborated by classical taxonomy and molecular biology results (PCR and RAPD-PCR). The results obtained gives support to development of a methodology useful on fermenting microbiologic monitoring with the selection of nine strains of killers yeasts with highly discrimination between industrial bakker yeasts and contaminants of the fermentation process.

1 INTRODUÇÃO

Segundo dados do IBGE, o setor agropecuário tem respondido por um percentual bastante significativo dentro do Produto Interno Bruto brasileiro (PIB), com uma participação de cerca de 9,2 % em 2003. Dentro do setor agropecuário a cana-de-açúcar detém participação também relevante, ocupando cerca de 9,5% da área cultivada no Brasil.

O Brasil, tradicional produtor de cana-de-açúcar, instituiu a partir de 1975 o Programa Nacional do Álcool (PROÁLCOL), na tentativa de superar ou ao menos atenuar os problemas advindos da crise mundial de combustíveis fósseis.

Antes do PROÁLCOL, a produção brasileira de etanol representava apenas uma parcela não muito significativa na industrialização da cana-de-açúcar, com 600 milhões de litros por safra obtidos por processos fermentativos.

Com o advento do PROÁLCOL, a capacidade de produção das indústrias evoluiu rapidamente, atingindo cerca de 12 bilhões de litros na safra 1985/86, em consequência do aumento da capacidade volumétrica e do número de unidades fermentativas. A partir de então, a produção de etanol praticamente permaneceu neste patamar, com produção de 12,6 bilhões de litros na safra 03/04 (UNICA, 2004).

Tradicionalmente, a fermentação alcoólica tem sido um processo conduzido em batelada no qual a formação do produto está diretamente relacionada ao crescimento do microrganismo agente. Esta interdependência entre crescimento e formação do produto levou Gaden (1959) a classificá-la como uma fermentação "com crescimento associado", apesar da existência dos sistemas de fermentação em fluxo contínuo.

Pelo sistema Mèlle-Boinot, a fermentação sempre se inicia com uma determinada concentração celular, multiplicando-se parcialmente, até atingir o denominado "número limite de Brown", sendo que a partir desta condição o açúcar é quase que totalmente convertido em álcool, em detrimento da via metabólica de transformação em biomassa (Lopes, 1985).

Conforme Valsechi & Oliveira (1968), as leveduras utilizadas nas destilarias para a produção de etanol podem ser classificadas em:

SELVAGENS - quando apresentam características fermentativas em níveis não muito favoráveis. Eventualmente linhagens adequadas podem ser obtidas quando um bom material é selecionado;

PRENSADAS - são leveduras selecionadas para a indústria de panificação, conseqüentemente, são facilmente obtidas em grandes quantidades no comércio. Embora muito utilizadas, não são específicas para a produção de etanol;

SELECIONADAS - são aquelas que preenchem em alto grau as características principais para a fermentação.

Segundo Jones et al., (1981), os microrganismos mais indicados para a produção de etanol através de açúcares são as leveduras dos gêneros *Saccharomyces* e *Kluyveromyces* e a bactéria *Zymomonas mobilis*. No gênero

Saccharomyces destacam-se as espécies *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces uvarum* (*S. carlsbergensis*).

Contudo, o interesse das indústrias de fermentação vai ao nível de linhagens, que diferem grandemente em suas qualidades como leveduras de fermentação e tem sido distinguidas por propriedades como tolerância ao álcool, resistência à autólise, termotolerância e floculação (Campbell, 1971).

Além disso, comprovou-se que leveduras de panificação ou mesmo linhagens selecionadas em laboratório supostamente adequadas à fermentação industrial, são na realidade inadequadas por não conseguirem se manter no processo fermentativo ao longo da safra, sendo substituídas por outras oriundas da biodiversidade ambiental, as quais passam a ser responsáveis pela fermentação nas destilarias (Basso et al., 1993).

Souza et al., (1993) também ressaltaram que a ocorrência de contaminações dos processos fermentativos por leveduras tem ocorrido com substancial relevância, sendo que tais linhagens contaminantes tem conseguido predominar no processo dentro de pouco tempo e que suas ocorrências tem sido registradas concomitantemente com a queda do rendimento industrial. Este fato vem ao encontro da intensificação das preocupações com a melhoria dos processos fermentativos realizados no Brasil. Foi isolada por Ceccato-Antonini & Parazzi (1996), uma linhagem contaminante de *Saccharomyces cerevisiae* responsável por uma queda de 18% na produção de etanol em uma destilaria, sendo isto o equivalente a uma redução de cerca de 17 milhões de litros de etanol em uma única safra.

Como esta ocorrência de contaminantes pode causar redução drástica do rendimento industrial, exige-se que se mantenha um constante

monitoramento da fermentação. Tal monitoramento pode ser realizado de várias maneiras, tais como, acompanhamento e observação da morfologia celular, isolamento em meios diferenciais, taxonomia clássica baseada em assimilação de diferentes fontes de carbono e nitrogênio e até a caracterização molecular do material genético, porém cada um destes métodos apresenta algum tipo de desvantagem, como por exemplo, onerosidade, necessidade de muito tempo para execução, inviabilidade técnica ou econômica ou a necessidade de mão-de-obra altamente especializada.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a biotipagem de leveduras industriais através do sistema *killer* com base no perfil de sensibilidade às toxinas *killer* das leveduras. Tal perfil foi criado e comparado com testes de taxonomia clássica e técnicas moleculares de identificação de microrganismos, visando atestar a confiabilidade do mesmo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Como já citado anteriormente, a fermentação alcoólica é realizada utilizando-se a levedura como agente de transformação. Leveduras são fungos unicelulares com reprodução vegetativa por brotamento ou fissão. Sua distribuição é bastante ampla podendo ser encontrada, por exemplo, em flores, folhas, frutos, solo, ar, lagos, rios, mares e até internamente em insetos e animais, (Phaff & Starmer, 1987).

A importância deste microrganismo remonta ao começo da história da humanidade, ou seja, cerca de 8.000 a.C., através da produção do pão, sendo caracterizado como alimento de grande importância para a maioria das culturas, além da relevância na elaboração de outros produtos tais como, álcool etílico, o vinho e a cerveja, (El-Dash et al., 1980).

Phaff et al., (1978) ressaltaram que as primeiras observações de leveduras foram realizadas por Antonie van Leeuwenhoek em 1680. Mais tarde, Pasteur demonstrou se tratavam de microrganismos com habilidades tanto respiratória como fermentativa. No início do século XX, Guilliermondi realizou estudos das relações sistemáticas criando chaves dicotômicas para identificação de leveduras. Diversos trabalhos foram elaborados neste sentido até os dias atuais, sendo os três últimos mais relevantes os desenvolvidos por Lodder (1970), Kreger van Rij (1984) e Barnett et al.,

(1990), trabalhos estes que envolvem uma série bem elaborada de testes bioquímicos de assimilação de diversos compostos, principalmente carboidratos, além de análise de características morfológicas e condições especiais de crescimento. Atualmente, com o advento da biologia molecular, existem muitos trabalhos de estudos filogenéticos envolvendo o estudo das características genéticas das leveduras, (James et al., 1997).

Segundo Oliveira & Pagnocca (1988), durante o processo de fermentação alcoólica para produção de etanol, no decorrer de uma safra o fermento sofre inúmeras reciclagens e interferências externas advindas do caldo, do próprio ambiente, além de outras fontes, tornando-se vulnerável à contaminação por outros microrganismos, inclusive leveduras indesejáveis, sendo necessário um constante monitoramento do processo. Os mesmos autores ressaltaram que existem diversos métodos utilizados no monitoramento, sendo que a utilização de meios de crescimento diferenciais e seletivos é bastante comum (Ceccato-Antonini & Silva, 2000), apesar de demorados e dispendiosos.

Degré et al., (1989) citaram que a combinação de métodos bioquímicos, perfil *killer*, perfil da eletroforese de proteínas, perfil de ácidos graxos voláteis e cariótipo eletroforético tem sido utilizados na identificação de leveduras com o intuito da utilização de técnicas mais distintivas, confiáveis e práticas. Basso et al., (1993) propuseram o monitoramento de linhagens através de cariotipagem do DNA cromossômico, comparando, assim, as características genéticas dos cromossomos das leveduras.

Diversos tem sido os trabalhos com utilização de técnicas de

biologia molecular nos estudos de microrganismos, inclusive leveduras. Dentre as técnicas utilizadas estão o RFLP (*Random fragment length polymorphism*) a PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e o RAPD-PCR (Random amplified polymorphism DNA).

Kurtzman (1994) apontou para a possibilidade da utilização do RFLP com leveduras dos gêneros *Candida* sp. e *Cryptococcus* sp., lembrando porém, que a utilização desta metodologia se mostrou suficiente para discernir espécies mas não para o nível de linhagem.

Resumidamente, a técnica do RFLP, ou seja, do polimorfismo no tamanho dos fragmentos de restrição, trata-se de uma metodologia que envolve a clivagem da molécula de DNA em inúmeros fragmentos, por enzimas de restrição. Tais fragmentos ao se hibridizarem com uma sonda específica através de *Southern blot*, pode gerar polimorfismo de bandas devido as diferenças existentes no material genético. Wightman & Meacock (2003) obtiveram resultados satisfatórios utilizando *Southern blot* com a sonda *THI5* na separação de espécies de *Kluyveromyces* sp. e *Saccharomyces* sp. Outra modalidade desta técnica envolve a utilização de enzimas de restrição em segmentos menores do DNA amplificados via PCR, obtendo-se assim polimorfismo oriundo da existência de diferentes locais com sítios de restrição da enzima e conseqüente divisão de um fragmento em outros, conforme resultados apresentados por Valente et al., (1996), Guillamón et al., (1998), Fernandez-Espinar et al., (2000) e Egli & Henick-Kling (2001).

O aperfeiçoamento da técnica molecular da PCR (*Polymerase Chain Reaction*) a tem tornado cada vez mais confiável e aplicável na

caracterização e identificação de leveduras.

A PCR ou *Reação da polimerase em cadeia* foi desenvolvida por Kary Mullis em meados da década de 80 possibilitando um verdadeiro salto científico na área da biologia molecular, dada a sua rapidez, versatilidade e sensibilidade, sendo que atualmente esta técnica possui, ainda, diversas derivações, como é o caso do Polimorfismo do DNA Amplificado ao Acaso ou RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), cuja metodologia trataremos mais adiante. A PCR consiste basicamente na amplificação de milhões de cópias de um trecho específico do DNA (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Esta técnica consiste basicamente na separação das cadeias ou desnaturação do DNA molde por elevação da temperatura, hibridização ou anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores (também chamados *primers*), com seqüências complementares e posterior síntese da cadeia complementar, sendo que estes passos são repetidos por várias vezes (cerca de 30 a 40) para que ocorra a amplificação em escala geométrica, ou seja, ao fim de 30 ciclos de amplificação obtém-se 536.870.912 cópias para cada molécula de DNA.

Para o desenvolvimento da técnica do PCR houve a necessidade da busca de uma enzima polimerase capaz de suportar os ciclos repetitivos de elevação da temperatura e para tanto se estudou as polimerases de microrganismos termófilos com habitat em fontes termais, chegando-se a algumas possibilidades, dentre elas a polimerase de *Thermus aquaticus*, de onde se obteve a então chamada Taq DNA Polimerase, amplamente utilizada nos laboratórios de biologia molecular no mundo (Rumjanek, 2001).

A técnica de RAPD é uma variação da PCR com algumas diferenças

peculiares, como por exemplo a utilização de *primers* únicos, de menor tamanho e sequência desconhecida. Por esse motivo a amplificação é denominada como parcialmente ao acaso, ou seja, o *primer* arbitrário dirige a síntese de setores do DNA em diversos pontos ao mesmo tempo, porém não se conhece exatamente a sequência amplificada, apesar da ocorrência de repetibilidade da intensidade e tamanho dos fragmentos dentro de uma mesma linhagem (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Gomes (1995), avaliando quatro métodos de caracterização de leveduras chegou a conclusão de que a técnica de RAPD se mostrou vantajosa sobre as demais, que envolviam a taxonomia por via clássica ou PCR, principalmente devido a sua menor complexidade e a utilização de poucos *primers*.

Os métodos de genética molecular tiveram um impacto muito grande na identificação e caracterização de leveduras comparados com os métodos tradicionais baseados nas características fenotípicas. Entre essas técnicas moleculares, aquelas baseadas na análise de polimorfismo do DNA que codifica os genes RNA ribossomais (5S, 5.8S, 18S e 26S) e as regiões não codificadoras IGS (*Internal intergenic spacer*) e ITS (*Internal transcribed spacers*), Figuras 01 e 02, são úteis para a detecção de muitas espécies de leveduras e fungos (Baleiras-Couto et al., 1996; Fernandez-Espinar et al., 2000). O interesse nessas técnicas vem do fato de que esses genes evoluíram mostrando um baixo polimorfismo intraespecífico e alta variabilidade interespecífica, possibilitando assim o agrupamento dentro de mesmos gêneros.

Atualmente a grande dificuldade na implantação do monitoramento

O sistema killer, seu significado e importância, já foi bem definido para algumas fermentações, como a do vinho, porém, porém para a produção do álcool combustível, seu papel ainda não é totalmente conhecido.

Ceccato-Antonini et al., (1999, 2004) constaram a atividade killer de numerosas leveduras isoladas do processo fermentativo industrial e selecionaram linhagens com alta atividade killer em condições de fermentação.

A abordagem da biotipagem de leveduras através do uso de toxinas *killer*, ou o perfil de sensibilidade às mesmas já foi apontado por outros pesquisadores (Buzzini & Martini, 2000a,b).

Em *S. cerevisiae*, o principal agente da fermentação etanólica, o fenômeno *killer* foi descoberto há cerca de 40 anos por Bevan & Makower, citado por Somers & Bevan (1969), o qual produz proteínas de baixo peso molecular que são letais às leveduras sensíveis. Há três tipos básicos de fenótipos: *Killer*, sensível e neutro. As linhagens *Killer* tanto produzem um fator *Killer* específico quanto resistem a esta toxina. As linhagens neutras são insensíveis a um ou mais fatores *Killer* e não produzem qualquer toxina. As linhagens sensíveis são totalmente suscetíveis à toxina *Killer*, a qual causa inibição da síntese de macromoléculas e rompimento celular, provocando a morte da célula devido a perda de ATP e íons K⁺. As toxinas produzidas pelas leveduras *Killer* são reconhecidamente sensíveis ao calor e a protease (Woods & Bevan, 1968). A produção das toxinas ocorre, segundo Wickner (1979), quase que exclusivamente na fase log, ou exponencial de crescimento das leveduras

Há um sistema de classificação para as leveduras *Killer* baseado na

interação entre as linhagens através de reatividade cruzada. Esta classificação foi proposta por Young & Yagiu (1978) onde as leveduras são separadas em grupos distintos, recebendo as nomenclaturas de K1 a K11, conforme o padrão de sensibilidade e atividade *killer*, por exemplo, as leveduras denominadas K1 recebem esta denominação porque matam as chamadas K2, K3 e K4. Já Zhu & Bussey (1989) apresentaram tal classificação incluindo uma outra classe, denominada K11 (Tabela 1).

Estudos de caracterização das diversas toxinas têm demonstrado a existência de diferenças significativas entre tais toxinas, por exemplo, com relação a massa molecular estimada em 20KDa para uma linhagem de *S. cerevisiae* (Goto et al., 1990), 100 KDa para *Kluyveromyces lactis* (Sugisaki et al., 1984), 36 KDa para *Candida* sp., (Yokomori et al., 1988), 18 KDa para *Hanseniaspora uvarum*, (Radler et al., 1990), 300 KDa pra *Hansenula anomala*, (Kagiyama et al., 1988), 4 e 8 KDa para *Pichia farinosa* (Suzuki & Nikkuni, 1994).

A toxina K1 possui massa molecular de 11,4 KDa (Palfree & Bussey, 1979). Estudo realizado por Zhu et al., (1987) evidenciou que a toxina K1 de *S. cerevisiae* possui histidina como aminoácido terminal na cadeia β e alanina na cadeia α .

Palfree & Bussey (1979) demonstraram a existência de uma linhagem de *S. cerevisiae* que produzia uma toxina de 11,5 KDa, estável quando tratada termicamente a 30°C. Esta linhagem recebeu a denominação de *superkiller*.

Tabela 1. Padrão de sensibilidade às toxinas utilizadas na classificação das leveduras *killer*¹

Classificação de padrão <i>killer</i>	Sensíveis
K1	K2, K3 e K4
K2	K1 e K4
K3	K1 e K4
K4	K1
K5	K1, K3 e K4
K6	K1, K2, K3 e K4
K7	K1, K3, K4 e K6
K8	K1, K2, K3, K4 e K6
K9	K1, K2, K3, K4, K5 e K8
K10	K1, K2, K3, K4, K5, K6, K7 e K8
K11	K1

¹ - adaptado de Soares (1998)

Pfeiffer & Radler (1982) e Radler et al., (1990) também demonstraram a existência da toxina de uma linhagem *superkiller* de *S. cerevisiae* com massa molecular de 16 KDa, distinta, portanto, da toxina K1. Ressaltaram, ainda, que esta toxina apresentou grande estabilidade térmica, mesmo após tratamento a 40° C por 1 hora e que o receptor desta toxina junto a parede celular é diferente das glucanas necessárias à toxina K1, fatores estes que corroboram a distinção desta toxina. Posteriormente

Schmitt & Radler (1989) comprovaram ser a manana o receptor desta nova toxina junto a parede celular.

Segundo Fleet (1985), a parede celular das leveduras é composta por alguns componentes principais, sendo eles β -1,3 e β -1,6 glucanas (48-60%), manose-proteínas (20-30%) e quitina (0,6-2,7%). Estudos realizados por Bussey (1972) evidenciaram que a atividade *killer* está relacionada diretamente com a presença dessas glucanas, fato este melhor esclarecido posteriormente em trabalho conjunto de Zhu e Bussey (1989), onde se comprovou a necessidade da presença de glucanas agindo como sítios de ligação específicos da toxina junto à parede celular. Evidenciaram, ainda, que a simples ligação da toxina junto à parede celular não é suficiente para a atividade *killer*.

Takita & Castilho-Valavicius (1993) concluíram que a ligação específica da toxina *killer* de *Kluyveromyces lactis* ocorre não com as β -1,3 e β -1,6 glucanas e sim com quitina.

Kurzweilová & Sigler (1995) demonstraram que após a ligação da toxina, uma série de reações em cadeia, envolvendo outras moléculas, levam à formação de um poro na membrana celular que acaba por ocasionar a perda de produtos citoplasmáticos, fato este também sugerido anteriormente por Peña et al., (1981) e Kagan (1983).

Como existe a necessidade de um receptor específico, os estudos foram direcionados para o isolamento dos genes codificantes desses receptores, e resultados obtidos por Roemer & Bussey (1991) demonstraram que a introdução de genes que sintetizam o receptor específico, no caso β -1,6 glucana, para a toxina *killer*, transformaram linhagens antes resistentes

em sensíveis.

Diversos trabalhos tem demonstrado a existência de diferenças quanto ao caráter genético envolvido na expressão da atividade *killer* para os diferentes grupos de leveduras.

Basicamente são conhecidas duas possibilidades para a expressão da atividade *killer*. Uma delas está relacionada exclusivamente a genes cromossomais, por exemplo, genes presentes nos cromossomos V e IX de algumas linhagens de *S. cerevisiae*, segundo Goto (1990). A outra possibilidade, de ocorrência mais freqüente, envolve a combinação tanto de genes cromossomais, como a de plasmídios citoplasmáticos, formados por fitas duplas de RNA ou dsRNA (*double strand RNA*) encapsulados, também denominados VLPs (*virus-like particles*), conforme Herring & Bevan (1974). Tais VLPs não são considerados vírus propriamente ditos por não possuírem caráter infeccioso e não serem transmitidos exclusivamente por via extracelular, segundo Hollings (1978).

Os dois tipos conhecidos de dsRNA responsáveis pela expressão do fator *killer*, segundo Wickner (1979), são denominados M-dsRNA (*smaller*) e L-dsRNA (*larger*) devido a diferença existente entre os seus tamanhos. Os L-dsRNA das linhagens K1, K2 e K3 possuem peso molecular $2,44 \times 10^6$, $2,54 \times 10^6$ e $2,5 \times 10^6$ e os M-dsRNA dessas linhagens $1,28 \times 10^6$, 1×10^6 e $0,87 \times 10^6$, respectivamente. Com relação ao número de bases nitrogenadas, Field (1982) determinou que o L-dsRNA é formado por 4,8 Kb e M-dsRNA por 1,9 Kb. O mesmo autor ressaltou que a manutenção do M-dsRNA depende de, no mínimo, 28 genes cromossomais denominados *mak*. Além destes genes *mak*, outros 3 genes cromossomais, denominados *kex* e

rex são também necessários para a expressão do fator *killer*. As linhagens denominadas *superkiller* possuem necessariamente os genes *ski1* e *ski4*, responsáveis pela codificação de uma toxina *killer* mais estável.

Segundo Bostian (1980), M-dsRNA é o plasmídio responsável pela codificação da toxina *killer* enquanto L-dsRNA codifica uma proteína responsável pela encapsulação, replicação e expressão também do plasmídio M-dsRNA.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material biológico

As 31 linhagens de leveduras utilizadas neste trabalho para os testes de sensibilidade foram obtidas, junto ao banco de leveduras do Departamento de Tecnologia Agroindustrial e Sócio-economia Rural (DTAISER) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Tais leveduras foram isoladas de ambientes ligados a cadeia de processamento da cana-de-açúcar, por exemplo, caldo de cana, fermento, melaço e dornas de fermentação, conforme Tabela 2.

Utilizou-se 29 linhagens produtoras de toxinas *killer* também obtidas do banco de leveduras acima referido, em trabalho realizado anteriormente (Ceccato-Antonini et al., dados não publicados), Tabela 3. A atividade *killer* de cada linhagem foi confirmada através de um teste contra as linhagens sensíveis *S. cerevisiae* NCYC 1006 e *Torulopsis glabrata* ATCC 15126, em meio YEPD-azul de metileno tamponado com citrato-fosfato, pH 4,5 a 4,7, a 22°C.

As linhagens foram preservadas em meio YEPD tanto em *slants* como em placas de Petri, sendo as culturas renovadas periodicamente.

Tabela 2. Linhagens de leveduras estudadas nos testes de sensibilidade e suas respectivas fontes e locais de isolamento

Sigla¹	Isolamento	Local de obtenção²
CCA005	Destilaria	Usina Delta
CCA006	desconhecida	desconhecido
CCA007	Fermentação de saké	desconhecida
CCA008	desconhecida	YGSC-EUA
CCA012	Fermentação	Usina Santa Lucia
CCA022	Vinho	Usina São Marino
CCA023	Vinho	Usina São Marino
CCA027	Vinho	Usina São Marino
CCA035	Vinho	Usina São Marino
CCA037	Vinho	Usina São Marino
CCA053	Vinho	Usina São Marino
CCA059	Água de diluição	Usina São Marino
CCA077	Fermento	Destilaria Álcoazul
CCA083	Fermento	Destilaria Álcoazul
CCA115	Espuma	Planalsucar
CCA151	Vinho	Usina São Marino
CCA155	Vinho	Usina São Marino
CCA181	Caldo	desconhecida
CCA209	Vinho	Usina Diamante
CCA373	Caldo	Usina Santa Lucia
CCA385	Vinho	Usina Diamante
CCA397	Fermento	Usina Santa Lucia
CCA447	Mosto	Usina Santa Lucia
CCA467	Mosto	Usina Santa Lucia
CCA471	Mosto	Usina Santa Lucia
CCA506	Vinho	Usina Santa Lucia
CCA540	Fermento	Usina São João
CCA567	Vinho	Usina São João
CCA593	Mosto	Usina São João
CCA610	Vinho	Usina São João
CCA612	Vinho	Usina São João

¹ - CCA é a sigla para Centro de Ciências Agrárias;

² - YGSC significa *Yeast Genetic Stock Cultures*.

Tabela 3. Linhagens de leveduras com atividade *killer* utilizadas nos testes de sensibilidade contra as linhagens da Tabela 2

Sigla	Isolamento ou Características	Obtenção ou código ¹	Identificação ²
CCA003	Padrão sensível	NCYC1006	<i>S. cerevisiae</i>
CCA004	Padrão K2	NCYC738	<i>S. cerevisiae</i>
CCA008	desconhecida	YGSC-EUA	<i>S. cerevisiae</i>
CCA015	Fermentação	KD1-Fermentec	<i>S. cerevisiae</i>
CCA039	Padrão K11	ATCC15126	<i>Torulopsis glabrata</i>
CCA118	Padrão K1	NCYC232	<i>S. cerevisiae</i>
CCA156	Padrão K7	NCYC327	<i>S. cerevisiae</i>
CCA176	desconhecida	desconhecido	<i>S. cerevisiae</i>
CCA194	Padrão K4	NCYC388/CCT2369	<i>S. cerevisiae</i>
CCA195	Padrão K6	NCYC587/CCT2834	<i>S. cerevisiae</i>
CCA199	Padrão K8	NCYC435/CCT4373	<i>S. cerevisiae</i>
CCA231	desconhecida	Planalsucar	nd
CCA369	Fermento	Usina Santa Lucia	nd
CCA372	Caldo	Usina Santa Lucia	nd
CCA377	Fermento	Usina Santa Lucia	nd
CCA416	Fermento	Usina Santa Lucia	nd
CCA417	Fermento	Usina Santa Lucia	nd
CCA418	Fermento	Usina Santa Lucia	nd
CCA432	Melaço	Usina Santa Lucia	nd
CCA437	Melaço	Usina Santa Lucia	nd
CCA452	Mosto	Usina Santa Lucia	nd
CCA499	Vinho	Usina Santa Lucia	nd
CCA510	Vinho	Usina Santa Lucia	nd
CCA511	Vinho	Usina Santa Lucia	nd
CCA514	Vinho	Usina Santa Lucia	nd
CCA542	Fermento	Usina São João	nd
CCA584	Mosto	Usina São João	nd
CCA623	Vinho	Usina São João	nd
CCA630	Vinho	Usina São João	nd
CCA666	Vinho	Usina São João	nd

¹ - ATCC - *American Type Culture Collection*; CCT - *Coleção de Culturas Tropical*; NCYC - *National Culture Yeast Collection*;

² - nd = não determinada

3.2 Identificação segundo a taxonomia clássica

As linhagens da Tabela 2 foram submetidas às técnicas clássicas de identificação de leveduras, com base em parâmetros citados por Kreger van Rij (1984), Barnett et al., (1990) e Prada & Castro (1995), como formação de pseudomicélio, formação de esporos sexuais, fermentação da glicose, assimilação de compostos de carbono, assimilação de compostos de nitrogênio, resistência ai actidione, crescimento a 37°C, teste do DBB (*Diazonium Blue B Salt*) e produção de ácido.

3.2.1 Formação de esporos sexuais

Os testes de formação de esporos sexuais foram realizados em três diferentes meios de cultura indutores, sendo eles o Gorodkova, o YM e o Acetato, conforme sugerido por Barnett et al., (1990).

Após a inoculação das linhagens, as placas foram incubadas a 25°C por 3 semanas, sendo o monitoramento da presença de esporos realizado semanalmente.

Para melhor visualização dos esporos, utilizou-se a coloração de esporos pelo método de Vartz, onde as células de leveduras foram fixadas em lâminas de vidro e coradas com solução de verde malaquita seguidas de aquecimento em bico de Bünsen por 60 segundos, lavagem em água corrente e coloração com solução de safranina por 30 segundos e nova lavagem em água corrente, conforme Castro (1995).

As linhagens foram então analisadas em microscópio com aumento entre 40 a 200 vezes sendo, então, fotodocumentadas em câmera digital.

3.2.2 Assimilação de compostos de carbono

Para os testes de assimilação das diferentes fontes de carbono foram preparadas soluções de metanol e etanol a 3% (v/v), d-rafinose a 10% (p/v), eritritol, sacarose, d-galactose, d-xilose, melezitose, l-arabinose, d-celobiose, d-manitol, melibiose, d-glicose, maltose, ácido láctico, ácido cítrico, l-ramnose, ácido succínico e inositol a 5% (p/v). estas soluções estoque foram esterilizadas por filtração em membrana de 0,22 μ m.

Para a montagem dos testes, adicionou-se 2 mL de água destilada estéril, 0,25 mL do meio *Yeast Nitrogen Base* e 0,25 mL da solução estoque a ser testada como fonte de carbono. Os tubos foram então inoculados com 50 μ L da suspensão de células com densidade 2 através de referência ao cartão de Wickerham, conforme procedimento adotado por Prada e Castro (1995).

O cartão de Wickerham é composto de 3 linhas pretas que servem de referência na estimativa da concentração celular da suspensão de células (Figura 3). A avaliação é feita de forma comparativa em uma escala de 0 a 3, onde zero significa poucas células, com linhas pretas totalmente visíveis; um significa densidade fraca, com linhas visíveis, porém embaçadas; dois é igual a densidade média, com linhas embaçadas e difusas e, finalmente, três significa densidade forte, onde não se pode ver as linhas pretas.

Os tubos inoculados foram levados para incubadora a 27°C por 21 dias, sendo considerados positivos os tubos que apresentaram densidade 2 ou 3, conforme avaliação com o cartão de Wickerham, ou seja, considerou-se que as leveduras que apresentaram densidade igual ou superior a 2 assimilaram o composto testado.

Figura 3 - Cartão de Wickerham. Escala de avaliação da concentração celular utilizada como inóculo nos testes de assimilação de fontes de carbono e nitrogênio, onde 0 = poucas células, 1 = densidade fraca, 2 = densidade média e 3 = densidade forte

3.2.3 Assimilação de compostos de nitrogênio

para os testes de assimilação das diferentes fontes de nitrogênio foram preparadas soluções de etilamina 0,64 % (v/v), lisina 0,56 % (p/v) e nitrato de potássio 0,78 % (p/v). estas soluções estoque foram esterilizadas por filtração em membrana de 0,22 μ m de porosidade.

Adicionou-se a tubos de ensaio, 2 mL de água destilada estéril, 0,25 mL do meio *Yeast Carbon Base* e 0,25 mL da solução estoque da fonte de carbono. Os tubos foram então inoculados com 50 μ L da suspensão de células com densidade 2 através do cartão de Wickerham, conforme Prada & Castro (1995), esquematizado na Figura 3.

3.2.4 Resistência ao actidione

Para a montagem dos testes, adicionou-se 2 mL de água destilada estéril, 0,25 mL de meio *Yeast Nitrogen Base*, 0,25 mL de meio *Yeast*

Carbon Base e 0,25 mL de solução 0,01% ou 0,1%, conforme o caso. Os tubos foram então inoculados com 50 µL da suspensão de células com densidade 2 através de referência ao cartão de Wickerham.

3.2.5 Fermentação da glicose

Para o teste de fermentação de glicose 2,0 mL de meio basal foram transferidos para tubos de ensaio com tubos de Durham invertidos, sendo então autoclavados a 120°C por 15 minutos.

O teste foi preparado adicionando-se ao tubo de ensaio, 1 mL de solução de glicose 6% esterilizada por filtração em membrana de 0,22 µm e inoculando-se 50 µL de suspensão de células com densidade 3, conforme cartão de Wickerham. Os tubos foram incubados a 28°C por 21 dias. A leitura foi realizada observando-se a formação de gás contido no tubo de Durham. Os tubos com formação de gás foram considerados positivos para a fermentação de glicose.

3.2.6 Crescimento a 37°C

Para o teste de crescimento a 37°C as linhagens foram inoculadas em meio MYPG e levadas a incubadora nesta temperatura por 48 horas.

3.2.7 Formação de pseudomicelio

Para o teste de formação de pseudomicélio, utilizou-se a técnica de microcultivo em lâminas com meio CMA - *Corn Meal Agar* (Difco). O aparato foi montado em placas de Petri contendo bastões em "V" e algodão com água destilada para manter a umidade no sistema, conforme Figura 4.

As lâminas foram recobertas com o CMA estéril e após a solidificação do meio, as linhagens foram inoculadas em 3 linhas paralelas e cobertas com uma lamínula estéril, conforme Prada & Castro (1995). As placas foram mantidas em incubadora a 25°C por 5 a 7 dias sendo então avaliadas ao microscópio estereoscópio com aumento de 40 vezes e fotografadas em câmera digital Sony PC-100.

Figura 4 - Microcultivo em lâmina com meio CMA para formação de pseudomicélio das leveduras

3.2.8 Produção de ácido

Para a avaliação da habilidade de produzir ácido, as linhagens foram inoculadas em tubos de ensaio contendo meio de cultura Carbonato de cálcio. Tal meio é caracteristicamente opaco, tornando-se translúcido devido a ação do ácido, caso a levedura o produza. Os tubos cujo meio de

cultura ficaram translúcidos foram considerados positivos. Criou-se uma escala de zero a quatro para a estimativa da produção quantitativa de ácido, onde 0 (zero) significou produção nula; 1 (um), produção fraca com uma fina camada translúcida; 2 (dois), produção mediana com cerca de metade do volume do meio translúcido; e 3 (três), produção forte com o volume total do meio translúcido.

3.2.9 Teste do DBB (Diazonium Blue B Salt)

As placas de Petri contendo as culturas com 3 semanas de incubação em meio MYPG a 28°C foram recobertas com a solução de DBB (recém preparada) e mantidas em temperatura ambiente por 2 minutos. As colônias das linhagens consideradas DBB positivas adquirem coloração avermelhada ou violeta e as colônias consideradas DBB negativas são as sem alteração de cor ou com coloração amarela, marrom e laranja (Prada & Castro, 1995).

Os resultados foram utilizados para a identificação das leveduras baseando-se nas chaves de Kreger van Rij (1984) e Barnett et al., (1990).

3.3 Caracterização molecular

3.3.1 Obtenção de DNA genômico

Para obtenção do DNA foi realizada uma adaptação do método executado por Gomes (1995). As linhagens foram incubadas sob agitação por 15 horas, a 30 °C, em 50 mL de meio YEPD líquido, sendo o material centrifugado a 4.000 G por 5 minutos em tubos falcon de 50 mL, e o sobrenadante descartado. A massa celular obtida foi transferida para um

almofariz previamente esterilizado onde foi adicionado aproximadamente 30 mL de nitrogênio líquido sendo o material macerado com o auxílio de um pistilo, também estéril. Tanto o almofariz como o pistilo foram mantidos em gelo para evitar a rápida evaporação do nitrogênio líquido pelo aquecimento.

No próprio almofariz foi adicionado 3 mL de tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8. Um volume de 1.200 μ L foram transferidos para dois tubos *ependorf* de 1,5 mL (600 μ L em cada) e adicionado de 75 μ L de solução SDS 10% mais 60 μ L de β -mercaptoetanol (Sigma), sendo os tubos agitados lentamente até que a solução ficar viscosa.

Para executar a desproteíntização do material, adicionou-se o mesmo volume (635 μ L) de clorofane aos tubos, os quais foram agitados lentamente por inversão durante 10 minutos e centrifugados a 12.000 G por mais 10 minutos.

Após a centrifugação a parte superior da solução foi transferida para novo tubo *ependorf* com o auxílio de uma micropipeta de 100 μ L, sendo a parte inferior descartada. Este procedimento foi repetido por três vezes sendo que na última, o clorofane foi substituído pela solução CIA.

Após a desproteíntização, executou-se a precipitação dos ácidos nucléicos adicionando-se 5% do volume de acetato de sódio 3M e o dobro do volume de etanol absoluto resfriado a -20 °C. Os tubos foram levados ao freezer também a -20 °C onde permaneceram por 10 minutos, sendo então submetidos à centrifugação de 12.000 G por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente evitando-se dispensar o *pellet* de ácidos nucléicos formado no fundo do tubo. Os tubos foram invertidos e deixados em temperatura ambiente para total evaporação do etanol remanescente.

O material foi então ressuspendido em 400 μL de tampão TE 1X. A este material foi adicionado 15 μL de solução de RNase (10 mg/mL) incubando-se a 37 °C por 1 hora, para degradação do RNA.

Adicionou-se aos tubos o dobro do volume da solução CIA, sendo os mesmos agitados lentamente por inversão durante 10 minutos e centrifugados a 12.000 G por mais 10 minutos. A porção superior foi então transferida para novo tubo *ependorf* com o auxílio de uma micropipeta de 100 μL .

Para nova separação dos ácidos nucléicos repetiu-se o procedimento citado anteriormente utilizando-se 5% do volume de acetato de sódio 3M e o dobro do volume de etanol absoluto resfriado a -20 °C. Os tubos foram levados ao freezer também a -20 °C onde permaneceram por 10 minutos para a precipitação do DNA (Figura 5), sendo então submetidos à centrifugação de 12.000 G por 5 minutos e lavados com cerca de 50 μL de etanol 70 % e invertidos para a evaporação do etanol. O DNA foi então ressuspendido em 50 μL de tampão TE 1X e congelado a -20 °C.

Figura 5 - Tubo *ependorf* contendo DNA precipitado pela adição do acetato de sódio e etanol

Para estimativa da presença, quantidade e integridade do DNA, 2 μ L de amostra foram submetidos ao processo de eletroforese em gel de agarose 0,8 % (p/v) em tampão TBE 1X, sendo o gel submetido a uma voltagem de 2,24 V/cm e corrente de 90 miliamperes por 3 horas (fonte EPS301 - Amersham biotech.). A estimativa de concentração foi realizada comparativamente com a espessura e intensidade das bandas dos marcadores moleculares *Dna λ /HindIII* ou marcador de 1 Kb (BioLabs). O gel foi corado então com solução de brometo de etídio 0,3 ng/mL sendo a visualização do DNA feita em transiluminador de UV. As imagens foram fotodocumentadas em câmera digital Sony PC-100.

3.3.2 PCR

As leveduras foram caracterizadas pela técnica PCR através da amplificação da região ITS (*Internal transcribed spacer*) do DNA, incluindo o gene 5.8S, utilizando-se os *primers* ITS1-(TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS4-(TCCTCCGCTTATTGATATGC) (Invitrogen), conforme protocolo de White et al., (1994).

A reação de amplificação foi feita num volume de 100 μ L, contendo 100 ng de DNA genômico, 1 μ M de cada *primer*, 1,25 U Taq DNA polimerase (Taq Gen), 350 μ M de cada dNTP, 2,25 mM de cloreto de magnésio, tampão da enzima Taq 1X e água mili-Q.

O termociclador modelo Primus 96 Plus (MWGAG Biotech) utilizado para a amplificação da região ITS com os *primers* ITS-1 e ITS-4 foi programado para um ciclo de desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguido de 45 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, hibridização a

56°C por 1 minuto e extensão a 68°C por 1 minuto, seguidos de 1 ciclo de extensão final a 68°C por 10 minutos.

Os produtos da PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v) dissolvida em tampão TBE 1X sendo o gel submetido a uma voltagem de 2,24 V/cm e corrente de 90 miliamperes, por 2 horas (fonte EPS301 - Amersham biotech.). O gel foi corado então com solução de brometo de etídio 0,3 ng/mL sendo a visualização do DNA feita em transiluminador de UV. As imagens foram fotodocumentadas em câmera digital Sony PC-100.

3.3.3 RAPD

Para obtenção do polimorfismo por RAPD foram utilizados os *primers* OPA11, OPB17, M13, 1283 e 24, cujas seqüências de nucleotídeos se encontram na Tabela 4.

Para a reação de amplificação com o *primer* OPA-11 utilizou-se 2 µL do tampão de reação 10X, 0,25 mM de cada DNTP, 1,5 U de Taq DNA polimerase, 2,5 mM de MgCl₂, 0,45 µM de *primer*, 5 ng de DNA genômico e Água milli-Q para volume final igual a 20 µL, Zucchi (2002).

Com o *primer* OPB-17 utilizou-se 0,025 M de Tris-HCl pH 8, 0,031 M de KCl 0,125 mM de cada DNTP, 4,7 mM de MgCl₂, 5 ng de DNA genômico e Água milli-Q para volume final igual a 20 µL Gomes (1995).

Para os *primers* M13, 1283 e 24 foram realizadas adaptações dos protocolos de reação e programas RAPD-PCR apontados por Baleiras-Couto et al., (1996) e Torriani et al., (1999).

Tabela 4. Sequências de nucleotídeos utilizados nos ensaio RAPD

<i>Primers</i>	<i>Seqüência de nucleotídeos</i>
M13	(5'-GAGGGTGGCGGTTCT)
OPA-11	(5'-CAATCGCCGT)
OPB-17	(5` AGGGAACGAG)
24	(5'-GCGTGACTTG).
1283	(5'-GCGATCCCCA)

Para o *primer* M13 utilizou-se 2 µL do tampão de reação 10X, 0,2 mM de cada DNTP, 0,5 U de Taq DNA polimerase, 4 mM de MgCl₂, 5 µM de *primer*, 5 ng de DNA genômico e água milli-Q para volume final igual a 20 µL.

Para o *primer* 1283 utilizou-se 2 µL do tampão de reação 10X, 0,25 mM de cada DNTP, 0,5 U de Taq DNA polimerase, 3 mM de MgCl₂, 0,8 µM de *primer*, 5 ng de DNA genômico e água milli-Q para volume final de 20 µL.

Para o *primer* 24 utilizou-se 2 µL do tampão de reação 10X, 0,25 mM de cada DNTP, 2 U de Taq DNA polimerase, 4 mM de MgCl₂, 5 µM de *primer*, 5 ng de DNA genômico e água milli-Q para volume final igual a 20 µL.

Para as reações de amplificação com os *primers* M13, 1283 e 24, o termociclador modelo Primus 96 Plus (MWGAG Biotech) foi programado para 45 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, hibridização a 37°C por 20 segundos e extensão a 72°C por 2 minutos, seguidos de 1 ciclo de extensão final a 72°C por 5 minutos.

Para o *primer* OPA-11, a condição foi a de 45 ciclos de desnaturação a 92°C por 1 minuto, hibridização a 37°C por 1 minuto e

extensão a 72°C por 2 minutos, seguidos de 1 ciclo de extensão final a 72°C por 3 minutos.

Os produtos amplificados via RAPD foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,2% (p/v) dissolvida em tampão TBE 1X sendo o gel submetido a uma voltagem de 1,9 V/cm e corrente de 80 miliamperes, por 5 horas (fonte EPS301 - Amersham biotech.). O gel foi corado então com solução de brometo de etídio 0,3 ng/mL sendo a visualização das bandas realizada em transiluminador de UV. As imagens foram fotodocumentadas em câmera digital Sony PC-100.

Com base no padrão de bandas obtido, criou-se uma matriz de dados binários, onde o número 1 (um) foi considerado como presença de banda e o 0 (zero) como a ausência da mesma. A matriz gerada foi analisada no *software* NTSYSpc 2.02i (Applied Biostatistics) gerando coeficientes de similaridade baseados no índice SM (*Simple Matching*). Tais valores foram agrupados através do método UPGMA (*Unweighted pair group with arithmetic average*) possibilitando a criação de dendrogramas gráficos, utilizados na interpretação dos resultados.

3.4 Atividade *killer*

As 31 leveduras industriais estudadas neste trabalho foram avaliadas quanto a sensibilidade às toxinas *killer* produzidas por 29 linhagens com a finalidade de se obter o perfil *killer*.

Os testes de sensibilidade foram realizados em meio YEPD-azul de metileno, de forma que as linhagens de referência *killer* foram inoculadas em pontos em uma placa-mestre com o auxílio de um aparato multi-

inoculador adaptado (Figura 6), para a realização dos testes através de *replica plating*. Após a inoculação das leveduras *killer*, a suspensão de células da linhagem testada (aproximadamente 10^5 células/mL) foi inoculada através de pulverização, sendo as placas levadas para incubadora a 22°C por 48 horas. Os testes foram realizados em triplicata.

A sensibilidade foi evidenciada pela presença de um halo de inibição no crescimento ao redor da colônia da levedura *killer*, assim como pela formação de um círculo azul, formado por células mortas coradas pelo azul de metileno (Figura 7), ou seja, as linhagens que sofreram inibição do crescimento pela toxina foram consideradas positivas para a sensibilidade à mesma, mesmo que os halos tenham sido pequenos. Em caso de discrepância nos resultados das triplicatas, para cada levedura foram considerados os resultados com maior ocorrência.

Os resultados obtidos possibilitaram a criação de uma matriz de dados binários (31x29), onde o número 1 (um) foi considerado como sensibilidade à toxina killer e o 0 (zero) como a ausência de sensibilidade. Foi utilizado o software NTSYSpc 2.02i (Applied Biostatistics) gerando coeficientes de similaridade baseados no índice SM (Simple Matching). Tais valores foram agrupados através do método UPGMA (Unweighted pair group with arithmetic average), possibilitando a criação de dendrogramas gráficos utilizados na interpretação dos resultados.

Figura 6 - Aspecto do multi-inoculador adaptado (1) para realização de *replica plating* através da placa-mestre (2)

Figura 7 - Resultado positivo para a sensibilidade à toxina *killer*. A levedura testada sofreu inibição (presença do halo) e morte, (círculo azul) devido a produção de toxina pela linhagem *killer* ao centro

3.5 Meios e soluções utilizados para cultivos e ensaios

Os meios de cultura e soluções foram submetidos a processos que garantiram a assepsia do processo, sendo autoclavados a 120°C, por 15 minutos, ou filtrados em membranas de 0,22 μm de porosidade.

3.5.1 Meio MYPG para ativação das leveduras

Composto de 0,3% de extrato de malte (p/v), 0,3% de extrato de levedura (p/v), 0,8% de peptona (p/v), 1,0% de glicose (p/v) e 2% de agar (p/v) dissolvidos em água destilada.

3.5.2 Meio YEPD para manutenção de leveduras

Composto de 1% de extrato de levedura (p/v), 2% de peptona (p/v), 2% de glicose (p/v) e 2% de agar (p/v) dissolvidos em água destilada.

3.5.3 Meio YEPD-azul de metileno para testes de atividade *killer*

Tamponou-se uma solução de ácido cítrico 2 % (p/v) com solução de fosfato hidrogenado de potássio (K_2HPO_4) 7% (p/v) até pH 4,3. Adicionou-se 10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona e 20 g/L de glicose. Calculou-se um volume de água destilada igual a 2 % do volume total obtido para dissolver 20 g/L de ágar, o qual foi autoclavado. Após a autoclavagem a solução de nutrientes tamponada foi misturada com o ágar ainda quente e adicionou-se 2 mL/L de solução de azul de metileno. O pH permaneceu entre 4,5 e 4,7.

3.5.4 Meio Gorodkova para esporulação

Composto de 0,1% de d-glicose (p/v), 1% de peptona (p/v), 0,5% de cloreto de sódio (p/v), e 2% de ágar (p/v), dissolvidos em água destilada (Barnett et al., 1990).

3.5.5 Meio YM utilizado esporulação

Composto de 0,3% de extrato de malte (p/v), 0,3% de extrato de levedura (p/v), 0,5% de peptona, 1% de d-glicose (p/v) e 2% de ágar (p/v), dissolvidos em água destilada (Barnett et al., 1990).

3.5.6 Meio Acetato para esporulação

Composto de acetato de sódio 0,4% (p/v) dissolvido em água destilada, pH ajustado entre 6,5-7,0 e adicionado de 1,5% de ágar (p/v), dissolvidos em água destilada (Barnett et al., 1990).

3.5.7 Meio Basal para fermentação de glicose

Composto de extrato de levedura 0,45% (p/v) e peptona 0,75% (p/v). Os reagentes foram dissolvidos em água destilada acrescentando-se o corante azul de bromotimol até coloração verde-garrafa (Prada & Castro, 1995).

3.5.8 Meio carbonato de cálcio para teste de produção de ácido

Dissolveu-se em água destilada extrato de levedura 0,5% (p/v), carbonato de cálcio 0,5% (p/v), glicose 5% (p/v) e ágar 2% (p/v) (Kreger van Rij, 1984).

3.5.9 Tampão TBE 10X para preparo dos géis de agarose

Dissolveu-se 108 g de Trizma base e 55g de ácido bórico em 400 mL de EDTA 0,5M pH 8,0, sendo o volume completado para 1000mL com água milli-Q e submetido à autoclavagem.

3.5.10 Tris-HCl 1M pH 8

Dissolveu-se 121,10 g de Trizma-base em 800 ml de água milli-Q, ajustando-se o pH para 8,0 com HCl e completando-se o volume para 1000 mL com água milli-Q. Para concentrações menores diluiu-se convenientemente em água milli-Q estéril.

3.5.11 Tampão TE (Tris-EDTA) 10X

Este tampão foi preparado misturando-se 10 mL de Tris-HCl 1M pH 7,5 com 2 mL de EDTA 0,5M, completando-se o volume com água milli-Q para 1000 mL.

3.5.12 Clorofane

Solução obtida da mistura de fenol saturado (Sambrook, 2001), clorofórmio e álcool isoamílico na proporção de 25:24:1, respectivamente.

3.5.13 CIA

Solução obtida da mistura de clorofórmio e álcool isoamílico na proporção de 24:1, respectivamente

3.5.14 SDS 10%

Pesou-se 10 g de SDS e dissolveu-se em 80 mL de água milli-Q aquecida. Após resfriamento completou-se o volume para 100 mL. Esta solução não foi esterilizada.

3.5.15 RNase

Esta solução foi preparada misturando-se 10 mg/mL de RNase pancreática (RNase A) em solução de Tris-HCl pH 7,5 e NaCl 15 mM. A solução foi aquecida a 98°C por 15 minutos e estocada a -20°C.

3.5.16 Solução de azul de metileno

Para o preparo desta solução dissolveu-se 1,5 g do corante azul de metileno em 100 mL de água destilada estéril.

3.5.17 Meio *Corn Meal Agar*

Dissolveu-se 1,7 g de meio *Corn Meal Agar* (Difco) em 80 mL de água destilada aquecida, completando-se o volume para 100 mL.

3.5.18 Solução de verde-malaquita 5%

Dissolveu-se 5 g de corante verde-malaquita em 50 mL de água destilada completando-se o volume para 100 mL.

3.5.19 Solução de safranina 0,5%

Dissolveu-se 0,5 g de safranina em 50 mL de água destilada completando-se o volume para 100 mL.

3.5.20 Meio *Yeast Nitrogen Base*

Dissolveu-se 6,7 g de *Yeast Nitrogen Base* - YNB (Difco) em 60 mL de água destilada completando-se o volume para 100 mL.

3.5.21 Meio *Yeast Carbon Base*

Dissolveu-se 11,7 g de *Yeast Carbon Base* - YCB (Difco) em 60 mL

de água destilada completando-se o volume para 100 mL.

3.5.22 Solução de DBB

Foram misturados 15 mg de DBB ou o-dianisidine tetrazotized (Sigma) em 15 mL de solução tampão Tris 0,25 M pH 7,0 em tubo de ensaio imerso em gelo e água. A solução deve ser utilizada imediatamente após o preparo.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Identificação das linhagens de leveduras

As 31 linhagens de leveduras foram identificadas utilizando os testes de taxonomia clássica e de caracterização molecular por PCR.

4.1.1 Taxonomia clássica

Os resultados de fermentação da glicose, assimilação de diferentes fontes de carbono e nitrogênio, teste do DBB, avaliação de resistência ao actidione (ou cicloheximida) e crescimento a 37°C utilizados na taxonomia clássica, se encontram nas Tabelas 5 e 6.

Quanto à fermentação da glicose, somente a linhagem CCA567 foi negativa (Tabela 6). Nenhuma das leveduras assimilou eritritol e ácido láctico como fontes de carbono ao passo que todas assimilaram glicose. Para outras fontes, houve respostas variadas de acordo com a linhagem (Tabela 5).

Os testes de assimilação negativos para nitrato, etilamina e lisina e de resistência ao actidione 0,01% e 0,1% (Tabelas 5 e 6) foram importantes para caracterizar leveduras do gênero *Saccharomyces*, enquanto os resultados de forte produção de ácido e assimilação positiva para nitrato apontaram para os gêneros *Dekkera/Brettanomyces*, conforme Kreger van Rij (1984) e Barnett et al., (1990).

O chamado teste do DBB (Figura 8) é uma avaliação bastante útil especialmente no agrupamento de leveduras basidiomicéticas, que são DBB positivas. Segundo Van der Walt & Hopser-Haire citado por Hagler & Mendonça-Hagler (1991) o agrupamento de leveduras por este teste é possível devido a diferença existente na degradação de cetonas e do triptofano associadas à parede celular das leveduras. Nenhuma das leveduras testadas apresentou reação positiva ao DBB.

Figura 8 - Teste do DBB. As linhagens CCA 181, 506 e 567 são DBB negativas, enquanto a CCA379 é DBB positiva (utilizada como controle positivo)

Tabela 5. Resultados dos testes de assimilação de fontes de carbono e nitrogênio, utilizados na taxonomia clássica¹

Linhagem	Carbono																	Nitrogênio			
	Eritritol	Sacarose	Rafinose	Galactose	Xilose	Melezitose	Arabinose	Celobiose	Manitol	Melibiose	Glicose	Etanol	Maltose	Ac. Lactico	Ac. Citrico	Ramnose	Ac. Succínico	Inositol	Lisina	Etilamina	Nitrato
005	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-
006	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-
007	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
008	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
012	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-
022	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	nd	-
023	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
027	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	nd	-
035	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	nd	-
037	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
053	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+
059	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
077	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
083	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
115	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-
151	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
155	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
181	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-
209	-		+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
373	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-
385	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
397	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
447	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-
467	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+
471	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-
506	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-
540	-	+	-	+	nd	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-
567	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-
593	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-
610	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-
612	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-

¹ - (+) = positivo; (-) = negativo e (nd) = não determinado;

Avaliou-se também a produção, morfologia e número de esporos sexuais (Tabela 6). Foram utilizados três meios indutores de esporulação (Gorodkowa, YM e Acetato) e para algumas leveduras a coloração dos esporos pelo método de Vartz, para melhor visualização (Figura 9).

A Figura 9 mostra os esporos redondos característicos de *S. cerevisiae* em número de 2 a 4 por asco, enquanto a Figura 10 mostra os esporos de outros gêneros.

A formação de pseudomicélio foi avaliada pelo teste de microcultivo em meio CMA e os resultados obtidos encontram-se na Tabela 6 e Figura 11.

Com base nos resultados obtidos e utilizando as chaves dicotômicas de Kreger van Rij (1984) e Barnett et al., (1990) procedeu-se a identificação das linhagens, as quais encontram-se na Tabela 7.

Tabela 6. Resultados de outros testes utilizados na taxonomia clássica¹

Linhagem	Produção de esporos	Produção de pseudomicélio	Cresc. em actidione 0,01%	Cresc. em Actidione 0,1 %	Cresc. 37°C	DBB	Fermentação da Glicose	Prod. de ácido ²
005	+	-	-	-	+	-	+	2
006	+	+	+	+	+	-	+	2
007	+	+	-	-	+	-	+	0
008	+	+	-	-	+	-	+	2
012	+	+	+	-	+	-	+	2
022	-	+	-	-	+	-	+	1
023	+	+	-	-	+	-	+	2
027	-	+	-	-	+	-	+	1
035	+	-	-	-	+	-	+	2
037	-	-	-	-	+	-	+	0
053	+	+	+	-	+	nd	+	3
059	+	+	+	+	+	-	+	3
077	+	+	+	+	+	-	+	3
083	-	+	-	-	+	-	+	1
115	+	+	+	+	+	-	+	2
151	+	+	-	-	+	-	+	1
155	+	-	+	+	-	-	+	3
181	-	+	+	+	+	-	+	1
209	+	nd	-	-	+	-	+	2
373	+	+	-	-	+	-	+	1
385	+	+	-	-	+	-	+	1
397	+	+	-	-	+	-	+	0
447	+	+	+	+	+	-	+	2
467	+	-	+	+	+	-	+	2
471	+	+	+	+	+	-	+	0
506	+	nd	+	+	+	-	+	1
540	+	+	+	-	+	-	+	1
567	+	nd	+	-	+	-	-	1
593	+	+	+	+	+	-	+	1
610	-	+	+	+	+	-	+	1
612	-	+	+	+	+	-	+	0

¹ - (+) = positivo; (-) = negativo e (nd) = não determinado;

² - gradiente de intensidade: (0) = nula, (1) = fraca, (2) = média e (3) = forte.

Figura 9 - Formação de esporos sexuais em meio Acetato-água de linhagens de *S. cerevisiae*. A seta na linhagem CCA008 indica um asco contendo os esporos (tétrades) característicos de *S. cerevisiae*. A linhagem CCA022, não apresentou esporos por ser haplóide

Figura 10 - Formação de esporos sexuais em meio Acetato-água. As quatro linhagens de cima foram coradas pelo método de Vartz

Figura 11 - Formação de pseudomicélio em meio CMA. Características de alguns tipos de pseudomicélios apresentados pelas leveduras, com exceção da CCA037, que não apresentou essas estruturas

Tabela 7. Identificação das espécies de leveduras, baseada em Kreger van Rij (1984) e Barnett et al., (1990)

Sigla	Identificação
CCA005	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
CCA006	<i>Debaryomyces hansenii</i>
CCA007	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
CCA008	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
CCA012	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
CCA022	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
CCA023	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
CCA027	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
CCA035	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
CCA037	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
CCA053	<i>Dekkera intermedia</i>
CCA059	<i>Dekkera intermedia</i>
CCA077	<i>Dekkera intermedia</i>
CCA083	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
CCA115	<i>Pachytichospora transvaalensis</i>
CCA151	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
CCA155	<i>Dekkera intermedia</i>
CCA181	<i>Candida steatolytica</i>
CCA209	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
CCA373	<i>Pichia segobiensis</i>
CCA385	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
CCA397	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
CCA447	<i>Lodderomyces elongisporus</i>
CCA467	<i>Citeromyces matritensis</i>
CCA471	<i>Lodderomyces elongisporus</i>
CCA506	<i>Debaryomyces castelii</i>
CCA540	<i>Candida steatolytica</i>
CCA567	<i>Pichia</i> sp
CCA593	<i>Lodderomyces elongisporus</i>
CCA610	<i>Pichia etchellsii</i>
CCA612.	<i>Pichia etchellsii</i>

A identificação das leveduras foi facilitada e confirmada pelos dados obtidos com a amplificação da região ITS do DNA ribossomal, cujo tamanho é característico das espécies de leveduras. Os resultados são apontados a seguir.

4.1.2 PCR

A metodologia empregada para extração do DNA genômico mostrou-se eficiente para as linhagens, conforme observou-se na Figura 11, após eletroforese de 2 μ L da amostra em gel de agarose 0,8 % (p/v) e visualização sob luz ultravioleta após tratamento com brometo de etídio. O DNA das linhagens apresentou-se íntegro e sem contaminação (Figura 12).

Figura 12 - DNA genômico em gel de agarose. A quantificação de DNA das linhagens CCA 022, 023 e 037 foi realizada comparando-se a intensidade e espessura da banda com as bandas dos marcadores moleculares (primeiro e último poços)

Através da PCR, analisando-se o tamanho do segmento amplificado (região ITS) foi possível distinguir as linhagens dentro dos grupos de *Saccharomyces* sp. e não *Saccharomyces* sp., ou seja, os resultados obtidos nos testes de amplificação da região ITS subsidiaram a diferenciação dentre as espécies conforme mostram as Figuras 13 e 14 e a estimativa do tamanho dos fragmentos amplificados, conforme Tabela 8.

Figura 13 - Eletroforese dos segmentos amplificados da região ITS para as leveduras do gênero *Saccharomyces cerevisiae*, onde nota-se a presença de bandas de tamanho próximo a 850 bp

Figura 14 - Eletroforese dos segmentos amplificados da região ITS, para as leveduras não *Saccharomyces*, onde nota-se a presença de bandas de tamanho próximo a 500 bp

Tabela 8. Tamanho dos fragmentos amplificados via PCR pelos *primers* ITS1 e ITS4

Linhagem	Tamanho do fragmento (em pares de bases)
CCA005	850
CCA007	850
CCA008	850
CCA012	850
CCA022	850
CCA023	850
CCA027	850
CCA035	850
CCA037	850
CCA053	480
CCA059	480
CCA077	480
CCA083	850
CCA115	490
CCA151	850
CCA181	490
CCA209	850
CCA373	490
CCA385	850
CCA397	850
CCA447	490
CCA467	490
CCA471	490
CCA506	490
CCA540	500
CCA567	510
CCA593	510
CCA610	510
CCA612	510

Apenas para as linhagens CCA006 e CCA155 não se obteve sucesso na amplificação dos fragmentos mesmo após várias tentativas e variações do método, fato este que não comprometeu a identificação dessas linhagens, dado o número de resultados obtidos nas outras técnicas de identificação.

Egli & Henick-Kling (2001) obtiveram amplificação de fragmentos da mesma região do DNA com tamanho entre 450 e 550 bp para leveduras do gênero *Brettanomyces* sp, enquanto para *Candida* sp, *Pichia* sp e *Saccharomyces cerevisiae* o tamanho dos fragmentos variaram entre 600 e 900 bp. Valente et al., (1996), Guillamón et al., (1998), e Fernández-Espinar et al., (2000) obtiveram fragmentos, também da região ITS do DNA, com o tamanho de cerca de 850 bp para espécies *Saccharomyces cerevisiae*, fatos que validam os resultados obtidos neste trabalho por estarem condizentes com os obtidos por outros pesquisadores.

4.2. Análise de polimorfismos das linhagens de leveduras

4.2.1 RAPD

Uma das técnicas desenvolvidas e baseadas nos padrões na tecnologia da PCR é a análise RAPD. Nesse ensaio, os padrões são gerados pela amplificação de segmentos de DNA ao acaso com *primers* únicos, pequenos (10 bases), de seqüência arbitrária de nucleotídeos e subsequente eletroforese do DNA em gel de agarose (Williams et al., 1990). Este método permite discriminação ao nível de espécie, mas pequenas diferenças nos padrões de linhagens diferentes pertencentes à mesma espécie podem ocorrer, indicando ser também possível discriminar ao nível de subespécie. Segundo van der Vossen & Hofstra (1996), mais importante do que a escolha

do *primer*, uma vez que a sequência é arbitrária, é o número de bandas geradas no ensaio RAPD com o dado *primer* pois nem todos os de sequência de 10 bases são necessariamente úteis no ensaio.

Foram testados cinco *primers* de sequências arbitrárias (OPA11, OPB17, M13, 1283 e 24) nas condições referidas anteriormente (item 3.3.3) e somente com o *primer* OPA11 é que se obteve amplificação para quase todas as linhagens, permitindo a detecção de polimorfismos. Com os demais *primers* não se obteve resultados satisfatórios quanto ao número de bandas polimórficas, e a amplificação dos segmentos ao acaso restringiu-se a poucas linhagens, apesar de outros autores terem obtido bons resultados com outras linhagens e a utilização dos *primers* OPB17, 24, M13 e 1283 (Gomes 1995; Baleiras-Couto et al., 1996 e Torriani et al., 1999, respectivamente).

A Figura 15 mostra os padrões RAPD para as linhagens *S. cerevisiae*.

Figura 15 - Padrões RAPD de linhagens *S. cerevisiae* gerados com o *primer* OPA11. Os números acima dos poços referem-se às linhagens de leveduras. O primeiro e o segundo poços referem-se aos marcadores moleculares de 1 Kb e 100 bp, respectivamente

Figura 16 mostra os padrões para as linhagens não *Saccharomyces* sp gerados com o *primer* OPA11.

Figura 16 - Padrões RAPD de linhagens não *Saccharomyces* gerados com o *primer* OPA11. Os números acima se referem às linhagens de leveduras. 1 Kb e 100 bp referem-se aos marcadores moleculares. As linhagens assinaladas com asteriscos são *S. cerevisiae*, colocadas no gel para efeito de comparação

As linhagens CCA 467 e 593 não apresentaram qualquer banda enquanto a CCA471 apresentou uma única banda (Figura 16). Outras condições de ensaio RAPD foram testadas para essas linhagens com o mesmo *primer* (OPA11) e não foram obtidas bandas polimórficas, na verdade somente a amplificação de duas bandas de baixo peso molecular (abaixo de 1 Kb).

Com os dados acima obtidos, num total de 42 bandas polimórficas, foi gerada uma matriz de dados binários (42X31), os coeficientes de similaridade do índice SM, agrupados através do método UPGMA, e o dendrograma esquemático, conforme Figura 17.

Figura 17 - Dendrograma gerado com o método UPGMA baseado no índice SM utilizando os dados obtidos por RAPD com o *primer* OPA-11

No dendrograma da Figura 17, observou-se três grupos predominantes de leveduras, o primeiro formado por 14 linhagens de *S. cerevisiae*, mostrando nível de similaridade de cerca de 76 % com o segundo grupo, o qual refere-se às não *Saccharomyces* sp., com exceção das CCA 610 e 612, que formaram o terceiro grupo com nível de similaridade de 71% com os outros dois agrupamentos. Considerou-se satisfatório o nível de discriminação obtido com o ensaio RAPD e *primer* OPA11, até mesmo em nível intraespecífico.

4.2.2 Biotipagem através da sensibilidade às toxinas *Killer*

Após o período de incubação foi realizada a avaliação dos resultados para a sensibilidade das leveduras testadas.

A sensibilidade foi evidenciada pela presença de um halo de inibição no crescimento ao redor da colônia da levedura *killer*, assim como pela formação de um círculo azul, formado por células mortas coradas pelo azul de metileno, ou seja, as linhagens que sofreram inibição do crescimento pela toxina foram consideradas positivas para a sensibilidade à mesma.

A Figura 18 ilustra a característica das placas de Petri onde os testes foram realizados, exemplificando os resultados obtidos para as linhagens CCA151 e CCA209 (ambas *Saccharomyces cerevisiae*), onde é notável a diferença quanto aos resultados e conseqüente obtenção de polimorfismo.

Estudos já demonstraram que o caráter *killer* em leveduras é um fator altamente polimórfico, sendo confirmada a existência de numerosos fenótipos com grande variabilidade dentre diferentes linhagens da mesma

espécie e isso oferece um quadro bastante elaborado para as relações de sensibilidade às toxinas *killer* (Martini, 1983; Polonelli et al., 1983; Vaughan-Martini et al., 1988; Vaughan-Martini et al., 1996 e Young, 1987).

Figura 18 - Placas de teste *Killer*. Nota-se diferenças com relação a sensibilidade às toxinas para as linhagens CCA209 e CCA151 (ambas *Saccharomyces cerevisiae*), através das zonas de inibição e presença do halo azul formado por células mortas)

O dendrograma da Figura 19 trata-se da análise de polimorfismo pelo índice SM do método UPGMA, obtido com os resultados dos testes de sensibilidade às toxinas *killer*.

Figura 19 - Dendrograma gerado com o método UPGMA baseado no índice SM, utilizando os dados de sensibilidade às 29 linhagens de leveduras *killer*

Com exceção das linhagens CCA027, CCA083 e CCA209 as demais *S. cerevisiae* foram incluídas em um único grupo, que apresentou cerca de 65 % de similaridade com o segundo grupo onde foram incluídas as demais espécies. O terceiro grupo constituiu-se da linhagem CCA083 e de uma linhagem de *Debaryomyces hansenii* CCA006, com similaridade de cerca de 63% com os outros dois grupos.

As linhagens CCA027, CCA083 e CCA209 apresentaram alguns resultados discrepantes com relação ao demonstrado pelas demais *S. cerevisiae*, o que levou ao agrupamento destas linhagens com os outros gêneros e espécies, porém, como veremos mais adiante, uma análise mais detalhada, com a utilização de um grupo restrito de leveduras *killer* com maior potencial distintivo entre os grupos, foi suficiente para contornar esta dificuldade.

A linhagem CCA027 permaneceu no grupo formado pelas quatro linhagens de *Dekkera* sp (CCA 053, 059, 077 e 155).

Analisando o grupo 1 formado por linhagens de *S. cerevisiae*, observou-se a formação de 4 subgrupos. Um deles, constituído exclusivamente pela linhagem CCA007, apresentou similaridade de cerca de 70 % com os outros grupos. É interessante observar que essa levedura é uma, dentre duas *S. cerevisiae*, não isolada de uma destilaria e sim do processo fermentativo para produção do Saké. A outra levedura (CCA008), isolada de fonte desconhecida, formou um grupo com a linhagem CCA023, esta isolada da destilaria São Marino.

Segundo Vaughan-Martini et al., (1988) e Vaughan-Martini & Rosini (1989), a possível ultraespecificidade do fenômeno *killer* pode estar

relacionada à origem ambiental das linhagens, em outras palavras, somente leveduras ecologicamente relacionadas poderiam exibir padrões de sensibilidade *killer* comparáveis. Se assim fosse a maioria das linhagens aqui testadas deveriam exibir um padrão de sensibilidade similar, não discriminatório. No entanto, pelos resultados obtidos, o padrão de sensibilidade *killer* permitiu a discriminação entre grupos de leveduras taxonomicamente diferentes e, além disso, os dados aqui obtidos para o grupo de *S. cerevisiae* mostraram uma aparente correlação entre padrão de sensibilidade *killer* e origem dos biótipos, pela maior diferença no padrão de sensibilidade *killer* apresentado pela CCA007 e as demais *S. cerevisiae* do primeiro grupo. Essa discriminação em relação à origem, no entanto, não a colocou fora do grupo das *S. cerevisiae*, embora tenha apresentado menor similaridade com as demais deste grupo.

As linhagens do gênero *Dekkera* sp (CCA 053, 059, 077 e 155) não se mostraram sensíveis a quaisquer das 29 leveduras *killer* e, além disso, não cresceram vigorosamente após 48 horas de incubação em YEPD-azul de metileno, a 25°C, condições estabelecidas para a avaliação dos testes. Este gênero (*Brettanomyces* é a forma imperfeita) foi caracterizado como de crescimento lento em alguns meios comuns utilizados em testes de crescimento, segundo Barnett et al., (1990), e assim, supõe-se que um período maior de incubação talvez possa levar a um padrão positivo para a sensibilidade às toxinas *killer*. Foi possível observar um crescimento bem mais efetivo em placas incubadas por cerca de 120 horas, porém os dados de sensibilidade não puderam ser utilizados na comparação dos dados em função desta diferença na metodologia empregada. De qualquer forma, o

padrão obtido foi exclusivo para este gênero e assim discriminatório.

Investigações futuras talvez possam levar ao desenvolvimento de um método de monitoramento rápido e reproduzível para essas leveduras, as quais, estão comumente envolvidas na deterioração também de cerveja e vinho. Neste, estas leveduras crescem tipicamente em baixas concentrações depois do término da fermentação alcoólica e malolática, ou seja, durante o envelhecimento do vinho em barris, tanques e garrafas. O aroma característico dos metabólitos produzidos foram descritos como de plástico queimado, fumaça, couro, lã molhada, entre outras (Egli & Henick-Kling 2001). Além disso trata-se também de importante grupo de leveduras contaminantes da fermentação do caldo de cana, conforme constatação de Silva (1994), onde a população destas leveduras chegou a 92% do total de isolamentos, atestando, assim, a sua alta competitividade e relevância, dentro do monitoramento das contaminações em fermentações alcoólicas.

As quatro linhagens de *Dekkera* aqui utilizadas foram isoladas de destilarias e safras distintas: CCA053 e CCA059 isoladas da Destilaria São Marino de vinho e água de diluição, respectivamente, indicando uma possível contaminação da dorna através da água, corroborada também pela alta similaridade genética entre elas, apresentada pelo ensaio RAPD; CCA077, isolada de fermento da Destilaria Alcoazul; e CCA155 isolada do vinho da Destilaria São Marino, porém em safra distinta dos isolados CCA053 e CCA059. Ressalte-se a maior distância genética apresentada por essas duas últimas entre si e entre as duas anteriores.

Quanto ao grupo 2, formado por linhagens pertencentes a gêneros e espécies diversas, com exceção das *Dekkera* sp., comentadas

anteriormente, nenhum outro gênero ou espécie mostrou um agrupamento mais homogêneo. No entanto, observou-se que as quatro linhagens de *Pichia* agruparam-se duas a duas (CCA610 e 612) e (CCA373 e 567), tanto no ensaio RAPD quanto no padrão de sensibilidade *killer*.

O grupo 3 foi formado por uma linhagem de *S. cerevisiae* (CCA083) e uma *Debaryomyces hansenii* (CCA006). Essa última apresentou um padrão diferenciado também no ensaio RAPD.

Dos resultados obtidos, expostos no dendrograma da Figura 19, foi possível discriminar entre linhagens de *S. cerevisiae* e outros gêneros e espécies utilizando o padrão de sensibilidade às toxinas *killer*. A nível intra-específico, a discriminação pelo padrão de sensibilidade às toxinas *killer* chegou ao nível da origem dos biótipos para *S. cerevisiae*.

Quanto à *Dekkera* sp, contaminante importante do processo fermentativo, observou-se um padrão único, não apresentado por outros gêneros, podendo ser utilizado para o seu monitoramento.

Ao analisar a matriz de dados binários notou-se uma característica interessante, onde algumas linhagens apresentaram atividade *killer* contra as leveduras *S. cerevisiae* e não a apresentaram contra os demais gêneros e espécies. A grande maioria das linhagens de *S. cerevisiae* apresentaram sensibilidade às toxinas das linhagens CCA 008, 015, 118, 176, 195, 630 e 666, enquanto as demais não foram sensíveis. Contudo, para CCA 194 e 199, o grupo de *S. cerevisiae* não foi sensível, enquanto os demais gêneros e espécies apresentaram sensibilidade às mesmas.

Dada esta observação, construiu-se uma matriz de dados binários (9X31), executou-se a análise comparativa das leveduras estudadas somente

Figura 20 - Dendrograma gerado com o método UPGMA baseado no índice SM, utilizando os dados de sensibilidade às 9 linhagens *killer* mais eficientes no agrupamento de leveduras industriais

com base no perfil de sensibilidade a estas linhagens *killer* mais distintivas, (Figura 20) e percebeu-se uma separação mais eficiente sobretudo entre os grupos de leveduras. Com a utilização exclusivamente dessas nove linhagens, citadas acima, o resultado com um mínimo de quatro casos positivos para sensibilidade (contra as CCA 008, 015, 118, 176, 195, 630 e 666) e resposta neutra para as demais linhagens (CCA 194 e 199) colocariam a linhagem em estudo dentro do grupo de *S. cerevisiae*.

Da mesma forma, um máximo de três casos positivos para sensibilidade (contra as CCA 194, 199 e 630) e resposta neutra às CCA 008, 015, 118, 176, 195 e 666, caracterizaria a linhagem em estudo como não *Saccharomyces*.

Observando-se o dendrograma da Figura 20, pode-se notar a localização das linhagens de *S. cerevisiae* em um único grupo com coeficiente de similaridade baixo (cerca de 31 %) em relação a um segundo grande grupo que inclui todas os demais gêneros e espécies.

Desta forma obteve-se melhor discriminação entre linhagens de *S. cerevisiae* em relação a outros gêneros e espécies do que quando da utilização de todas as 29 leveduras *killer* contempladas neste trabalho.

Estudos mais detalhados, ampliando o número e espécies de *Saccharomyces* e outros gêneros, poderiam levar a proposição de um método rápido e eficiente para a caracterização de leveduras do processo fermentativo e contaminantes, com a elaboração de um *kit* que poderia ser utilizado nas destilarias com baixo custo.

5 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos foi possível concluir que:

1 - O padrão de sensibilidade às diferentes toxinas *killer* foi discriminatório e eficiente para a biotipagem de leveduras industriais, principalmente na distinção entre linhagens utilizadas no processo fermentativo (*Saccharomyces cerevisiae*) e linhagens contaminantes do processo (não *Saccharomyces* sp.);

2 - A discriminação de leveduras pelo padrão de sensibilidade às toxinas *killer* foi eficiente também em nível intra-específico, diferenciando mesmo quanto à origem do biotipo;

3 - Os resultados de identificação das leveduras por taxonomia clássica e biologia molecular (PCR e RAPD-PCR) corroboraram os resultados obtidos na biotipagem pelo sistema *killer*;

4 - As informações obtidas subsidiam o desenvolvimento de uma metodologia de biotipagem aplicável para o monitoramento microbiológico na indústria sucro-alcooleira, com a seleção de nove leveduras *killer* contra as

quais as leveduras industriais apresentaram um perfil característico de sensibilidade, dependendo do grupo ao qual pertencem (*S. cerevisiae* ou não *Saccharomyces*).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALEIRAS COUTO, M.M.; EIJSMA, B.; HOFSTRA, H.; HUIS, J.H.J.;
VOSSEN, J.M.B.M. Evaluation of molecular typing techniques to assign
genetic diversity among *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Applied
Environmental Microbiology**, v.62, p.41-46, 1996.

BARNETT, J.A.; PAYNE, R.W.; YARROW, W.A. **Yeasts**: characteristics and
identification. Cambridge: Harvard University Press, 1990. 811p.

BASSO, L. C.; AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J.; MARTIM, V.F.; CAMPOS,
A.A.; GALLO, C.R. Dominância de leveduras contaminantes sobre as
linhagens industriais avaliadas pela técnica de cariotipagem, In:
CONGRESSO NACIONAL DA SOCIEDADE DOS TÉCNICOS
AÇUCAREIROS DO BRASIL, 5., Águas de São Pedro, 1993. **Anais**. Águas
de São Pedro: STAB, 1993. p.246-250.

BOSTIAN, K.A.; STURGEON, J.A.; TIPPER, D.J. Encapsidation of yeast
killer double stranded ribonucleic acids: dependence of M on L. **Journal
of Bacteriology**, v.143, n.1, p.463-470, 1980.

BUSSEY, H. Effects of yeast killer factor on sensitive cells. **Natural New Biology**, v.235, p.73-75, 1972.

BUZZINI, P.; MARTINI, A. Differential growth inhibition as a tool to increase the discriminating power of killer toxin sensitivity in fingerprinting of yeasts. **FEMS Microbiological Letters**, v.193, p. 31-36, 2000a.

BUZZINI, P.; MARTINI, A. Utilization of differencial killer toxin sensitivity patterns for fingerprinting and clustering yeast strains belonging to different genera. **System and Applied Microbiology**, v.23, p. 450-457, 2000b.

CAMPBELL, I. Detection and identification of yeasts. **Technical Quaterly**, v.8, p.129-133, 1971.

CASTRO, M. M.S. Leveduras contaminantes do processo de fermentação alcoólica: diversidade taxonômica e metabólica. Campinas, 1995. 124p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

CECCATO-ANTONINI, S.R.; PARAZZI, C. Isolamento de levedura selvagem floculante e efeitos da contaminação em processo de fermentação etanólica contínua. In: CONGRESSO NACIONAL DA SOCIEDADE DOS TÉCNICOS AÇUCAREIROS DO BRASIL, 6., Maceió, 1996. **Anais**. Maceió: STAB, 1996. p. 23-29.

CECCATO-ANTONINI, S.R.; SILVA, D.F. Eficiência de meios diferenciais no isolamento de cepas de leveduras de processos industriais de fermentação alcoólica. **STAB**, v.18, p. 40-46, 2000.

CECCATO-ANTONINI, S.R.; CREMONINI, L.C.M.; REGENFUSS, C. Killer character of yeasts isolated from ethanolic fermentations. **Scientia Agricola**, v.56, n.3, p. 631-635, 1999.

CECCATO-ANTONINI, S.R.; TOSTA, C.D.; SILVA, A.C. Determination of yeast killer activity in fermenting sugarcane juice using selected ethanol-making yeasts. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.47, n.1, p.13-23, 2004.

CORREDOR, M.; DAVILA, A.M.; GAILLARDIN, C.; CASAREGOLA, S. DNA probes specific for the yeast species *Debaryomyces hansenii*: useful tools for rapid identification. **FEMS Microbiological Letters**, v. 193, p.171-177, 2000.

DEGRE, R.; THOMAS, D.Y.; ASH, J.; MAILHIOT, K.; MORIN, A.; DUBORD, C. Wine yeasts strain identification. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.40, n.4, p.309-315, 1989.

DUKE UNIVERSITY. Conserved primer sequences for PCR amplification and sequencing from nuclear ribosomal RNA. <<http://www.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm>> (31 ago.2004).

EGLI, C.M.; HENICK-KLING, T. Identification of *Brettanomyces/Dekkera* species based on polymorphism in the rRNA internal transcribed spacer region. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.52, n.3, p.241-247, 2001.

EL-DASH, A.A.; CAMARGO, C.O.; DIAZ, N. M. **Fundamentos da tecnologia de panificação**. São Paulo: FTPT, 1980. 349p.

FERNANDEZ-ESPINAR, M.T.; ESTEVE-ZARZOSO, B.; QUEROL, A.; BARRIO, E, RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacers and the 5.8S rRNA gene region of the genus *Saccharomyces*: a fast method for species identification and the differentiation of flor yeasts. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.78, p. 87-97, 2000.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: EMBRAPA, CENARGEN, 1998. 220p.

FIELD, L.J.; BOBEK, L.A.; BRENNAN, V.E.; REILLY, J.D.; BRUENN, J.A. There are at least two yeast viral double-stranded RNAs of the same size: an explanation for viral exclusion. **Cell**, v. 31, p.193-200, 1982.

FLEET, G.H. Composition and structure of yeast cell wall. **Current Topics in Mycology**, v.1, p.24-56, 1985.

GADEN, E.L. Fermentation process kinetics. **Journal of Biochemical Microbiological and Technological Engineering**, v.1, p. 413-415, 1959.

GOMES, L.H., Avaliação de quatro métodos para identificação de leveduras. Piracicaba, 1995. 88p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo.

GOTO, K; IWASE, T.; KICHISE, K.; KITANO, K.; TOTSUKA, A; OBATA, T.; HARA, S. Isolation and properties of a chromosome-dependent KHR killer toxin in *Saccharomyces cerevisiae*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.54, p. 505-509, 1990.

GUIDI, R. H., Caracterização, classificação e determinação de marcadores genético moleculares para estirpes de leveduras contaminantes da fermentação etanólica. Jaboticabal, 2000. 99p. Dissertação (Mestrado) -Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Julio Mesquita Filho".

GUILLAMÓN, J.M.; SABATÉ, J.; BARRIO, E.; CANO, J.; QUEROL, A. Rapid identification of wine yeast species based on RFLP análisis of the ribossomal internal transcribed spacer (ITS) region. **Archives in Microbiology**, n.169, p.387-392, 1998.

HAGLER, A.N; MENDONÇA-HAGLER, L.C. A diazonium blue B test for yeasts grown three days on on Yeast Carbon Base-urea agar. **Reviews of Microbiology**, v.22, n.1, p.71-74, 1991.

HERRING, A.J; BEVAN, E.A. Virus-like particles associated with double strand RNA species found in killer and sensitive strains of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Genetic Virology**, v.22, p.384, 1974.

HOLLINGS, M. Mycoviruses: viruses that infect fungi. **Advances in Virus Research**, n.22, p.1-53, 1978.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA.
<<http://www.ibge.org.br>> (31 ago. 2004).

JAMES, S.A.; CAI, J.; ROBERTS, I.N.; COLLINS, M.D. A phylogenetic analysis of the genus *Saccharomyces cerevisiae* based on 18S rRNA gene sequences: description of *Saccharomyces kunashirensis* sp. Nov. and *Saccharomyces martiniae* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.47, n.2, p.453-460, 1997.

JONES, R.P.; PAMMENT, N.; GREENFIELD, P.F. Alcohol fermentation by yeasts: the effect of environmental and other variables. **Process in Biochemistry**, v.16, n.4, p. 42-49, 1981.

KAGAN, B. L. Mode of action of killer toxins: channel formation in lipid bilayer membranes. **Nature**, n.302, p.709-711, 1983.

KAGIYAMA, S.; AIBA, T.; KADOWAKI, K.; MOGI, K. New killer toxins of halophilic *Hansenula anomala*. **Agricultural Biological Chemistry**, v.52, n.1, p.1-7, 1988.

KREGER van RIJ, N.J.W. **The yeasts**: a taxonomic study. 3.ed. Amsterdam: Elsevier, 1984. 1082 p.

KURTZMAN, C.P., Molecular taxonomy of the yeasts. **Yeast**, v.10, p. 1727-1740, 1994.

KURZWEILOVÁ, H.; SIGLER, K. Significance of the lag phase in K1 killer toxin action on sensitive yeast cells. **Folia Microbiologica**, v.40, n.2, p.213-215, 1995.

LODDER, J. **The yeasts**: a taxonomic study. London: North-Holland, 1970. 1385p.

LOPES, C.H. Aspectos paramétricos e dimensionais da fermentação alcoólica. **Álcool & Açúcar**, v.5, n.21, p. 34-40, 1985.

MARTINI, A. A principi di classificazione dei lieviti e posibilita di tipizzare i ceppi selezionati. **Atti Italiana Della Vite e del Vino**, n.35, p.215-223, 1983.

OLIVEIRA, K.; HAASE, G.; KURTZMAN, C.; HYLDING-NIELSEN, J.J.; STENDER, H. Differentiation of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by fluorescent *in situ* hybridization with peptide nucleic acid probes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n.11, p.4138-4141, 2001.

OLIVEIRA, M.C.F.L.; PAGNOCCA, F.C.; Aplicabilidade de meios seletivos empregados na indústria cervejeira para a detecção de leveduras selvagens em unidades sucroalcooleiras. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 8., São Lourenço, 1988. **Anais**. São Lourenço: SINAFERM, 1988, p. 78-81.

PALFREE, G.E.; BUSSEY, H., Killer toxin from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: purification and properties: purification and characterization of the protein toxin from *Saccharomyces cerevisiae*. **European Journal of Biochemistry**, v.93, p.487-493, 1979.

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

PFEIFFER, P.; RADLER, F. Purification and characterization of extracellular and intracellular killer toxin of *Saccharomyces cerevisiae* strains 28. **Journal of Genetic Microbiology**, v.128, p.2699-2706, 1982.

PHAFF, H.J.; MILLER, M.W.; MRAK, E.M. **The life of the yeasts.** Cambridge: Harvard University Press, 1978. 341p.

PHAFF, H.J.; STARMER, W.T. Yeasts associated with plants, insects and soils. **Yeasts**, v.1, p.123-180, 1987.

POLONELLI, L.; ARCHIBUSACCI, A.; STARMER, W.T. Killer system: a simple method for differentiating *Candida albicans* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, n.17, p.774-780, 1983.

PRADA, G.M.M.; CASTRO, M.M.S. **Usinas de açúcar e álcool: estudos das leveduras e dos fatores que afetam a fermentação.** Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello, 1995. 49 p.

RADLER, F.; SCHMITT, M.J.; MEYER, B. Killer toxins of *Hanseniaspora uvarum*. **Archives in Microbiology**, v. 154, p.175-178, 1990.

ROEMER, T.; BUSSEY, H. Yeast β -Glucan Synthesis: KRE6 Encodes a Predicted Type II Membrane Protein Required for Glucan Synthesis in vivo and for Glucan Synthase Activity in vitro. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. V.88, p.11295-11299, 1991.

RUMJANEK, F. D. **Introdução à biologia molecular.** Rio de Janeiro: Âmbito Cultural, 2001. 157p.

SAMBROOK, J.; RUSSEL. D. W. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 3.ed. New York: Cold Spring Harbor, 2001. v.3, 843p.

SCHMITT, M.; RADLER, F. Purification of yeast killer toxin KT28 by receptor-mediated affinity chromatography. **Journal of Chromatography**, v.469, p.448-452, 1989.

SILVA, R.B.O. Leveduras contaminantes na produção de etanol industrial por processo contínuo: quantificação e identificação. Rio Claro, 1994. 145p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Julio Mesquita Filho".

SOARES, G.A.M., Caracterização da toxina "Killer" produzida pela linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* Y500-4L. Campinas, 1998. 91p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

SOMERS, J.M.; BEVAN, E.A. The inheritance of killer character in yeast. **Genetic Researches**, v.13, p. 71-73, 1969.

SOUZA, M.A.C; MELO, W.J.; MARQUES, M.O. Caracterização de leveduras em caldo primário e mosto, In: CONGRESSO NACIONAL DA SOCIEDADE DOS TÉCNICOS AÇUCAREIROS DO BRASIL, 5., Águas de São Pedro, 1993. **Anais**. Águas de São Pedro: STAB, 1993, p.235-240.

STENDER, H.; KURTZMAN C.; HYLDING-NIELSEN, J.J.; SORENSEN, D.;
BROOMER, A.; OLIVEIRA, K.; PERRY-O'KEEFE, H.; SAGE, A.; YOUNG,
B.; COULL, J. Identification of *Dekkera bruxellensis* (*Brettanomyces*)
from wine by fluorescence *in situ* hybridization using peptide nucleic acid
probes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, n.2, p.938-941,
2000.

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*. **European Journal of
Biochemistry**, v. 141, p. 241-245, 1984.

SUSUKI, C.; NIKKUNI, S., The primary and subunit structure of a novel
type killer toxin produced by a halotolerant yeast *Pichia farinose*.
Journal of Biological Chemistry, v.269, n.4, p.9041-3046, 1994.

TAKITA, M.A.; CASTILHO-VALAVICIUS, B. Absence of cell wall chitin in
Saccharomyces cerevisiae leads to resistance to *Kluyveromyces lactis*
killer toxin. **Yeast**, n.9, p.589-598, 1993.

TORRIANI, S.; ZAPPAROLI, G.; SUZZI, G. Genetic and phenotypic
diversity of *Saccharomyces sensu stricto* strains isolated from Amarone
wine. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.75, p.207-215, 1999.

UNIÃO DA AGROINDÚSTRIA CANAVIEIRA DE SÃO PAULO.
<<http://www.portalunica.com.br>> (31 ago. 2004).

VALENTE, P.; GOUVEIA, F.C.; LEMOS, G.A. DE.; PIMENTEL, D.; ELSAS, J. D. V.; MENDONÇA-HAGLER, L.C.; HAGLER, A.N. Pcr amplification of the rRNA internal transcribed spacer region for differentiation of *Saccharomyces cerevisiae* cultures. **Microbiological Letters**, v.137, p.253-256, 1996.

VALSECHI, O., OLIVEIRA, E.R. **Tecnologia do álcool**. Piracicaba: ESALQ, Depto de Tecnologia Rural, 1968. 142p.

VAN DER VOSSEN, M.B.M; HOFSTRA, H. DNA based typing, identification and detection systems for food spoilage microorganisms: development and implementation. **International Journal of Food Microbiology**, n.33, p.35-49, 1996.

VAUGHAN-MARTINI, A.; CARDINALI, G.; MARTINI, A. Differential killer sensitivity as a toll for fingerpeinting wine-yeast strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Industrial Microbiology**, v.17, p.124-127, 1996.

VAUGHAN-MARTINI, A.; ROSINI, G. Killer relationships within the yeasts in the genus *Kluyveromyces*. **Mycologia**, v.81, p.317-321, 1989.

VAUGHAN-MARTINI, A.; ROSINI, G.; MARTINI, A. Killer individual sensitivity patterns as a toll for the fingerprinting of strains within the yeast species *Kluyveromyces lactis* and *Kluyveromyces marxianus*. **Biotechnological Techniques**, v.2, p.293-296, 1988.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. (Ed.). **PCR protocols: a guide to methods and applications**. New York: Academic Press, 1994. p. 315-321.

WICKNER, R.B. The killer double-stranded RNA plasmids of yeast. **Plasmids**, v.2, p.303-322, 1979.

WIGHTMAN, R.; MEACOCK, P.A. The *THI5* gene family of *Saccharomyces cerevisiae*: distribution of homologues among the hemiascomycetes and functional redundancy in the aerobic biosynthesis of thiamin from pyridoxine. **Microbiology**, v.149, p.1447-1460, 2003.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.E.; LEVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.C. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Researches**, v.18, p.6531-6535, 1990.

WOODS, D.R.; BEVAN, E.A. Studies on nature of the Killer factor produced by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Genetic Microbiology**, v.115, n.51, p.126, 1968.

YOKOMORI, Y.; AKIYAMA, H.; SCHIMIZU, K. Toxins of a wild *Candida* killer yeast with a novel killer propertie. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.52, n.11, p.2797-2801, 1988.

YOUNG, T.W. **Killer yeasts**. London: Academic Press, 1987. 230p.

YOUNG, T.; YAGIU, M. A comparison of the killer character in different yeasts and its classification. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.44, p.59-77, 1978.

ZHU, H.; BUSSEY, H. The K1 toxin of *Saccharomyces cerevisiae* kills spheroplasts of many yest species. **Applied and Environmental Microbiology**, v.55, n.8, p.2105-2107, 1989.

ZHU, H.; BUSSEY, H.; THOMAS, D.I.; GAGNON, J.; BELL, W. Determintaiion of the carboxyl termini of the α and β subunits if yeast K1 Killer toxin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n.22, p.10728-10732, 1987.

ZUCCHI, M. I. Análise da estrutura genética de *Eugenia dysenterica* DC utilizando marcadores RAPD e SSR. Piracicaba, 2002. 130p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.