

**SELEÇÃO DE LINHAGENS DE *Saccharomyces cerevisiae***  
**POTENCIALIZADAS PELO FATOR *KILLER*, H<sub>2</sub>S<sup>-</sup> E O CARATER**  
**FLOCULANTE**

**ANNY STELLA MONTEIRO BRITES**

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.

**PIRACICABA**  
Estado de São Paulo – Brasil  
Janeiro - 2003

**SELEÇÃO DE LINHAGENS DE *Saccharomyces cerevisiae***  
**POTENCIALIZADAS PELO FATOR *KILLER*, H<sub>2</sub>S<sup>-</sup> E O CARATER**  
**FLOCULANTE**

**ANNY STELLA MONTEIRO BRITES**

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.

**PIRACICABA**

Estado de São Paulo – Brasil

Janeiro - 2003

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

Brites, Anny Stella Monteiro

Seleção de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* potencializadas pelo fator Killer, H<sub>2</sub>S e o caráter floculante / Anny Stella Monteiro Brites. - Piracicaba, 2003.

60 p.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2003.

Bibliografia.

1. Floculação 2. Fusão de protoplasto 3. Levedura I. Título

CDD 589.23

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

À Deus sem o qual nada seria possível,

Aos meus amados pais Vera Lúcia e Luiz,  
Que tornaram esse sonho possível através do constante incentivo e  
Amor a mim dedicados.

A meu marido Marcus,  
Pelo amor incondicional, apoio e amizade.

Ao meu querido filho Felipe, que me dá forças,  
Por fazer minha vida mais doce e feliz.

Dedico

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Professor Jorge Horii, pela orientação e estímulo que tornaram possível a realização deste trabalho.

Aos Professores Aline Aparecida Pizzirani-Kleiner, Luiz Carlos Basso, Sandra Regina. Ceccatto-Antonini, por toda atenção dispensada e pelas preciosas sugestões.

A todos os amigos do Laboratório de Genética de Fungos Filamentosos da ESALQ/USP, principalmente à Agatha Cristiane Huppert Giancoli e ao Fernando Gomes Barcelos pela amizade e valiosas contribuições para a realização.

Aos colegas e professores do Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos, pelo enriquecimento à minha vida pessoal e profissional.

Aos funcionários do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da ESALQ/USP.

Aos amigos Antônio, André, Solange, Patrícia, Maria Cecília, Giovana, Daniela, Flavia e Romilda pela colaboração e alegrias compartilhadas.

Ao Laboratório de Microbiologia da EMBRAPA/CNPVU pela gentil cessão das linhagens de leveduras utilizadas.

À empresa Fermentec S/C Ltda – Assistência Técnica em Fermentação pela gentil cessão das linhagens de levedura utilizadas.

A todos aqueles que de uma forma ou outra, colaboraram para a realização deste trabalho.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS .....	viii
LISTA DE QUADROS .....	ix
RESUMO .....	x
SUMMARY .....	xi
1 INTRODUÇÃO .....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	3
2.1 Produção de H <sub>2</sub> S .....	3
2.2 Flocculação .....	5
2.3 Fator “killer” .....	6
2.4 Cariotipagem Eletroforética .....	10
2.5 Fusão de protoplastos em leveduras .....	13
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	16
3.1 Material Biológico .....	16
3.2 Métodos .....	17
3.2.1 Meios de Cultura .....	17
3.2.2 Soluções, Reagentes e Tampões .....	19
3.2.3 Teste Potencial para Produção de H <sub>2</sub> S .....	26
3.2.4 Teste de Flocculação .....	27
3.2.5 Teste para Detecção do Fenótipo “killer” .....	27
3.2.6 Cariotipagem Eletroforética .....	28
3.2.7 Observação em microscópio eletrônico de varredura (MEV) de células intactas levedura .....	30

3.2.8	Fusão de Protoplastos .....	30
3.2.9	Teste de Estabilidade dos Produtos de Fusão .....	32
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	33
4.1	Potencial para Produção de H <sub>2</sub> S e Flocculação .....	33
4.2	Detecção do Fenótipo “ <i>killer</i> ” .....	34
4.3	Cariotipagem Eletroforética .....	36
4.4	Seleção das Linhagens .....	38
4.5	Observação em microscópio eletrônico das células das levedura .....	40
4.6	Fusão de Protoplastos .....	43
4.7	Estabilidade dos produtos de fusão .....	48
5	CONCLUSÕES .....	51
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	52



## LISTA DE FIGURAS

	Página
1 Esquema genético, toxicogênico, imunológico e de atividade para o sistema “killer” de <i>S. cerevisiae</i> .....	8
2 Esquema de uma célula de levedura em corte apresentando destaque para os cromossomos presentes no núcleo e suas distribuições no gel de eletroforese, de acordo com seus tamanhos .....	11
3 Procedimentos para Cariotipagem Eletroforética .....	29
4 Placa com meio indutor que exhibe halo de inibição da levedura sensível AH <sub>22</sub> em torno da levedura “killer” K <sub>1</sub> .....	35
5 Perfil eletroforético das linhagens “killer” e floculante .....	37
6 Superfície celular da levedura <i>S. cerevisiae</i> (linhagem “killer” K <sub>1</sub> ) com brotamento lateral observada em MEV .....	41
7 Superfície celular da levedura <i>S. cerevisiae</i> (linhagem floculante ATCC 26602) observada em MEV .....	41
8 Protoplastos obtidos a partir de células da linhagem ATCC 26602 após 30 minutos de exposição .....	45
9 Protoplastos obtidos a partir de células da linhagem K <sub>1</sub> após 30 minutos de exposição .....	46
10 Comparativo entre a linhagem parental não floculante K <sub>1</sub> no teste de floculação .....	49
11 Linhagem recombinante de produto de fusão obtido em teste de floculação .....	49

## LISTA DE QUADROS

	Página
1 Características das linhagens selecionadas para estudos de floculação e produção de H <sub>2</sub> S .....	33
2 Caracterização das linhagens obtidas através do uso de suas marcas naturais, sendo testada a resistência obtidas através do uso de suas marcas naturais, sendo testada a resistência ao fungicida Benomyl e as diferentes concentrações do estabilizante osmótico Sorbitol .....	44

**SELEÇÃO DE LINHAGENS DE *Saccharomyces cerevisiae***  
**POTENCIALIZADAS PELO FATOR *KILLER*, H<sub>2</sub>S<sup>-</sup> E O CARÁTER**  
**FLOCULANTE**

Autora: ANNY STELLA MONTEIRO BRITES

Orientador: Prof. Dr. JORGE HORII

**RESUMO**

Dentre as características desejáveis em leveduras fermentadoras alcóolicas estão a capacidade de floculação, a não produção de H<sub>2</sub>S e o caráter “*killer*”. Neste trabalho foram selecionadas sete linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* com algumas destas características, que passaram por testes confirmativos e pela cariotipagem eletroforética resultando na escolha de duas linhagens: ATCC 26602 (altamente floculante) e K<sub>1</sub> (H<sub>2</sub>S<sup>-</sup> e possuidoras do caráter “*killer*”). Estas linhagens foram utilizadas em um cruzamento via fusão de protoplasto para se obter um produto de fusão estável com as características de interesse tecnológico. Na seleção das linhagens híbridas com base em caracteres naturais foram isolados 1291 híbridos em meio seletivo e entre essas colônias somente 1,5% foram inicialmente consideradas híbridas. Após três subcultivos em YEPD líquido, estes produtos de fusão não se mostraram estáveis.

# **IMPROVEMENT OF A *Saccharomyces cerevisiae* STRAIN BY THE CHARACTERS: “killer” SKILLS, FLOCCULATION CAPACITY AND LACK IN PRODUCTION OF H<sub>2</sub>S**

Author: ANNY STELLA MONTEIRO BRITES

Adviser: Prof. Dr. JORGE HORII

## **SUMMARY**

Flocculative and “killer” skills and lack in production of H<sub>2</sub>S are desirable characteristics of the ethanolic fermentative yeasts. Seven selected strains of *Saccharomyces cerevisiae* with some of these characteristics were evaluated for confirmation of these abilities and their genetic characterization was undertaken by electrophoretic karyotyping. The strain ATCC 26602 had flocculant ability and the strain K<sub>1</sub> was H<sub>2</sub>S<sup>-</sup> and “killer”. The strains were selected for protoplast fusion aiming to obtain a stable fusion strain with these desirable technological characteristics. The selection of the hybrid strains was based on natural characters and have shown 1291 hybrids (frequency of 1,5%) in the medium for the isolation of the fusionants (protoplasts). The protoplast stability was monitored by three continuous growth in the YEPD liquid medium and the stable fusion products were not obtained.

## 1 INTRODUÇÃO

As indústrias que se utilizam das leveduras nos processos de produção, particularmente as de bebidas alcoólicas, são muito tradicionais e refletem a atitude conservadora dos fabricantes. O uso industrial de linhagens de leveduras se dá pelo processo de fermentação anaeróbica, que é empregado para a manufatura de produtos baseado no etanol e por sistemas aeróbicos. Uma de suas características mais requisitadas é a produção de álcool etílico a partir de carboidratos fermentáveis (fermentação alcoólica), processo utilizado na fabricação de bebidas alcoólicas, destiladas e não destiladas (Rose & Harrison, 1993).

O processo de seleção de leveduras para uso em processos fermentativos tem sido realizado com objetivos distintos, como por exemplo, para a produção de álcool combustível (Basso et al., 1993), e no caso de bebidas fermentadas (Colagrande, Silva & Fumi, 1994).

Em termos gerais, nos processos fermentativos para produção de álcool, é considerado importante que a levedura possua as seguintes características segundo Jarvis, Founters & Kensila (1995); Henick-Kling (1995), Schember & Costa (1987): iniciar a fermentação rapidamente; boa taxa de fermentação; relativa resistência a baixos valores de pH; tolerância à alta concentração de etanol, a alta pressão osmótica e a elevadas temperaturas durante a fermentação; produção de toxina “*killer*”; não produzir espuma excessiva; características de floculação e produção mínima de SO<sub>2</sub>.

Entretanto, as indústrias de bebidas alcoólicas apresentam recentes inovações, pela introdução de benefícios gerados pela bioengenharia e por manipulações

genéticas. As indústrias cervejeiras tiveram muitos desafios nos últimos anos como, por exemplo, aumentar a resistência da levedura ao etanol, à temperatura e ao dióxido de carbono e eliminar ou diminuir a produção de compostos que prejudicam a qualidade de bebidas.

A fim de obter linhagens que apresentassem algumas destas propriedades, foram utilizados métodos de manipulação genética.

Mediante o exposto, o presente trabalho teve por objetivo obter linhagens de leveduras provenientes do cruzamento ou fusão de protoplasto de *Saccharomyces cerevisiae* com uma linhagem “killer” correspondente, para que tenham a capacidade de flocular, não sejam produtoras de H<sub>2</sub>S e contenham o fator “killer”, pois estas características desejáveis ocorrem, cada uma, em apenas 1% das linhagens selvagens de leveduras (Romano et al., 1985).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Produção de H<sub>2</sub>S

A habilidade das leveduras para formar H<sub>2</sub>S tem grande importância comercial, particularmente em certas indústrias de bebidas alcoólicas, tais como a produtora de cerveja, onde o H<sub>2</sub>S e os compostos dele derivados podem ocorrer em concentrações indesejáveis no produto final. O controle e prevenção da formação e a remoção do H<sub>2</sub>S são de grande importância na produção de bebidas alcoólicas. Isto porque este gás e os produtos dele derivados podem ser produzidos em quantidades que degradam os produtos, acarretando perdas econômicas. Nos produtos destilados, o H<sub>2</sub>S e seus derivados são menos nocivos, pois a maioria destes compostos podem ser removidos durante o estágio de destilação, apesar de, segundo Wainwright (1971), poucas informações estarem disponíveis a esse respeito.

Hammond (1993) e Haecht & Dufour (1995) concordam que na cerveja o H<sub>2</sub>S formado pela levedura durante o processo fermentativo contribui para o *flavour* quando presente em baixa concentração. Porém, este composto quando presente em altas concentrações, pode conferir odor e gosto desagradáveis ao produto.

Segundo Kunkee & Amerine (1970) a quantidade de H<sub>2</sub>S formada pela levedura durante a fermentação alcoólica depende da linhagem e da temperatura da fermentação.

O mesmo foi observado por Zambonelli (1964) que constatou que as diferenças na redução de sulfatos eram controladas geneticamente. Considerando estas

constatações, Wainwright (1971) recomendou a seleção de linhagens estáveis para esta característica.

A síntese de  $H_2S$  em *Saccharomyces cerevisiae* está relacionada com o metabolismo de alguns aminoácidos e é controlada pela composição destes no meio. Ele é intermediário na biossíntese de aminoácidos sulfurados, cisteína e metionina, a partir de compostos de enxofre inorgânicos (Wainwright, 1971).

Segundo Houg et al. (1982) a síntese do  $H_2S$  está relacionada ao crescimento da levedura e durante a fermentação de linhagens de cervejaria, a taxa máxima de produção coincide com a taxa máxima de crescimento. Hammond (1993) observou que na fermentação da cerveja ocorreu a produção de  $H_2S$  que foi analisada pela observação de quatro picos de crescimento da levedura. Estes picos coincidiram com o período em que as células das leveduras não estão em brotamento.

A não produção de  $H_2S$  é decorrente de uma mutação no gene que afeta a enzima sulfito redutase e esta propriedade pode ser transferida por técnicas genéticas (Zambonelli et al., 1975 e Romano et al., 1985).

A deficiência em vitaminas essenciais, bem como nitrogênio amino livre, está associado ao aumento da produção de  $H_2S$  devido à estimulação das reações de disseminação proteolítica, desencadeado pelo estresse das leveduras (Vine, 1993). Em algumas circunstâncias, apesar do controle efetivo para a não produção de  $H_2S$ , o mesmo era produzido em quantidade excessiva. Vos & Gray (1979) realizaram experimentos a fim de determinar a causa da esporádica produção de  $H_2S$  em mostos cuja fonte de enxofre elementar eram eliminadas. Foram utilizadas linhagens de leveduras apropriadas para controlar a formação do  $H_2S$  durante a fermentação e assim, quantidades excessivas de certos íons metálicos foram evitadas.



## 2.2 Floculação

A floculação é um fenômeno apresentado por determinadas leveduras, as quais se agregam espontaneamente formando flocos. Esses são constituídos por milhares de células, que se sedimentam rapidamente no meio de fermentação no qual estão suspensas. A floculação é uma das importantes propriedades de determinadas linhagens de leveduras utilizadas em fermentações industriais, tais como na cervejaria (Atkinson & Daoud, 1976).

A floculação deverá ocorrer em um ponto desejável da fermentação, onde atuará eficientemente na remoção das células do mosto (Calleja, 1987). Este fato, desta forma, contribui na diminuição do custo do processo e aumenta sua produtividade (Prince & Bradford, 1982; Neto et al., 1985).

As leveduras selecionadas para a produção de cerveja apresentam a capacidade de flocular no final da fermentação (Mill, 1964). Assim, estudos sobre a floculação foram realizados visando à melhoria do processo fermentativo, sendo que a maioria deles utilizou leveduras da espécie *S. cerevisiae* (Mill, 1964; Jayatissa & Rose, 1976) e linhagens da indústria cervejeira (Stewart & Russel, 1986).

As indústrias de bebidas fermentadas, como a cerveja, necessitam de linhagens com características específicas. Espera-se que elas cresçam e fermentem como células isoladas, e que iniciem a floculação imediatamente após a exaustão do açúcar do mosto para “limpar” a bebida, onde as células colhidas poderão iniciar nova fermentação (Stratford & Carter, 1993).

O processo da floculação é controlado por um complexo de inter-relações de fatores genéticos, fisiológicos e ambientais. Assim, as modificações que geram a floculação das células de leveduras são oriundas das mudanças na estrutura química de suas paredes celulares resultantes dos processos metabólicos do organismo (Mill, 1964). Deste modo, mesmo em circunstâncias onde o genótipo das células e as condições

fisiológicas permitem a floculação, sua realização depende ainda de condições ambientais favoráveis (Esser & Kues, 1983).

Os fatores genéticos que envolvem a floculação são determinados por uma característica controlada geneticamente, sendo dominante sobre a não floculação (Strafford, 1992). Na linhagem comentada, ocorre a floculação que foi determinada por um loco simples, enquanto que outros resultados obtidos sugerem o envolvimento de três locos não ligados dentro de uma só linhagem. Com o aumento do número de genes dominantes cresceu a estabilidade da floculação, mas sua intensidade não foi alterada..

A floculação é afetada por fatores ambientais que podem ser agrupados em efeitos físicos, químicos e biológicos, de acordo com sua ação e sua influência. Podem exercer seu efeito por vários mecanismos, onde a ação individual de um fator sobre a floculação pode ser de maneira direta ou indireta ou dependendo da natureza da ação, esta pode ter efeitos reversíveis ou uma mudança permanente (Atkinson & Daoud, 1976).

Segundo Martins (1997) não há concordância na literatura quanto à explicação do processo de floculação, mas existem algumas hipóteses que tentam explicar o mecanismo pelo qual se efetiva a floculação. Dentre as teorias destacam-se a da floculação coloidal, a hipótese das pontes de cálcio, a teoria das lectinas e o modelo simbiótico.

A instabilidade das leveduras quanto à floculação traz prejuízos econômicos à indústria de cerveja. Algumas das causas da perda de floculação pode ser devido a alterações no meio de cultivo, mas não há dúvida que esta é uma propriedade instável (Stewart, 1975).

### **2.3 Fator “killer”**

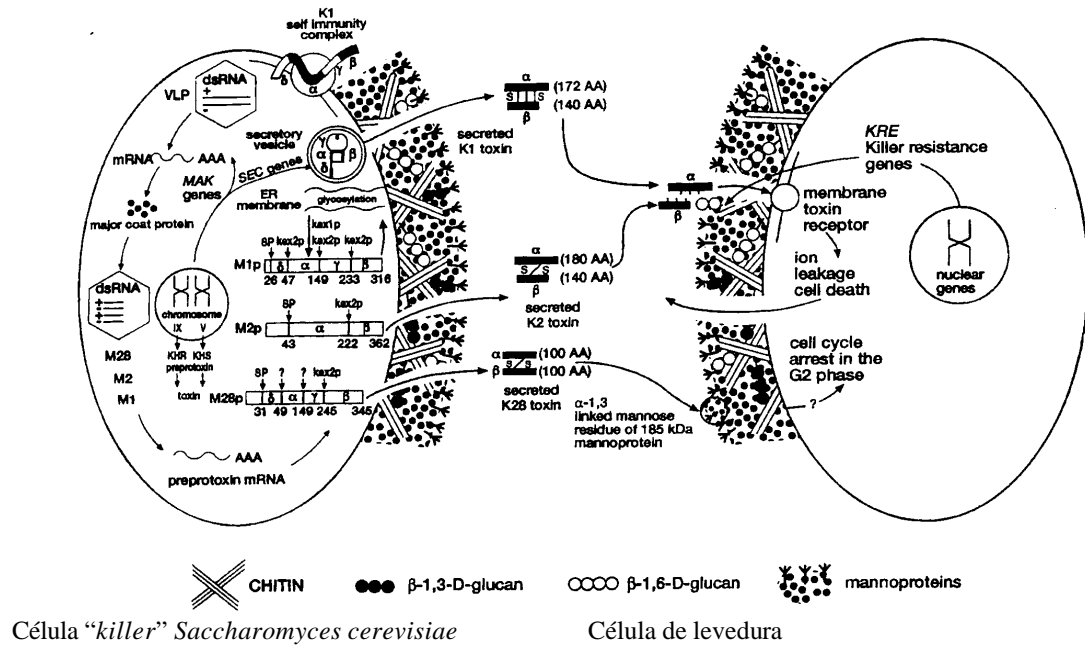
O fenótipo “killer” foi descrito pela primeira vez em linhagens de laboratório de *Saccharomyces cerevisiae* por Bevan & Makower, 1963. Estes pesquisadores

propuseram que certas cepas de *S. cerevisiae* podiam ser classificadas em um dos três fenótipos: “killer”, sensível e neutro. Quando células “killer” e sensíveis cresciam em um mesmo meio de cultura, uma grande proporção das células sensíveis morria. As células neutras não matavam células sensíveis, nem eram mortas por células “killer”.

Woods & Bevan (1968) verificaram que o efeito “killer” era causado por uma proteína extracelular sensível ao calor e a ação de proteases onde estabeleceram as condições necessárias para o crescimento de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e a produção de soluções estáveis de toxina. O pH ótimo para a produção e estabilidade da toxina em meio líquido esteve na faixa de pH 4,6 – 4,8 a 22<sup>0</sup>C. O fator “killer” foi inativado em temperaturas superiores a 25<sup>0</sup>C, em meio líquido tamponado e em temperaturas inferiores a 42<sup>0</sup>C, em meio sólido. O efeito “killer” foi também inativado por filtração ou quando vigorosamente aerado. A toxina apresentou espectro de ação altamente específico.

Azevedo (1998) comenta a presença do caráter “killer” em leveduras como *S. cerevisiae*, onde as linhagens “killer” secretam uma substância que mata linhagens sensíveis. Essas células “killer” têm um fator citoplasmático não encontrado em células sensíveis. Também existem células “neutras” que não produzem a substância que mata outras, mas também não são mortas por essa substância. O cruzamento de linhagem “killer” com linhagem sensível, tem como resultado toda descendência do tipo “killer”, enquanto os neutros cruzados com sensíveis dão todos descendentes neutros. Por sua vez, o cruzamento de “killer” com neutro dá proporções diversas de “killer” e neutros (4:0 até 0:4). A presença do fator citoplasmático de “killers” e também de neutros que possuem este fator mas não a substância secretora, é dependente de um gene nuclear chamado M ou +mak<sup>-1</sup>. Outros genes nucleares ( hex1 e hex2) convertem “killer” em neutros. Verificou-se que células “killer” e neutras contêm dois tipos de RNA de dupla fita em seu citoplasma, um grande e outro pequeno, encapsulados em partículas virais. A presença das partículas com o pequeno RNA de dupla fita é responsável pela produção de toxina, mas depende do alelo +mak<sup>-1</sup> e das partículas contendo o RNA grande de

dupla fita. Todos estes dados estão de acordo com o levantamento realizado por Magliani et al. (1997).



Suscetível

Figura 1 - Esquema genético, toxigênico, imunológico e de atividade para o sistema "killer" de *S. cerevisiae*.

Fonte: Magliani et al. (1997)

Young (1981) descreveu um procedimento no qual o caráter "killer", citoplasmaticamente hereditário, de uma linhagem de *S. cerevisiae* foi transferido a uma linhagem de levedura de cerveja. Não foram requeridos para o processo, a preparação dos protoplastos da levedura de cerveja nem tão pouco a mutação de seus genes nucleares. A linhagem "killer" de cerveja produzida teve vantagens em relação a seus parentes pois mataram células sensíveis e foram imunes ao fator "killer" de algumas

leveduras. O método descrito pelos autores ofereceu vantagens significativas no comando de processos que envolviam a manipulação genética de leveduras comerciais.

A ação letal da toxina sobre leveduras sensíveis não está relacionada com absorção do fator “*killer*” já que a ação “*killer*” pode ser diminuída pela variação das condições do meio. Segundo Woods & Bevan (1968), a ação letal do fator “*killer*” era muito semelhante àquela causada pelas colicinas produzidas por algumas bactérias, uma vez que matavam o organismo sem causar a lise da célula.

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

Os efeitos primários da toxina “*killer*” em *S. cerevisiae* foram reportados por De la Peña et al.(1980), imediatamente após a sua adição às células sensíveis de leveduras. Os pesquisadores observaram que quarenta minutos após a adição da toxina “*killer*” às células sensíveis, 50% delas já haviam morrido. Embora a fase lag tivesse sido cogitada como importante na ação da toxina, os autores desenvolveram experimentos que mostraram o efeito “*killer*” afetando a célula sensível imediatamente após a sua ligação à parede celular, por inibição do transporte de L-[<sup>3</sup>H]-leucina e de prótons que normalmente seriam transportados com aminoácido ou com a histidina para o interior da célula. A toxina “*killer*” também inibiu o bombeamento de prótons para o

meio em células que metabolizavam ativamente a glicose. Todos os efeitos dependeram da concentração da toxina no meio. Os resultados obtidos sugeriram que a toxina “*killer*” atuava modificando o gradiente eletroquímico de prótons através da membrana plasmática.

Maule & Thomas (1973), isolaram linhagens de leveduras “*killer*” contaminantes durante a produção de cerveja em sistema de fermentação contínua. Estas linhagens produziam fatores “*killer*”, altamente ativos na faixa de pH 3,8 – 4,2. Quando o nível de contaminação alcançou 2,0%, a concentração do fator “*killer*” foi suficiente para dar vantagem seletiva à levedura “*killer*” e a levedura de cerveja foi morta rapidamente. Com o predomínio das linhagens “*killer*”, a cerveja adquiriu sabor e aromas desagradáveis. As linhagens floculantes e não floculantes encontradas, mostraram características de *S. cerevisiae*, mas pareciam fermentar mais açúcares do mosto e apresentavam células pequenas e pleomorfas em cultura mista.

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

## **2.4 Cariotipagem Eletroforética**

O cariótipo é o conjunto completo de cromossomos de uma célula ou organismo. A cariotipagem consiste na determinação do tamanho e número cromossomal, sendo assim a cariotipagem eletroforética é o termo usado para designar a análise de cromossomos pela separação destes, quando submetidos a um ou mais campos elétricos.

Em leveduras, particularmente, a cariotipagem somente tem sido realizada pela separação eletroforética dos cromossomos intactos em gel de agarose. Os cromossomos uma vez separados no gel, são visualizados como bandas individuais, porém nem sempre o número de bandas observado corresponde exatamente ao número de cromossomos existentes nas células, pois alguns cromossomos podem exibir o mesmo peso molecular, resultando em uma única banda.

A técnica da cariotipagem é baseada na separação eletroforética do DNA cromossômico intacto (moléculas que se diferenciam tanto em número como em tamanho, contidas no núcleo da levedura e primordialmente relacionada com suas características genéticas, podendo ser observado na figura abaixo), tem se mostrado como uma excelente ferramenta na diferenciação de gêneros, espécies, bem como de diferentes linhagens de uma mesma espécie (Basso, 1996).

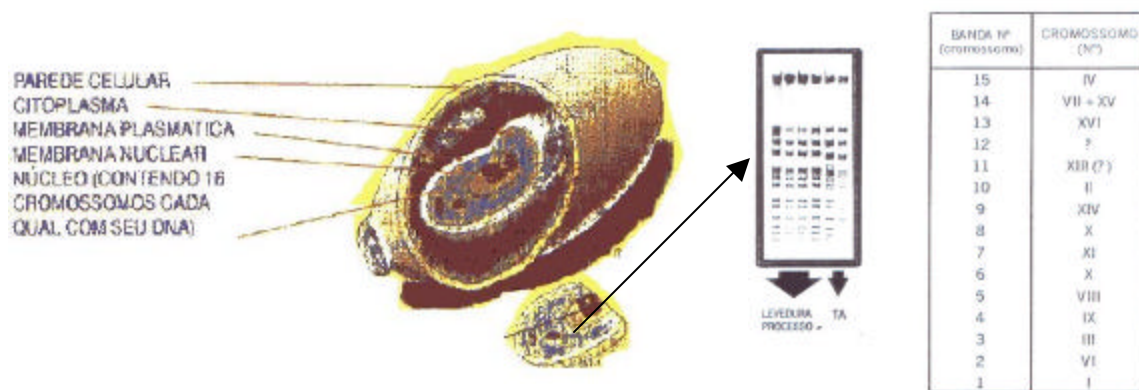


Figura 2 - Esquema de uma célula de levedura em corte apresentando destaque para os cromossomos presentes no núcleo e suas distribuições no gel de eletroforese, de acordo com seus tamanhos.

Fonte: Angier (1986)

Em indústrias que utilizam leveduras do gênero *Saccharomyces*, tais como destilarias, cervejarias, indústrias de vinho e de panificação, a eletroforese de campos pulsados constitui uma tecnologia, com imediata aplicação em controle de qualidade e programas de desenvolvimento e pesquisa, uma vez que os perfis eletroforéticos dos cromossomos das leveduras permitem a distinção das mesmas em nível de linhagens (Casey et., 1988).

Este fato pode ser confirmado pela pesquisa realizada por Vezinhet et al. (1990), onde 22 linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* produtoras de vinho, tiveram seus cromossomos separados eletroforeticamente, utilizando-se da modalidade TAFE, cujos resultados demonstraram que nenhuma das 22 linhagens estudada apresentou similaridade com o perfil eletroforético de uma linhagem usada como referência. Além disso, 19 linhagens apresentaram perfis diferentes entre si, com variações na posição, número e intensidade das bandas. Dessa forma, o polimorfismo cromossomal observado, indica que a técnica utilizada é uma ferramenta que auxilia na identificação e controle das linhagens industriais.

A cariotipagem eletroforética, modalidade TAFE, também foi utilizada por Basso et al.(1992) durante o monitoramento da permanência de leveduras melhoradas (levedura “TA” e uma linhagem “não floculante”) empregadas em destilarias separadas de uma mesma unidade industrial, monitoramento este, realizado durante a safra 91/92. Através da análise dos perfis eletroforéticos obtidos, constatou-se que as duas linhagens melhoradas não conseguiram competir com aquelas existentes no ambiente das destilarias e que, portanto, as leveduras selvagens dominaram o processo.

Durante a safra 92/93, Basso et al. (1993), realizaram novamente um acompanhamento em unidades industriais para se verificar a estabilidade das leveduras nas dornas de fermentação, pela análise de seus perfis eletroforéticos. Das 6 destilarias acompanhadas, apenas uma, a qual iniciou o processo com “fermento” próprio, permaneceu com o mesmo “fermento” ao longo da safra; nas outras 5 destilarias, contudo, os “fermentos” iniciais (“TA” ou “Fleischmann”) foram dominados por outras



leveduras. As leveduras contaminantes mostraram perfis eletroforéticos distintos, evidenciando a existência de uma população extremamente variada nas dornas de fermentação; mesmo assim, tais leveduras em grande parte, se mostraram geneticamente mais próximas entre si do que em relação aos “fermentos” “TA” e “Fleischmann”.

Já o monitoramento durante a safra 93/94 realizada por Basso et al. (1994), envolveu um número maior de unidades industriais que a safra anterior. Dentre as leveduras iniciais utilizadas (principalmente “JA-1”, “TA” e “Fleischmann”), a levedura “JA-1” mostrou maior habilidade de permanência no processo, sendo que o aparecimento de leveduras contaminantes variou com a destilaria em questão. As leveduras contaminantes normalmente se constituíram de diferentes *Saccharomyces*, algumas se mostrando como dominantes, outras como persistentes; leveduras não *Saccharomyces* apareceram em menor frequência, porém sem permanência no processo. Os dados em questão, foram obtidos pela cariotipagem eletroforética dos cromossomos, onde se utilizou novamente a modalidade TAFE.

## **2.5 Fusão de protoplastos em levedura**

Nas leveduras que possuem ciclo sexual nem sempre os cruzamentos são possíveis devido à incompatibilidade que ocorre em diferentes linhagens. A situação se complica ainda mais quando se tenta fazer cruzamentos intergenéricos ou interespecíficos. Essa incompatibilidade explica-se muitas vezes pela parede celular que impede a anastomose. As possibilidades de produzir células sem parede celular (protoplastos) e a fusão destas células permitiram cruzamentos entre linhagens de uma mesma espécie antes incompatíveis. Também a retirada da parede celular possibilita cruzamentos entre espécies ou gêneros distintos de leveduras, embora nem sempre os produtos de fusão sejam totalmente viáveis.

Os protoplastos podem ser obtidos de diferentes maneiras mas, de um modo geral, o tratamento de uma levedura com enzimas que destroem a parede celular é o preferido. Isso é feito em meio de cultura com alta concentração de sais ou açúcares (estabilizadores osmóticos), para evitar o rompimento das células. Obtidos os

protoplastos, a fusão pode ser feita por adição de agentes fusogênicos ao meio, como o polietileno glicol (PEG). De muitos protoplastos formados, apenas alguns sofrem fusão. É necessário então uma seleção dos produtos de fusão, o que é facilitada se forem usadas linhagens de leveduras com mutantes apropriados : auxotróficos, resistentes a drogas etc. Uma outra técnica de seleção de produtos de fusão utiliza mutantes resistentes a agentes inibidores. Em leveduras como *Saccharomyces cerevisiae* , o método é bastante eficiente, pois mutantes mitocondriais, que conferem resistência a antibióticos como: cloranfenicol e eritromicina, podem servir como bons marcadores seletivos (Azevedo, 1998).

A técnica de fusão de protoplastos é uma ferramenta muito útil no estudo da genética de vários microrganismos. Os protoplastos podem ser obtidos de diferentes modos e segundo a revisão feita por Ferenczy (1985), as diferenças apresentadas nos protocolos de obtenção, regeneração e fusão de protoplastos são decorrentes de variações nos requerimentos utilizados tais como: enzimas e seus aditivos, estabilizadores osmóticos e agentes fusionantes e seus aditivos. Há também variações quanto ao tempo de exposição à enzima. Esta diversidade aponta para a necessidade de adequação dos protocolos para cada linhagem a ser tratada.

Em um experimento de fusão de protoplasto conduzido por Sulo et al. (1992) obteve-se a expressão do fenótipo “killer” de *Saccharomyces cerevisiae* em leveduras comerciais de vinho. A fusão foi interespecífica, utilizando linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces oviformis*. A qualidade dos vinhos resultantes da fermentação destes híbridos foi similar á qualidade dos vinhos obtidos a partir das linhagens parentais. Quanto ao fenótipo “killer”, sua estabilidade foi maior nas linhagens originais, mais sua atividade nos híbridos foi suficiente para suprimir linhagens indesejáveis.

Javadekar et al. (1995) construíram uma linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* altamente floculante associada ao caráter killer. Nesta fusão os protoplastos com o fenótipo “killer” foram mortos por exposição à luz ultravioleta enquanto que os

protoplastos com a característica floculante foram mantidos vivos. Os fusionantes foram selecionados pela resistência ao benomyl.

Martins et al. (1999) obtiveram linhagens floculantes e H<sub>2</sub>S negativas por fusão de protoplasto. A instabilidade inicial observada para estes fenótipos foi atribuída à distância taxonômica entre as espécies parentais comprovada por eletroforese do DNA intacto destes parentais.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Material biológico

Foram utilizadas as seguintes linhagens da levedura *Saccharomyces cerevisiae*:

**ATCC 26602** : linhagem altamente floculante obtida junto à Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia “André Tosello” - CCT/FTPTAT, Campinas - SP.

**AH<sub>22</sub>** : linhagem “killer” sensível fornecida pela empresa Fermentec S/C Ltda Assistência Técnica em Fermentação, Piracicaba - SP.

**KD<sub>1</sub> e KD<sub>2</sub>** : linhagens “killer” selvagens fornecidas pela empresa Fermentec S/C Ltda Assistência Técnica em Fermentação, Piracicaba - SP.

**SL<sub>1</sub>V<sub>5</sub>12L** : linhagem “killer” cedida pelo Departamento de Tecnologia Agro-industrial e Sócio-Economia Rural da CCA/UFSCar, Araras - SP.

**K<sub>1</sub> e 20B** : linhagem “killer” obtida junto ao Laboratório de Microbiologia da EMBRAPA/CNPUV, Bento Gonçalves - RS.

## 3.2 Métodos

Os experimentos foram conduzidos nos seguintes laboratórios:

1 Laboratório de Açúcar e Álcool do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, LAN-ESALQ/USP: testes para a produção de H<sub>2</sub>S e de floculação do material citado em **3.1**.

2 Laboratório de Genética de Fungos Filamentosos do Departamento de Genética, LGN-ESALQ/USP: fusão de protoplastos das linhagens selecionadas.

3 Laboratório de Microrganismos do Departamento de Tecnologia Agroindustrial e Sócio-Economia Rural da CCA/USFCar: teste para detecção de fenótipo “*killer*”.

4 Laboratório do Setor de Bioquímica do Departamento de Ciências Biológicas, LCB-ESALQ/USP: cariotipagem eletroforética..

### 3.2.1 Meios de Cultura

Os meios de cultura foram esterilizados em autoclave a 121<sup>0</sup>C e 1 atm por 20 minutos.

#### a) Meio Completo (YEPD - Mortimer & Hawthorne, 1969)

Extrato de levedura	10 g
Peptona	20 g
Glicose	20 g
Água destilada	1000 mL

Para o preparo do meio sólido, 20 gramas de agar foram adicionados. O pH não foi ajustado. Este meio foi utilizado para a manutenção de culturas e seu crescimento.

**b) Meio WL Nutrient Medium Desidratado (DIFCO) Ceccato - Antonini & Silva, 2000)**

WLN	80 g
Água destilada	1000 mL
Agar	10 g

Após reidratá-lo, aquecer até ferver para dissolver completamente o meio.

Este meio foi utilizado para a manutenção inicial das culturas (meio diferencial para a identificação de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*).

**c) Meio BSA (Bismuth sulfite agar desidratado – DIFCO)**

BSA	52 g
Água deionizada	1000 mL

Após ser reidratado o meio foi aquecido até fervura para dissolver, por no máximo 2 minutos. Este meio foi utilizado para determinação qualitativa do caráter H<sub>2</sub>S.

**d) Meio de esporulação – Rafinose Acetato (RA)**

Solução A: Rafinose 2,2%

Solução B: Acetato de potássio 20%

Um mililitro da solução A e 1 mL da solução B foram misturadas e o volume ajustado para 200 mL com água destilada. A este foram adicionados 4 g de agar. Este meio é um indutor de esporulação.

**e) Meio YEPD de regeneração**

Este meio foi preparado como descrito no item 3. 2. a e a estabilidade osmótica foi obtida pela adição de 0,6 M de sorbitol. O presente meio foi utilizado na regeneração de protoplastos em experimento para determinar a porcentagem de protoplastização, de regeneração e na fusão propriamente dita.

**f) Meio BSA seletivo**

Este meio foi preparado segundo descrição no item 3.2.c e a estabilidade osmótica foi obtida pela adição de 0,6 M de sorbitol. A este meio foi adicionado o antifúngico Benlate na concentração de 0,15 mg/mL de meio BSA. Este meio foi utilizado na seleção de híbridos obtidos por fusão de protoplasto.

**3.2.2 Soluções, Tampões e Reagentes****a) Solução salina (0,85%)**

NaCl 8,5 g

Água destilada 1000 mL

A solução foi acondicionada em frasco com 10 e 9 mL, autoclavada a 120<sup>0</sup>C por 20 minutos e conservada em geladeira. Foi utilizada para fazer suspensões celulares e diluições.

### **b) Tampão citrato fosfato**

Para o preparo de 500 mL de meio:

6,155 g de ácido cítrico em 293 mL de água destilada;

14,422 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> em 207 mL de água destilada.

Medir o pH da solução de ácido cítrico e adicionar o fosfato até o pH 4,3. Nessa solução tampão adicionar:

Extrato de levedura	5 g
Peptona	10 g
Glicose	10 g

Dissolver bem. Medir o volume do meio e na diferença até o volume de 500 mL, dissolver 12 g de ágar. Esterilizar na autoclave (120<sup>0</sup>C/20 minutos). Após a esterilização, misturar o conteúdo dos dois frascos. Esperar esfriar e retirar uma pequena amostra e medir o pH que deverá ser em torno de 4,5 a 4,7. Acrescentar ao final nesta solução 1mL de solução de azul de metileno. Este tampão adicionado ao meio completo YEPD foi utilizado para a detecção de fenótipo "killer".

Todos os itens a seguir foram usados na técnica de cariotipagem:



**c) Tampão TE (500 mL)**

Tris	600 mg
------	--------

EDTA ácido	146 mg
------------	--------

Ajustado o pH para 8,0 foi autoclavado e armazenado em geladeira.

**d) Tampão TAFE (1000 mL)**

Tris	24,2 g
------	--------

EDTA ácido	2,9 g
------------	-------

Ácido acético glacial	5,0 mL
-----------------------	--------

O tampão foi autoclavado e armazenado em geladeira.

**e) Tampão CPE (200 mL)**

Ácido cítrico	1,68 g
---------------	--------

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3,41 g
----------------------------------	--------

EDTA.Na <sub>2</sub>	1,49 g
----------------------	--------

O tampão foi autoclavado e armazenado em geladeira.

**f) Tampão CPES (25 mL)**

Ácido cítrico	0,210 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,426 g
EDTA.Na <sub>2</sub>	0,186 g
Sorbitol	5,630 g
Dithiothreitol	0,020 g

Foram distribuídos 3 mL por tubo de ensaio com tampa rosqueada, autoclavado e guardado em câmara fria.

**g) Solução 3 (200 mL)**

EDTA.Na <sub>2</sub>	33,50 g
Tris	0,24 g
Lauryl Sulfato de Sódio	2,0 g

O pH da solução foi ajustado para 9,0 com NaOH e em seguida a solução foi autoclavada e armazenada em geladeira.

**h) Solução de EDTA.Na<sub>2</sub> (650 mL)**

EDTA.Na <sub>2</sub>	121 g
----------------------	-------

O pH da solução foi ajustado para 8,0 com NaOH e a solução foi autoclavada e guardada em geladeira.

**i) Solução enzimática**

Novozym 234 (Lising-enzymes) 7 mg

CPES 1 mL

A solução foi mantida em frasco escuro em congelador.

**j) Solução de Proteinase K**

Proteinase K 0,75 mg

Solução 3 1 mL

Foi utilizado 0,4 mL por amostra.

**k) Solução de Brometo de Etídio**

Brometo de etídio 0,5 mg

Tampão TAFE diluído 1 mL

Da solução acima, foi retirado 0,30 mL e foi diluído em 250 mL de Tampão TAFE diluído.

**l) Agarose do Plug**

Agarose 75 mg

CPE 6,25 mL

Foi utilizado 40  $\mu\text{L}$  por amostra.

Todos os itens a seguir foram usados na fusão de protoplasto:

**m) Solução tampão fosfato sorbitol (TSP 1M)**

Solução A: 0,2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4$	210 mL
Solução B: 0,2 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4$	40 mL
Sorbitol	91 g

As soluções A e B foram misturadas e o volume foi levado até 450 mL com  $\text{H}_2\text{O}$  destilada e o pH foi ajustado para 7,5 com uma das soluções. Após a adição do sorbitol o volume foi finalmente completado para 500 mL.

Solução A: 0,2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4$	28,39 g
Água destilada	1000 mL
Solução B: 0,2 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4$	5,52 g
Água destilada	200 mL

As soluções A e B foram conservadas em refrigerador e o tampão foi preparado fresco.

**n) Solução de EDTA 10 mM**

EDTA. $\text{Na}_2$	3,7225 g
Água destilada	1000 mL

O pH foi ajustado com pastilhas de NaOH e a solução foi autoclavada e mantida em temperatura ambiente.

**o) Solução enzimática para obtenção de protoplastos**

Enzima lítica 200 mg

Água destilada esterilizada 2 mL

A solução foi mantida em frasco escuro em congelador.

**p) Solução de cloreto de cálcio (1,2M)**

CaCl<sub>2</sub> 6,6528 g

Água destilada 50 mL

A solução foi autoclavada e mantida em temperatura ambiente.

**q) Solução fusogênica (PEG 40%)**

PEG 2 g

CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 5,5 mg

TSP 5 mL

A solução foi autoclavada e mantida no refrigerador.

**r) Solução de sorbitol**

Sorbitol	18,2 g
Água destilada até	100 mL

A solução foi autoclavada e mantida em refrigerador.

**s) Solução de Benlate ( metil-butil-carbamoil-2-benzimidazole carbamato)**

Benlate (50% Benomyl)	20 mg
Água destilada	10 mL

Foi preparada de acordo com Hastie (1970). Foi adicionado Benlate em água destilada, previamente esterilizada e a solução foi levada ao banho-maria por 15 minutos. Depois de pronta, a solução foi mantida em refrigerador.

**3.2.3 Teste Potencial para a Produção de H<sub>2</sub>S**

Este método foi utilizado por Zambonelli (1964) para a identificação de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* deficientes na atividade da enzima sulfito redutase e foi validado como uma metodologia rápida para a seleção de linhagens H<sub>2</sub>S<sup>-</sup> para uso vinícola por Jiranek et al (1995).

O método consiste na transferência das linhagens através de estrias para meio Bismuth Sulfite Agar (DIFCO) seguindo-se incubação por 24 a 48 horas em estufa a 28<sup>o</sup>C. Após este período, as estrias foram observadas quanto à coloração. As estrias que resultaram na cor branca foram identificadas como sendo linhagens H<sub>2</sub>S<sup>-</sup> e as estrias pretas ou enegrecidas de linhagens H<sub>2</sub>S<sup>+</sup>.

### 3.2.4 Teste de Flocculação

As linhagens foram inoculadas em tubos de ensaio contendo aproximadamente 10 mL de meio YEPD líquido e foram incubadas a 28<sup>o</sup>C por 48 horas. Transcorrido o período de incubação, a cultura depositada no fundo do tubo foi homogeneizada com meio de cultura em agitador tipo Vortex e a avaliação consistiu na visualização dos flocos suspensos no meio de cultura, assim como foi proposto por Suzzi et al. (1984).

### 3.2.5 Teste para Detecção de Fenótipo “killer”

As células da linhagem sensível de *Saccharomyces cerevisiae* AH<sub>22</sub>, das linhagens “killer” *S. cerevisiae* K<sub>1</sub>, KD<sub>1</sub>, KD<sub>2</sub>, 20B e SL<sub>1</sub>V<sub>5</sub>12L e da linhagem floculante ATCC 26602 (originalmente estas linhagens foram recebidas em placas ou tubos com meio YEPD) foram obtidas de placas contendo o meio YEPD e transferidas para tubos de ensaio contendo solução salina estéril em concentração de 10<sup>6</sup> – 10<sup>7</sup> células/mL.

A levedura sensível foi espalhada (0,1mL) sobre meio YEPD - azul de metileno (YEPD + 0,003% azul de metileno + tampão citrato – fosfato pH 4,5) em placas em duplicata com alça de Drigalsky, segundo técnica descrita por Woods & Bevan (1968) e Fink & Styles (1972). As linhagens “killer” e floculante a serem testadas quanto ao caráter killer foram inoculadas nessas placas com alça de níquel cromo, onde a massa celular foi inoculada na forma de ponto (5 mm de diâmetro).

Após 48 horas de incubação a 25<sup>o</sup>C, as colônias “killer” foram confirmadas e detectadas nas placas pelo aparecimento de zonas de inibição da levedura inoculada ou pelo surgimento de halos azul-escuros formados pelas leveduras mortas coradas pelo azul de metileno (Borzani e Vairo,1970).

### 3.2.6 Cariotipagem Eletroforética

As leveduras foram estriadas em meio de cultivo sólido YEPD e incubadas à 30<sup>0</sup>C por 24/48 horas. Após a incubação, as leveduras foram submetidas à separação eletroforética do DNA cromossômico intacto (técnica de cariotipagem), segundo Basso et al. (1994).

Para tal, as colônias isoladas foram submetidas à digestão enzimática da parede celular (com Novozyme 234) e das proteínas e lipoproteínas (com proteinase K e laurilsulfato). O material assim obtido, fixado em gel de agarose, foi submetido à eletroforese de pulso a 13<sup>0</sup>C, modalidade TAFE, empregando-se equipamento Beckmann modelo Gene-Line, programado para 150mA por 18 horas com pulsos de 1 minuto, seguido de 170mA por 1 hora com pulsos de 10 segundos. Após a corrida eletroforética, o gel foi corado com brometo de etídio e foi fotografado com auxílio de um transluminador ao ultravioleta.

A análise propriamente dita foi realizada mediante a comparação dos perfis eletroforéticos das leveduras amostradas com os perfis da levedura floculante (ATCC 26602), obtendo-se assim, a caracterização das leveduras em estudo.

A figura 3 apresenta o procedimento para a cariotipagem eletroforética, conforme mostrado a seguir.



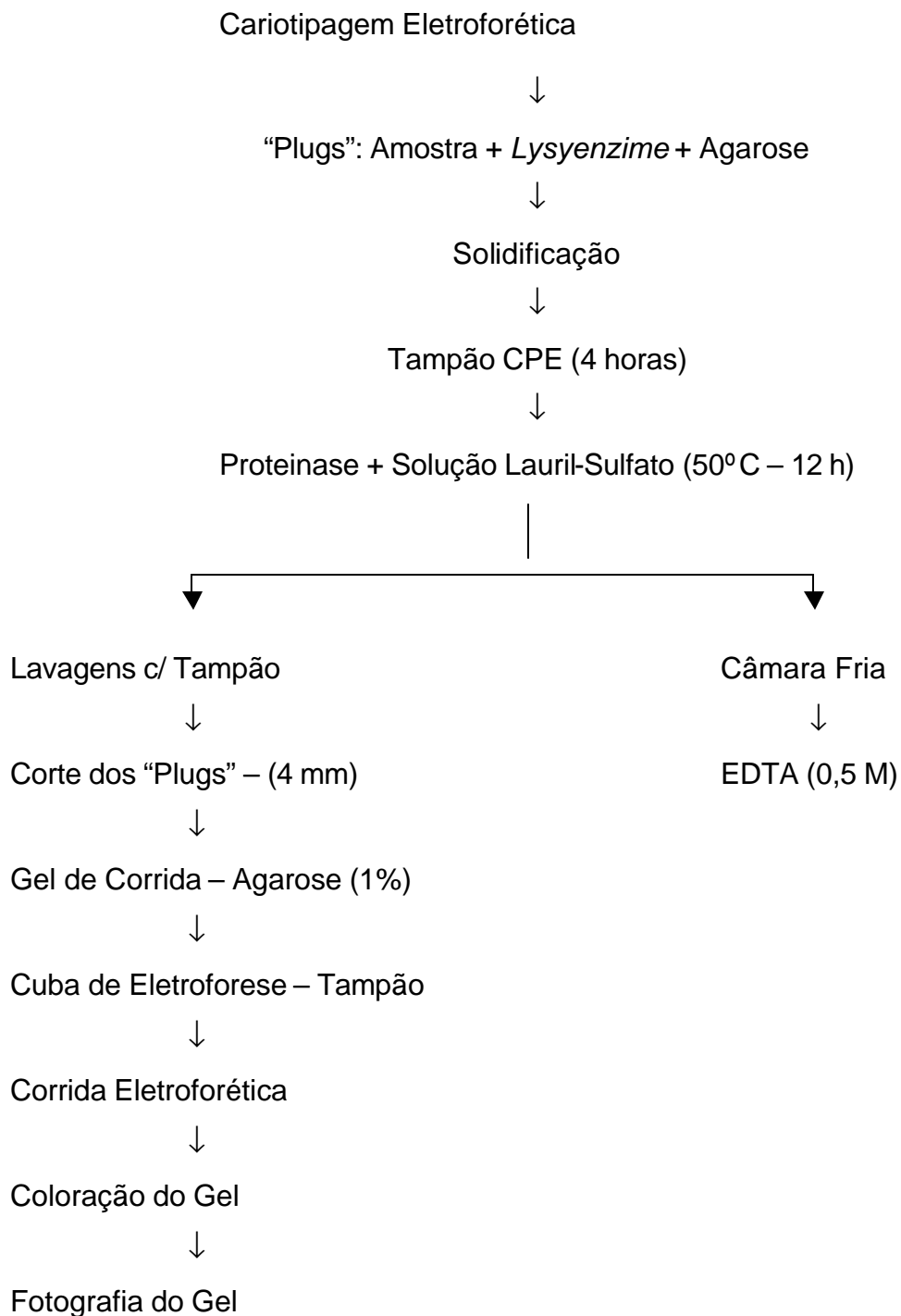


Figura 3 - Procedimento para Cariotipagem Eletroforética.

### **3.2.7 Observação em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) de células intactas de leveduras**

Foi realizado o estudo morfológico das linhagens de leveduras ATCC 26602 (floculante) e K<sub>1</sub> (“*killer*”) através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Estas análises foram executadas no Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica aplicada à Pesquisa Agropecuária (NAP/MEPA), centro localizado na ESALQ/USP.

A integridade da parede celular das células é observada ao MEV e pressão variável LEO435 VP. As células foram tratadas primeiramente com fixador de Karnovsky modificado (Kitajima, 1997), sendo a seguir fixadas com tetróxido de ósmio seguindo-se desidratação com cetona e secagem ao ponto crítico. Após a montagem dos “*stubs*” foi feita metalização com ouro.

### **3.2.8 Fusão de Protoplastos**

A fusão de protoplastos com seleção de conjugantes foi baseada em caracteres naturais, sendo o meio seletivo para a recuperação de híbridos obtidos por fusão de protoplastos formulados em função dos requerimentos e características de assimilação das linhagens parentais (Laguna,1983).O meio utilizado como seletivo está descrito no item 3.2.1.(f) . O teste de resistência a Benomyl (possibilidade em usar como marca de fusão nuclear) foi feito com concentrações de 0,10 mg/mL, 0,15 mg/mL e 0,20 mg/ mL de Benlate adicionado ao meio BSA com o estabilizador osmótico sorbitol ( nas concentrações de 0,6 M; 0,8 M e 1 M de Sorbitol) .

A esferoplastização e posterior fusão de protoplasto foi feita seguindo o protocolo de Laguna (1983) e modificado de acordo com as necessidades deste trabalho.

As linhagens foram cultivadas em 100 mL de YEPD líquido até o final da fase exponencial de crescimento ( $1-5 \times 10^7$  cels/mL).

As células foram coletadas por centrifugação a 3500 g e lavadas duas vezes em EDTA 10 mM. A densidade de células foi ajustada para  $1 \times 10^8$ /mL (4 a 5 mL).

**Obs.:** 0,1 mL desta suspensão foi plaqueada em meio seletivo e 0,1 mL de uma diluição  $10^{-5}$  foi plaqueada em YEPD, ambos tratamentos com 3 repetições a fim de determinar a frequência de reversão ou aparecimento de crescimento residual.

À suspensão de células foi adicionado 2-mercaptoetanol até 1% e incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente. As células foram então coletadas por centrifugação a 1000 g (5 minutos), lavadas duas vezes com tampão estabilizador (TSP) e finalmente ressuspensas em 3 mL do tampão (solução de EDTA 10 mM). A esta suspensão foi adicionado em uma proporção de 0,1 mL de solução lítica para cada mL de suspensão celular.

A suspensão foi incubada a 30°C e observada microscopicamente em períodos de 30 minutos até obter 95 a 100% de esferoplastização.

Os esferoplastos foram recuperados por centrifugação a 1000 g e lavados 3 vezes em tampão TSP e finalmente ressuspensos em 1 mL de solução de sorbitol com 0,25 mL de solução de  $\text{CaCl}_2$  1,2 M. Quantidades iguais de protoplastos das linhagens foram misturadas e centrifugadas a 1000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi removido e os protoplastos ressuspensos no resto do tampão. A esta mistura foi adicionado 1 mL de solução fusogênica (PEG) e incubada após leve agitação a 30°C por 30 minutos.

Após este tempo, foram adicionadas 3 mL de solução de sorbitol e as células foram lavadas 3 vezes com tampão sorbitol. A suspensão foi então diluída convenientemente e plaqueada em meio seletivo de regeneração colocando por cima das células uma pequena camada do mesmo meio. Para estimar a frequência de fusão também foram plaqueadas 3 repetições em YEPD de regeneração em diluição de  $10^{-5}$ . As placas foram incubadas por 5 a 10 dias a 30°C.

### 3.2.9 Teste de Estabilidade dos Produtos de Fusão

Algumas colônias consideradas híbridas foram avaliadas quanto a sua estabilidade. Após o crescimento em meio seletivo, foram transferidas para meio YEPD sólido e incubadas por 48 horas. A seguir, cada colônia foi inoculada em 100 mL de YEPD líquido em frascos de erlenmeyer e colocadas para incubar em agitador a 150 rpm a 30<sup>0</sup>C por 24 horas. Destas culturas, um mililitro foi transferido para outro erlenmeyer contendo YEPD líquido e incubado nas mesmas condições por mais 24 horas. O último procedimento foi repetido mais uma vez, perfazendo o total de três subcultivos. No terceiro subcultivo foi retirada uma alíquota de 0,1 mL e efetuadas as devidas diluições e procedida à inoculação das culturas obtidas a partir dos produtos de fusão avaliados, sendo estas incubadas em estufa a 30<sup>0</sup>C. As colônias que cresceram isoladas foram testadas quanto a produção de H<sub>2</sub>S, flocculação e o fator “*killer*”. Após 3 subcultivos, os produtos de fusão que apresentassem 100% de colônias H<sub>2</sub>S, flocculantes e “*killer*” eram considerados estáveis.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Teste Potencial para Produção de H<sub>2</sub>S e Floclulação

Os testes aplicados nas sete linhagens para a confirmação ou ausência das características para a produção de H<sub>2</sub>S e a capacidade de floclular estão no quadro 1.

Linhagem	Floculante	H <sub>2</sub> S
ATCC 26602	+	+
AH <sub>22</sub>	-	+/-
KD <sub>1</sub>	-	-
KD <sub>2</sub>	-	+
SL <sub>1</sub> V <sub>5</sub> 12L	-	+
K <sub>1</sub>	-	-
20 B	-	+/-

Quadro 1 - Característica das linhagens selecionadas para estudos de floclulação e produção de H<sub>2</sub>S.

(+) indica presença da característica

(-) indica ausência da característica

A linhagem ATCC 26602 apresentou-se altamente floculante, enquanto que as demais linhagens possuíam baixa ou nenhuma capacidade floculante. A floculação é uma das importantes propriedades determinadas em linhagens de leveduras utilizadas em fermentações industriais como: cervejaria; vinificação; produção de etanol e produção de biomassa (Martins, 1997).

O interesse da floculação de *Saccharomyces cerevisiae* se dá por dois motivos: o primeiro, diz respeito à separação econômica das células do produto fermentado no final da fermentação, enquanto que o segundo deriva do interesse comercial do uso de leveduras imobilizadas em fermentações (Stratford, 1992).

As linhagens K<sub>1</sub> e KD<sub>1</sub> apresentaram baixa ou nenhuma produção de H<sub>2</sub>S, o que as tornaram as melhores linhagens de leveduras selecionadas para a fermentação.

A habilidade das leveduras para formar H<sub>2</sub>S tem grande importância comercial. Quase todas as linhagens utilizadas comercialmente podem reduzir sulfato a sulfeto e as enzimas responsáveis foram isoladas de diversas linhagens de *Saccharomyces* (Martins, 1997).

Giudici & Kunkee (1994) afirmaram que a linhagem da levedura influencia fortemente a quantidade de H<sub>2</sub>S produzido, onde linhagens sem ou com baixa atividade de sulfito redutase nunca produziram quantidades detectáveis de H<sub>2</sub>S.

Estudos realizados por Zambonelli (1964) constataram que nas linhagens H<sub>2</sub>S negativas a falta de capacidade de produzir hidrogênio sulfurado é uma característica fixa e que não se perde com as sucessivas transferências da cultura; sendo este um caráter estável, constante e controlado geneticamente.

#### **4.2 Detecção do Fenótipo “killer”**

As linhagens “killer” ( KD<sub>1</sub>, KD<sub>2</sub>, K<sub>1</sub>, 20B e SL<sub>1</sub> V<sub>5</sub>12L) e a linhagem “killer” sensível AH<sub>22</sub> foram testadas para a confirmação da atividade “killer”, que ficou evidenciada através do halo de inibição de crescimento da levedura sensível em torno da

levedura “killer” (figura 4).As células das leveduras foram mortas devido à ação da toxina “killer” que adquiriu a coloração azul devido à adsorção do azul de metileno. O azul de metileno possui cargas positivas, que combinam fortemente com os constituintes celulares da levedura e são carregados negativamente (ácidos nucléicos e polissacarídeos ácidos), segundo Borzani & Vairo (1970).



Figura 4 - Placa com meio de cultivo indutor que exibe halo de inibição da levedura sensível AH<sub>22</sub> em torno da levedura “killer” K<sub>1</sub>.

A capacidade de produzir o fator “killer” pode conferir uma vantagem seletiva sobre linhagens crescendo em competição com células sensíveis. Leveduras “killer” excretam proteínas letais às células de leveduras sensíveis de sua própria espécie e ou de espécies ou gêneros distintos. Vários estudos relataram a presença deste fenótipo em processos fermentativos. Linhagens produtoras de fator “killer” têm sido descritas em *Saccharomyces* e em pelo menos mais oito gêneros de leveduras (Soares, 1998).

Silva (1996) relatou a ocorrência de leveduras “killer”, sensíveis e neutras em mosto de uva no sul do Brasil. A sensibilidade e a característica neutra mostraram

ser dependente do meio e da linhagem “*killer*”. Interações entre os três fenótipos simultaneamente revelaram que algumas estirpes neutras pareciam proteger estirpes sensíveis contra a toxina “*killer*” devido a um efeito de diluição.

Ceccato-Antonini & Parazzi (1996) estudaram leveduras produzidas industrialmente para inóculo em fermentações para produção de álcool ou rum caracterizadas quanto à presença de fator “*killer*”. O interesse para tal pesquisa está na possibilidade de usar linhagens “*killer*” de *Saccharomyces cerevisiae*, espécie que apresenta ampla distribuição do caráter “*killer*”, como inóculo selecionado para fermentação, usando-o para prevenir o crescimento de linhagens selvagens.

### **4.3 Cariotipagem Eletroforética**

A cariotipagem das leveduras testadas (figura 5) possui um perfil eletroforético bem conhecido. O DNA cromossomal de *Saccharomyces cerevisiae* é separado em 12 a 15 bandas com tamanhos conhecidos variando de 260 Kb (cromossomo I) à aproximadamente 2200 Kb (cromossomo XII) e algumas bandas são duplas por apresentarem cromossomos de mesmo peso molecular.



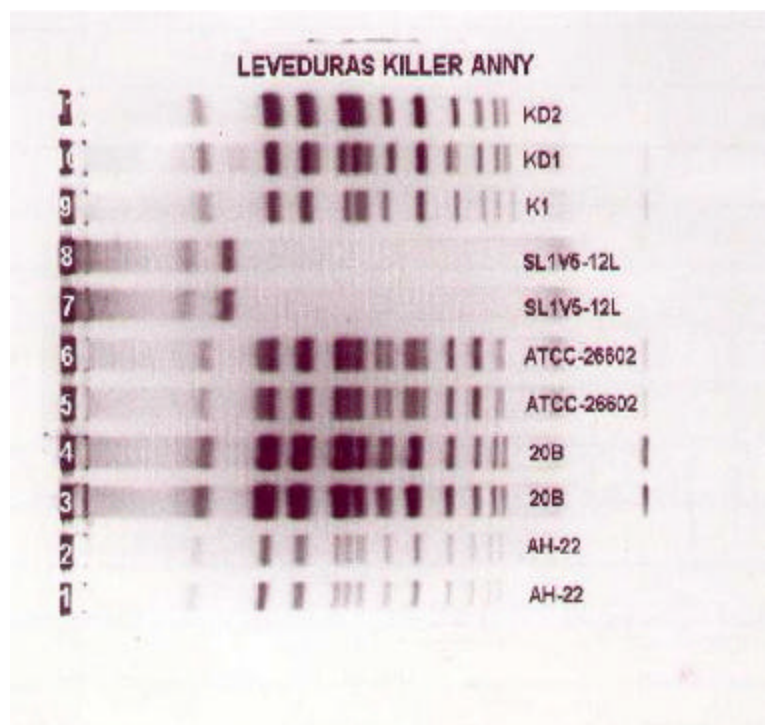


Figura 5 - Perfil eletroforético das linhagens “killer” e flocculante.

As exceções feitas a esse julgamento são as respostas obtidas pela linhagem “killer” SL<sub>1</sub>V<sub>5</sub>12L e a linhagem “killer” sensível AH<sub>22</sub> que descaracterizam completamente o perfil eletroforético de *Saccharomyces cerevisiae*. Seus cariótipos estão muito próximos ao obtido por Martins (1997) e Martins et al (1999) para a linhagem IZ 987. Os autores julgaram esta linhagem como não pertencente ao gênero *Saccharomyces*, pois a linhagem IZ 987 mostrou a resolução de somente 6 bandas cromossômicas, e assim nota-se como as linhagens “killer” e sensível possuem um número semelhante de bandas em seus perfis eletroforéticos.

A cariotipagem eletroforética é útil para a distinção entre espécies e linhagens como no caso do processo de fermentação alcoólica, em que a eletroforese pode ser utilizada com o propósito de se identificar leveduras, quer na verificação de

leveduras contaminantes, quer na constatação da permanência do fermento selecionado ao longo da safra (Basso, 1990).

A técnica tem se mostrado bastante eficiente para diferenciar gênero, espécies e linhagens de uma mesma espécie nas indústrias de vinho, cervejas e nas destilarias de álcool combustível. O perfil eletroforético evidencia muitas leveduras diferentes entre si, mas em todas que possuem uma banda de alta mobilidade eletroforética, suspeita-se que este perfil esteja relacionado com a característica “killer” (Basso, 1993).

Araujo et al. (1999) verificaram, com a técnica de cariotipagem, a ocorrência de polimorfismos cromossômicos, sendo que todas as amostras testadas apresentaram perfis diferentes entre si. O estudo do cariótipo permitiu observar que existe uma sucessão de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* durante o processo fermentativo na indústria de aguardente.

Naumov et al. (1993) investigaram a homologia genética entre três espécies aparentadas do gênero *Saccharomyces* por cariotipagem eletroforética. Neste estudo concluíram que as três espécies analisadas apresentavam 16 cromossomos e que o cariótipo eletroforético das linhagens selvagens de *Saccharomyces cerevisiae* e *S. paradoxus* eram praticamente idênticos.

#### **4.4 Seleção das linhagens**

Pelos resultados obtidos anteriormente podemos determinar as melhores linhagens para a obtenção de uma nova linhagem com as características desejadas (floculante e  $\text{H}_2\text{S}^-$ ) que são:

1. ATCC 26602 X  $\text{K}_1$
2. ATCC 26602 X  $\text{KD}_1$

Por possuírem ciclo sexual, as leveduras têm fácil resposta ao se estabelecer cruzamentos para estudos genéticos e para programas de melhoramento genético. O ciclo sexual pode ser estudado pela obtenção de corpos de frutificação no heterocário e existindo mutantes, a análise genética pode ser realizada com facilidade, dependendo da levedura, como em *Saccharomyces cerevisiae* (análise de esporos sexuais não ordenados) (Pizzirani-Kleiner et al., 1998).

Estas linhagens foram investigadas quanto à esporulação para determinar sua compatibilidade sexual, ou seja para determinar a necessidade ou não de que o cruzamento das linhagens seja feito via fusão de protoplastos. As linhagens acima foram semeadas em meio rafinose-acetato, que é um meio indutor da esporulação no qual espera-se que linhagens diplóides de leveduras esporulem. Constatou-se que a linhagem ATCC 26602 (floculante) foi incapaz de esporular, levando à conclusão de que é haplóide ou diplóide ou apresenta alguma dificuldade em esporular. As outras duas linhagens “killer” (K<sub>1</sub> e KD<sub>1</sub>) esporularam normalmente neste meio de rafinose-acetato.

A obtenção de híbridos é fundamental em estudos genéticos, pois desta forma além das qualidades existentes em diferentes leveduras poderem ser reunidas em uma única linhagem, também são aproveitados os acréscimos devidos a efeitos heteróticos.

A incompatibilidade genética assim como o tipo de reação sexual cria uma barreira na formação natural de híbridos. Uma alternativa eficiente é a técnica de fusão de protoplastos, que requer meios para a diferenciação dos conjugantes. Além dos vários problemas de obtenção dos híbridos, ainda nos restam os problemas decorrentes de instabilidade genética causada por perda cromossômica e incompatibilidade citoplasmática, especialmente quando as linhagens parentais pertencem a espécies diferentes (Laguna, 1983).

Estes problemas assim mencionados podem ser minimizados pela escolha criteriosa feita anteriormente destas linhagens (hibridação feita dentro da mesma espécie de *Saccharomyces*).

#### 4.5 Observação em Microscópio Eletrônico das Células das Leveduras

As suspensões de células de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602 e K<sub>1</sub> foram tratadas para observação em microscópio eletrônico de varredura (MEV), como descrito em 4.2.7.

A figura 6 ilustra a superfície externa lisa e uniforme da parede celular intacta de *S. cerevisiae* K<sub>1</sub> e a figura 7 mostra a parede celular de *S. cerevisiae* ATCC26602 nas mesmas condições da linhagem K<sub>1</sub> que foram observadas por Ferro (2002).

Kopeka et al. (1974) observaram em microscópio eletrônico que as células intactas de leveduras apresentaram uma parede celular completamente lisa e sem microfibrilas.

Kliss (1994) relatou que a parede celular de leveduras é responsável pela força mecânica da célula e mais ainda Stratford (1994) descreveu que a parede celular apresenta-se como proteção física, estabilidade osmótica, suporte para enzimas e de ligante de compostos, favorece a adesão célula-célula e a permeabilidade serve como barreira seletiva.

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

Bussey et al. (1973) confirmaram a necessidade de sítios de ligação para a toxina “killer” na parede celular das células intactas de leveduras sensíveis. Estes resultados sugerem, portanto, a alteração da membrana celular de leveduras induzidas pelo fator “killer”.

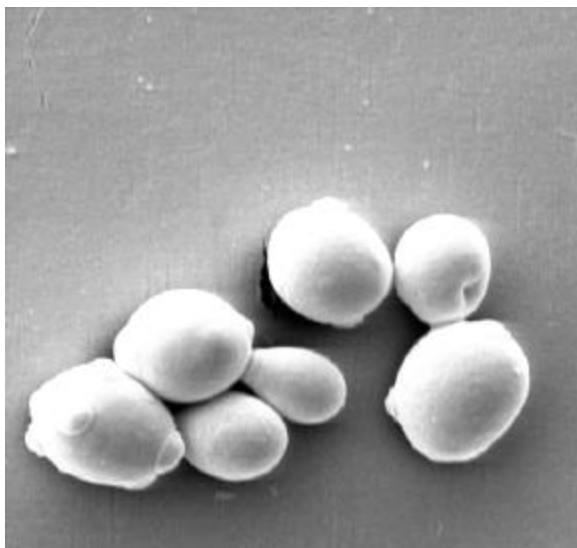


Figura 6 - Superfície celular da levedura **S. cerevisiae** (linhagem *killer* K1) com brotamento observado em MEV (15 kv; 13 mm e aumento de 5000 X).

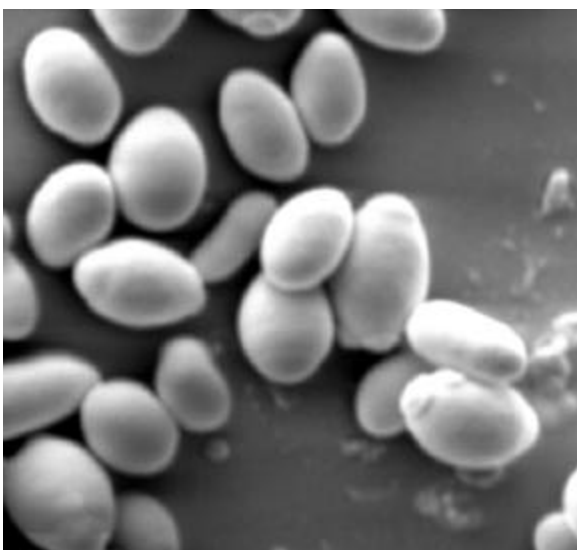


Figura 7 - Superfície celular da levedura **S. cerevisiae** (linhagem flocculante ATCC26602) observada em MEV (15 kv; 13mm e aumento de 5000 X).

O mecanismo de ação da toxina envolve primeiro a ligação desta na parede da célula sensível e depois provoca dano na membrana celular. O mecanismo mais elucidado é o de *S. cerevisiae* e principalmente o padrão  $K_1$ . Sabe-se que o receptor primário na parede, ou seja, o sítio de ligação é o  $\beta$  (1-6) D-glucana. Após a toxina se ligar na parede da célula sensível ocorre a formação de um canal iônico na membrana. O dano na membrana é causado pelo desbalanceamento iônico, apresentando extravasamento de íon K, ATP e conseqüente acidificação do citoplasma da célula sensível, levando assim, à inibição da síntese de macromoléculas e conseqüente morte da célula sensível sem, entretanto, causar a lise da mesma (Soares, 1998).

Zhu & Bussey (1989) verificaram que a toxina ‘killer’  $K_1$  de *S. cerevisiae* foi capaz de matar esferoplastos de vários gêneros de leveduras, cujas células intactas não são sensíveis a esta toxina. Os autores concluíram que receptores de parede celular podem definir a especificidade da toxina e que são necessários mas não suficientes para a ação da toxina em células intactas.

A característica da floculação é estimada primeiramente como uma manifestação da parede celular externa da levedura, especificamente a manose-componentes de proteínas. Muitos fatores exercem uma influência na floculação de células de levedura. Dentre estes estão: os componentes genéticos cromossômicos e extracromossômicos; a função mitocondrial; proteínas e peptídeos; agitação e estresse; produtos da fermentação como etanol; pH e cátions, especialmente Ca (Garcia, 1999).

O estudo de Calleja (1987) diz respeito a combinação de células de leveduras sexuadas no mecanismo de adesão. Cepas haplóides de dois tipos de leveduras sexuadas no caso de *S. cerevisiae* trocam poucos feromônios peptídeos, fatores  $\underline{a}$  e  $\underline{\alpha}$  que causam um número de mudanças fisiológicas. Depois destas modificações, as células agregam-se, antes da fusão celular, para formar diplóides. A adesão entre células é por ligação proteína/proteína entre aglutininas  $\underline{a}$  e  $\underline{\alpha}$  fixadas nas paredes celulares complementares.

A floculação, em contraste, não parece envolver combinação sexuada (Stratford, 1989). A floculação geralmente ocorre entre células de apenas uma cepa de levedura, independente do tipo de combinação ou ploidia. A ligação parece ser proteína/carboidrato e requer a presença de íons de cálcio na parede celular. A floculação, não como uma agregação por combinação, é reversível, inibida por agentes quelantes ou por açúcares específicos.

Uma das áreas na qual a esferoplastização tem papel fundamental é no estudo de composição e síntese da parede celular de leveduras. Os protoplastos de várias espécies de leveduras são capazes de sintetizar a parede celular desde que as condições assim o permitam e, portanto, tornam-se novamente células completas capazes de se reproduzirem. A grande importância da síntese e regeneração da parede celular de leveduras, principalmente nos estudos de fusão é ressaltado somente que os protoplastos regenerados são capazes de formar clones.

#### **4.6 Fusão de Protoplastos**

A incompatibilidade genética assim como o tipo de reação sexual criam uma barreira na formação natural de híbridos. Uma alternativa eficiente é a utilização da técnica de fusão de protoplastos, que requer meios para a diferenciação dos conjugantes.

Uma série de experimentos foi realizada a fim de se obter os meios seletivos para a recuperação de híbridos obtidos por fusão de protoplastos que foram formulados em função dos caracteres naturais das linhagens determinadas. A produção de  $H_2S^-$  e a resistência ao Benomyl em diferentes concentrações na formulação foram usadas como marcas genéticas naturais próprias das linhagens parentais conforme o método de preparação do meio descrito em 3.2.1.(f). Os dados correspondentes a esta análise, além do uso do estabilizador osmótico sorbitol em diferentes molaridades são apresentados no Quadro 2.

Linhagem	Sorbitol 0,6 M	Sorbitol 0,8 M	Sorbitol 1,0 M	Benomyl 0,10 mg/mL	Benomyl 0,15 mg/mL	Benomyl 0,20 mg/mL
KD <sub>1</sub> (H <sub>2</sub> S <sup>-</sup> )	+/-	+/-	+/-	-	-	-
K <sub>1</sub> (H <sub>2</sub> S <sup>-</sup> )	+	+	+	+	+	+
ATCC26602 (H <sub>2</sub> S <sup>+</sup> )	+	+	+	-	-	-

Quadro 2 - Características das linhagens obtidas através do uso de suas marcas naturais, sendo testada a resistência ao fungicida Benomyl e as diferentes concentrações do estabilizador osmótico Sorbitol.

(+) indica a presença da característica  
 (-) indica a ausência da característica  
 (+/-) crescimento anormal da linhagem

Os dados acima obtidos demonstraram a escolha das linhagens parentais K<sub>1</sub> (resistente a Benomyl na concentração de 0,10 mg/mL e H<sub>2</sub>S<sup>-</sup>) e ATCC 26602 (H<sub>2</sub>S<sup>+</sup>) para a fusão de protoplastos com marcas (características) naturais na qual permitiu a formulação do meio seletivo com o uso de sorbitol na concentração de 0,6 M e o uso de 0,10 mg/ mL Benomyl .

Para a obtenção e regeneração de protoplastos, o tempo de exposição das células das linhagens parentais à enzima protoplastizadora foi de 30 minutos, onde se verificou uma protoplastização de quase 100%. Quanto à relação ao tempo de exposição na enzima lítica, as linhagens apresentaram comportamento esperado, pois o maior tempo de exposição à enzima lítica leva a retirada total da parede celular e portanto mais difícil se torna a regeneração.

Os protoplastos obtidos a partir de células das linhagens parentais K<sub>1</sub> e ATCC 26602 após 30 minutos de exposição à enzima lítica são mostrados nas Figuras 8 e Figuras 9.



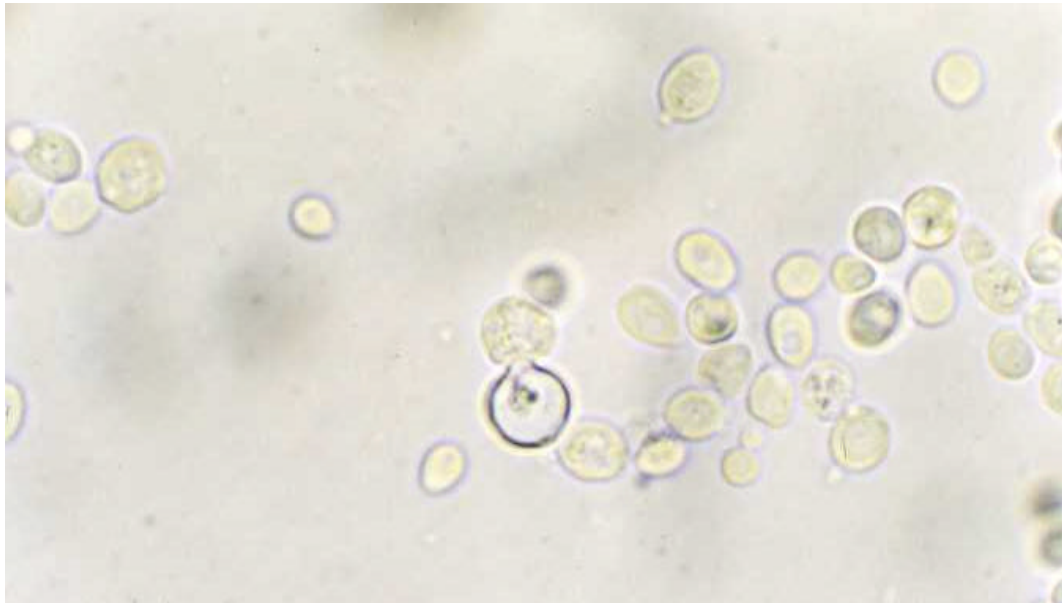


Figura 8 - Protoplastos obtidos a partir de células da linhagem ATCC 26602 após 30 minutos de exposição à enzima Novozym 234. (Aumento 1000X – imersão).

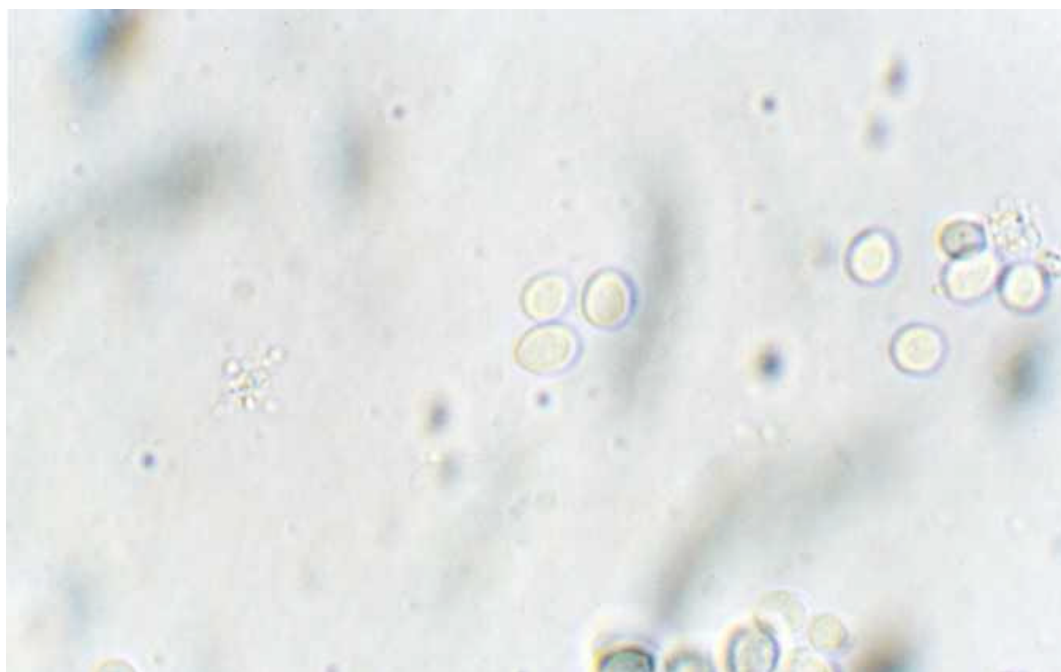


Figura 9 - Protoplastos obtidos a partir de células da linhagem K<sub>1</sub> após 30 minutos de exposição à enzima Novozym 234. (Aumento 1000X – imersão).

No cruzamento para a fusão de protoplastos entre K<sub>1</sub> e ATCC 26602 foram isolados 1291 colônias em meio seletivo. Dentre estas foram selecionadas 20 colônias que mantiveram as duas características, o que representa 1,5 % das colônias isoladas inicialmente consideradas como híbridos. Este valor muito baixo denota a inconsistência deste sistema seletivo.

Apesar da inconsistência deste sistema seletivo para assegurar unicamente o desenvolvimento dos híbridos podemos considerá-lo como de eficiência elevada. Isto é evidente quando compararmos estes dados com os resultados de Barney et alii (1980) obtidos para a fusão de protoplastos entre *Saccharomyces diastaticus* e *Saccharomyces uvarum*. Em dois experimentos separados, identificaram 31 105 híbridos, respectivamente, em aproximadamente 10<sup>6</sup> colônias testadas, pela técnica de seleção em dois meios seletivos.

A frequência de fusão obtida ( $n^0$  de colônias em meio seletivo /  $n^0$  de colônias em YEPD de regeneração menos o  $n^0$  de colônias em YEPD) foi de  $2,2 \times 10^{-4}$ . Estes dados da frequência de fusão estão de acordo com os obtidos por Javadekar et alii (1995) e Martins (1997).

Uma vez que a taxa de reversão ou aparecimento de crescimento residual foram nulas no teste de reversão, pode-se supor que as colônias desenvolvidas no meio seletivo e de regeneração foram verdadeiros produtos de fusão citoplasmática.

Os produtos de fusão protoplasmática foram transferidos para meio de BSA. Pode-se observar que 50 % das colônias transferidas mantiveram a capacidade de crescimento neste meio de cultura. As colônias que não foram capazes de manter o seu crescimento neste meio, provavelmente eram heterocários instáveis que dissociaram os núcleos das linhagens parentais. Esta mesma situação foi verificada por Martins (1997) quando analisou produtos de fusão em *Saccharomyces cerevisiae*, onde observou que cerca de 54,6 % das colônias obtidas em meio mínimo de regeneração, segregavam as marcas parentais, sendo portanto heterocários instáveis.

O sistema de seleção de híbridos com base em características próprias das linhagens, pode ter sua maior desvantagem por não se poder assegurar a expressão gênica de tais caracteres nos híbridos. Estes resultados podem levar à consideração errônea de que as linhagens são incompatíveis geneticamente. Este fato foi observado por Laguna (1983) na fusão entre *Saccharomyces cerevisiae* e *S. starkeyi* para os quais não foi possível a recuperação de híbridos, apesar de se ter obtido frequências elevadas de esferoplastização e terem sido analisadas aproximadamente  $10^9$  células.

A utilização de linhagens com marcas genéticas, especialmente as auxotróficas (mutantes capazes de crescer em meio mínimo constituído apenas por sais minerais e uma fonte de carbono, poucos aminoácidos, vitaminas ou outros componentes de natureza conhecida adicionados ao meio) tem sido largamente aplicado devido a facilidade de isolamento dos conjugantes produtos de fusão de protoplastos.

Para o uso de marcadores dominantes naturais, as mutações auxotróficas são dispensáveis nas células a serem transformadas. Em outras situações, mutações auxotróficas são indesejáveis, por exemplo, quando se deseja transformar linhagens industriais. Estas são normalmente prototróficas e a sua mutagenização pode comprometer a sua performance. Ainda na seleção com marcadores auxotróficos é necessária a utilização de meio de cultura mínimo de maior preço, livre de aminoácidos, vitaminas ou bases nitrogenadas. O uso de mutações auxotróficas na produção industrial é inviável e o problema se agrava mais quando se deseja manter a estabilidade mitótica de um híbrido numa fermentação em escala industrial em que grandes quantidades de meio de cultivo são necessárias, aumentando ainda mais o custo do processo. Em contrapartida, a seleção com marcadores dominantes naturais pode ser feita em meio de custo mais baixo, estendendo-se o baixo custo a processos em escala aumentada (Gomes, 2000).

#### **4.7 Estabilidade dos produtos de fusão**

A fim de verificar a estabilidade dos produtos de fusão em meio líquido YEPD, situação similar ao que ocorrerá na dorna de fermentação, alguns produtos de fusão que mantiveram as características desejadas, como a de  $\text{H}_2\text{S}^-$ , foram testados.

Nenhum dos produtos de fusão analisados manteve a estabilidade após três subcultivos em YEPD líquido, mas de 20 produtos de fusão testados, apenas um apresentou recombinantes com as características de floculação e não produção de  $\text{H}_2\text{S}$ , conforme a figura 10 e figura 11.



Figura 10 - Comparativo entre a linhagem parental não floculante K<sub>1</sub> no teste de floculação.



Figura 11 - Linhagem recombinante de produto de fusão obtido em teste de floculação.

Uma provável explicação para a alta instabilidade dos produtos de fusão em YEPD líquido é a diferença bioquímica e fisiológica existente entre as linhagens parentais. Martins (1997) observou que os produtos de fusão obtidos pelos cruzamentos de duas linhagens auxotróficas complementares eram muito instáveis do ponto de vista genético e produziam diferentes tipos de segregantes.

A incompatibilidade genética assim como o tipo de reação sexual cria uma barreira na formação natural de híbridos. Uma alternativa eficiente é a utilização das técnicas de fusão de protoplasto que requer meios para a diferenciação dos conjugantes. Além de vários problemas de obtenção de híbridos, ainda nos restam os problemas decorrentes de instabilidade genética causada por perda cromossômica e incompatibilidade citoplasmática (poliploidia, *mating type* e exibir reação sexual definida), mesmo quando as linhagens parentais pertencem a mesma espécie. Quanto maior sejam as diferenças entre as linhagens hibridizadas, correspondendo à distância filogenética, espera-se maior instabilidade dos conjugantes (Laguna, 1983 e Javadekar & alii, 1995).

As linhagens parentais utilizadas neste trabalho necessitam serem avaliadas quanto a seus marcadores genéticos no isolamento de híbridos e também quanto ao seu tipo de reação sexual.

## 5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir que:

- Os testes utilizados para a confirmação das características das leveduras: floculação, caráter “*killer*” e  $\text{H}_2\text{S}$  foram eficientes para a escolha das melhores linhagens.
- A cariotipagem eletroforética foi uma ferramenta de alto valor para confirmar a similaridade dos perfis carióticos de pertencer ou não ao gênero *Saccharomyces*.
- A técnica de fusão de protoplasto foi testada com êxito na obtenção de linhagens de leveduras altamente floculantes e não produtoras de  $\text{H}_2\text{S}$ , onde estas características se expressaram em uma só linhagem.
- A seleção de híbridos obtidos por fusão de protoplastos com base em caracteres naturais, entretanto não se mostrou um método eficiente, mesmo neste caso onde as frequências esperadas de fusão foram elevadas, devido a pouca estabilidade destes híbridos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANGIER, N.A. Stupid cell with all the answers. **Discovery**, v.19, p.71-83, 1986.
- ARAÚJO, R.A.C.; GUERRA, J.B.; PATARO, C.; MENDONÇA-HAGLER, L.C.; ROSA, C.A. Caracterização molecular por PFGE de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas durante o ciclo fermentativo para produção de aguardente de cana de açúcar. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 20., Salvador, 1999. **Resumos**. Salvador: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1999. p.175.
- ATKINSON, B.; DAUOD, I.S. Microbial flocs and flocculation in fermentation process engineering. In: GHOSE, T.K.; RIECHTER, A.; BLAKEBROUGH, N. (Ed.). **Advances in Biochemical Engineering**. Berlin: Springer-Verlag, 1976. v.4, p.41-124.
- AZEVEDO, J.L. **Genética de microrganismos**. Goiânia: Editora da Universidade Federal de Goiás, 1998. 490p.
- BARNEY, M.C.; JANSEN, G.P.; HELBERT, J.R. Use of spheroplast fusion and genetic transformation to introduce dextrin utilization into *Saccharomyces uvarum*. **Journal of American Society of Brewistry and Chemistry**, v.38, p.1-5, 1980.
- BASSO, L.C. Identificação de leveduras pela técnica da separação dos cromossomos por eletroforese (cariotipagem). **Relatório Anual de Pesquisas em Fermentação Alcoólica**, Piracicaba, n.10, p.43-45, 1990.



- BASSO, L.C.; AMORIM, H.V.; OLIVEIRA, A.J. de; ORELLI, V.F.D.M. Identificação de leveduras pela técnica da eletroforese do DNA cromossômico (cariotipagem). **Relatório Anual de Pesquisas em Fermentação Alcoólica**, Piracicaba, n.12, p.101-108, 1992.
- BASSO, L.C.; AMORIM, H.V.; OLIVEIRA, A.J. de; CAMPOS, A.A.; ORELLI, V. F.D.M. Estabilidade da levedura em condições industriais avaliada pela técnica da cariotipagem (separação eletroforética do DNA cromossômico). **Relatório Anual de Pesquisas em Fermentação Alcoólica**, Piracicaba, n.13, p.79-95, 1993.
- BASSO, L.C.; AMORIM, H.V.; OLIVEIRA, A.J. de; ORELLI, V.F.D.M. Estabilidade da levedura em condições industriais avaliada pela técnica da cariotipagem durante a safra 93/94. **Relatório Anual de Pesquisas em Fermentação Alcoólica**, Piracicaba, n.14, p.1-43, 1994.
- BASSO, L.C.; OLIVEIRA, A.J.; ORELLI, V.F.D.M.; CAMPOS, A.A.; GALLO, C. R.; AMORIM, H.V. Dominância das leveduras contaminantes sobre linhagens industriais avaliadas pela técnica de cariotipagem. In: CONGRESSO NACIONAL DA STAB, 5., Águas de São Pedro, 1993. **Anais**. Águas de São Pedro: STAB, 1993. p.246-250.
- BEVAN, E.A.; MAKOWER, M. The physiological basis of the killer character in yeast. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON GENETICS, 11., London, 1963. **Proceedings**. London: Academic Press, 1963. v.1, p.203.
- BORZANI,W.; VAIRO, M. The influence of relative dye and cell concentration on the adsorption method for the measurement of the specific areas of microorganisms. **Journal of Fermentation Technology**, v.48, p.329-333, 1970.
- BUSSEY, H.; SHERMAN, D. Yeast killer factor: ATP leakage and coordinate inhibition of macromolecular synthesis in sensitive cells. **Biochimica Biophysica Acta**, v.298, p.868-875, 1973.

- BUSSEY, H.; SHERMAN, D.; SOMERS, J.M. Action of yeast killer factor: a resistant mutant with sensitive spheroplasts. **Journal of Bacteriology**, v.113, n.3, p.1193-1197, 1973.
- CALLEJA, G.B. Cell agregation. In: ROSE, A.H.; HARRISON, J.S. (Ed.). **The yeasts**. 3.ed. London: Academic Press, 1987. v.2, p.165-238.
- CASEY, G.P.; XIAO, W.; RANK, G. H. Application of pulsed field chromosome electrophoresis in the study of chromossome XIII and the eletrophoretic karyotype of industrial strains of *Saccharomyces* yeasts. **Journal of the Institute of Brewing**, v.94, n.4, p.239-243, Jul./Aug. 1988.
- CECCATTO-ANTONINI, S.R.; PARAZI, C. Isolamento de levedura selvagem floculante e efeitos da contaminação em processo de fermentação etanólica contínua. In: CONGRESSO NACIONAL DA STAB, 6., Maceió, 1996. **Anais**. Piracicaba: 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, n.4, p.40-46, 2000.
- COLAGRANDE, O.; SILVA, A.; FUMI, M.D. Recent applications of biotechnology in vine production. **Biotechnology Progress**, v.10, p.2-18, 1994.
- DE LA PEÑA, P.; BARROS, F.; GASCÓN, S. Primary effects of killer toxin. **Biochemica Biophysica Resume Commum**, v.96, n.2, p.544-550, 1980.
- ESSER, K.; KUES, U. Flocculation and its implication for biotechnology. **Process Biochemistry**, v.18, p.21-23, 1983.
- FERENCZY, L. Protoplast fusion in yeast. In: PEBEERDY, J.F.; FERENCZY, L. (Ed.). **Fungal protoplasts: applications in biochemistry and genetics**. New York: Marcel Dekker, 1985. v.6, cap.14, p.279-306.

- FERRO, L.A. Produção purificação e caracterização da enzima  $\beta$ -1,3: glucanase de *Cellulomonas cellulans* YLM- B191-1 e ação da enzima na parede celular de leveduras. Campinas, 2002. 175p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- FLEET, G.H. Composition and structure of yeast cell walls. In: MCGINNIS, M.R. **Current Top Medium Mycology**. New York: Springer-Verlag, 1985. p.24-56.
- FINK, G.R.; STYLES, C.A. Curing of a killer factor in *Saccharomyces cerevisiae*. **Proceeding National Academic Science of USA**, v.69, p.2846-2849, 1972.
- GARCIA, C.E. Efeito de contaminação de bactérias isoladas de processo industrial de fermentação alcoólica, na floculação de levedura. Piracicaba, 1999. 80p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- GOMES, L.H. Construção de um vetor com gene GFP de *Aequorea victoria* para a transformação de *Saccharomyces cerevisiae*. Piracicaba, 2000. 73p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- GIUDICI, P.; KUNKEE, E. The effect of nitrogen deficiency and sulfur-containing amino acids on the reduction of sulfate to hydrogen sulfide by wine yeasts. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.45, n.1, p.107-112, 1994.
- HACHT, J.L. van; DUFOUR, J.P. The production of sulfur compounds by brewing yeast: a review. **Cerevisia and Biotechnology**, v.20, n.1, p.51-64, 1995.
- HAMMOND, J.R.M. Brewer's yeasts. In: ROSE, A.; HARRISON, J. S. (Ed.). **The yeasts**. London: Academic Press, 1993. v.5, cap.2, p.7-67.
- HASTIE, A.C. Benlate induced instability of *Aspergillus diploides*. **Nature**, v.226, p.771, 1970.

- HENICK-KLING, T. Control of malo-lactic fermentation in wine: energetics, flavor modification and methods of starter culture preparation. **Journal of Applied Bacteriology**, v.24, p.29-37, 1995. Supplement.
- HOUGH, J.S.; BRIGGS, D.E.; STEVENS, R.; YOUNG, T.W. **Malting brewing and science**: hopped wort and beer. 2.ed. London: Chapman and Hall, 1982. cap.3, p.566-614: Metabolism of wort by yeast.
- JARVIS, B.; FORTERS, M.J.; KENSILLA, W.P. Factors affecting the developments of cider flavor. **Journal of Applied Bacteriology**, v.24, p.5-18, 1995. Supplement.
- JAYATISSA, P.M.; ROSE, A.H. Role of wall phosphomannan in flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of General Microbiology**, v.96, p.165-174, 1976.
- JIRANEK, V.; LANGRIDGE, P.; HENSCHKE, P.A. Validation of bismuth-containing indicator media for predicting  $H_2S^-$  producing potential of *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts under enological conditions. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.26, n.2, p.269-273, 1995.
- JOHNSTON, J.R.; CONTOPOULOU, C.R.; MORTIMER, R.K. Karyotyping of yeast strains of several genera by field inversion gel electrophoresis. **Yeasts**, v.4, p.191-198, 1988.
- KITAJIMA, E.W. **Curso introdutório de microscopia eletrônica de varredura**. Piracicaba: ESALQ, Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada à Pesquisa Agropecuária, 1997. 37p.
- KLISS, F.M. Review: cell wall assembly in yeast. **Yeast**, v.10, p.851-869, 1994.
- KOPECKA, M.; PHAFF, H.J.; FLEET, G.H. Demonstration of fibrillar component in the cell wall of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its chemical nature. **The Journal of Cell Biology**, v.62, p.66-76, 1974.

- KUNKEE, R.E.; BISSON, L.F. Wine-making yeast. In: ROSE, A.H.; HARRISON, J.S. (Ed.). **The yeasts**. London: Academic Press, 1970. v.3, cap.2, p.4-71.
- LAGUNA, S.E. Estabilidade genética e heterose em híbridos interespecíficos de leveduras. Piracicaba, 1983. 167p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- MAGLIANI, W.; CONTI, S.; GERLONI, M.; BERTOLOTTI, D.; POLONELLI, L. Yeast killer systems. **Clinical Microbiology Reviews**, v.10, n.3, p.369-400, 1997.
- MARTINS, C.V.B. Biologia e fusão de protoplastos de leveduras flocculantes e H<sub>2</sub>S<sup>-</sup>. Piracicaba, 1997. 95p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- MARTINS, C.V.B.; HORII, J.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A. Characterization of fusion products from protoplasts of yeast and their segregants by electrophoretic karyotyping and RAPD. **Revista de Microbiologia**, v.30, p.79-84, 1999.
- MAULE, A.P.; THOMAS, P.D. Strains of yeast lethal to brewery yeast. **Journal of the Institute of Brewing**, v.79, p.137-141, 1973.
- MILL, P.J. The effect of nitrogenous substances on the time of flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of General Microbiology**, v.35, p.53-60, 1964.
- MILL, J.P. The nature of interactions between flocculent cells in the flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of General Microbiology**, v.35, p.61-68, 1964.
- MORTIMER, R.K.; HAWTHORNE, D.C. Yeast genetics. In: ROSE, A.H.; HARRISON, J.S. (Ed.). **The yeasts**. New York: Academic Press, 1969. v.1, p.385-460.

- NASCIMENTO, A.M. Isolamento e seleção de leveduras produtoras de fator “*killer*” para aplicação na produção de bebidas alcoólicas. Campinas, 1994. 74p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- NAUMOV, G.L.; NAUMOVA, E.S.; GAILLARDIN, C. Genetic and karyotyping identification of wine *Saccharomyces bayanus* yeast isolated in France and Italy. **Systematic and Applied Microbiology**, v.16, p.274-279, 1993.
- NETO, C.B.; DESTRUHAUI, A.; GOMA, G. Ethanol fermentation by flocculating yeast: performance and stability dependence on a critical fermentation rate. **Biotechnology Letters**, v.7, n.5, p.355-360, 1985.
- PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; PEREIRA, J.O.; AZEVEDO, J.L. **Genética de fungos no laboratório**. Manaus: Editora da Universidade do Amazonas, 1998. 138p.
- PRINCE, I.G.; BARDFORD, J.P. Induced flocculation of yeasts for use in the tower fermenter. **Biotechnology Letters**, v.4, n.10, p.621-626, 1982.
- ROMANO, P.; SOLI, M.G.; SUZZI, G.; GRAZIA, L.; ZAMBONELLI, C. Improvement of wine *Saccharomyces cerevisiae* strain by a breeding program. **Applied and Environmental Microbiology**, v.50, n.4, p.1064-1067, 1985.
- ROSE, A.H.; HARRISON, J.S. Introduction. In: ROSE, A.H.; HARRISON, J.S. (Ed.). **The yeasts: yeast technology**. London: Academic Press, 1993. v.5, cap.1, p.1-6.
- SCHEMBERG, A.C.; COSTA, S.O.P. Molecular and genetic approaches to alcohol biotechnology in Brazil. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.6, n.4, p.323-355, 1987.
- SILVA, G.A. The occurrence of *killer* sensitive and neutral yeasts in brazilian riesling italico grape must and the effect of neutral strains on killing behavior. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.46, p.112-121, 1996.

- SOARES, G.A.M. Caracterização da toxina *killer* produzida pela linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* Y 500- 4L. Campinas, 1998. 91p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- SPACEK, R.; VONDREJS, V. Rapid method for estimation of *killer* activity in yeasts. **Biotechnology Letters**, v.8, n.10, p.701-706, 1986.
- STEWART, G.G. Yeast flocculation: practical implications and experimental findings. **Brewer's Digest**, v.50, p.42-57, 1975.
- STEWART, G.G.; RUSSEL, I. Centenary review: one hundred years of yeast research and development in the brewing industry. **Journal of the Institute of Brewing**, v.92, p.537-558, 1986.
- STRATFORD, M. Evidence for two mechanism of flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v.5, p.441-445, 1989. Special Issue.
- STRATFORD, M. Lectin-mediated aggregation of yeasts: yeasts flocculation. **Biotechnology & Genetic Engineering Reviews**, v.10, p.283-341, 1992.
- STRATFORD, M.; CARTER, A.T. Yeast flocculation: lectin synthesis and activation. **Yeasts**, v.9, p.371-378, 1993.
- STRATFORD, M. Another brick in the wall ? Recent developments concerning the yeast cell envelope. **Yeast**, v.10, p.1741-1752, 1994.
- SUZZI, G.P.; ROMANO, P.; ZAMBONELLI, C. Flocculation of wine yeasts: frequency, differences and stability of character. **Canadian Journal of Microbiology**, v.30, p.36-39, 1984.
- VEZINHET, F.; BLONDINI, B.; HALLET, J. Chromosomal DNA patterns and mitochondrial DNA polymorphism as tool for identification of enological strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.32, n.5, p.568-571, 1990.

- VINE, R.P. Applications of technology in wine production. In: GUMP, B.H. **Beer and wine production: analysis, characterization and technological advances.** Washington: American Chemical Society, 1993. cap.8, p.132-49.
- VOS, P.J.A.; GRAY, R.S. The origin and control of hydrogen sulfide during fermentation of grape must. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.30, n.3, p.187-197, 1979.
- YOUNG, T.W. The genetic manipulation of killer character into brewing yeast. **Journal of the Institute of Brewing**, v.87, p.292-295, 1981.
- WAINWRIGHT, T. Production of H<sub>2</sub>S by yeasts: role of nutrients. **Journal of Applied Bacteriology**, v.34, n.1, p.161-171, 1971.
- WOODS, D.R.; BEVAN, E.A. Studies on nature of killer factor produced by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of General Microbiology**, v.23, p.115-126, 1968.
- ZAMBONELLI, C. Ricerche biometriche sulla produzione de hidrogeno solforato da solfati e solfiti in *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*. **Annali Microbiologia**, v.14, p.129-141, 1964.
- ZAMBONELLI, C.; MUTINELLI, P.; PACCHETTI, G. Biosynthesis of sulphur amino acids in *Saccharomyces cerevisiae* I. Genetic analysis of leaky mutants of sulphite reductase. **Archives of Microbiology**, v.102, p.247-251, 1975.
- ZHU, H.; BUSSEY, H. The K<sub>1</sub> toxin of *Saccharomyces cerevisiae* kills spheroplasts of many yeasts species. **Applied and Environmental Microbiology**, v.55, n.8, p.2105- 2107, 1989.