

LEVEDURA KILLER: SOLUÇÃO OU PROBLEMA NA VINIFICAÇÃO?¹

Gildo Almeida da Silva²

Introdução

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

O fator killer se enquadra no grupo das proteínas ou glicoproteínas com características exclusivas de antibiose. Esta toxina, descoberta por Bevan e Makower em 1963, é apenas mais uma das diversas toxinas produzidas por fungos. A toxina killer exhibe seu efeito letal sobre leveduras sensíveis da mesma espécie, de espécies diferentes e até mesmo de diferentes gêneros. Diferentes linhagens secretam toxinas com diferentes especificidades, apresentam reação cruzada e a secreção está, de um modo geral, vinculada à "auto-imunidade".

¹Trabalho apresentado na II Jornada Brasileira de Vitivinicultura.

²Biomédico, PhD, Pesquisador da EMBRAPA - Centro Nacional de Pesquisa de Uva e Vinho, Rua Livramento, 515 - 95700-000 - Bento Gonçalves, RS, Brasil.

Apesar de terem sido identificados 11 grupos de fator killer (K_1 - K_{11}), estudos têm se concentrado nos grupos K_1 , K_2 e K_3 , com maior ênfase para o grupo K_1 . As linhagens killer do gênero **Saccharomyces** possuem exclusivamente um destes três grupos. Os outros gêneros possuem um dos grupos restantes, ou seja, K_4 - K_{11} . O efeito antibiótico da toxina tem induzido pesquisadores a utilizar industrialmente leveduras killer em processos fermentativos não estéreis.

O fator killer, no gênero **Saccharomyces**, é determinado por, basicamente, dois tipos de moléculas de RNA encapsuladas. Estas moléculas estão localizadas no citoplasma celular e são denominadas L-dsRNA (L_A -dsRNA e L_{BC} -dsRNA), e M-dsRNA. Embora várias outras moléculas menores de RNA como S3, T, W e XL tenham sido identificadas em algumas linhagens, aumentando, desta forma, a complexidade do fenômeno killer, há apenas evidências do envolvimento dos genomas L-dsRNA e M-dsRNA no sistema.

Outros elementos extracromossômicos como rho, CIR, psi, MAL, DNA de 2 μ m, URE.3, e 20S RNA presentes em **Saccharomyces cerevisiae**, não apresentam qualquer relação com os genomas L-dsRNA e M-dsRNA. Os gens nucleares, no entanto, apresentam envolvimento com a manutenção e expressão do genoma M-dsRNA e alguns determinam a manutenção do genoma L-dsRNA.

Convém salientar que não apenas plasmídeos de RNA estão envolvidos na produção da toxina killer. Plasmídeos formados por dsDNA linear também têm sido responsabilizados pela produção de toxina killer em **Kluyveromyces lactis** e, mais recentemente, em **Pichia acaciae**.

Para estabelecer uma melhor compreensão do fenômeno killer serão enfocados aspectos ligados à distribuição das leveduras na natureza, aos plasmídeos envolvidos na formação do fator killer, a suas características e variantes, a gens citoplasmáticos e cromossômicos que afetam o caráter killer e ao modo de ação da toxina.

Distribuição na Natureza

É comum observar resultados de pesquisa indicando baixa freqüência de linhagens killer e resistentes, ou seja, linhagens com o genoma M-dsRNA. Talvez tenha sido este o motivo pelo qual pesquisadores têm recomendado o emprego de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* killer para o processo de vinificação. A baixa freqüência, no entanto, deve ser tomada com cautela porque os ensaios tanto para produção de toxina como para detecção de "imunidade" requerem a escolha de linhagem sensível apropriada e de condições ótimas para a atividade da proteína. De qualquer forma, seja ela por que motivo for, a baixa prevalência de linhagens killer pode indicar ineficiência do processo.

É possível que a freqüência de linhagens killer, "imunes" e resistentes esteja relacionada com o meio do qual estes microrganismos foram isolados. Meios que ativem uma maior competitividade metabólica podem favorecer a predominância de linhagens killer, "imunes" e resistentes, aumentando, desta forma, a freqüência de tais microrganismos. Além disso, meios que facilitam a difusividade da toxina e que promovem maior contato das leveduras killer com as sensíveis, como meios líquidos, devem desfavorecer estas últimas e aumentar a

população de microrganismos killer, "imunes" e resistentes. Já foram isoladas na Alemanha 209 leveduras killer de mosto de uva em fermentação. Na África do Sul, 230 linhagens killer foram isoladas de uvas **Chenin blanc**. Linhagens de vários habitats naturais foram investigadas quanto às características killer e sensível, tendo-se observado que 17% das linhagens se mostraram killer e 11% sensíveis. No Brasil, (Centro Nacional de Uva e Vinho/CNPUV-EMBRAPA), 25,5% de uma população de leveduras presentes em mosto de uva da variedade **Riesling** apresentaram o fenômeno killer, 95,4% se mostraram resistentes e apenas 4,6% das linhagens foram sensíveis.

Linhagens que apresentam sensibilidade a fator killer em meio artificial podem exibir resistência em mosto, como ocorre com as linhagens EMBRAPA-1B e **Saccharomyces cerevisiae** EMBRAPA-20B. Isto se deve não apenas ao valor de pH do mosto, pois se sabe que a atividade da toxina é pH dependente, mas provavelmente a fatores de proteção, para uma determinada linhagem, presentes no próprio mosto. Tem sido observado que íons Ca^{2+} evitam danos à membrana celular provocados pela toxina.

Uma linhagem pode ser resistente a uma determinada levedura killer, sensível à outra e ao mesmo tempo se mostrar killer para uma terceira. A linhagem EMBRAPA-1B é resistente, em meio artificial e em meio com mosto, a uma linhagem de **Saccharomyces cerevisiae** killer comercial, é sensível à linhagem killer EMBRAPA-91B apenas em meio artificial e exibe fator killer para a linhagem sensível EMBRAPA-26B tanto em meio artificial como em mosto.

Portanto, a interação microrganismo/microrganismo/meio, além de outros fatores como taxas volumétricas de formação da toxina, pode determinar a complexidade do efeito prático do fator killer em processos industriais.

Plasmídeos Envolvidos na Formação do Fator Killer

O fenômeno killer em *Saccharomyces cerevisiae* está associado com plasmídeo contendo genomas com dupla fita de RNA (dsRNA) de tamanhos diferentes chamados L (Large) e M (Medium). O genoma M-dsRNA codifica a síntese da toxina e responde pela "imunidade" celular. A forma L-dsRNA, por sua vez, codifica a formação do envelope (capsídeo) que envolve seu próprio genoma e o genoma M-dsRNA e apresenta ainda a função de manutenção. A dupla fita de RNA envolvida pelo capsídeo é chamada de VLP (Virus-Like Particles) ou micovírus. A presença de VLP não é exclusividade de leveduras. Outros VLPs são amplamente distribuído na natureza, sendo encontrados em animais, plantas, insetos, fungos e bactérias.

Os dsRNAs killer de *Saccharomyces cerevisiae* são estavelmente mantidos em relativamente alto número de cópias e a transmissão ocorre durante o brotamento, cruzamento, citodução e fusão de protoplasto. A estabilidade observada mostra haver um certo grau de acoplamento do processo de replicação do VLP com o ciclo celular. Isto pode ser explicado pelo fato de os genomas M e L dependerem de múltiplos loci genéticos nucleares, o que significa falta de autonomia. Linhagens de leveduras podem ser classificadas, com relação ao fenômeno killer, da seguintes formas: killer, neutras, sensíveis, sensíveis supressivas, suicidas e superkiller.

As linhagens killer de *Saccharomyces cerevisiae* são aquelas que produzem toxina, apresentam "auto-imunidade" e, portanto, podem matar leveduras sensíveis sem ser afetadas pela própria toxina. Estas possuem um fenótipo K^+R^+ e um genótipo KIL-k. Todas as linhagens killer de *Saccharomyces cerevisiae* contêm no seu citoplasma L-dsRNA e M-dsRNA. Como as linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* só apresentam os grupos K_1 , K_2 e K_3 , a linhagem killer do grupo K_1 possui um genótipo KIL- k_1 , os genomas L_{1A} -dsRNA e M_1 -dsRNA e um fenótipo $K_1^+R_1^+$. Embora L_{BC} -dsRNA seja encontrada na maioria das linhagens K_1 , provavelmente este plasmídeo não tem relação com o sistema killer. As formas T, W e XL podem também estar presentes mas não tem sido demonstrado seu papel no sistema. Para manter o plasmídeo M_1 -dsRNA é necessário o envolvimento dos gens cromossômicos MAK, SPE e PET. Todas as formas do plasmídeo L_A -dsRNA exigem alguns gens cromossômicos MAK. Linhagens killer com genótipo KIL- b_1 , mutação no plasmídeo M-dsRNA, têm sido também obtidas. Estas linhagens possuem as mesmas características da killer K_1 em termos de toxina e "imunidade", mas não exigem os produtos dos gens cromossômicos MAK4, MAK7, MAK11 ou MAK17 para sua manutenção.

A linhagem do grupo K_2 exhibe um genótipo KIL- k_2 , os genomas L_{2A} -dsRNA e M_2 -dsRNA e um fenótipo $K_2^+R_2^+$. L_{BC} -dsRNA e estruturas equivalentes às formas T, W e XL têm também sido encontradas nestas linhagens. Os gens cromossômicos MKT e MKS estão envolvidos na manutenção do M_2 -dsRNA.

O grupo K_3 mostra, por fim, um genótipo KIL- k_3 , possui os genomas L_{3A} -dsRNA e M_2 -dsRNA e um fenótipo $K_3^+R_3^+$. As formas L_{BC} -dsRNA, T, W e XL não têm sido identificadas nestas

linhagens. Convém salientar que, além dos grupos K_1 , K_2 e K_3 foram também reportadas duas outras linhagens killer de *Saccharomyces cerevisiae*, denominadas K_3GR_1 e KT28. Testes cruzados geralmente mostram que, dentro de um determinado gênero, cada linhagem killer é "imune" a sua própria toxina, mas pode apresentar sensibilidade à toxina de outras classes "imunes".

As leveduras neutras resistem à ação da toxina mas não a produzem de forma efetiva. Podem, portanto, ser linhagens não secretoras do fator killer ou secretoras de um fator killer inativo devido a uma mutação no plasmídeo M_1 -dsRNA. A mutação afeta a formação da toxina mas não compromete o componente deflagrador da "imunidade". Estas leveduras apresentam um genótipo $KIL-n_1$, possuem os genomas L-dsRNA e M_{n1} -dsRNA e um fenótipo $K^-R_1^+$. Apenas uma linhagem neutra K_2 foi caracterizada. As outras formas de levedura killer, ou seja, as linhagens K_3GR_1 e KT28 não apresentam mutantes no que diz respeito ao fator killer.

As leveduras sensíveis, além de não produzirem toxina mostram sensibilidade à mesma. Seu fenótipo é caracterizado por $K^-R_1^-$ e seu genótipo é $KIL-0$. Não apresentam o genoma M-dsRNA mas a maioria exhibe o genoma L-dsRNA.

A sensibilidade de leveduras à toxina killer é um fenômeno complexo devido às variações de sensibilidade observadas. Tanto as linhagens produtoras de toxina como as não produtoras podem apresentar variações de sensibilidade relacionadas com mutações nucleares. É importante distinguir a diferença entre a resistência específica, chamada também de "imunidade", e a resistência menos específica. A resistência específica está

relacionada com os plasmídeos, enquanto que a menos específica é determinada pelo genótipo nuclear. As mutações nucleares (kre1, kre2 e kre3) em *Saccharomyces cerevisiae*, que resultam em resistência a M₁-dsRNA, além de conferir resistência à toxina K₁, provocam resistência a uma faixa mais ampla de outras toxinas. Mutações no plasmídeo M₁-dsRNA resultam em linhagens resistentes apenas à toxina K₁.

As leveduras sensíveis supressivas são caracterizadas por uma deleção interna no plasmídeo M₁-dsRNA, originando o plasmídeo S-dsRNA que se mantém independentemente do plasmídeo que lhe deu origem. O plasmídeo S-dsRNA interfere com a replicação do M₁-dsRNA e causa a perda do genótipo KIL-k. Estas linhagens mostram um genótipo KIL-s, possuem os genomas L-dsRNA e S-dsRNA e um fenótipo K⁻R⁻. A deleção interna do plasmídeo M₁-dsRNA faz com que não haja produção de toxina e nem "imunidade" celular. O cruzamento de linhagens KIL-s₁ com linhagens KIL-k₁ pode resultar, eventualmente, em células que apresentem plasmídeos M₁-dsRNA que só serão mantidos se tais células forem diplóides. Estas linhagens, que são chamadas de diplóides dependentes, mostram um genótipo KIL-d₁, possuem os genomas L₁-dsRNA e M₁-dsRNA (mutante) e exibem um fenótipo K₁⁺R₁⁺. A manutenção do M₁-dsRNA parece depender do controle do "locus" MAT.

Leveduras que apresentam "imunidade" parcial, resultante de uma mutação no plasmídeo M₁-dsRNA, e que produzem teores normais toxina K₁, se comportam como linhagens killer K₁ normais quanto à formação de toxina mas deficiente sob o ponto de vista "imunológico". Estas linhagens que se mostram sensíveis a sua própria toxina são denominadas linhagens

suicidas ou "imuno"-deficientes. Elas exibem um genótipo KIL- i_1 , possuem os genomas L-dsRNA e M_{11} -dsRNA e mostram um fenótipo $K_1^+R_1^W$. As linhagens com estas características, como é de se esperar, são afetadas apenas quando altas concentrações de toxina são formadas. As linhagens "imuno"-deficientes podem morrer se mantiverem contato com concentrações de toxina 100 vezes maiores que aquelas necessárias para matar as linhagens sensíveis.

Leveduras superkiller (ski) podem ser formadas pelo mutante de genótipo KIL-b, mutante este que dispensa determinados produtos do gen MAK para sua manutenção e permite um elevado número de cópia do M_1 -dsRNA, ou por mutações no plasmídeo M_1 -dsRNA que, além de exibir um maior número de cópias do plasmídeo, leva à modificação na subunidade α da toxina, tornando-a mais estável. A superkiller mostra um genótipo KIL- sk_1 , possuem os genomas L_{1A} -dsRNA e M_1 -dsRNA (mutante) e um fenótipo $K_1^{++}R_1^+$. O número de cópia do genoma L, para algumas linhagens, é estimado em milhares, enquanto que o número de cópia normal do genoma M é de 100 a 1000 por célula. A presença de um genoma L pode afetar o número de cópias de outros L genomas e a perda do genoma M resulta num aumento do número de cópia do genoma L. Em mutações ski (superkiller), ou seja, em ambientes desrepressivos, o número de cópias dos genomas L e M é dramaticamente elevado. Em ambientes repressivos SKI, a exclusão ou falta de estabilidade do genoma M pode ser resultado de competição por alguns componentes comuns à replicação dos diferentes dsRNAs, como ocorre com fagos e plasmídeos de procariotos.

Características dos Plasmídeos Envolvidos com o Fator Killer

Como foi visto, o plasmídeo M-dsRNA pode sofrer mutações que levam a alterações profundas no comportamento celular. Entre as características mais expressivas deste plasmídeo podem ser citadas:

1. Codifica os precursores da toxina

a. M_1 -dsRNA é um plasmídeo de 1,9 kb que codifica a toxina K_1 e determina o fenótipo $K_1^+R_1^+$. A toxina codificada por este plasmídeo não é glicosilada e apresenta um peso molecular de 9 kd. Em termos de temperatura, a proteína se mostra termolábil e possui uma estabilidade em torno de 22 °C. É ativa apenas numa faixa estreita de pH (4,2-4,8), sendo 4,6 o valor de pH ótimo e 4,5 seu ponto isoelétrico. Em valores de pH acima de 6,5 a proteína é irreversivelmente inativada e apresenta, em meio de cultura, uma meia vida de apenas 60 minutos. A proteína é degradada por proteases de linhagens selvagens. Alguns inibidores de proteases, como PMSF (fenilmetilsulfonil fluoreto), aumenta a estabilidade da toxina e a quantidade da proteína secretada. Este mesmo fenótipo é observado em mutantes *ski5*. Estes mutantes secretam não apenas a proteína killer mais estável mas também outras proteínas de baixo peso molecular que interferem no processo de proteção da superfície celular ao ataque da toxina. Leveduras $K_1^+R_1^+$ podem matar as linhagens $K_2^+R_2^+$ e $K_3^+R_3^+$.

b. M_2 -dsRNA é um plasmídeo de 1,7 kb responsável pela formação da toxina K_2 e caracteriza o fenótipo $K_2^+R_2^+$. A toxina K_2 formada por este plasmídeo difere da toxina K_1 em vários aspectos. A proteína é glicosilada e possui um peso molecular de 16 kd. Atuando numa faixa de pH mais ampla

(2,8-4,8), com ponto isoelétrico de 4,5, e apresentando um pH ótimo para sua atividade entre 4,2 e 4,4, estas linhagens se mostram, portanto, mais adequadas, quanto à expressão da atividade killer, ao processo de elaboração de vinhos. Leveduras com o fenótipo $K_2^+R_2^+$ são capazes de matar as linhagens com os fenótipos $K_1^+R_1^+$, $K_3^+R_3^+$ e K^-R^- .

c. M_3 -dsRNA é um plasmídeo de 1,5 kb, responde pela síntese da toxina K_3 e caracteriza o fenótipo $K_3^+R_3^+$. O pH para a atividade ótima da proteína é 4,6. Leveduras $K_3^+R_3^+$ podem matar as linhagens $K_1^+R_1^+$, $K_2^+R_2^+$ e K^-R^- . Apesar de haver poucos estudos referentes a toxina K_3 , sabe-se que esta proteína pode ser formada por outro plasmídeo com 2,0 a 2,1 kb, tendo sido designado, por alguns autores, como M_4 -dsRNA e considerado típico em leveduras para vinho.

d. S_3 -dsRNA é um plasmídeo de 0,73 kb proveniente de uma deleção interna do plasmídeo M_1 -dsRNA que provoca a perda do genótipo KIL-k, ou seja, transforma uma levedura killer em sensível (K^-R^-).

2. Confere "imunidade" celular.

3. Dependem de plasmídeos semelhantes e gens nucleares para sua manutenção.

4. Estão presentes apenas em células que possuam o plasmídeo L-dsRNA.

5. Apresentam-se no citoplasma sob a forma de VLP e, portanto, necessitam do processo de encapsulação.

Estudos genéticos sugerem a existência de diferentes L-dsRNAs. Estas diferenças têm levado a nomenclaturas confusas para definição das diferentes espécies de L-dsRNA. A maioria das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* apresenta pelo menos

uma espécie de L-dsRNA, mesmo naquelas linhagens que não possuem M-dsRNA. L-dsRNAs são plasmídeos não infecciosos de 4,5 a 5,0 kb estavelmente mantidos, não dependem de outros plasmídeos para sua manutenção e codificam a síntese de proteínas (78 a 88-kd) para a formação de seu próprio capsídeo e do capsídeo do M-dsRNA. Seu fenótipo se refere apenas à manutenção dos plasmídeos M-dsRNAs e quando sozinhos, se comportam como entidades parasíticas. A espécie L_A -dsRNA depende dos gens cromossômicos MAK3, MAK10 e PET18 para sua própria replicação. Quanto à manutenção dos M-dsRNAs, as subespécies L_A apresentam variações que dependem das bases genéticas citoplasmática e nuclear.

A subespécie L_{1A} -dsRNA é um plasmídeo de 4,7 kb naturalmente encontrado em leveduras killer K_1 e codifica um polipeptídeo de 88 kd para a formação de seu capsídeo e do capsídeo do M_1 -dsRNA.

A subespécie L_{2A} -dsRNA é do mesmo tamanho da subespécie L_{1A} -dsRNA e está naturalmente presente em leveduras killer K_2 . Codifica proteínas de 84 kd necessárias para a formação do capsídeo de seus próprios VLPs.

As subespécies L_B , L_C e L_{BC} são plasmídeos que apresentam o mesmo tamanho dos demais até agora estudados e que são encontrados nas linhagens K_1 e K_2 . Relacionam-se entre si mas não apresentam relação com L_{1A} ou L_{2A} . Não são requeridos e nem mostram competência para exercer a função de manutenção dos plasmídeos M_1 e M_2 -dsRNAs mas codificam proteínas de 82 kd para a construção de seus próprios VLPs.

Os plasmídeos T-dsRNA e W-dsRNA são espécies menores de dsRNA (2,7 e 2,25 kb) de função desconhecida que não

apresentam relação entre si e nem com outras espécies de dsRNAs conhecidas. O plasmídeo XL-dsRNA é ocasionalmente citado em linhagens killer K_1 mas é de identidade desconhecida.

A toxina killer pode também estar associada a plasmídeos formados por DNA. Foram identificados em *Pichia acaciae* os plasmídeos pPacl-1-dsDNA de 13,6 kb e pPacl-2-dsDNA de 7,3 kb. A perda destes dois plasmídeos faz com que as linhagens antes resistentes e imunes se mostrem sensíveis e não produtoras de toxina. Apenas os plasmídeos lineares pGKL1 e pGKL2 presentes em *Klyveromyces lactis* têm função conhecida. A forma pGKL1 responde pela formação da toxina e pela "imunidade" celular, enquanto a forma pGKL2 parece codificar as funções necessárias à replicação e pode também ter alguma função "imunológica".

Estas exotoxinas formadas pelas diferentes linhagens de levedura podem, de um modo geral, ser distinguidas entre si com base no pH, na estabilidade térmica, na susceptibilidade à ação de proteases, na especificidade imunológica e no tamanho do plasmídeo M-dsRNA.

Gens Citoplasmáticos que Afetam o Caráter Killer

Além dos gens citoplasmáticos citados que estão diretamente relacionados com a formação, "imunidade" celular e manutenção dos plasmídeos, existem outros que afetam a expressão do fenômeno killer. Estes fenótipos foram originariamente definidos como plasmídeos não identificados. Hoje se sabe que se tratam de variantes do plasmídeo L_A -dsRNA, ou seja, determinados gens citoplasmáticos, na verdade, se

apresentam em combinação com as formas variantes naturais do plasmídeo L_A . O plasmídeo L_{1A} -dsRNA, encontrado em linhagens killer K_1 , carrega consigo o genótipo de herança citoplasmática [HOK] (Helper Of Killer), necessário à replicação dos plasmídeos M_1 ou M_2 -dsRNA numa linhagem SKI. Esta forma é conhecida como L_{A-H} -dsRNA.

Foi observado que uma linhagem sensível (AN33) possuidora de uma forma de L-dsRNA ao cruzar com uma linhagem killer K_2 , ou seja, portadora dos plasmídeos L_{2A} -dsRNA e M_2 -dsRNA, formava diplóides sensíveis, indicando ter havido exclusão do plasmídeo M_2 -dsRNA. O plasmídeo da linhagem AN33 com esta capacidade de exclusão foi denominado [EXL] (EXcluder) e, posteriormente, verificou-se que se tratava de uma forma de L-dsRNA, agora identificada como L_{A-E} -dsRNA. Hoje se sabe que este plasmídeo é incompetente no que diz respeito à manutenção tanto do plasmídeo M_1 -dsRNA como o M_2 -dsRNA em linhagens com base genética SKI. Em mutantes com base genética ski, no entanto, é capaz de manter o plasmídeo M_1 -dsRNA. É importante ressaltar que, com a base genética (SKI), o plasmídeo L_{A2} -dsRNA das linhagens killer K_2 normais possui fraca atividade [HOK], sendo capaz de promover auto-replicação e replicação dos plasmídeos M_1 e M_2 -dsRNA em muito baixo número de cópias. Isto mostra que os mutantes ski dispensam a necessidade da atividade [HOK]. A combinação de uma levedura M_1 -dsRNA normal com L_{A-E} -dsRNA e uma mutação ski resulta numa linhagem de genótipo KIL-sd₁.

Existe uma outra forma de L-dsRNA presente em determinadas linhagens que exclui M_2 -dsRNA quando cruzadas com linhagens killer K_2 (fenótipo [EXL]), mas que mantém M_1 -dsRNA com um

número de cópia moderado numa base genética SKI (fenótipo [HOK]). Este L-dsRNA se denomina L_{A-HE} -dsRNA.

Como já mencionado, as linhagens killer K_2 apresentam o plasmídeo L_A -dsRNA com fraca atividade [HOK]. A introdução de L_{A-E} -dsRNA, portanto, causa a perda de M_2 -dsRNA. Uma mutação nesta linhagem K_2 leva a obtenção de linhagens resistentes a exclusão [EXL^R] de M_2 . Estas linhagens, na verdade, passaram a apresentar fenótipo [HOK] forte no seu L-dsRNA, sendo denominado, por isso, L_{2A-H} -dsRNA.

Existe também aqueles plasmídeos L_{1A} -dsRNA de linhagens killer K_1 e, portanto, com atividade [HOK] forte, que quando associados com M_2 -dsRNA evitam a exclusão pelo [EXL] (L_{A-E} -dsRNA). Este fenótipo se denomina [NEX] (Non-EXcludable) e este tipo de L_{1A} -dsRNA é conhecido como L_{1A-HN} -dsRNA.

O gen cromossômico MKT garante a manutenção do genótipo KIL- k_2 na presença de [NEX]. Os plasmídeos L_{A-HN} -dsRNA podem excluir o plasmídeo M_2 -dsRNA se os cruzamentos com linhagens K_2 contendo L_{2A} -dsRNA produzirem haplóides que carreguem o alelo recessivo mkt1 e mkt2. Esta exclusão é temperatura dependente, pois, ocorre a 30, mas não a 20 °C. Isto significa que, dependendo da temperatura, linhagens que apresentam alelo recessivo mkt são incapazes de manter o genótipo KIL- k_2 na presença de [NEX] (L_{A-HN} -dsRNA), ou seja, nestas condições, o [NEX] se transforma em agente excludente do plasmídeo M_2 -dsRNA. A exclusão de M_2 -dsRNA em linhagens com alelo recessivo mkt pode ser evitada por mutações ski2, ski3 e ski4 mas não por ski1. Procurando-se outros supressores de exclusão do M_2 -dsRNA, foram encontrados os ski6, ski7 e ski8. Mutações em qualquer destes seis "loci" provocam um aumento

significativo no número de cópia dos plasmídeos L_A , L_{BC} e M_1 -dsRNA. Uma linhagem que apresente a combinação L_{A-HN} -dsRNA- M_1 -ski exibe sensibilidade ao frio. Se o plasmídeo M_1 -dsRNA for removido, a sensibilidade desaparece, sugerindo que a replicação de M_1 -dsRNA requer algum componente celular crítico para o crescimento do microrganismo em baixas temperaturas. Se o plasmídeo L_{A-HN} -dsRNA for substituído pelo plasmídeo L_{A-E} -dsRNA, o número de cópias do M_1 -dsRNA se reduz e a linhagem se apresenta resistente ao frio. Mutações nos "loci" $mks1$, $mks2$ ou $MKS50$ resultam na supressão da exclusão de M_2 -dsRNA provocado por [NEX] em linhagens mkt .

Além da exclusão por [EXL] (L_A -dsRNA) e por [NEX] (L_{A-HN} -dsRNA) em mutantes mkt , o plasmídeo M_2 -dsRNA pode também ser excluído do sistema pelo plasmídeo M_1 -dsRNA. Esta exclusão não está relacionada com o plasmídeo L_{1A-HN} -dsRNA presentes nas linhagens K_1 , uma vez que linhagens curadas, mas que continuam carregando o plasmídeo L_{1A-HN} -dsRNA, não mais exibem capacidade de exclusão.

Não existem explicações coerentes, até o momento, para as interações dos diferentes L-dsRNAs com eles mesmos, nem com os M-dsRNAs e nem com os produtos dos gens cromossômicos que serão abordados a seguir. Sabe-se apenas que, pelos efeitos provocados pela mutação nestes "loci" sobre a manutenção dos diferentes dsRNAs, existem diferenças importantes nos mecanismos de replicação e controle.

Gens Cromossômicos e sua Relação com o Fenômeno Killer

Um grande número de gens cromossômicos estão envolvidos na manutenção e na replicação dos dsRNAs, assim como outros estão

relacionados com a expressão, a resistência, a secreção e a supressão de exclusão de determinados plasmídeos. A manutenção de M_1 -dsRNA depende de gens nucleares cujos produtos são importantes ou até mesmo fundamentais para a função celular como crescimento, esporulação e secreção de proteínas.

O gen PET18, além de necessário para a manutenção do M_1 -dsRNA, é requerido para a manutenção do DNA mitocondrial e crescimento celular. O gen SPE (SPERMidine & SPERmine biosynthesis) é um outro gen que é exigido para função de crescimento celular. Além disso responde pelo processo de esporulação. Os gens cromossômicos SEC (SECretion), por outro lado, estão envolvido com a secreção de proteínas de um modo geral. Mutantes sec18 afetam a passagem da toxina do retículo endoplasmático rugoso para o sistema de Golgi. O mutante sec7 atua na passagem da toxina do sistema de Golgi para a vesícula secretora. O mutante sec1 age na passagem da toxina da vesícula secretora para o meio externo.

Os gens MAK (MAintenance of KIL- k_1) são necessários para a manutenção do M_1 -dsRNA. Os mutantes que levam o alelo recessivo mak não possuem M_1 -dsRNA e são K^-R^- . Alguns destes gens são requeridos para a manutenção do M_2 -dsRNA. Os gens MAK3, MAK10 e PET18 são necessários para todas as formas de L_A e o gen MAK27 é exigido por L_{A-E} -dsRNA.

Os produtos de um determinado gen baixam o número de cópia dos plasmídeos L_A , L_{BC} , M_1 e M_2 -dsRNA. Este gen foi denominado SKI (SuperKiller), chamado por alguns autores de SK1. Linhagens mutantes que levam os alelos recessivos ski2, ski3, ski4, ski6, ski7 ou ski8 apresentam um maior número de cópia dos plasmídeos M_1 , M_2 , L_A e L_{BC} e exibem uma toxina mais

estável. Estas linhagens são conhecidas como superkiller. Estes mutantes eliminam a exigência dos plasmídeos M-dsRNAs por [HOK] e por alguns gens MAK e, ao mesmo tempo, evita a exclusão de M₂-dsRNA por L_A-HN-dsRNA em linhagens mkt. O mutante ski5 não possui estas características mas faz com que a célula fique desprovida da protease de superfície que normalmente degrada a toxina e exiba um acúmulo aumentado da toxina.

Os gens KRE (Killer REsistant) são necessários para a ação normal da toxina sobre os receptores de células sensíveis. KRE1 afeta o receptor e KRE2 atua na ligação da toxina com os receptores. As linhagens krel e kre2, por apresentar uma perda de receptores na parede celular, dificultando a ação da toxina, são consideradas toxina-protoplasto sensíveis. Mutantes kre3, no entanto, são linhagens toxina-protoplasto resistentes e exibem sítios normais de ligação da parede celular.

O gen MKT atua na manutenção do KIL-k₂ na presença de [NEX]. Considerações sobre este gen, assim como sobre o gen MKS (MKt Supressor), foram anteriormente apresentadas quando se discutiu a exclusão do plasmídeo M₂-dsRNA.

Os gens KEX (Killer EXpression) respondem pela expressão do fator killer. Dois gens (KEX1 e KEX2) são necessários para processar a toxina precursora. Mutantes kex são incapazes de processar adequadamente o precursor da subunidade alfa e muitas outras proteínas também são afetadas. As proteínas ou glicoproteínas sintetizadas pelas linhagens kex2 são maiores que o usual e secretam uma subunidade alfa inativa e superglicosilada. As linhagens kex2 se mostram também

incapazes de esporular e cruzar. Linhagens kex1 e kex2 crescem lentamente e ambas as mutações afetam o processo de maturação da proteínas não glicosiladas. A protoxina é estável em linhagens kex1 mas instável em linhagens kex2. Mutantes duplos kex1/kex2 se comportam como verdadeiros kex1. Os mutantes simples (kex1 ou kex2) e os duplos mutantes (kex1/kex2) possuem, portanto, o fenótipo K^-R^+ , ou seja, se comportam como linhagens neutras.

REX (Resistance EXpression) é um gen cromossômico responsável pela expressão da resistência à toxina determinada pelo plasmídeo M_1 -dsRNA. Apesar de não ser estudada extensivamente, sabe-se que linhagens KIL- k_1 são suicidas. Este gen pode estar relacionado com os vários processos de proteção que a célula killer deve exibir para se manter viva. Entre os processos podem-se mencionar a ativação prematura da toxina, degradação do fator "imunológico" ou alteração do receptor de toxina a nível celular.

Como se vê, vários gens cromossômicos e extra cromossômicos podem interagir afetando o fenômeno killer e os pontos vitais das células de várias formas. Com relação ao fator killer, as interações atingem principalmente, os processos de síntese, expressão, resistência e sensibilidade, secreção, manutenção e perda, supressão entre outros. Além destes fatores interativos, outros componentes igualmente importantes, como fatores físico-químicos, podem alterar completamente o quadro de todo este processo.

Modo de Ação da Toxina Killer

A protoxina killer é formada pelas subunidades alfa, beta, gama e delta. Uma considerável fração da proteína, no entanto, é inativa. Os componentes alfa e beta apresentam teores elevados de aminoácidos hidrofóbicos e aminoácidos carregados. Inicialmente, a toxina se liga, de uma forma que não necessita de energia metabólica, a receptores localizados na parede celular, identificados como 1,6- β -D-glicano. Leveduras "imunes" e sensíveis apresentam um grande número destes receptores. Alterações nestes receptores podem levar a mudanças de comportamento da levedura em relação à toxina. Como discutido anteriormente, mutações *krel* e *kre2* provocam uma redução significativa nos sítios de ligação e apresentam modificações no teor de 1,6- β -D-glicano. Estes mutantes, protoplasto toxina sensíveis, se mostram resistentes a uma gama maior de toxina, indicando que o processo de ligação com a parede celular é uma etapa inicial comum às diferentes toxinas.

Um detalhe de extrema importância prática se refere à exigência do número mínimo de ocupação dos receptores celulares para a expressão do fator killer. Sabe-se que a toxina deve ocupar pelo menos 3×10^3 dos 10^7 receptores da parede celular para que a subunidade alfa se acople à membrana celular e exerça seu efeito killer. Isto mostra que não é suficiente apenas a presença do fator killer no meio mas também a relação entre sua concentração e o número de linhagens sensíveis. Depois da ocupação de pelo menos 3×10^3 receptores, um outro sistema, energia dependente, se encarrega do transporte da toxina para a membrana citoplasmática.

Os eventos que conduzem a célula à morte também estão relacionados com o desprendimento de energia metabólica. A morte se dá após um período "lag" que depende da composição química do meio e da fase de crescimento do microrganismo. Na fase "lag" os efeitos da toxina podem ser revertidos. Microrganismos que se encontram na fase estacionária são relativamente resistentes à toxina killer. É interessante observar que toxina, inibindo a extrusão de prótons e aumentando a permeabilidade da membrana a prótons contraria pelo menos dois princípios básicos da hipótese quimiosmótica de transporte de moléculas, grupos químicos e íons. A ação da toxina pode não afetar diretamente o sistema ATPase mitocondrial, mas seus efeitos são tão surpreendentes que, num período de 40 a 90 minutos, o pH intracelular baixa drasticamente e o metabolismo celular é inibido. A célula perde potássio e produtos importantes como ATP. Embora as células se apresentem perfuradas, como resultado de danos físicos causados pela toxina, macromoléculas não são perdidas. A célula murcha mas não ocorre lise.

A nível celular, a toxina é sintetizada no retículo endoplasmático rugoso, após a passagem do mRNA de dentro do plasmídeo para o citoplasma, portando a mensagem do M-dsRNA. O processo se inicia pela síntese da subunidade delta. Esta serve para ancorar, na superfície da membrana do retículo endoplasmático e de outras vesículas da via secretória, o seguimento restante da protoxina a ser formada. Logo em seguida, formam-se as subunidades alfa, gama e beta. O processo de glicosilação da subunidade gama e a formação das pontes de enxofre entre as subunidades alfa e beta se efetuam

ainda neste estágio. Vesículas contendo a protoxina se desprendem do retículo endoplasmático para formar o sistema de Golgi. Esta passagem é permitida, como já mencionada, pelo gen SEC18. Embora os gens KEX1 e KEX2 possam atuar no sistema de Golgi, nenhuma alteração da protoxina tem sido observada neste estágio. Do sistema de Golgi são formadas vesículas (vesículas secretórias) onde uma série de reações ocorrem. A formação das vesículas é controlada pelo gen SEC7. Nestas vesículas a protoxina sofre fragmentação, que envolvem proteases. Na membrana das vesículas parece existir pontos receptores que se ligam com a subunidade gama. Estes mesmos pontos são os que se ligam com a subunidade alfa ao nível de membrana citoplasmática. A liberação da toxina, que é controlada pelo gen SEC1, se processa pela passagem da mesma para o meio externo. As subunidades alfa, gama e beta são liberadas da subunidade delta. A subunidade gama, por sua vez, se prende aos receptores da membrana celular, protegendo a célula da ação de sua própria toxina ("imunidade") por ocupar o espaço destinado à toxina. As subunidades alfa e beta se liberam da subunidade gama. A subunidade beta, ao se fixar aos receptores da parede celular (1,6- β -D-glicano), induz um enfraquecimento das ligações de enxofre, permitindo que a subunidade alfa seja liberada. Uma vez livre, a subunidade alfa procura os receptores da membrana para promover as alterações celulares que resultam em morte.

Considerações Gerais

O fator killer de levedura é um fenômeno complexo. A aplicação de tais leveduras na elaboração de vinhos parece, à

primeira vista, ser vantajosa no que se refere à domínio populacional. Mas a realidade biológica mostra que o simples fato de uma levedura ser killer não garante sua prevalência no processo de vinificação. Este domínio só seria verdadeiro se não houvesse a presença natural de leveduras neutras e killer no mosto. As leveduras neutras anulam o efeito killer e as leveduras killer contaminantes podem ameaçar as leveduras killer inoculantes (K_1 mata K_2 e K_3 ; K_2 mata K_1 e K_3 ; K_3 mata K_1 e K_2). A preocupação com o preparo do inóculo, portanto, deve ser a mesma que se tinha antes da descoberta do fator killer por Bevan e Makower em 1963.

Mesmo no caso de se inocular leveduras sensíveis em mostos com leveduras killer contaminantes, deve-se considerar alguns pontos já discutidos. Um destes pontos alerta para a existência de uma relação numérica entre as leveduras killer e leveduras sensíveis para a eficácia do efeito killer. A relação talvez esteja vinculada ao número de receptores da parede celular ocupados (mínimo 3×10^3 /célula) e à taxa específica de formação de produto tóxico das diferentes leveduras killer. Segundo dados de literatura, a atividade killer pode ser detectada em relações killer:sensível de 1:1, 1:2, 1:20, 1:40, 1:50, 1:500, 1:1000, 25:1, 100:1. Resultados de pesquisa recentes obtidos com a relação 1:2 (killer:sensível), onde o efeito killer pode ser detectado, mostram que não foi possível a eliminação total das linhagens sensíveis, mesmo quadruplicando a concentração de leveduras killer (2:1 - killer:sensível).

Partindo-se do princípio de que a quantidade de microrganismo contaminante é muitas vezes menor que a do

inóculo no momento da inoculação, o efeito killer das linhagens contaminantes presentes no mosto não devem causar qualquer problema se, imediatamente depois do esmagamento da uva, o mosto for inoculado com um volume e uma concentração corretos de leveduras inoculantes. Este cuidado deve ser tomado tanto para o caso de inoculações com leveduras killer como para as inoculações com leveduras neutras ou sensíveis. Quando, no entanto, por qualquer motivo, o mosto não é imediatamente processado, procedimento, aliás, considerado inadequado, os riscos de parada de fermentação são muitos altos. Neste aspecto, as leveduras killer contaminantes presentes no mosto desempenham um importante papel.

Outro aspecto de grande importância diz respeito à composição química do meio de cultura. Leveduras sensíveis em meio artificial e tamponado podem apresentar resistência em meio natural tendo mosto de uva como principal componente. O mesmo pode ser dito para a característica killer. Não raros são os relatos de literatura mostrando a baixa frequência de leveduras killer na natureza. Na África do Sul, de 85 linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* apenas 7 produziam proteína killer, 9 se apresentavam neutras e 69 eram sensíveis. Em meio agar, o número de linhagens killer desta população se reduzia a zero quando o pH meio era ajustado para aquele normalmente encontrado no vinho. A competência do fator killer em condições naturais, portanto, pode não ser a mesma que se obtém em condições artificiais. Tem sido observado que o meio completo e o suco de uva causam declínio da atividade killer. O etanol também afeta de forma negativa a característica killer.

Além da composição química do meio, a fase de crescimento do microrganismo também pode influir na sensibilidade e formação do produto killer. Leveduras sensíveis podem ter sua sensibilidade reduzida se a população estiver na fase estacionária. O crescimento de determinadas linhagens sensíveis pode ser até mesmo estimulado pela presença do fator killer. Por outro lado, a densidade de leveduras killer pode ser maior que a de leveduras não killer na presença de linhagens sensíveis.

Parece evidente, diante da complexidade do fenômeno killer, que a ação e o predomínio das linhagens killer não dependem apenas de fatores intrínsecos, mas também de sua interação com o meio ambiente e de algumas características ecológicas.

Literatura

- AMERICAN SOCIETY OF BREWING CHEMISTS Killer yeast identification. **American Society of Brewing Chemists Journal**, v.44, p.123-125, 1986.
- BUSSEY, H. Effects of yeast killer factor on sensitive cells. **Nature New Biology**, v.235, p.73-75, 1972.
- BUSSEY, H. Yeast killer factor-induced turbidity changes in cells and sphaeroplasts of a sensitive strain. **Journal of General Microbiology**, v.82, p.171-179, 1974.
- CANSADO, J.; LONGO, E.; AGRELO, D.; VILLA, T.G. Curing of the killer character of *Saccharomyces cerevisiae* with acridine orange. **FEMS Microbiology Letters**, v.65, p.233-238, 1989.

- CANSADO, J.; LONGO, E.; CALO, P.; SIERO, C.; VELASQUEZ, J.B.; VILLA, T.G. Role of killer character in spontaneous fermentations from NW Spain: ecology, distribution and significance. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.34, p.643-647, 1991.
- CARTWRIGHT, C.P.; ZHU, Y.-S.; TIPPER, D.J. Efficient secretion in yeast based on fragments of killer preprotoxin. **Yeast**, v.8, p.361-372, 1992.
- CUINIER, M.C.; GROS, M.C. Enquete sur la repartition des levures killer in France. **Vigne et Vins**, v.318, p.25-27, 1983.
- EL-SHERBEINI, M.; BEVAN, E.A.; MITCHELL, D.J. Two biochemically and genetically different forms of L dsRNA of *Saccharomyces cerevisiae* exist: one form, L2, is correlated with [OHK] plasmid. **Current Genetics**, v.7, p.63-68, 1983.
- EXTREMERA, A.L.; MARTIN, I.; MONTOYA, E. A new killer toxin produced by *Saccharomyces cerevisiae*. **Current Genetics**, v.5, p.17-19, 1982.
- EXTREMERA, A.L.; MONTOYA, E. The partial purification, separation, and properties of yeast killer toxins. **Microbios**, v.27, p.33-40, 1980.
- FARRIS, G.A.; FATICHENTI, F.; BERARDI, E.; DEIANA, P.; SATTA, T. A genetically improved wine yeast. **Biotechnology Letters**, v.14, p.219-222, 1992.
- FARRIS, G.A.; MANHAZU, I.; BUDRONI, M. Identification of killer factor in the yeast genus *Metschnikowia*. **Biotechnology Letters**, v.13, p.297-298, 1991.

- GANTER, P.F.; STARMER, W.T. Killer factor as a mechanism of interference competition in yeasts associated with cacti. *Ecology*, v.73, p.54-67, 1992.
- GOTO, G.; FUKUDA, H.; KICHISE, K.; KITANO, K.; HARA, S. Cloning and nucleotide sequence of the KHS killer gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Agricultural and Biological Chemistry*, v.55, p.1953-1958, 1991.
- HAMMOND, J.R.M.; ECKERSLEY, K.W. Fermentation properties of brewing yeast with killer character. *Journal of the Institute of Brewing*, v.90, p.167-177, 1984.
- HEARD, G.M.; FLEET, G.H. Occurrence and growth of killer yeasts during wine fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, v.53, p.2171-2174, 1987.
- JACOBS, C.J.; FOURIE, I.; VUUREN, H.J. van Characterization of killer yeast isolated from *Chenin Blanc* grapes and grape skins. *The South African Journal for Enology and Viticulture*, v.12, p.28-31, 1991.
- JACOBS, C.J.; FOURIE, I.; VUUREN, H.J. van Occurrence and detection of killer yeast on *Chenin blanc* grapes and grape skins. *The South African Journal for Enology and Viticulture*, v.9, p.28-31, 1988.
- KAGAN, B.L. Mode of action of yeast killer toxins: channel formation in lipid bilayer membranes. *Nature*, v.302, p.709-711, 1983.
- KANAMOTO, S.; ARAI, N.; KABOYASHI, M.; KAWAHARA, K.; IWAHASHI, H.; TANABE, C.; HATORI, H.; NAKAMURA, T. Isolation and characterization of mutants of *Saccharomyces cerevisiae* resistant to killer toxin of *Kluyveromyces lactis*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v.70, p.222-227, 1990.

- KANDLE, J.S.; STERN, T.A. Killer phenomenon in pathogenic yeast. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.15, p.568-571, 1979.
- KITAMOTO, H.K.; OHMOMO, S.; NAKAHARA, T. Selection of killer yeasts (*Kluyveromyces lactis*) to prevent aerobic deterioration in silage making. **Journal of Dairy Science**, v.76, p.803-811, 1993.
- KITANO, K.; SATO, M.; SHIMAZAKI, T.; HARA, S. Occurrence of wild killer yeasts in Japanese wineries and their characteristics. **Journal of Fermentation and Technology**, v.62, p.1-6, 1984.
- KONO, I.; HIMERO, K. *Kluyveromyces* yeast having killer activity against *Zygosaccharomyces rouxii*. **Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology**, v.39, p.1135-1139, 1992.
- KOTANI, H.; SHINMYO, A.; ENATSU, T. Killer toxin for sake yeast: properties and effects of adenosine 5'-diphosphate and calcium ion on killing action. **Journal of Bacteriology**, v.129, p.640-650, 1977.
- LAPLACE, J.M.; DELGENES, J.P.; MOLETTA, R.; NAVARRO, J.M. Alcoholic glucose and xylose fermentations by the coculture process: compatibility and typing of associated strains. **Canadian Journal of Microbiology**, v.38, p.654-658, 1992.
- LONGO, E.; CANSADO, J.; SIEIRO, C.; CALO, P.; VELAZQUEZ, J.B.; VILLA, T.G. Influence of the curing of the killer phenotype in *Saccharomyces cerevisiae* wine strains on their fermentative behavior. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.8, p.147-150, 1992.

- MATSUMOTO, Y.; SANKAR, G.; SOMMER, S.S.; WICKNER, R.B. A yeast antiviral protein, SKI8, shares a repeated amino acid sequence pattern with Beta-subunits of G proteins and several other proteins. *Yeast*, v.9, p.43-51, 1993.
- MICHALCAKOVA, S.; REPOVA, L. Effect of ethanol, temperature and pH on the stability of killer yeasts strains. *Acta Biotechnologica*, v.12, p.163-168, 1992.
- OUCHI, R.; HISHIYA, T.; AKIYAMA, H. UV-killer protoplast fusion as a method for breeding killer yeasts. *Journal of Fermentation and Technology*, v.61, p.631-635, 1983.
- PALLFREE, R.G.E.; BUSSEY, H. Yeast killer toxin: purification and characterization of the protein toxin from *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry*, v.93, p.487-493, 1979.
- PETERING, J.E.; SYMONG, M.R.; LANGDGE, P.; HENSCHKE, P.A. Determination of killer yeast activity in fermenting grape juice by using a marked *Saccharomyces* wine yeast strain. *Applied and Environmental Microbiology*, v.57, p.3232-3236, 1991.
- PFEIFFER, P.; RADLER, F. Purifications and characterization of extracellular killer toxin of *Saccharomyces cerevisiae* strain 28. *Journal of General Microbiology*, v.128, p.2699-2706, 1982.
- PFEIFFER, P.; RADLER, F.; CASPRITZ, G.; HANEL, H. Effect of a killer toxin of yeast on eucaryotic systems. *Applied and Environmental Microbiology*, v.54, p.1068-1069, 1988.
- PHILLISKIRK, G.; YOUNG, T.W. The occurrence of killer character in yeasts of various genera. *Antonie van Leeuwenhoek*, v.41, p.147-151, 1975..1s1

- PRETORIUS, I.S.; WESTHUIZEN, T.J. van der Impact of yeast genetics and recombinant DNA technology on wine industry. **The South African Journal for Enology and Viticulture**, v.12, p.3-31, 1991.
- ROSINI, G. The occurrence of killer characters in yeasts. **Canadian Journal of Microbiology**, v.29, p.1462-1464, 1983.
- SCHIMITT, M.J.; TIPPER, D.J. Genetic analysis of maintenance and expression of L and M double-stranded RNAs from yeast killer virus K28. **Yeast**, v.8, p.373-384, 1992.
- SEKI, T.; CHOI, E.-H.; RYU, D. Construction of killer wine yeast strain. **Applied and Environmental Microbiology**, v.49, p.1211-1215, 1985.
- SHIMIZU, K.; ADACHI, T.; KITANO, K.; SHIMAZAKI, T.; TOTSUKA, A.; HARA, S.; DITTRICH, H.H. Killer properties of wine yeasts and characterization of killer wine yeasts. **Journal of Fermentation and Technology**, v.63, p.421-429, 1985.
- SOMMER, S.S.; WICKNER, R.B. Co-curing of plasmids affecting killer double-stranded RNAs of *Saccharomyces cerevisiae*: [HOK], [NEX] and the abundance of L are related and further evidence that M1 requires L. **Journal of Bacteriology**, v.150, p.545-551, 1982.
- STARMER, W.T.; GANTER, P.F.; ABERDEEN, V. Geographic distribution and genetic of killer phenotypes for the yeast *Pichia kluyveri* across the United States. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.55, p.1953-1958, 1991.
- STARMER, W.T.; GANTER, P.F.; ABERDEEN, V.; LACHANCE, M.A.; PHAFF, H.J. The ecological role of killer yeasts in natural communities of yeasts. **Canadian Journal of Microbiology**, v.33, p.783-796, 1987.

- STUMM, C.; HERMANS, J.M.H.; MIDELBEEK, E.J.; CROES, A.F.;
VRIES, G.J.M. de Killer-sensitive relationships in yeasts
from natural habitats. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.43,
p.125-128, 1977.
- SULO, P; MICHALCAKOVA, S. The K3 type killer strains of genus
Saccharomyces for wine production. **Folia Microbiologica**,
v.37, p.289-294, 1992.
- SULO, P; MICHALCAKOVA, S.; REISE, V. Construction and
properties of K1 type killer wine yeasts. **Biotechnology
Letters**, v.14, p.55-60, 1992.
- THORNTON, R.J. Wine yeast research in New Zeland and
Australia. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.11,
p.327-345, 1991.
- TIPPER, D.J.; BOSTIAN, K.A. Double-stranded ribonucleic acid
killer systems in yeasts. **Microbiological Reviews**, v.48,
p.125-156, 1984.
- TOMMASINO, M. Killer system of **Kluyveromyces lactis**: the open
reading frame 10 of the pGK12 plasmid encodes a putative DNA
binding protein. **Yeast**, v.7, p.245-252, 1991.
- TREDOUX, H.G.; TRACEY, R.P.; TROMP, A. Killer factor in wine
yeasts and its effect on fermentation. **The South African
Journal for Enology and Viticulture**, v.7, p.105-112, 1986.
- VEZINHET, F. de Quelques applications de la génétique des
levures en enologie. **Bulletin de L'O.I.V.**, v.608,
p.830-842, 1981.
- VUUREN, H.J.J. van; JACOBS, C.J. Killer yeast in the wine
industry: a review. **American Journal of Enology and
Viticulture**, v.43, p.119-128, 1992.