

CARACTERIZAÇÃO DO FATOR KILLER EM LEVEDURAS SELVAGENS ISOLADAS DURANTE O PROCESSO FERMENTATIVO DE VINHOS TROPICAIS NO BRASIL

CAMILA MUNIQUE PAULA BALTAR SILVA DE PONZZES¹; CAROLINE ALBUQUERQUE SANTANA²; DÂNGELLY LINS FIGUERÔA MARTINS DE MÉLO³; GIULIANO ELIAS PEREIRA⁴; CARLOS ALBERTO TUÃO GAVA⁵; JULIANA DE OLIVEIRA SANTOS⁶; SHEILA CRISTINA SILVA DE SIQUEIRA⁶; PATRÍCIA OLIVEIRA SANTOS³; ANTÔNIO MÁRCIO BARBOSA JUNIOR⁷; RITA DE CÁSSIA TRINDADE¹. ¹DMO/UFS; ²Bolsista PIBIC/CNPq – Biologia/UFS; ³Doutoranda RENORBIO/UFS; ⁴Pesquisador Embrapa Uva e Vinho/Semi-Árido; ⁵Pesquisador Embrapa Semi-Árido; ⁶Bolsista-ITEP/Embrapa Semi-Árido; ⁷Doutorando UFMG.

E-mail: milinhadeponzzes@ibest.com.br

RESUMO

Durante a elaboração do vinho, inúmeras leveduras selvagens contribuem para a realização da fermentação alcoólica. É importante verificar a presença da proteína *killer* em leveduras, pois esta permite inibir a ação de leveduras de contaminação. O objetivo deste trabalho foi verificar a atividade *killer* em leveduras selvagens isoladas em uvas, cultivar Tempranillo, durante o processo de elaboração de vinhos tropicais no nordeste do Brasil. As uvas foram coletadas em junho/2007. Foram utilizados 68 amostras de leveduras selvagens, isoladas durante o processo fermentativo, duas leveduras padrão, produtoras das proteínas K1 e K2 (*Saccharomyces cerevisiae*), e 3 amostras de leveduras sensíveis a estas proteínas (*S. cerevisiae* NCYC 1006, *Candida glabrata* Y55 e *Pichia kluyveri* CAY15). Todas as leveduras foram previamente semeadas em ágar Sabouraud (48 horas a 25 +/- 2°C). Suspensões celulares equivalentes à escala 0,5 de McFarland das leveduras sensíveis foram inoculadas em meio YEPD-azul de metileno tamponado com tampão citrato, pH 4,2, para a formação do tapete. Sobre as sensíveis, foram inoculadas as leveduras selvagens, juntamente com as amostras padrão de produção das proteínas *killer* K1 e K2, em suspensões equivalentes a escala 5 de Mcfarland e incubadas a 22 °C. Após esse período a sensibilidade foi evidenciada pela presença do halo de inibição de crescimento ao redor da colônia da levedura *Killer*, assim como pela presença de uma região azul, formada por células mortas coradas pelo azul de metileno. Foram feitas três leituras (2º, 3º e 5º dia). Das 68 leveduras selvagens testadas, a atividade *killer* foi verificada em sete, somente para a amostra padrão

Y55. A atividade *killer* evidenciada em leveduras selvagens testadas representa um potencial competitivo na garantia de uma fermentação em boas condições. A determinação da atividade *killer* é mais uma ferramenta para auxiliar na tipificação de linhagens de leveduras em regiões produtoras de vinhos.

Palavras-chave: Linhagem de levedura; proteína *killer*; vinhos tropicais; tipificação.

1. INTRODUÇÃO

A característica *killer* é um fator importante para leveduras utilizadas na indústria de bebidas fermentadas, principalmente para a vinificação. No processo fermentativo, pode haver contaminação, causando possíveis limitações qualitativas. Tal característica ocorre somente em alguns microrganismos, por isso, é fundamental encontrá-la em leveduras que atuam na fermentação alcoólica das uvas, no intuito de preservar a qualidade dos vinhos. O fenômeno *killer* caracteriza-se por produzir exotoxinas com atividade antimicrobiana, que são mediadas por receptores de parede específicos da célula em microrganismos suscetíveis. Estas leveduras estão aptas a destruir células e atuam em organismos da mesma espécie ou espécies distintas, que são caracterizadas por estarem presentes em substratos com alta concentração de açúcar e baixo pH. (POLONELLI *et al.*, 1991).

A atividade *killer*, de acordo com Somers e Bevan (1969), corresponde a produção de proteínas de baixo peso molecular que são letais às leveduras sensíveis. Suas toxinas *killer* possuem massa molecular que varia de 18 a 300 kDa, dependendo da espécie de levedura (SOARES; SATO, 2000). A capacidade de produção de toxina *killer* pode representar uma vantagem seletiva entre espécies competidoras em um mesmo habitat (SATO *et al.*, 1993). Esta característica foi descrita pela primeira vez em linhagens de laboratório de *Saccharomyces cerevisiae* por Bevan e Makower, 1963. Foi proposto que certas cepas de *S. cerevisiae* podiam ser classificadas em três fenótipos: *killer*, sensível e neutra. Quando células *killer* e sensíveis cresciam em um mesmo meio de cultura, uma grande proporção das células sensíveis era destruída. As células neutras não matavam células sensíveis, nem eram mortas por células *killers* (BRITES, 2003). Contudo, as toxinas produzidas pelas leveduras *killer* são sensíveis ao calor e a protease e dependentes das condições do pH e oxigênio (WOODS; BEVAN, 1968; VAZ *et al.*, 2002). De acordo com (VAZ *et al.*, 2002), a obtenção de uma levedura que reúna as características de boa fermentadora e atividade *killer*, é de grande importância para a indústria de bebidas alcoólicas, pois estas leveduras têm a vantagem adicional de eliminar leveduras contaminantes sensíveis durante o processo fermentativo. Assim, proporcionariam melhor qualidade aos produtos originados da fermentação, como o vinho.

2. OBJETIVO

Verificar a presença da atividade *killer* em leveduras selvagens isoladas em uvas, cultivar Tempranillo, durante o processo de elaboração de vinhos tropicais no nordeste do Brasil.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Microrganismos

Para verificar a atividade *Killer*, foram utilizadas 68 leveduras selvagens, pertencentes ao banco de linhagens do Laboratório de Microbiologia Aplicada/UFS-Brasil, isoladas em uvas da cultivar Tempranillo, durante o processo de elaboração de vinhos tropicais no nordeste do Brasil. As uvas foram coletadas em junho/2007. Foram utilizadas duas amostras padrão de produção da proteína *killer* K1 e K2 (*Saccharomyces cerevisiae*) e as linhagens padrão de sensibilidade a estas proteínas *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1006, *Candida glabrata* Y55 e *Pichia kluyveri* CAY15. Todas as leveduras foram repicadas em ágar Sabouraud por 48 horas a temperatura ambiente (25+/-2°C).

3.2 Ensaio de caráter *Killer*

Após a multiplicação fez-se uma suspensão de 0.5 na Escala de MacFarland, das leveduras padrão de sensibilidade (NCYC 1006, Y55 e CAY15), que foram espalhadas com swab (Figura 01), em meio YEPD-azul de metileno tamponado com citrato-fosfato, pH 4,5 a 4,7. A suspensão para as leveduras testadas na uva e para os padrões de produção das proteínas K1 e K2 foi de 5 na Escala de MacFarland. Sobre os padrões de sensibilidade foram inoculadas (Figura 02) as leveduras a serem testadas e os controles positivos (amostras padrão na produção de K1 e K2), em seguida foram incubadas a 22°C por até 10 dias.



Figura 01 – Espalhamento dos padrões de sensibilidade (NCYC 1006, Y55 e CAY15) em meio YEPD-azul de metileno com uso de swab. LMA/UFS. Agosto de 2007.



Figura 02 – Inoculação das leveduras a serem testadas e dos padrões de produção das proteínas K1 e K2. LMA/UFS. Agosto de 2007.

4. RESULTADOS

Após o período de incubação, a sensibilidade foi evidenciada pela presença do halo de inibição de crescimento ao redor da colônia da levedura *Killer*, bem como pela presença de uma região azul, formada por células mortas coradas pelo azul de metileno. Foram feitas três leituras (2º, 3º e 5º dia). Das 68 leveduras selvagens testadas, a atividade *killer* foi verificada em sete (7K, 26K e 28K, 35K, 43K, 54K, 60K), somente para a amostra padrão Y55 (Figura 03, 04, 05, 06, 07, 08, respectivamente).

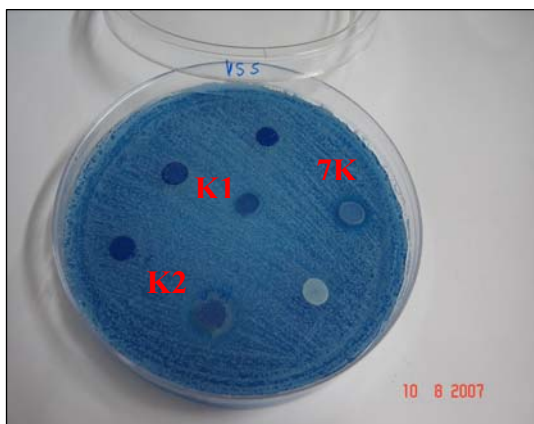


Figura 03 – Atividade *Killer* positiva para o isolado 7K (1 cm de halo) em Y55. LMA/UFS. Agosto de 2007.

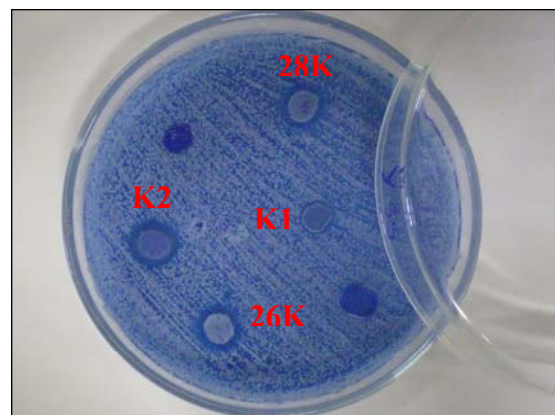


Figura 04 – Atividade *Killer* positiva para os isolados 26K e 28K (1,1 e 1,2 cm de halo, respectivamente) em Y55. Agosto de 2007. LMA/UFS. Agosto de 2007.

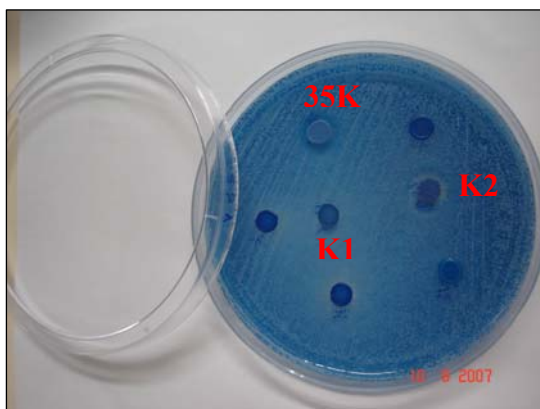


Figura 05 – Atividade *Killer* positiva para o isolado 35K (0,7 cm de halo) em Y55. LMA/UFS. Agosto de 2007.

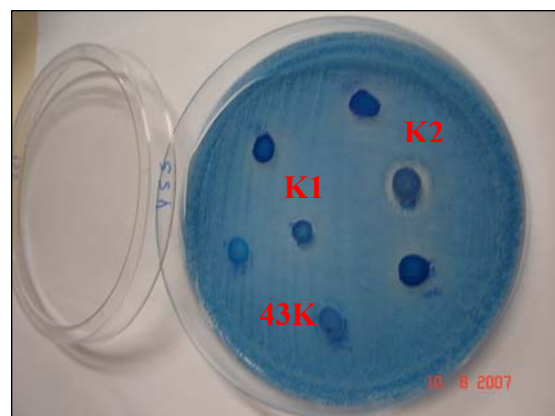


Figura 06 – Atividade *Killer* positiva para o isolado 43K (1,1 cm de halo) em Y55. LMA/UFS. Agosto de 2007.

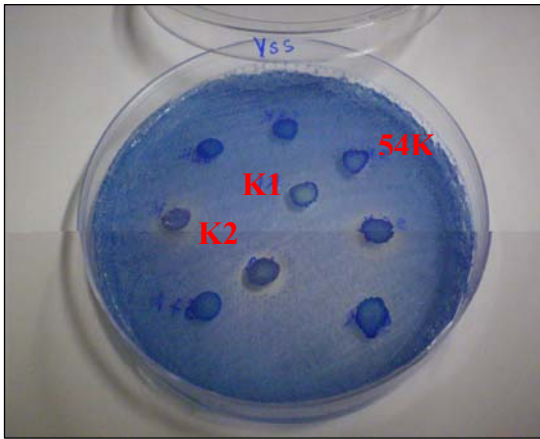


Figura 07 – Atividade *Killer* positiva para o isolado 54K (1 cm de halo) em Y55. LMA/UFS. Agosto de 2007.

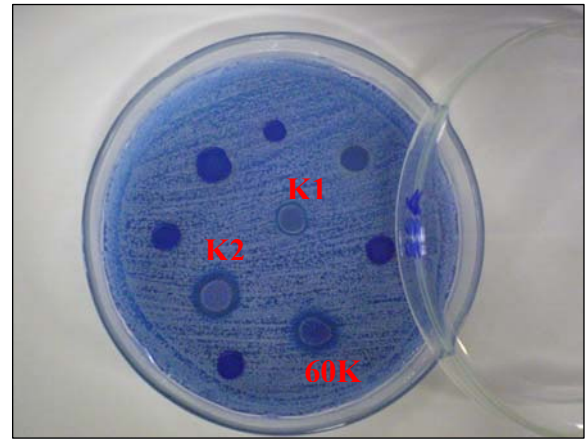


Figura 08 – Atividade *Killer* positiva para o isolado 60K (1 cm de halo) em Y55. LMA/UFS. Agosto de 2007.

5. CONCLUSÃO

O caráter *Killer* foi verificado em sete das 68 amostras testadas. A atividade *Killer* se apresenta em algumas das leveduras selvagens testadas, sugerindo um potencial competitivo na permanência das mesmas durante o processo de produção de vinho, podendo ser considerada como mais uma ferramenta para auxiliar na tipificação de linhagens de leveduras.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BEVAN, E.A.; MAKOWER, M. The physiological basis of the killer character in yeast. **Proceeding of the 11th International Conference on Genetics**, 1: 203, 1963.

BRITES, A. S. T. **Seleção de Linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* Potencializadas pelo Fator Killer, H₂S⁻ e o Carater Floculante**. Piracicaba, 2003. 72p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

POLONELLI, L; CONTI, S; GERLONI, M; MAGLIANI, W; CASTAGNOLA, M; LUCAS, A . P. **Acerola: suco da saúde conquista o mundo inteiro**. Manchete Rural, Rio de Janeiro, v.5, n.69, p.10-13, 1993.

SATO, H. H.; PASTORE, G. M.; PARK, Y. K. **Rev Microbiol** 1993, 24, 71-72.

SOARES, A; SATO, H. H. **Braz J Microbiol**, v.31, p. 291-297, 2000.

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

VAZ, F. L. ; MARTINS, S. C. S. ; CARVALHO, A. F. F. U. ; Melo, V. M. M. . Isolamento e caracterização de um toxina killer de levedura isolada de cana-de-açúcar. **In: VI Reunião Regional da SBBq Nordeste**, 2002, Fortaleza. CD room VI Reunião Regional da SBBq Nordeste, 2002.

WOODS, D.R., BEVAN, E.A. Studies on the nature of the killer factor produced by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal Genetic Microbiology**. Vol. 51, p.115-126. 1968.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos às vinícolas do Vale pelas amostras de uvas cedidas para este estudo, bem como à Embrapa Semi-Árido, a Universidade Federal de Sergipe e a Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), pelos recursos disponibilizados para o projeto.