

INIBIÇÃO DA DETECÇÃO DE FATOR KILLER EM MEIOS COMPLEXOS CONTENDO DERIVADOS DE DIFERENTES CULTIVARES DE UVA

Gildo Almeida da Silva¹; Taís Letícia Bernardi²; Patrícia D. C. Shacker³; Ana Paula Todeschini⁴

¹Embrapa Uva e Vinho, Departamento de Microbiologia, 95700-000, Bento Gonçalves, RS.

²Embrapa Uva e Vinho/UFRGS- Bolsista-Capes, 95700-000, Bento Gonçalves, RS.

³Embrapa Uva e Vinho/UFRGS- Bolsista-Embrapa, 95700-000, Bento Gonçalves, RS

⁴Embrapa Uva e Vinho/Unijui, 95700-000, Bento Gonçalves, RS

INTRODUÇÃO

O fator killer é uma proteína de baixo peso molecular produzida por algumas linhagens de leveduras, embora descoberta por Makower & Bevan (1963) em *Saccharomyces cerevisiae*, não é exclusividade deste gênero, mas também encontrada em outros gêneros, como *Pichia* (Comitini et al., 2004; Passoth et al., 2006; Hernández et al., 2008), *Kluyveromyces* (Stark et al., 1984; Comitini et al., 2004; Hernández et al., 2008), *Torulopsis* (Bussey & Skipper, 1975), *Candida* (Silva et al., 2008; Hernández et al., 2008) e *Debaryomyces* (Hernández et al., 2008).

A detecção de fator killer de *Sacch. cerevisiae* depende de fatores biológicos, como linhagens sensíveis (Young & Yagiu, 1978; Silva, 1996), composição química do meio (Hernández et al., 2008; Silva et al., 2008) e condições de cultivo (Heard & Fleet, 1987; Silva, 1996). No Brasil, foram isoladas, diretamente de cachos de uva da região do Vale dos Vinhedos, linhagens killer, sensíveis e neutras (Silva, 1996).

O meio YEPD tamponado (pH 4,5) é o mais empregado para detectar tal fator. Nem sempre os resultados com este meio são consistentes, ou seja, o fator killer pode estar presente mas pode não ser detectado. Este fato dificulta a caracterização de uma linhagem em killer, sensível e neutra. O trabalho teve como objetivo verificar a possibilidade de se empregar diferentes produtos da uva como meio de cultura para a detecção do fator killer produzido por *Sacch. cerevisiae*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Micro-organismos: Foi utilizada a linhagem *Saccharomyces cerevisiae* Embrapa 1B/84, para a produção de toxina killer e para a detecção, foi empregada a linhagem *Saccharomyces cerevisiae* Embrapa 26B/84.

Meios de Cultura: A produção de proteína killer foi induzida no meio líquido comercial YEPD (extrato de levedura 10 g.L⁻¹, peptona 20 g.L⁻¹ e dextrose 20 g.L⁻¹). Meios sólidos contendo diferentes produtos derivados da uva e de diferentes cultivares foram avaliados para a detecção. Foram utilizados suco de uva da cultivar Isabel, mosto de uva das cultivares Cabernet Sauvignon e Lorena (M80). Este último contém mosto de uva da cultivar Lorena na proporção de 80 mL e 20 mL de ELNC (Silva et al., 2006). Vinho das cultivares Ruby Cabernet, Merlot, Cabernet Sauvignon e Tannat também foram avaliados. Os meios, para a detecção, foram preparados na mesma proporção do M80, suplementado com 10 g.L⁻¹ de ágar e 0,03 g.L⁻¹ de azul de metileno (Merck). Como controle foi utilizado o meio YEPD. Todos os meios foram esterilizados a 121 °C, a 1 atm e por 30 min. O teor de etanol foi determinado segundo Ribéreau-Gayon et al. (1982)

Condições para produção do fator killer: Alíquotas de 2 mL de uma suspensão de células da linhagem *Sacch. cerevisiae* Embrapa 1B/84, contendo 10⁷ células.mL⁻¹, foram transferidas para 100 mL de meio YEPD. O meio foi incubado em agitador rotatório (New Brunswick-Edson, US) por 8 dias a 150 rpm, a 18° C. As alíquotas para avaliação dos meios para a detecção foram retiradas no intervalo de 24 horas.

Condições para detecção do fator killer: A capacidade killer da proteína formada foi avaliada pela técnica de contato entre a proteína killer isenta de células killer e células sensíveis, denominada interação proteína/célula (Silva et al., 2008). Alíquotas diárias do meio de produção foram centrifugadas a 10000 x g (Eppendorf-Centrifuge 5416, USA) e submetidas à filtração esterilizante com membrana de 0.22 µm (Millipore-Millex, USA). Na placa, contendo os diferentes meios sólidos para detecção previamente inoculados com a linhagem sensível *Sacch. cerevisiae* Embrapa 26B/84, foram feitos poços de 0,5 cm de diâmetro. Os poços foram preenchidos com 20 µL do filtrado YEPD. As placas foram incubadas a 18° C. Foram consideradas positivas as interações que resultaram em formação de halo e de linha de morte.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A detecção do fator killer em menos de sete dias de fermentação só foi possível nos meios contendo suco e mosto de uva (Figura 1 A,C,D). O meio YEPD não se mostrou adequado para a detecção (Figura 1 B). Provavelmente, o tempo necessário para a produção de fator killer passível de detecção em YEPD seja maior que para aqueles derivados da uva. De fato, após sete dias de fermentação, o meio YEPD se mostrou eficiente (Figura 1 E). Este fato sugere haver, no suco de uva, fatores que fragilizam vias citoprotetoras da levedura sensível ou ativam

efetivamente a ação da proteína killer. Podem ainda atuar como facilitadora do trânsito para o interior da célula ou do contato desta proteína com sítios vulneráveis da parede e da membrana celular. Embora os mecanismos requeridos para este trânsito e morte não sejam ainda completamente conhecidos, Carroll et al. (2009) verificaram vias citoprotetoras em mutantes hipersensíveis à proteína killer K28. Os fatos aqui observados exibem a fragilidade do meio YEPD na detecção do fator killer, podendo levar a resultados falsos negativos. Embora os sucos possam ser empregados para a detecção do fator killer, os sucos brancos ou os mostos de uvas brancas ou tintas devem ser os de escolha por facilitar a visualização do efeito. Em todos os meios que continham vinho, não foi possível detectar a ação deste fator sobre a linhagem sensível (Figura 1 F,G,H,I). A presença do vinho na composição do meio para a detecção sugere haver agregação de fatores que ativam as vias citoprotetoras da linhagem sensível e assim não permitem que a ação deletéria do fator killer seja efetivada. Collins et al. (2009) invocam o etanol presentes em bebidas como vinho, cerveja e licor como o provável agente citoprotetor em células animais. O fato aqui observado pode ser atribuído ao etanol do vinho uma vez que, embora todos os meios de detecção tenham sido submetidos à esterilização pelo calor, o teor de etanol no meio final ainda foi de 3,19 ° GL.



Figura 1 - Detecção da atividade killer em diferentes meios de cultura contendo suco ou mosto de uva e em YEPD : A= Mosto Lorena, B= YEPD menos sete dias, C= Mosto Cabernet Sauvignon, D= Suco Isabel, E= YEPD mais de sete dias; F= Ruby Cabernet, G= Merlot, H= Cabernet Sauvignon, I= Tannat

REFERÊNCIAS

- BEVAN, E. A; MAKOWE, M. The physiological basis of the killer character in yeast. In: International Conference on Genetics, 11., 1963, The Hague. **Proceedings...** Oxford: Pergamon, 1963. p. 202-203.
- BUSSEY, H.; SKIPPER, N. Membrane-mediated killing of *Saccharomyces cerevisiae* by glycoproteins from *Torulopsis glabrata*. **J. Bacteriol.**, v. 124, n. 1, p. 476-483, 1975.
- CARROLI, S. Y.; STIRLING, P. C.; STIMPSON, H. E. M.; GIESSELMANN, E.; SCHMITT, M. J.; DRUBIN, D. G. A yeast killer toxin screen provides insights into a/b toxin entry, tracking, and killing mechanisms. **Dev. Cell**, v. 17, n. 4, p. 552-560, 2009.
- COLLINS, M. A.; NEAFSEY, E. J.; MUKAMAL, K. J.; GRAY, M. O.; PARKS, D. A.; DAS, D. K.; KORTHUIS, R. J. Alcohol in moderation, cardioprotection, and neuroprotection: epidemiological considerations and mechanistic studies. **Alcohol Clin. Exp. Res.**, v. 33, n. 2, p. 206-219, 2009.

COMITINI, F.; INGENIIS, J. D.; DE, J. I.; PEPE, L.; MANNAZZU, I.; CIANI, M. *Pichia anomala* and *Kluyveromyces wickerhamii* killer toxins as new tools against *Dekkera/Brettanomyces* spoilage yeasts. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 238, n. 1, p. 235-240, 2004.

HEARD, G. M.; FLEET, G. H. Occurrence and growth of killer yeasts during wine fermentation. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 53, n. 9, p. 2171-2174, 1987.

HERNÁNDEZ, A.; MARTÍN, A.; CÓRDOBA, M. G.; BENITO, M. J.; ARANDA, E.; PÉREZ-NEVADO, F. Determination of killer activity in yeasts isolated from the elaboration of seasoned green table olives. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 121, n. 2, p. 178-188, 2008.

MAKOWER, M.; BEVAN, E. A. The inheritance of a killer character in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In Geerts, S., editor, Genetics today. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF GENETICS, 11., 1963, The Hague. **Proceedings...** Oxford: Pergamon, 1963. p. 202.

PASSOTH, V.; FREDLUND, E.; DRUVEFORS, U. A.; SCHNÜRER, J. Biotechnology, physiology and genetics of the yeast *Pichia anomala*. **FEMS Yeast Res.**, v. 6, n. 1, p. 3-13, 2006.

RIBÉREAU-GAYON, J.; PEYNAUD, E.; SUDRAUD, P.; RIBÉREAU-GAYON, P. **Traité d'Oenologie: sciences et techniques du vin**. 2 ed. Paris: Dunod, 1982.

SILVA, G. A. da. The occurrence of killer, sensitive, and neutral yeasts in Brazilian Riesling Italic grape must and the effect of neutral strains on killing behaviour. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 46, n. 2, p. 112-121, 1996.

SILVA, G. A. da; ALMEIDA, E. A. de. Production of yellow-green fluorescent pigment by *Pseudomonas fluorescens*. **Brazilian Archives Biology and Technology**, v. 49, n. 3, p. 411-419, 2006.

SILVA, G. A. da; POLI, J. S.; POLETTO, C. M.; BALBINOTTE, J.; VALENTE, P. Composição do meio e sua relação com a expressão killer. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VITICULTURA E ENOLOGIA, 12., 2008, Bento Gonçalves. **Anais...** Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2008. p. 158.

SILVA, S.; CALADO, S.; LUCAS, C.; AGUIAR, C. Unusual properties of the halotolerant yeast *Candida nodaensis* killer toxin, cnkt. **Microbiol. Res.**, v. 163, n. 2, p. 243-251, 2008.

STARK, M. J.; MILEHAM, A. J.; ROMANOS, M. A.; BOYD, A. Nucleotide sequence and transcription analysis of a linear DNA plasmid associated with the killer character of the yeast *Kluyveromyces lactis*. **Nucleic Acids Res.**, v. 12, n. 15, p. 6011-6030, 1984.

YOUNG, T. W.; YAGIU, M. A comparison of the killer character in different yeasts and its classification. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 44, n. 1, p. 59-77, 1978.