

Purificação parcial de toxina *killer* de *hansenula wingei* visando aplicação no controle do desenvolvimento de fungos filamentosos deteriorantes de alimentos

Herrison Yoshiki Yocida Fontana
Fernanda Gonzales Paião

Mayka Reghiany Pedrão
Alexandre Rodrigo Coelho

1 Introdução

O Brasil é um país agropecuário de destaque no cenário mundial da produção de *commodities* agrícolas, com produtividade de 219,1 milhões de toneladas de grãos, distribuídos em aproximadamente 59 milhões de hectares de área cultivada na safra de 2016/17 (Companhia Nacional de Abastecimento – CONAB, 2017). Dentre a produção de cereais, leguminosas e oleaginosas, destacam-se o arroz, a soja e o milho, com produção de 11,89, 105,56 e 87,41 milhões de toneladas, respectivamente (CONAB, 2017).

Não obstante, o país tem relevada participação como produtor de frutas frescas, colocando-o entre os quatro maiores produtores mundiais, juntamente com a China, Índia e os Estados Unidos da América (Secretaria de Estado da Agricultura e Abastecimento – SEAB, 2015).

Os grãos, de forma geral, podem ser armazenados por longos períodos de tempo sem perdas significativas na qualidade. Entretanto, são suscetíveis à deterioração por fungos toxigênicos, quando não adotados controles adequados durante o armazenamento, acarretando perdas econômicas e riscos à saúde humana e animal (MIGUEL, 2009).

A respeito das infecções fúngicas que acometem os produtos agropecuários, citam-se, principalmente, a ocorrência de *Aspergillus ochraceus* em café, *A. flavus* em amendoim (ZORZETE, 2010) e castanhas-do-brasil (REIS et al., 2012),

Fusarium verticillioides em milho (MIGUEL, 2009) e *Penicillium expansum* em maçãs (COELHO, 2005).

Durante o crescimento, determinadas espécies podem produzir micotoxinas, metabólitos secundários, que constituem um perigo natural na cadeia produtiva do alimento. Sendo assim, medidas de controle do desenvolvimento fúngico se tornam necessárias, a fim de garantir a segurança desses alimentos. Nesse contexto, o controle biológico por meio da utilização de leveduras *killer* vem sendo promissor contra fungos filamentosos de importância econômica. Citam-se, por exemplo, o controle satisfatório *in vivo* de *P. expansum* em maçãs pós-colheita por *Hansenula wingei*, bem como contra fungos fitopatogênicos causadores da ferrugem asiática e do mofo branco (CALEGARI et al., 2014). Dessa forma, este trabalho teve por objetivo produzir e purificar parcialmente toxina *killer* de *Hansenula wingei* visando aplicação no controle do desenvolvimento de fungos filamentosos deteriorantes de alimentos.

2 Característica killer

Determinadas cepas de leveduras são capazes de inibir o crescimento de outras leveduras sensíveis e outros micro-organismos por meio de exotoxinas de natureza proteica ou glicoproteica. Toxinas *killer*, como são denominadas, podem diferir entre espécies, em estrutura molecular, massa molecular, bases genéticas, maturação das proteínas, imunidade e mecanismos de ação (MAGLIANI et al., 1997; MARQUINA et al., 2002).

O primeiro fenômeno de atividade *killer* foi descrito por Bevan e Makower (1969) a partir da observação de isolados de *Saccharomyces cerevisiae*. Desde então, leveduras *killer* têm sido isoladas e caracterizadas dos mais diversos ambientes. Dentre os gêneros, destacam-se: *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Ustilago*, *Torulopsis*, *Williopsis* e *Zigowilopsis* (MAGLIANI et al., 1997; PHILLISKIRK; YOUNG, 1975; YOUNG, 1981; SCHMITT; BREINIG, 2002).

Os fenótipos *killer* de leveduras podem ser classificados como *killer* resistente (K^+R^+), *killer* sensível (K^+R^-) e neutras (K^-R^-). As linhagens resistente e sensível são produtoras de toxina, podendo ou não ser resistente às toxinas de outras linhagens, ao passo que as linhagens classificadas como neutras não produzem toxina e não possuem resistência (MAGLIANI et al., 1997).

Young e Yagiu (1978) elaboraram um sistema de classificação das toxinas de leveduras, nomeando-as K1 a K10, tendo como base as interações entre as linhagens quanto aos padrões de sensibilidade e atividade *killer*. Posteriormente, Zhu e Bussey (1989) adicionaram ao sistema o grupo K11 (Tabela 1).

Tabela 1 – Classificação dos grupos *killer* segundo interação entre as linhagens

Classificação <i>killer</i>	Classes sensíveis
K1	K2, K3 e K4
K2	K1 e K4
K3	K1 e K4
K4	K1
K5	K1, K3 e K4
K6	K1, K2, K3 e K4
Classificação <i>killer</i>	Classes sensíveis
K7	K1, K3, K4 e K6
K8	K1, K2, K3, K4 e K6
K9	K1, K2, K3, K4, K5 e K8
K10	K1, K2, K3, K4, K5, K6, K7 e K8
K11	K1

Fonte: Young e Yaugiu (1978), Zhu e Bussey (1989).

2.1 Bases genéticas e mecanismos de ação

As bases genéticas que conferem o fenótipo *killer* às leveduras são variáveis entre espécies, podendo ser determinado por genes cromossomais ou extra-cromossomais. Este último é dividido ainda em plasmídeos lineares de DNA fita dupla e RNA fita dupla, encapsulados em *virus-like-particles* (VLP), e identificados, respectivamente, em *K. lactis* e em *S. cerevisiae*, conforme apresentado na Tabela 2 (SCHIMITT; BREINIG, 2002).

A parede celular de células fúngicas determina sua forma e é essencial para sua integridade, sendo constituída principalmente de carboidratos livres e aqueles ligados a proteínas. Os principais constituintes da parede celular de leveduras são o (1→3) -β-D-glucana (50%), (1→6) -β-D-glucana (5%) e manoproteínas. Podem conter também (1→6) -β-D-glucana com algumas ligações (1→3) -β (14%) e quitina (0,6 a 9%). A função dos polissacarídeos na parede celular é a de recepção de proteínas, mas ainda pouco se sabe sobre este mecanismo (SANTOS et al., 2000).

O mecanismo de ação da toxina *killer* foi proposto inicialmente por Middebeek et al. (1980), quando sugeriram haver uma interação da toxina de *Pichia*

kluveri e células de *S. cerevisiae*, determinado em três estágios sucessivos: (I) ligação da toxina *killer* em receptores específicos, (II) transmissão da toxina para seu local reativo na membrana plasmática, (III) dano à permeabilidade da membrana, resultando em extravasamento de íons potássio e diminuição do pH intracelular.

Segundo Marquina et al. (2002), as toxinas plasmidiais K1 e K2 de *S. cerevisiae*, apesar de serem diferentes, possuem mecanismos de ação semelhantes, se ligando ao receptor (1 \otimes 6) - β -D-glucana da membrana plasmática, tornando-a permeável a prótons e íons potássio. Por outro lado, a toxina K9 codificada por genes cromossomais de *Hansenula mrakii* tem ação sobre os processos metabólicos que envolvem a síntese de β – glucano, especificamente β - (1,3) -glucano em células sensíveis, tornando-as osmoticamente frágeis e defeituosas, resultando em sua lise e conseqüentemente morte (YAMAMOTO et al., 1986a).

Tabela 2 – Leveduras *killer* e bases genéticas de sua toxina

Leveduras <i>killer</i>	Bases genéticas
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	dsRNA
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	dsRNA
<i>Zygosaccharomyces bailli</i>	dsRNA
<i>Ustilago maydis</i>	dsRNA
<i>Kluyveromyces lactis</i>	dsDNA linear plasmidial
<i>Pichia acaciae</i>	dsDNA linear plasmidial
<i>Pichia inositovora</i>	dsDNA linear plasmidial
<i>Pichia kluveri</i>	Cromossomal
<i>Pichia farinosa</i>	Cromossomal
<i>Pichia anomala</i>	Cromossomal
<i>Williopsis mrakii</i>	Cromossomal

Fonte: Schimitt e Breinig (2002).

2.2 Aplicações

Desde sua descoberta, leveduras *killer* e suas toxinas têm sido utilizadas em diversas aplicações: nos processos fermentativos industriais (VONDREJS; JANDEROVÁ; VALASEK, 1996; LIMA et al., 2007), biocontrole de fungos deteriorantes e/ou micotoxigênicos em alimentos (LIMA et al., 2013; FIEIRA et al., 2013;

COELHO et al., 2007; COELHO et al., 2009), desenvolvimento de antimicóticos para o tratamento humano e animal (MARQUINA et al., 2002) e em tecnologias de DNA recombinante (SCHMITT; BREINIG, 2002).

Marquina et al. (2002) relataram também o uso das leveduras como sistemas modelo para o estudo dos mecanismos de regulação e processamento de polipeptídios em eucariotos, como indicativo de parentesco filogenético, além de futuras aplicações em pesquisas de controle e expressão de vírus em organismos eucariotos, conforme apresentado na Tabela 3.

Tabela 3 – Principais aplicações biotecnológicas das toxinas *killer*

Campo de aplicação biotecnológica	Aplicações
Controle biológico na agricultura	Atividade antifúngica contra a podridão da madeira e fungos fitopatogênicos.
Fermentação de bebidas	Controle de contaminantes e como culturas <i>starters</i> em processos fermentativos.
Pesquisa de biologia celular em células eucariontes.	Estudos de biossíntese, processamento e secreção de proteínas.
Tecnologia de alimentos	Preservação de alimentos <i>in natura</i>
Genética	<i>Fingerprinting</i> de leveduras do vinho e tecnologia do DNA recombinante.
Medicina	Atividade zimocida contra patógenos.
Taxonomia	Padrão de sensibilidade <i>killer</i> como indicativo de parentesco filogenético

Fonte: Marquina et al. (2002).

O controle de doenças pós-colheita ainda se baseia no uso de fungicidas sintéticos (CASTORIA et al., 2001); todavia, o uso indiscriminado desses fungicidas levaram ao surgimento de cepas resistentes (BARALDI et al., 2003). Logo, estudos vêm sendo realizados a fim de solucionar problemas de perda pós-colheita empregando micro-organismos capazes de realizar o biocontrole de fungos micotoxigênicos e/ou deteriorantes de alimentos.

Santos et al. (2009) descreveram uma nova toxina de *Pichia membranifaciens* CYC 1086 cuja atividade *killer* foi testada, juntamente com outra cepa previamente estudada de *P. membranifaciens* CYC 1106, contra vários micro-organismos relacionados a problemas agrônômicos a fim de avaliar seu possível potencial biotecnológico.

Como resultado, todas as cepas de *Brettanomyces bruxellensis*, levedura contaminante do vinho, se mostraram sensíveis à *P. membranifaciens* CYC 1086, enquanto que nenhuma cepa de *S. cerevisiae* isolada de processos fermentativos do vinho foi afetada pela toxina. Entretanto, fungos filamentosos foram mais resistentes a esta toxina; nenhuma cepa de *Botrytis cinerea* e apenas duas de *Fusarium proliferatum* mostraram sensibilidade, enquanto que a toxina de *P. membranifaciens* CYC 1106 se mostrou efetiva contra *B. cinerea* (SANTOS; SÁNCHEZ; MARQUINA, 2004).

Fieira et al. (2013) indicaram a possibilidade de aplicação no controle pós-colheita de maçãs após relatarem ótima eficiência no controle *in vivo* de *P. expansum*, ao submeterem os frutos artificialmente infectados, em tratamento com leveduras *Hansenula wingei* e *S. cerevisiae* PF2₃ aplicadas em sinergismo com o fungicida Tecto® em baixa dosagem.

Na indústria fermentativa, linhagens *killer* contaminavam o processo de elaboração do vinho, causando variações sensoriais no produto final e interferindo na qualidade. Tal fato levou pesquisadores a investigarem a possibilidade de “construir” cepas de leveduras fermentadoras com caráter *killer* a fim de serem utilizadas como culturas *starters*, associando assim o benefício da fermentação de cerveja e vinho com o controle de culturas selvagens, que porventura pudessem prejudicar o processo fermentativo (VONDREJS; JANDEROVÁ; VALASEK, 1996).

Diversos estudos demonstraram que leveduras fermentativas do vinho geneticamente modificadas, produtoras de diferentes toxinas, exibiram significativa capacidade antagonica contra potenciais contaminantes como *Candida*, *Hanseniaspora*, *Kloeckera* e *Pichia* (BUSSEY; VERNET; SDICU, 1988; BOONE et al., 1990; SCHIMIT; SCHERNIKAU, 1997; SANTOS et al., 2009). Logo, o uso da tecnologia do DNA recombinante tornou possível o desenvolvimento/aprimoramento da capacidade *killer* em leveduras fermentadoras.

2.3 Gênero *Hansenula*

O gênero *Hansenula* caracteriza-se como células esferoidais, elipsoidais ou alongadas e, em alguns casos, afuniladas. Os ascósporos são em forma de chapéu, semiesferoidal ou esferoidal com borda. A reprodução assexuada é por brotamento multilateral e algumas espécies podem produzir pseudo-hifas (KURTZMAN; FELL, 1999).

Ashida et al. (1983) descreveram uma toxina *killer* (K9) produzida por *Hansenula mrakii* com propriedades superiores a outros gêneros relatados, como por exemplo, estabilidade em valores de pH entre 4,0-11,0 e termoestabilidade evidenciada pela manutenção da atividade após fervura por 3 minutos em pH 4,0, e à 100 °C por 10 minutos (TAKASUKA et al., 1995).

Toxinas *killer* de *H. mrakii* e *H. saturnus* foram purificadas anteriormente, sendo suas massas moleculares e composição de aminoácidos similares; a toxina *killer* de *H. mrakii* é uma pequena proteína de 88 aminoácidos com 5 pontes dissulfeto (SELVAKUMAR et al., 2006), possui ponto isoelétrico (pI) 9,1 e massa molar de 10.7 kDa, enquanto que a toxina de *H. saturnus* é uma proteína de 87 aminoácidos, possui massa molar entre 8.5 – 9.0 kDa, e possui uma homologia de 87% com a toxina *killer* de *H. mrakii* (YAMAMOTO, 1986a; YAMAMOTO 1986b; TAKASUKA et al., 1995).

Lowes et al. (2000) inocularam *S. cerevisiae* e *C. krusei* em iogurte, juntamente com toxina heteróloga de *H. mrakii* purificada em duas diferentes concentrações, nas temperaturas de 10 °C e 20 °C. Foi constatado o crescimento rápido dos inóculos no controle negativo nas duas temperaturas testadas, enquanto que nas amostras contendo toxina *killer*, todos os inóculos foram eliminados nas duas concentrações de toxina, em um período de 24 h.

C. krusei tem sido classificada como patógeno de classe II por exibir altos níveis de resistência à fluconazol, entretanto foi eliminada com a toxina heteróloga de *H. mrakii*. A micocina exibe ampla ação de atividade contra espécies de levedura e possui boas características físico-químicas, incluindo estabilidade em amplo pH e temperatura, podendo ser utilizada, se necessário, como método alternativo contra infecções causadas por leveduras (LOWES et al., 2000).

3 Metodologia

Este estudo foi realizado no período de março a novembro de 2015 no Laboratório de Micotoxinas na Universidade de São Paulo e no Laboratório de Biologia Molecular e Microbiologia na Universidade Tecnológica Federal do Paraná – campus Londrina.

3.1 Fungos testes

Aspergillus ochraceus A152 e *Penicillium expansum* n. 2, previamente isolados de café e maçã (COELHO, 2005), foram identificados geneticamente (em nível molecular) para posteriormente serem testados frente ao efeito da toxina *killer* quanto à inibição da germinação de esporos.

Os fungos foram mantidos em Ágar Batata Dextrose – BDA inclinado a 4 °C na ausência de luz.

3.1.1 Extração de DNAr dos fungos filamentosos

Os fungos foram inoculados em ágar YES (glicose 3,0%, extrato de levedura 0,5%, adenina 0,005%, histidina 0,005%, leucina 0,005%, lisina 0,005%,

uracila 0,005%, ágar 1,5%) e cultivados por 3 dias em B.O.D a 25 °C. Em seguida, um fragmento de micélio de aproximadamente 0,5 cm² foi recortado, o ágar removido, e o micélio transferido para um microtubo de 1,5 mL contendo 300 µL de PrepMan Ultra® (APPLIED BIOSYSTEMS, 2010).

O microtubo foi agitado em vórtex por um minuto e colocado em banho de água a 100 °C por 15 minutos, seguido de centrifugação por 7 minutos a 14.000 rpm em temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e armazenado a -4 °C.

3.1.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para a PCR foram utilizados microtubos de 0,2 mL. O fragmento da região ITS foi amplificado com os *primers* ITS1 e ITS4. As sequências dos *primers* utilizados encontram-se no Quadro 1. A PCR foi realizada com 12,5 µL de PCR Master Mix, 6,5 µL de água Milli-Q e 2 µL de DNA (40 ng) e 2 µL (20 pmol) de cada iniciador para um volume final de 25 µL. O programa de amplificação incluiu uma desnaturação inicial (94 °C por 3 min), seguido por 35 ciclos de desnaturação (94 °C por 1 min), anelamento a 57 °C, e extensão a 72 °C por 1 min. Uma etapa de extensão final a 72 °C por 5 min foi incluída ao final da amplificação (WHITE et al., 1990).

Quadro 1 – Sequência dos primers utilizados na PCR

Gene	Primer	Sequência do iniciador (5' - 3')	Referência
Internal Transcribed Spacer (ITS)	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCG	WHITE et al., 1990
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATAT	

3.1.3 Eletroforese do produto de PCR

Após a reação de PCR, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel para verificação da amplificação. O gel de agarose foi preparado na concentração de 1,2% em solução de TBE (Tris Borato EDTA), acrescido de Syber Safe. Para a aplicação das amostras nos poços do gel, um volume de 2 µL de solução de azul de bromofenol foi adicionado em 3 µL de amostra. O gel foi submetido a 100 volts a 400 mA por 1 hora. Como referência, adicionou-se 6 µL de DNA Ladder 100 pb.

3.1.4 Purificação dos produtos de PCR

A purificação do produto da reação de PCR teve como objetivo a remoção de *primers*, dNTPs, enzimas e sais dos produtos de PCR que pudessem interferir na reação de sequenciamento. Para isso utilizou-se o kit QIAquick PCR purification, otimizado da seguinte forma: ao volume de 17 µL do produto de PCR foi adicionado 100 µL do Buffer PB – Binding Buffer (Tampão de Ligação) e todo conteúdo foi transferido para a coluna que acompanha o kit, a qual foi deixada em repouso por um minuto, centrifugada a 13.000 rpm/1 min e descartada a fase inferior do microtubo. Em seguida, adicionou-se 700 µL de Buffer PE – Wash Buffer (Tampão de Lavagem), o qual permaneceu em repouso por um minuto. Centrifugou-se a 13.000 rpm/1 min e descartou-se a fase inferior do microtubo. O conjunto foi centrifugado novamente a 13.000 rpm por 3 minutos, para remoção total do tampão de lavagem. Para eluição, a coluna foi transferida para um novo microtubo de 1,5 mL e adicionando 20 µL de EB – Elution Buffer (Tampão de Eluição) no centro da coluna, e após 1 minuto de repouso foi centrifugado a 13.000 rpm/1 min (QIAGEN, 2006).

3.1.5 Sequenciamento dos produtos de PCR

Os produtos de PCR foram sequenciados utilizando os primers usados na amplificação, seguindo o protocolo do Kit *Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing*. As reações ocorreram em um sequenciador 3100 DNA.

3.1.6 Edição, avaliação da qualidade e análise das sequências geradas

As sequências consenso foram obtidas utilizando o programa Sequencher versão 4.1.4. Estas, por sua vez, foram pesquisadas em BLASTn (www.ncbi.nlm.nih.gov) como forma de confirmar premissas iniciais.

3.2 Obtenção do extrato bruto de *Hansenula wingei*

A levedura *Hansenula wingei* (AM2-2) *killer* positiva, previamente isolada de milho (GASPERINI, 2011), e mantida em ágar Meio Para Levedura – MPL (glicose 2%, extrato de levedura 0,5%, cloreto de sódio 1%, sulfato de amônio 0,5%, ágar 1,8%, acidificado com ácido tartárico 10% até pH 4,5) a 7 °C, foi reativada em Caldo MPL para obtenção do extrato bruto.

Para tanto, uma alçada da levedura foi transferida para 25 mL de Caldo MPL, seguido de incubação a 25 °C por 24 h. Em seguida, um inóculo de aproximadamente $3,0 \times 10^6$ células, previamente padronizado na Escala número 1 de

MacFarland, foi transferido para 17 erlenmeyers contendo 50 mL de Caldo MPL (totalizando 850 mL de cultivo) e incubados a 25 °C por 96 h em cultivo estático (SIMER, 2013). Após incubação, o cultivo foi centrifugado por 15 min a 10.000 rpm e filtrado em membrana de 0,20 µm para remoção das células (COELHO, 2005).

3.2.1 Sistema de ultrafiltração

O extrato bruto (700 mL) foi submetido a duas etapas consecutivas de ultrafiltração, utilizando membranas de celulose de exclusão molecular de 30 e 10 kDa, conforme descrito por Coelho (2005). O sistema possibilitou a obtenção de três frações, denominadas Fração 1 (contendo moléculas de massa molecular maior que 30 kDa), Fração 2 (contendo moléculas de massa molar entre 10 e 30 kDa), e Fração 3 (moléculas menores que 10 kDa). As Frações 1 e 2 foram concentradas 14 e 13 vezes. Uma parte do extrato bruto foi reservada para o ensaio antifúngico.

3.2.2 Atividade antifúngica

Um volume de 1,0 mL das frações obtidas foi distribuído em 3 tubos de ensaio contendo 1,0 mL de Caldo MPL. Paralelamente, utilizou-se o mesmo volume de extrato bruto como controle positivo e água destilada estéril como controle negativo.

A seguir, foram inoculados 10^5 esporos dos fungos a serem testados (suspensos em Tween. 80 e padronizados em câmara de Neubauer). Após incubação a 25 °C/12 horas, os tubos foram submetidos a centrifugação (10.000 rpm/10 minutos) e 90% do sobrenadante descartado.

Após ressuspensão do pellet em volume reduzido (aproximadamente 200 µL), realizou-se a determinação da porcentagem dos esporos germinados em lâmina (CHEN et al., 1999). O ensaio antifúngico foi realizado 3 vezes, sendo que em cada repetição os tratamentos foram analisados em triplicata.

A porcentagem dos esporos germinados nas frações foi calculada conforme a fórmula a seguir:

$$X = \frac{100 \times \text{média esporos germinados na fração}}{\text{média esporos germinados no controle}} \quad (1)$$

Onde X corresponde à porcentagem de esporos que germinaram no tratamento. Para determinar a porcentagem de inibição (Y), utilizou-se a fórmula:

$$Y = 100\% \text{ inibição} - X.$$

3.3 Tratamento dos dados

As médias dos resultados encontrados nos ensaios antifúngicos foram analisadas estatisticamente por meio do Teste de Tukey ($p < 0,05$), pelo programa BioEstat 5.3.

4 Resultados e discussão

A taxonomia de fungos filamentosos baseia-se, tradicionalmente, na análise qualitativa de sua morfologia e perfis bioquímicos. No entanto, variações na interpretação morfológica podem ocorrer, resultando em esquemas taxonômicos discutíveis (SAMSON; HONG; FRISVAD, 2004). Desta forma, as ferramentas moleculares seriam as mais indicadas para a caracterização de fungos.

O sequenciamento da região ITS do DNA ribossomal dos fungos testes *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium expansum* foi analisado em banco de dados *online*, resultando em 99% de similaridade (Figuras 1 e 2).

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
876 bits(474)	0.0	488/494(99%)	4/494(0%)	Plus/Plus
Query 1	CTGCGGAAGGATCATTACTGAGTAAGGGTCCCTCGGGGCCAACCTCCCACCCGTGTATA			60
Sbjct 1	CTGCGGAAGGATCATTACTGAGTAAGGGTCCCTCGGGGCCAACCTCCCACCCGTGTATA			60
Query 61	CCGTACCTTGTGCTTGGGGCGAGCCCGCCCCCTTTTCTTAGGGGGGCACAGCGCTCGC			120
Sbjct 61	CCGTACCTTGTGCTTGGGGCGAGCCCGCCCCCTTTTCTTAGGGGGGCACAGCGCTCGC			120
Query 121	CGGAGACACCAACGTGAACACTGTCTGAAGTTTTGTCTGCTGAGTCGATTGTATCGCAAT			180
Sbjct 121	CGGAGACACCAACGTGAACACTGTCTGAAGTTTTGTCTGCTGAGTCGATTGTATCGCAAT			180
Query 181	CAGTTAAAACCTTTCATCAATGGATCTCTTGGTCCGGCATCGATGAAGAA-GCAGCGAAA			239
Sbjct 181	CAGTTAAAACCTTTCAACAAATGGATCTCTTGGTCCGGCATCGATGAAGAAACGAGCGAAA			240
Query 240	TGCGATAATTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTG-ACGCACATTG			298
Sbjct 241	TGCGATAATTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTG			300
Query 299	CACCCCTGGTATTCGGGGGGTATGCGTGTCCGAGCGTCATTGCTGCC-CAAGCACGG			357
Sbjct 301	CACCCCTGGTATTCGGGGGGTATGCGTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCACGG			360
Query 358	CTTGTGTGTTGGGTCGTGTCccccccGGGGGACGGGCCGAAAGGCAGC-GCGGCACCG			416
Sbjct 361	CTTGTGTGTTGGGTCGTGTCccccccGGGGGACGGGCCGAAAGGCAGCGCGGCACCG			420
Query 417	CGTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACACCGCTCTTGTAGGCCCGGCCGGCTGC			476
Sbjct 421	CGTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACACCGCTCTTGTAGGCCCGGCCGGCTGC			480
Query 477	TGCCCGACGCTGAA	490		
Sbjct 481	TGCCCGACGCTGAA	494		

Figura 1 – Alinhamento do sequenciamento da região ITS de *Aspergillus ochraceus* com banco de dados online

Fonte: Autoria própria

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1057 bits(572)	0.0	592/600(99%)	7/600(1%)	Plus/Plus
Query 1	ACTAGTGATTTCCGTAGGTGTTCTCGGGAAGGATCATTACCGAGTGAGG--CCTCTGGG			58
Sbjct 1	ACTAGTGATTTCCGTAGGTGTTCTCGGGAAGGATCATTACCGAGTGAGGGCCCTCTGGG			60
Query 59	TCCAACCTCCCACCCGTGTTTATATTACCTTGTGCTTCGGCGCGCCCG-CTAAACTGGC			117
Sbjct 61	TCCAACCTCCCACCCGTGTTTATATTACCTTGTGCTTCGGCGGGCCCGCCTAAACTGGC			120
Query 118	CGCCGGGGGGCTTACGCCCCCGGGCCCGCCCGCCGAAGACACCCTCGAACTCTGTCTG			177
Sbjct 121	CGCCGGGGGGCTTACGCCCCCGGGCCCGCCCGCCGAAGACACCCTCGAACTCTGTCTG			180
Query 178	ATGATTGAAG-CTGAGTGAATATATATATTATTATAACTTTCAACAAC-GATCTCTTGG			235
Sbjct 181	ATGATTGAAGTCTGAGTGAATATATATATTATTATAACTTTCAACAACGGATCTCTTGG			240
Query 236	TTCCGGCATC-ATGAAGAAGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAATTCAGT			294
Sbjct 241	TTCCGGCATCGATGAAGAAGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAATTCAGT			300
Query 295	GAATCATCGAGTCTATGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTC			354
Sbjct 301	GAATCATCGAGTCTATGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTC			360
Query 355	CGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGCCCGTCCCCGATCTCCG			414
Sbjct 361	CGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGCCCGTCCCCGATCTCCG			420
Query 415	GGGGACGGGCCCGAAAGGACAGCGGCGCACCGTCCGGTCCCGAGCGTATGGGGCTTT			474
Sbjct 421	GGGGACGGGCCCGAAAGGACAGCGGCGCACCGTCCGGTCCCGAGCGTATGGGGCTTT			480
Query 475	GTCACCCGCTCTGTAGGCCCGGGCGGCTTGCCGATCAACCCTAATTTTTATCCAGGTT			534
Sbjct 481	GTCACCCGCTCTGTAGGCCCGGGCGGCTTGCCGATCAACCCTAATTTTTATCCAGGTT			540
Query 535	GTCCTCGGAT-AGGTAGGGATACCCGCTGAACTTATGCATATCAATAAGCGGAGGAAATC			593
Sbjct 541	GTCCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTATGCATATCAATAAGCGGAGGAAATC			600

Figura 2 – Alinhamento do sequenciamento da região ITS de *Penicillium expansum* com banco de dados online

Fonte: Autoria própria

As técnicas moleculares têm apresentado expressivo progresso na taxonomia de fungos. Reis et al. (2012) isolaram e identificaram micobiota de castanhas-do-brasil utilizando uma abordagem polifásica. Além da caracterização morfológica, a produção de metabólitos secundários e sequenciamento do DNA ribossomal das regiões ITS, β -tubulina e calmodulina, foram utilizados para confirmação. Os gêneros *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. representaram 4 e 16% dos isolados.

Para estudos com enfoque principal na taxonomia e ecologia de fungos, a abordagem polifásica é a mais recomendada pois combina várias informações acerca da identidade dos micro-organismos. Entretanto, para confirmação da identificação morfológica, o sequenciamento da região ITS se mostra eficaz.

Para o ensaio antifúngico, o extrato bruto submetido ao sistema de ultrafiltração foi separado em 3 frações (1: maior que 30 kDa, 2: entre 10 e 30 kDa e 3: menor que 10 kDa).

Conforme a Tabela 4, pode-se observar que a porcentagem de esporos germinados nas frações 1 (> 30 kDa) e controle positivo (extrato bruto) não diferiu entre si ($p > 0,05$), embora a primeira fração tenha sido aparentemente um pouco mais eficaz. Tal fato poderia ser explicado pela ressuspensão da fração em 50 mL de água destilada estéril, para retirada das moléculas da membrana, o que concentrou o extrato bruto em cerca de 14 vezes.

Embora as frações 2 e 3 tenham diferido significativamente entre si e do controle negativo ($p < 0,05$), observou-se que mais de 50% dos esporos de ambos os fungos germinaram na presença destas.

Tabela 4 – Atividade antifúngica realizada com as frações obtidas após a ultrafiltração do extrato bruto*

Tratamento	Germinação de esporos (%)	
	<i>A. ochraceus</i>	<i>P. expansum</i>
Controle negativo (água)	88,56+4,07 ^d	97,00+1,87 ^d
Extrato Bruto	9,89+5,82 ^a	6,89+6,39 ^a
1 (> 30 kDa)	2,33+2,24 ^a	4,78+4,89 ^a
2 (> 10 kDa)	71,67+6,02 ^c	82,67+4,09 ^c
3 (< 10 kDa)	59,44+13,04 ^b	57,78+10,47 ^b

* Letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).
Fonte: Autoria própria.

Na interpretação da Tabela 4, quanto menor o valor apresentado, maior será a atividade antifúngica. Cada valor corresponde à média e ao desvio padrão dos valores de 9 dados, sendo três respostas para cada repetição.

A Figura 3 exibe a porcentagem (%) de inibição da germinação de esporos dos fungos filamentosos, apresentando uma relação inversa entre inibição e germinação de esporos, ou seja, a maior porcentagem de inibição indica uma menor germinação de esporos.

A toxina *killer* de *H. wingei* foi detectada na fração 1, que mostrou ser tão eficiente quanto o Extrato Bruto na inibição da germinação dos esporos de *A. ochraceus*, quando comparado com *P. expansum*. Entretanto, ambos mostraram sensibilidade à toxina *killer*. As demais frações não apresentaram resultados satis-

fatórios na inibição fúngica, cujos valores mostraram menos da metade da eficiência do extrato bruto, usado como controle positivo.

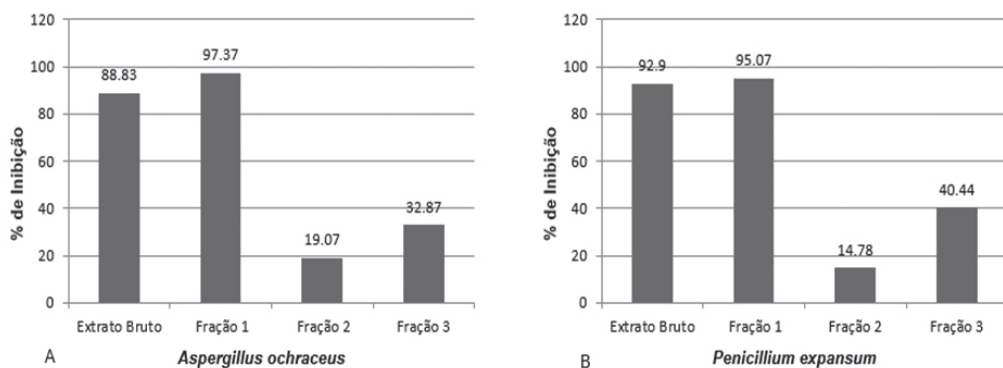


Figura 3 – Porcentagens de inibição da germinação de esporos de *A. ochraceus* e *P. expansum*

Fonte: Autoria própria

Com base na Tabela 4 e Figura 3, o processo de ultrafiltração não foi eficiente na purificação parcial da toxina *killer* de *H. wingei*, provavelmente devido ao fato de esta toxina possuir peso molecular maior que 30 kDa. Por outro lado, os compostos com peso molecular < que 30 kDa foram eliminados, diminuindo assim a presença de uma parte de interferentes no meio, e consequentemente aumentando a atuação contra os fungos, quando comparado com o extrato bruto.

A toxina *killer* > 30 kDa produzida por *H. wingei* neste trabalho diferiu daquelas relatadas por outros pesquisadores em leveduras do mesmo gênero, como por exemplo as toxinas *killer* de 10.7 kDa de *H. mrakii* (SELVAKUMAR et al., 2006), e de 8.5 – 9.0 kDa de *H. saturnus*. Apesar de as toxinas apresentarem tamanhos diferentes, os autores relataram homologia de 87% entre as duas toxinas (YAMAMOTO, 1986a; YAMAMOTO 1986b; TAKASUKA et al., 1995).

Por outro lado, Andrade (2011) caracterizou uma toxina *killer* de *Kodamaea ohmeri* ES92 como uma glicoproteína de massa molecular maior que 30 kDa, ao passo que a toxina de *Pichia anomala* NCCY 432 foi determinada em 47 kDa (IZGU; ALTINBAY; ACUN, 2006). Toxinas *killer* possuem variadas massas moleculares que variam entre gêneros e espécies, sendo seu tamanho determinado pelos tipos de resíduos monossacarídeos que as constitui (SCHMITT; BREINING, 2002).

A atividade de β -glucanases produzidas por leveduras tem sido relatada em diversos gêneros: *Candida*, *Pichia*, *Hansenula* e *Saccharomyces* (DEL REY et al., 1979; SALIGKARIAS; GRAVANIS; EPTONA, 2002; BAR-SHIMON et al., 2004).

Yamamoto (1986b), em seu estudo, mostrou que toxina *killer* de *H. mra-kii*, codificada por genes cromossomais, tem como sítio de ligação β -1,3-glucana, principal constituinte da parede celular fúngica, e quando ligada causava danos à permeabilidade, tornando-a osmoticamente frágil e defeituosa, resultando em morte celular.

As proteínas *killer* do gênero *Hansenula*, particularmente, possuem estabilidade em ampla faixa de pH (4,0-10,0) e manutenção da atividade à 100 °C (ASHIDA et al., 1983), além de ampla ação contra leveduras patógeno-opportunistas do gênero *Candida* spp. (HODGSON; BUTTON; WALKER, 1995).

Em estudo realizado por Simer (2013), *H. wingei* (AM2²) mostrou-se *killer* positiva perante as leveduras sensíveis de referência *Candida glabrata* NCYC 366, *C. albicans* 12A e *Pichia kluyveri* CAY-15. O fato de atuar contra mais de uma levedura sensível sugere a possibilidade de a levedura em questão ser capaz de produzir uma toxina *killer* com amplo espectro de ação, ou até mesmo estar associado com a produção de mais de uma toxina *killer*, a exemplo de toxinas K1, K2 e K28 produzidas por *Saccharomyces cerevisiae* (SCHMITT, BREINING, 2002).

Brock (1965) relatou atividade de duas exo-hidrolases (β -1,3 e β -1,6-glucanases) produzidas por *H. wingei*. Este fato, associado às informações da literatura, pressupõe sugerir que a toxina de *H. wingei* possa estar associada a uma β -glucanase com peso molecular maior que 30 kDa, uma vez que a análise da sequência de aminoácidos da toxina K5 produzida por *P. anomala* foi comparada com a de exo- β -1,3-glucanase, resultando em uma homologia de 100% (IZGU; ALTINBAY, 2004).

5 Conclusão

O sequenciamento da região ITS de *A. ochraceus* e *P. expansum* foi eficiente na confirmação das premissas iniciais baseadas na identificação morfológica.

O cultivo de *H. wingei* em caldo de cultura a 25 °C por 96 h resultou em produção de toxina *killer* e este extrato bruto, quando submetido ao sistema de ultrafiltração, separou-se em frações de diferentes massas moleculares (moléculas maiores que 30 kDa, entre 30 e 10 kDa e menores que 10 kDa).

A análise das frações obtidas quanto à inibição da germinação de *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium expansum* se mostrou eficiente com o controle positivo (extrato bruto) e fração 1 (> 30 kDa).

Agradecimentos

Os autores deste trabalho agradecem ao CNPq pelo apoio financeiro, à prof^a. Elisa Yoko Hirooka pela concessão de bolsa CAPES via projeto n. 23 Edital

n. 04/2008 – Rede Nanobiotec, e à UTFPR pelo apoio financeiro e concessão de bolsa. Os autores agradecem também ao prof. Dr. Benedito Corrêa pelas análises realizadas no Laboratório de Micotoxinas da Universidade de São Paulo.

Referências

- ANDRADE, M. L. **Caracterização e purificação parcial da toxina *killer* produzida pela levedura *Kodamaea ohmeri* ES92**. 2011. 92 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.
- APPLIED BIOSYSTEMS. **PrepMan@Ultra Sample Preparation Reagent Protocol**. 2010. Disponível em < https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms_042136.pdf >. Acesso: 15 fev. 2017.
- ASHIDA, S. et al. **New *killer* toxin of *Hansenula mrakii***. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 47, n. 12, p. 2953-2955, 1983.
- BARALDI, E. et al. **Studies on thiabendazole resistance of *Penicillium expansum* of pears: pathogenic fitness and genetic characterization**. **Plant Pathology**, v. 52, n. 3, p. 362-370, 2003
- BAR-SHIMON, M. et al. **Characterization of extracellular lytic enzymes produced by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila***. **Current Genetics**, v. 45, n. 3, p. 140-148, 2004.
- BEVAN, E. A.; MAKOWER, M. **The physiological basis of the killer character in yeast**. In: **Proceeding of International Congress Genetic, 1963**. **Anais...**, 1963, v. 1, p. 202.
- BOONE, C. et al. **Yeast *killer* toxin: site-directed mutations implicate the precursor protein as the immunity component**. **Cell**, v. 46, p. 105-113, 1986.
- BROCK, T. D. **Biochemical and cellular changes occurring during conjugation in *Hansenula wingei***. **Journal of Bacteriology**, v. 90, n. 4, p. 1019-1025, 1995.
- BUSSEY, H.; VERNET, T.; SDICU, A. M. **Mutual antagonism among *killer* yeasts: competition between K1 and K2 *killers* and a novel cDNA-based K1-K2 *killer* strain of *Saccharomyces cerevisiae***. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 38-44, 1988.

- CALEGARI, R. P. et al. Biocontrole de mofo branco e tombamento e murcha de esclerócio por levedura *killer*. In: Congresso Brasileiro de fitopatologia: Simpósio Brasileiro de mofo branco, 2014, Londrina. **Anais...**, 2014.
- CASTORIA, R. et al. *Aureobasidium pullulans* (LS-30) an antagonist of postharvest pathogens of fruits: study on its modes of action. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 22, p. 7-17, 2001.
- CHEN Z. et al. Inhibition of plant-pathogenic fungi by a corn trypsin inhibitor overexpressed in *Escherichia coli*. **Applied Environmental Microbiology**. v. 65, n. 3, p. 1320-1324, 1999.
- COELHO, A. R. Controle de *Penicillium expansum*/biodegradação de patulina: perfil cromatográfico de composto bioativo de levedura *killer* visando aplicação pós-colheita. 2005. 122 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2005.
- COELHO, A. R.; CELLI, M. G.; ONO, E. Y. S.; WOSIACKI, G.; HOFFMANN, F. L.; PAGNOCCA, F. C.; HIROOKA, E. Y. *Penicillium expansum* versus antagonist yeasts and patulin degradation in vitro. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Londrina, v. 50, n. 4, p. 725-733, 2007.
- COELHO, A. R.; TACHI, M.; PAGNOCCA, F. C.; NOBREGA, G. M. A.; HOFFMANN, F. L. HARADA, K. I.; HIROOKA, E. Y. Purification of *Candida guilliermondii* and *Pichia ohmeri* killer toxin as active agent against *Penicillium expansum*. **Food Additives and Contaminants**, v. 26, n. 1, p. 73-81, 2009.
- Companhia Nacional de Abastecimento – CONAB. 2015. Disponível em < http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_02_13_12_03_45_boletim_graos_fevereiro_2017.pdf >. Acesso em: 15 fev. 2017.
- DEL REY, F. et al., Synthesis of 1,3- β -glucanases in *Saccharomyces cerevisiae* during the mitotic cycle, mating and sporulation. **Journal of Bacteriology**. v. 139, n. 3, p. 924-931, 1979.
- FIEIRA, C. et al. *In vitro* and *in vivo* antifungal activity of natural inhibitors against *Penicillium expansum*. **Food Science and Technology**, v. 33, n. 1, p. 40-46, 2013.

- GASPERINI, A. **Biocontrole de *Fusarium verticillioides* em milho**. 2011. 53 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso Superior de Tecnologia em Alimentos). Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, 2011.
- IZGU, F.; ALTINBAY, D.; ACUN, T. Killer toxin of *Pichia anomala* NCYC 432; purification characterization and its exo- β -1,3-glucanase activity. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 39, p. 669-676, 2006.
- IZGU, F.; ALTINBAY, D. Isolation and characterization of the K5-type yeast killer protein and its homology with na exo- β -1,3-glucanase. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** v. 68, n. 3, p. 685-693, 2004.
- KIMURA, T. et al. Isolation and nucleotide sequences of the genes encoding *killer* toxins from *Hansenula mrakii* and *H. saturnus*. **GENE**. v. 137, p. 265-270, 1993.
- KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. **The yeasts – A taxonomic study**. 2. ed. Amsterdam: Elsevier, 1999.
- LIMA, J. R. et al. Use of *killer* yeast in the management of postharvest papaya anthracnose. **Postharvest Biology and Technology**. v. 83, p. 58-64, 2013.
- LOWES, K. F. et al. Prevention of Yeast Spoilage in Feed and Food by the Mycocin HMK. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 66, p. 1066-1076, 2000.
- MAGLIANI, W. et al. Yeast *killer* systems. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 10, n. 3, p. 369-400, 1997.
- MARQUINA, D.; SANTOS, A.; PEINADO, J. M. Biology of *killer* yeasts. **Int Microbiol**, v. 5, p. 65-71, 2002.
- MIDDELBEEK, E. J. et al. Physiological conditions affecting the sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to a *Pichia kluyveri* killer toxin and energy requirement for toxin action. **Antonie van Leeuwenhoek**. v. 46, p. 483-497, 1980.
- MIGUEL, T. Á. **Avaliação dos efeitos da fertilização nitrogenada (uréia e uréia com NBPT) e do fungicida MAXIM – XL na produção de fumonisinas por *Fusarium verticillioides***. 2005. 114f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2005.

- PHILLISKIRK, G.; YOUNG, T. W. The occurrence of *killer* character in yeasts of various genera. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 41, p. 147-151, 1975.
- QIAGEN. **QIAquick® Spin Handbook**. 2006. Disponível em: <http://mvz.berkeley.edu/egl/inserts/QIAquick_Spin_Handbook.pdf>. Acesso em: 10 fev. 2017.
- REIS, T. A. et al. Mycobiota and mycotoxins in Brazil nut samples from different states of the Brazilian Amazon region. **International Journal of Food Microbiology**. v. 159, p. 61-68, 2012.
- SALIGKARIAS, I. D.; GRAVANIS, F. T.; EPTONA, H. A. S. Biological control of *Botrytis cinerea* on tomato plants by the use of epiphytic yeasts *Candida guilliermondii* strains 101 and US 7 and *Candida oleophila* strain I-182. **Biological Control**, v. 25, n. 2, p. 151-161, 2002.
- SAMSON, R. A.; HONG, S. B.; FRISVAD, J. C. Old and new concepts of species differentiation in *Aspergillus*. **Med. Mycol.**, v. 44, p. 133-148, 2006.
- SANTOS, A. et al. (1 α 6)-b-D-glucan as cell wall receptor for *Pichia membranifaciens killer* toxin. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 66, p. 1809-1813, 2000.
- SANTOS, A. et al. PMKT2, a new *killer* toxin from *Pichia membranifaciens*, and its promising biotechnological properties for control of the spoilage yeast *Brettanomyces bruxellensis*. **Microbiology**. v. 155, p. 624-634, 2009.
- SANTOS, A.; SÁNCHEZ, A.; MARQUINA, D. Yeasts as biological agents to control *Botrytis cinerea*. **Microbiological Research**. v. 159, p. 331-338, 2004.
- SCHMITT, M. J.; BREINIG, F. The viral *killer* system in yeast: from molecular biology to application. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 26, p. 257-276, 2002.
- SCHMITT, M. J.; SCHERNIKAU, G. Construction of a cDNA based K1/K2/K28 triple *killer* strain of *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Technol. Biotechnol.** v. 35, p. 281-285, 1997.
- SECRETARIA DE ESTADO DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO – SEAB. Fruticultura. 2015. Disponível em: <http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/fruticultura_2014_15.pdf>. Acesso em: 12 out. 2015.

- SIMER, P. Efeito de frações ultrafiltradas do cultivo de *Hansenula wingei* no controle de *Penicillium expansum* e *Apergillus ochraceus*. 2013. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso Superior de Tecnologia em Alimentos). Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, 2013.
- TAKASUKA, T. et al. Cell wall synthesis specific cytotoxic effect of *Hansenula mrakii* toxin. 1 on *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell and Molecular Biology*. v. 41, p. 575-581, 1995.
- VONDREJS, V.; JANDEROVÁ, B.; VALASEK, L. Yeast killer K1 and its exploitation in genetic manipulations. *Folia Microbiologica*. v. 41, p. 379-194, 1996.
- YAMAMOTO, T. et al. Application of monoclonal antibodies to the isolation and characterization of a killer toxin secreted by *Hansenula mrakii*. *FEBS Letters*, v. 195, p. 253-257, jan. 1986a.
- YAMAMOTO, T. et al. Killer toxin from *Hansenula mrakii* selectively inhibits cell wall synthesis in a sensitive yeast. *FEBS Letters*, v. 197, p. 50-54, mar. 1986b.
- YOUNG, T. W. The genetic manipulation of *killer* character into brewing yeasts. *Journal of the Institute of Brewing*. v. 87, p. 292-295, 1981.
- YOUNG, T. W.; YAGIU, M. A. A comparison of the *killer* character in different yeasts and its classification. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 44, p. 59-77, 1978.
- ZHU, H.; BUSSEY, H. The K1 toxin of *Saccharomyces cerevisiae* kills spheroplasts of many yeast species. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 55, p. 2105-2107, 1989.
- ZORZETE, P. Fungos, micotoxinas e fitoalexina em variedades de amendoim do plantio ao armazenamento. 2010. 188 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.