

Marcelo Menoncin

Centro de Biotecnologia, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

## Introdução

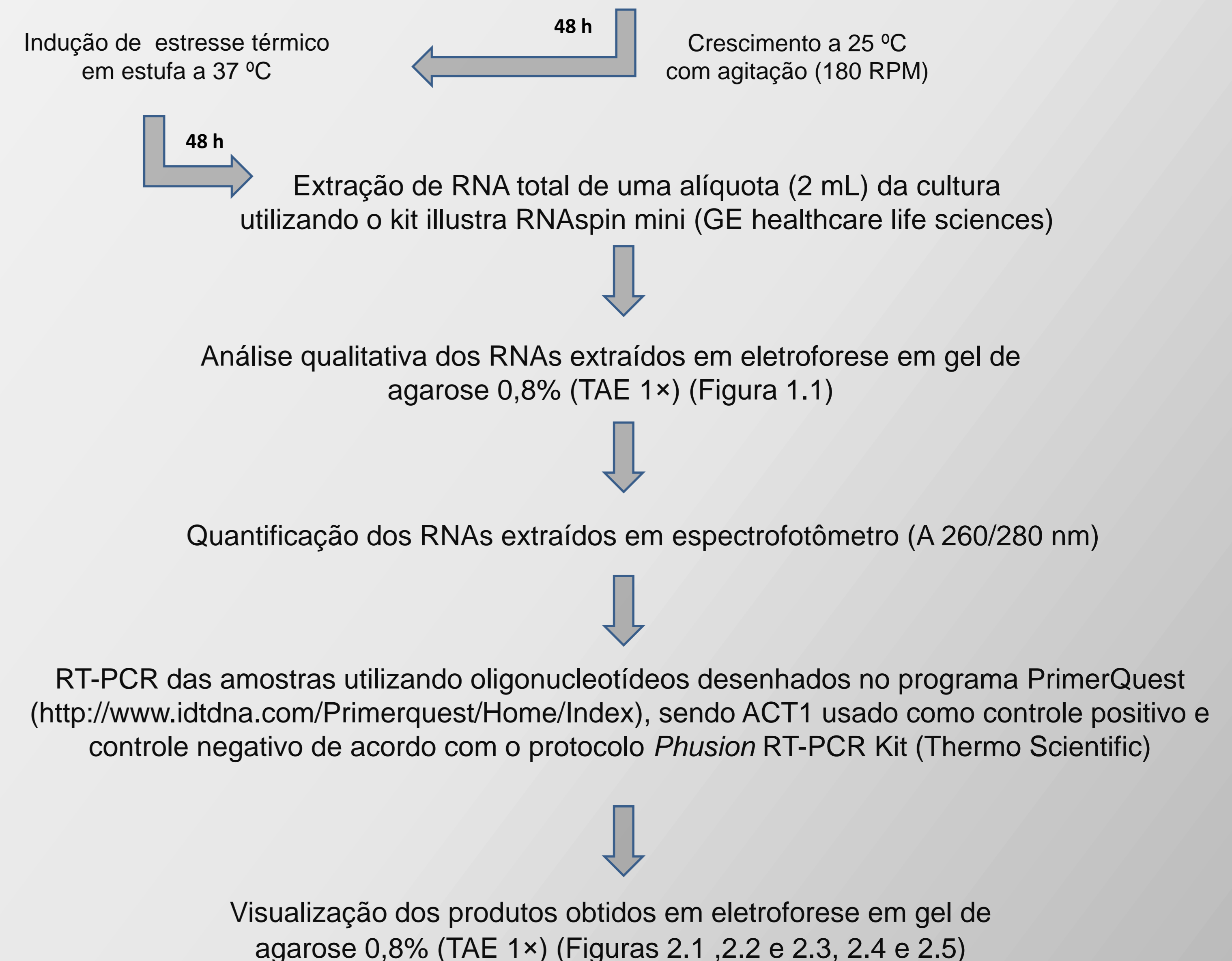
O gênero de levedura *Brettanomyces* vem ganhando espaço na indústria de cervejas artesanais devido à produção de compostos aromáticos (ésteres, fenólicos e agliconas) e, sobretudo, à tolerância a uma ampla gama de condições ambientais (elevadas concentrações de etanol, alta pressão osmótica e depleção de nutrientes). Esse gênero não apresenta nenhum organismo-modelo, contendo portanto, poucas informações moleculares, especialmente dados relacionados à expressão de genes importantes no ambiente de fermentação em microcervejarias. Com o intuito de gerar subsídios para o estudo dos motivos pelos quais cepas de *Brettanomyces* apresentam uma notável tolerância a estresses, foram analisados a expressão dos genes *PMA1*, *UBI4* e *HSP82*. *PMA1* codifica para uma proteína transmembrana que regula o pH intracelular liberando H<sup>+</sup> para o meio extracelular. *UBI4* é essencial para a resposta celular ao estresse, codificando para uma ubiquitina que marca proteínas para degradação pela via proteolítica. *HSP82* codifica para uma proteína chaperona e também é expresso em resposta ao estresse, como nas condições de choque térmico, altas concentrações de etanol e limitação de nutrientes. Para avaliar o uso desses três genes como biomarcadores foi escolhido como organismo-alvo a levedura comercial WLP650 (*Brettanomyces bruxellensis*) e para fins de comparação a cepa de *Saccharomyces cerevisiae* WLP500.

## Objetivo

Verificar se os genes *PMA1*, *HSP82* e *UBI4* podem ser utilizados como biomarcadores para análise de tolerância a ambientes indutores de estresse na cepa de levedura cervejeira WLP650 (*Brettanomyces bruxellensis*) por meio da comparação com WLP500 (*Saccharomyces cerevisiae*), utilizada como controle positivo.

## Métodos

Linhagens cervejeiras WLP500 (*Saccharomyces cerevisiae*) e WLP650 (*Brettanomyces bruxellensis*)



## Resultados

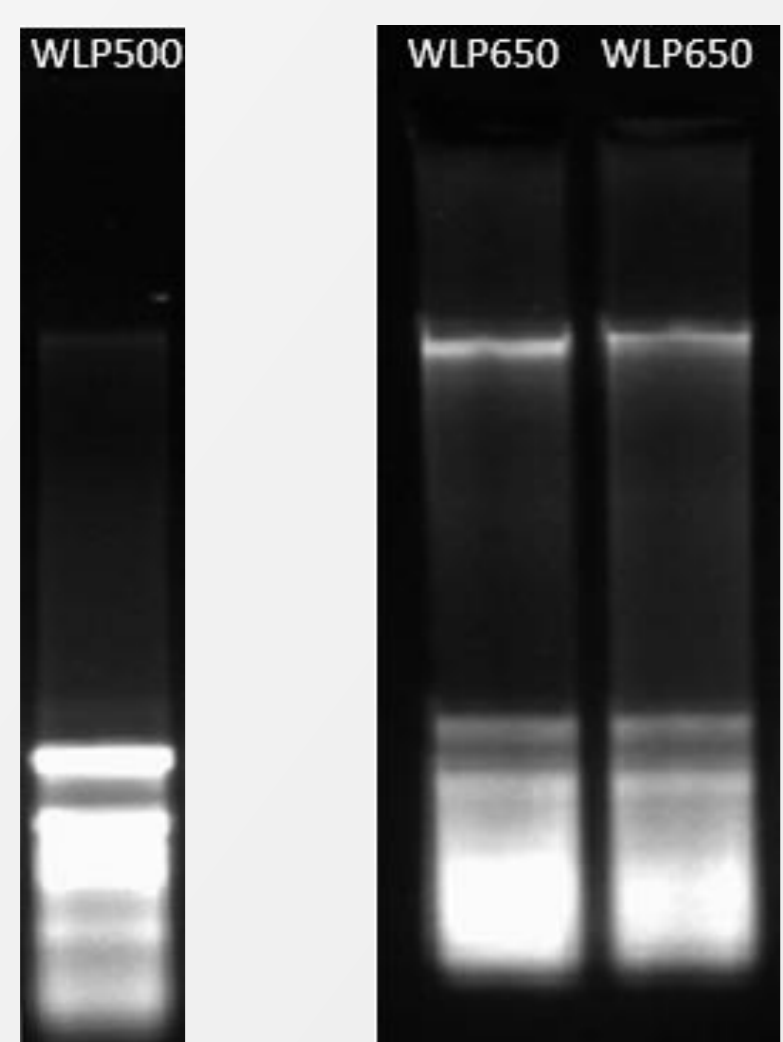


Figura 1.1 - Análise qualitativa em eletroforese em gel de agarose dos RNAs extraídos das linhagens WLP500 e WLP650.



Figura 2.1 - Análise dos produtos obtidos a partir da reação de RT-PCR com RNAs extraídos das linhagens WLP500 e WLP650 após estresse térmico (Iniciadores desenhados a partir do genoma de *Saccharomyces cerevisiae* S288c (1,2,3 e 4) e *Brettanomyces bruxellensis* AWRI1499 (5,6,7 e 8).

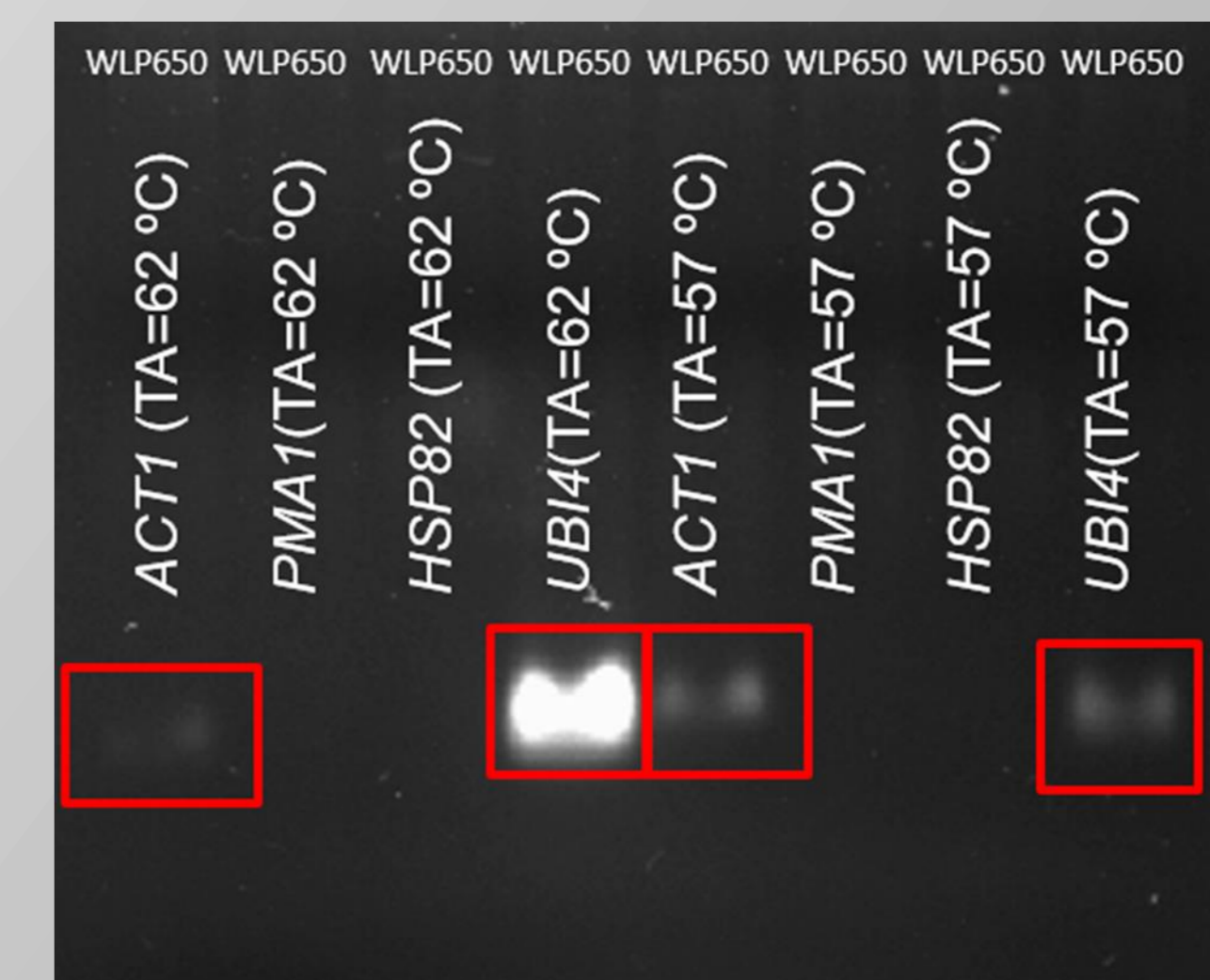


Figura 2.2 - Análise dos produtos obtidos a partir da reação de RT-PCR com RNAs extraídos da linhagem WLP650 após estresse térmico (Iniciadores obtidos a partir do genoma de *Saccharomyces cerevisiae* S288c [ACT1] e *Brettanomyces bruxellensis* AWRI1499 [PMA1, UBI4 e HSP82]).

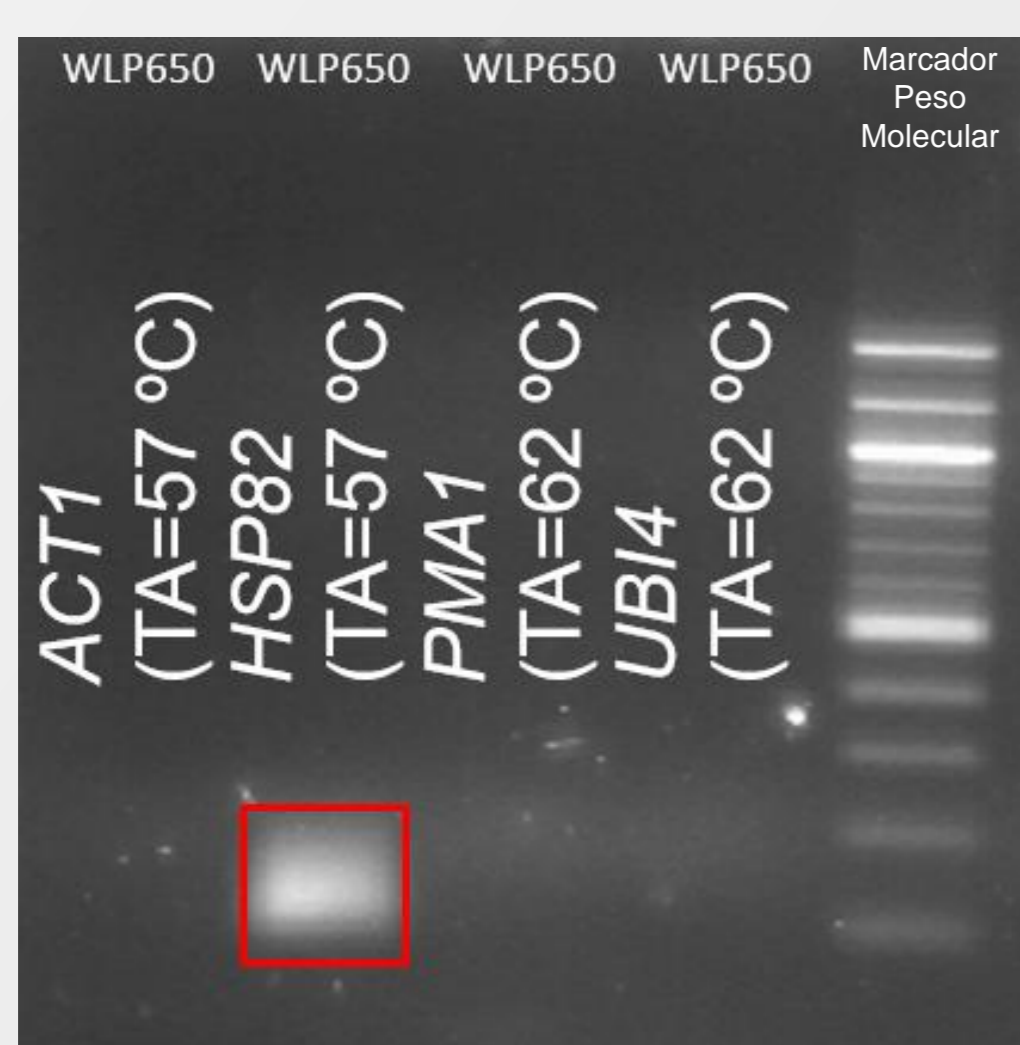


Figura 2.3 - Análise dos produtos obtidos a partir da reação de RT-PCR com RNAs extraídos da linhagem WLP650 após estresse térmico (Iniciadores obtidos a partir do genoma de *Brettanomyces bruxellensis* AWRI1499).

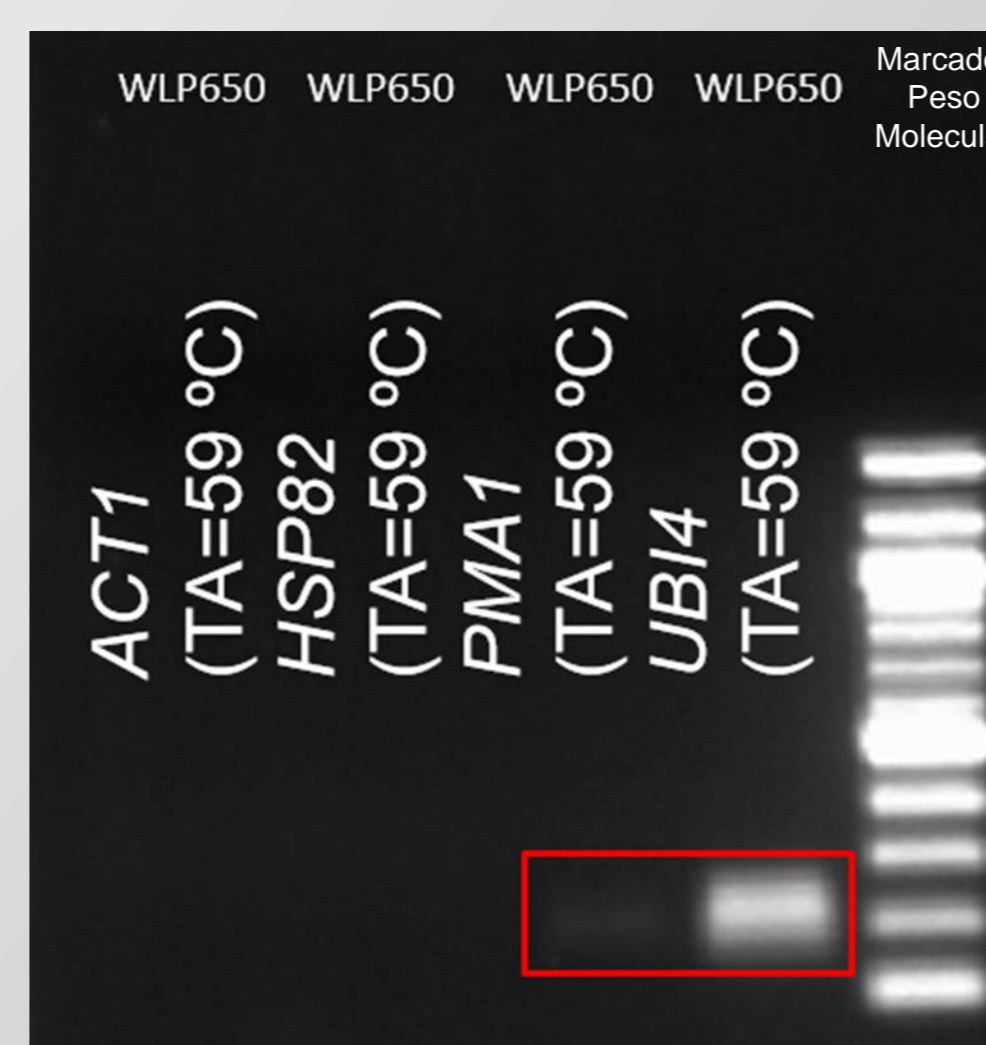


Figura 2.4 - Análise dos produtos obtidos a partir da reação de RT-PCR com RNAs extraídos da linhagem WLP650 após estresse térmico (Iniciadores obtidos a partir do genoma de *Brettanomyces bruxellensis* AWRI1499).

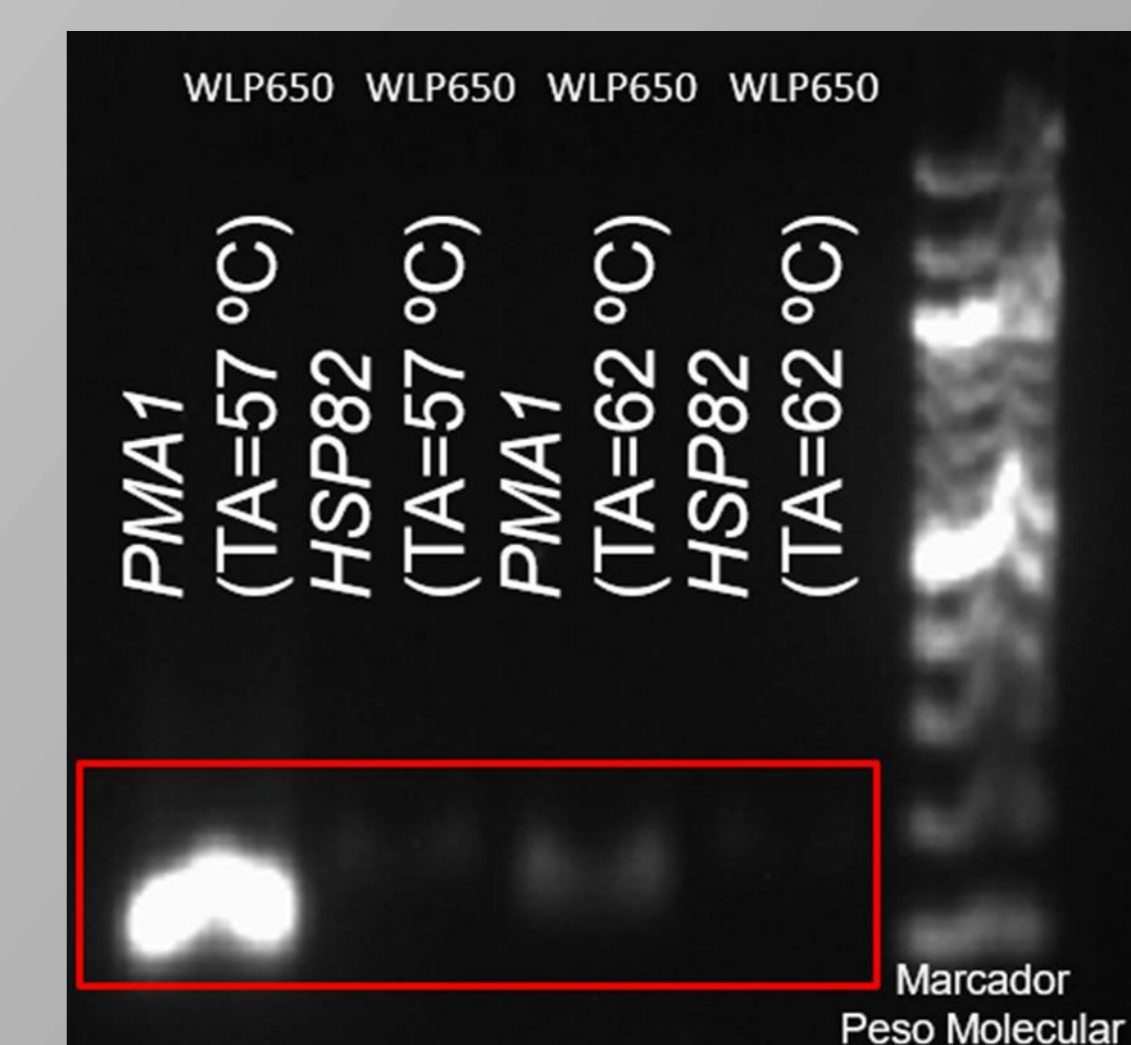


Figura 2.5 - Análise dos produtos obtidos a partir da reação de RT-PCR com RNAs extraídos da linhagem WLP650 após estresse térmico (Iniciadores obtidos a partir do genoma de *Saccharomyces cerevisiae* S288c).

## Discussão e Perspectiva

- Os oligonucleotídeos utilizados foram capazes de amplificar os cDNAs relativos a *PMA1*, *UBI4* e *HSP82* das cepas WLP500 e WLP650;
- O próximo passo consiste na utilização da técnica de reação em cadeia da polimerase acoplada à transcrição reversa em tempo real (qRT-PCR) visando a análise de expressão diferencial dos genes anteriormente citados e posterior comparação entre as linhagens selecionadas.

## Referências Bibliográficas

- Steensels J, Daenen L, Malcorps P *et al.* Brettanomyces yeasts — From spoilage organisms to valuable contributors to industrial fermentations. *Int J Food Microbiol* 2015;206:24–38.
- Finley D, *et al.* (1987) The yeast polyubiquitin gene is essential for resistance to high temperatures, starvation, and other stresses. *Cell* 48(6):1035–46
- Panaretou B and Piper PW (1992) The plasma membrane of yeast acquires a novel heat-shock protein (hsp30) and displays a decline in proton-pumping ATPase levels in response to both heat shock and the entry to stationary phase. *Eur J Biochem* 206(3):635–40