



<b>Evento</b>	Salão UFRGS 2015: SIC - XXVII SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS
<b>Ano</b>	2015
<b>Local</b>	Porto Alegre - RS
<b>Título</b>	Uso dos genes PMA1, HSP82 e UBI4 para avaliação da tolerância a ambientes indutores de estresse em <i>Brettanomyces bruxellensis</i>
<b>Autor</b>	MARCELO MENONCIN
<b>Orientador</b>	DIEGO BONATTO

## Universidade Federal do Rio Grande do Sul

**Autor:** Marcelo Menoncin

**Orientador:** Diego Bonatto

### Uso dos genes *PMA1*, *HSP82* e *UBI4* para avaliação da tolerância a ambientes indutores de estresse em *Brettanomyces bruxellensis*

O gênero de levedura *Brettanomyces* vem ganhando espaço na indústria de cervejas artesanais devido à produção de compostos aromáticos (ésteres, fenólicos e agliconas) e à tolerância a uma ampla gama de condições ambientais (elevadas concentrações de etanol, alta pressão osmótica, depleção de nutrientes). Devido ao fato de não ser um organismo-modelo, esse gênero contém poucas informações moleculares, especialmente dados relacionados à expressão de genes importantes no ambiente de fermentação em microcervejarias. Visando a geração de dados que auxiliem na compreensão 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. As cepas foram inoculadas em meio líquido YEDP e incubadas a 25 °C, 180 rpm, em incubadora com agitação por 48 horas. Posteriormente, as culturas foram induzidas a estresse térmico em estufa a 37 °C durante 120 horas. Para as análises, alíquotas de 2 mL foram centrifugadas (1000 × g por 10 minutos), seguido da extração do RNA total usando o kit illustra RNAspin mini (GE healthcare life sciences). Os iniciadores para amplificação dos genes *PMA1*, *UBI4* e *HSP82*, além de *ACT1* (usado como controle positivo) foram desenhados com o programa PrimerQuest (<http://www.idtdna.com/Primerquest/Home/Index>) a partir dos genomas da levedura referência S288c (*Saccharomyces cerevisiae*) e de AWRI1499 (*Brettanomyces bruxellensis*) e passaram por análise de formação de estruturas secundárias dos iniciadores (Beacon Designer free edition) e do *amplicon* (<http://www.idtdna.com/UNAFold>). As amostras amplificadas de cDNA referentes aos três genes marcadores foram avaliadas usando a técnica de RT-PCR, seguido da sua visualização em em gel de agarose 2,0% (p/v) em tampão tris-acetato-EDTA (TAE) 1×. Os resultados obtidos até o momento demonstram que os oligonucleotídeos utilizados foram capazes de amplificar os cDNAs relativos a *PMA1*, *UBI4* e *HSP82* das cepas WLP650 e WLP500. A análise de bandas, por sua vez, demonstrou que os genes analisados apresentam expressão diferencial aparente. Como perspectivas, tem-se a análise quantitativa da expressão dos genes *PMA1*, *UBI4* e *HSP82* usando a técnica de qRT-PCR, bem como avaliação do padrão de expressão dos mesmos genes nas cepas cultivadas em microrreatores semianaeróbicos em mosto-padrão cervejeiro, mimetizando o ambiente encontrado em microcervejarias.