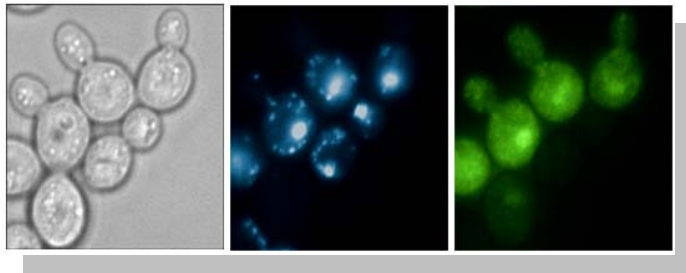


**UNIVERSITATEA DUNĂREA DE JOS
FACULTATEA DE ȘTIINȚA ȘI INGINERIA ALIMENTELOR**

**CERCETĂRI PRIVIND INFLUENȚA UNOR FACTORI DE STRES
ASUPRA DROJDIILOR DE BERE**

REZUMAT TEZĂ DE DOCTORAT



**Doctorand
Iulia (IONIȚĂ) BLEOANCĂ**

**Coordonator științific
Prof. dr. ing. Traian HOPULELE**

**GALAȚI
2011**

**CERCETĂRI PRIVIND INFLUENȚA UNOR FACTORI DE STRES
ASUPRA DROJDIILOR DE BERE**



Către _____

Universitatea "Dunărea de Jos" din Galați vă face cunoscut că în data de 21.01.2011 ora 11.30 în SALA TENISULUI va avea loc susținerea publică a tezei de doctorat intitulată : "Cercetări privind influența unor factori de stres asupra drojdiilor de bere", elaborată de domnul/doamna (ing. JONITĂ IULIA-LIDIA(BLEOANCĂ)), în vederea conferirii titlului științific de doctor în Domeniul de doctorat - Inginerie Industrială.

Comisia de doctorat are următoarea componență:

1. Președinte: Prof.dr.ing. Petru ALEXE
Decan - Facultatea de Științe și Ingineria Alimentației
Universitatea "Dunărea de Jos" din Galați.
2. Conducător de doctorat: Prof.dr.ing. Traian HOPILELE
Universitatea "Dunărea de Jos" din Galați
3. Referent oficial: Prof.dr.ing. Tatiana FASSE-DIARD
Universitatea din București
4. Referent oficial: Cercet.șt.șr.dr.ing. Năstasia BELE
Director-Institutul de Biotehnologie Alimentară din București
5. Referent oficial: Prof.dr.ing. Anca NICOLAE
Universitatea "Dunărea de Jos" din Galați

Cu această ocazie vă transmitem rezumatul tezei de doctorat și vă invităm să participați la susținerea publică, în cazul în care doriți să faceți eventuale aprecieri sau observații asupra conținutului lucrării, vă rugăm să le transmiteți în scris pe adresa Universității, str. Domnească nr. 47, 800008 - Galați, Fax - 0236 - 461353.

RECTOR,
Prof.dr.ing. Vasile MÎNZO

[Signature]



SECRETAR DOCTORAL,

Ing. Gheorghe ESTE

[Signature]

CUPRINS

OBIECTIVELE ȘTIINȚIFICE ALE TEZEI DE DOCTORAT	i
A. STUDIU DOCUMENTAR	
1. NOȚIUNI GENERALE PRIVIND TAXONOMIA ȘI BIOLOGIA DROJDIILOR DE BERE	1
1.1. Prezentare generală a drojdiilor	2
1.2. Taxonomia drojdiilor de bere	3
1.3. Metabolismul drojdiilor	12
1.3.1. Reglarea metabolismului glucidic al drojdiilor în funcție de disponibilitatea glucozei și a oxigenului	13
2. CICLUL DE VIAȚĂ ȘI GENETICA DROJDIILOR	
2.1. Ciclul de viață al drojdiilor din genul <i>Saccharomyces</i>	17
2.2. Expresia genelor- de la transcripție la translație	18
2.3. Prezentarea generală a procesului transcripțional	20
2.4. Particularitățile procesului transcripțional la organisme eucariote	21
2.5. Reglarea expresiei genelor la eucariote	21
2.6. Factorii de transcripție	23
2.6.1. Factorii de transcripție YAP	24
2.6.2. Yap1- principalul reglator al stresului oxidativ	25
3. STRESUL CELULAR	
3.1. Considerații generale	27
3.2. Sisteme de recepție a stresului	28
3.3. Fazele răspunsului la stres	29
3.4. Tipuri de stres ce pot afecta drojdiile	29
3.5. Tipuri specifice de stres manifestate asupra drojdiilor de bere	30
3.5.1. Stresul oxidativ	
3.5.1.1. Descriere	32
3.5.1.2. Acțiunea distructivă a stresului oxidativ la nivel celular	33
3.5.1.3. Modalități de apărare celulară. Antioxidanții	34
3.5.1.4. Factori care influențează stresul oxidativ la celulele de drojdie	39
3.5.1.5. Stresul oxidativ în industria berii	39
3.5.2. Stresul etanolic	
3.5.2.1. Descriere	46
3.5.2.2. Efectele etanolului asupra drojdiilor de bere	46
3.5.2.3. Răspunsul celulelor de drojdie la stresul etanolic	48
3.5.2.4. Factorii care influențează stresul determinat de alcoolii	52
3.5.2.5. Impactul stresului etanolic asupra culturilor starter în industria berii	53
B. STUDIU EXPERIMENTAL	
4. MATERIALE, METODE ANALITICE ȘI APARATURĂ DE LABORATOR	
4.1. Materiale	54
4.1.1. Culturi pure de microorganisme	54
4.1.2. Medii de cultură	54

**CERCETĂRI PRIVIND INFLUENȚA UNOR FACTORI DE STRES
ASUPRA DROJDIILOR DE BERE**

4.1.3. Enzime utilizate în studiile de biologie moleculară	57
4.1.4. Vectori utilizați în procesul de clonare	58
4.1.5. Primeri	59
4.1.6. Sonde moleculare	60
4.1.7. Markeri moleculari pentru acizi nucleici	60
4.1.8. Reactivi și kituri pentru analize de laborator	60
4.2. Aparatura	63
4.3. Metode analitice	67
4.3.1. Proceduri generale de lucru	67
4.3.2. Condiții de cultivare și conservare a culturilor pure de microorganisme	67
A. METODE MICROBIOLOGICE	
4.3.3. Caracterizarea morfo- fiziologică a tulpinilor de drojdii de bere	68
Evaluarea caracterelor morfologice	68
Morfologia celulelor cultivate în medii lichide	68
Aspectul coloniilor pe medii solidificate	68
Morfologia coloniilor gigant	68
Caracterizarea fiziologică comparativă pentru fipul fermentativ (de fermentație inferioară și respectiv superioară)	68
Capacitatea de dezvoltare la temperaturi ridicate	68
Cultivarea pe mediu selectiv cu X – α – Gal	68
Verificarea tulpinilor de drojdii pentru apariția mutanților petite	69
Testarea auxotrofiei tulpinilor de drojdii de bere industriale	70
4.3.4. Analiza cineticii multiplicării drojdiilor de bere industriale	70
4.3.5. Tehnici de evaluare a creșterii prin determinarea globală a biomasei substanță uscată	71
4.3.6. Evaluarea viabilității celulelor de drojdii supuse stresului etanolic	71
Determinarea viabilității prin metoda bazată pe reacția de reducere a albastrului de metilen în mediu alcalin	72
Determinarea viabilității prin metoda culturală	72
4.3.7. Evaluarea vitalității celulelor de drojdii supuse stresului etanolic la depozitare	73
4.3.8. Studiul dinamicii proceselor fermentative	75
Determinarea concentrației de etanol din probele fermentate	75
B. METODE DE BIOLOGIE MOLECULARĂ	76
4.3.9. Electroforeza în gel de agaroză a acizilor nucleici	78
4.3.10. Tehnica Northern blotting	79
Obținerea sondelor prin tehnica PCR	79
4.3.11. Localizarea celulară a factorului de transcripție Yap1 în condiții de stres oxidativ și etanolic folosind fuziunea proteică GFP- Yap1	80
Obținerea celulelor competente de <i>Escherichia coli</i>	81
Obținerea celulelor competente de drojdii prin metoda cu acetat de litiu	81
4.4. Prelucrarea statistică a rezultatelor experimentale	81
4.5. Modele matematice aplicate la dezvoltarea drojdiilor de bere industriale	81
4.6. Softuri de biologie moleculară utilizate în studiu	83

5. CARACTERIZAREA MORFOLOGICĂ ȘI FIZIOLOGICĂ A TULPINILOR DE DROJDII	
5.1. Alegerea tulpinilor de drojdii	85
5.2. Caracterizarea morfologică a tulpinilor de drojdii de bere	87
5.2.1. Studiul morfologiei pe medii culturale lichide	87
5.2.2. Analiza aspectului coloniilor pe medii culturale solide	89
5.2.3. Morfologia coloniilor gigant	90
5.3. Caracterizarea fiziologică a tulpinilor de drojdii de bere	91
5.3.1. Diferențierea drojdiei de fermentație inferioară de drojdia de fermentație superioară prin testarea temperaturii maxime de dezvoltare	91
5.3.2. Confirmarea tulpinilor de drojdii de fermentație inferioară și superioară prin cultivarea pe mediu selectiv cu X – α – Gal	92
5.4. Evaluarea multiplicării drojdiilor în sistem submers	93
5.5. Analiza dinamicii culturilor de drojdii industriale W 34/ 70 și W 210 în sistem submers discontinuu și corelarea concentrației de celule cu densitatea optică la 600nm a culturilor	93
5.5.1. Modelarea matematică a creșterii tulpinilor de drojdii de bere industriale	98
5.6. Concluzii parțiale	101
6. EFECTUL ETANOLULUI ASUPRA CELULELOR DE DROJDII	
6.1. Analiza fenotipică a drojdiilor în condiții de stres etanolic și oxidativ	103
6.2. Studiul viabilității și vitalității drojdiilor de bere pe durata depozitării în condiții de stres etanolic	106
6.2.1. Evaluarea viabilității drojdiilor de bere supuse stresului etanolic pe durata depozitării	110
6.2.2. Evaluarea vitalității drojdiilor de bere supuse stresului etanolic pe durata depozitării	116
6.3. Concluzii parțiale	123
7. LOCALIZAREA FACTORULUI DE TRANSCRIPȚIE Yap1 ÎN CONDIȚII DE STRES ETANOLIC	
7.1. Scurtă privire generală asupra factorului de transcripție Yap1	126
7.2. Studiul localizării proteinei Yap1 la celulele de drojdii în condiții de stres etanolic	
7.2.1. Proteina cu fluorescență verde GFP	127
7.2.1.1. Structura și particularitățile de bază ale GFP	128
7.2.2. Pregătirea analizei de localizare a factorului de transcripție Yap1 la celule de drojdii în condiții de stres etanolic	129
7.2.3. Localizarea factorului de transcripție Yap1 la celule de drojdii în condiții de stres etanolic	140
7.2.3.1. Reversibilitatea acumulării nucleare a GFP- Yap1	143
7.2.4. Analiza fenotipică a drojdiilor transformate cu GFP- Yap1 în condiții de stres	144
7.3. Amplificarea băncii de gene găzduită de plasmidul <i>pLEJ009</i>	145
7.4. Concluzii parțiale	148

8. ANALIZA NORTHERN PENTRU CELULE DE DROJDII SUPUSE STRESULUI ETANOLIC	
8.1. Tehnica Northern blotting	151
8.2. Analiza rezultatelor activării transcripționale a Yap1 și a genelor antioxidante GPH1, TPS1 și SOD1 ca răspuns la stresul etanolic aplicat celulelor de drojdii în fază exponențială și staționară	163
8.3. Concluzii parțiale	166
C. CONCLUZII FINALE	168
ANEXE	
Anexa 1. Glosar de termeni de specialitate	172
Anexa 2. Măsuri de siguranță pentru analizele de biologie moleculară	181
Anexa 3. Certificat de calitate a culturilor pure de drojdii de bere W 34/ 70 și W 210	184
Anexa 4. Caracterizarea genetică a drojdiilor de bere W 34/ 70 și W 210	185
Anexa 5. Colaborări internaționale cu laboratoare de specialitate	187
Anexa 6. Lista lucrărilor de cercetare elaborate în domeniul tezei de doctorat	188
REFERINȚE BIBLIOGRAFICE	189

OBIECTIVELE ȘTIINȚIFICE ALE TEZEI DE DOCTORAT

Drojdia *Saccharomyces cerevisiae* este utilizată de oameni de câteva mii de ani pentru obținerea băuturilor și a produselor alimentare fermentate.

Printre băuturile fermentate alcoolice, berea este una dintre cele mai consumate, producția anuală mondială situându-se la 1.7×10^{11} L anual (Barth, 2007), valoarea pieței mondiale de bere în 2009 ajungând la valori de aproximativ 200 miliarde euro. Începând cu anul 2001 s-a constatat o creștere progresivă a pieței mondiale a berii, previziunile indicând o menținere a acestei tendințe și în următoarea perioadă.

Este cunoscut faptul că etanolul produs de drojdii prin fermentație depinde de concentrația inițială de glucide din mediu. Având în vedere că etanolul acumulat în timpul fermentației reprezintă un potențial factor de stres chimic pentru celulele de drojdie, utilizarea unor medii de fermentație cu concentrații ridicate de glucide poate determina intensificarea stresului etanolic la care sunt supuse drojdiile.

Pentru minimizarea efectelor negative ale stresului etanolic asupra activității drojdiilor este necesară cunoașterea mecanismului de răspuns la stres etanolic, precum și rezistența tulpinilor de drojdii industriale. Literatura de specialitate prezintă studii asupra stresului etanolic realizate în ultimii 15 ani, dar care nu au descifrat încă mecanismul de răspuns la stres etanolic.

Studii recente realizate pe tulpini de drojdii de laborator aflate în condiții de stres etanolic indică producerea de specii reactive ale oxigenului (ROS, en. reactive oxygen species), substanțe specifice stresului oxidativ (Smart, 2007; Boulton, 2006; Garray- Arroyo, 2004; Lentini, 2003).

Lucrarea de față propune o abordare originală cu privire la mecanismul de răspuns la stres etanolic al drojdiilor de bere, prin investigarea relației stresului etanolic cu cel oxidativ, care este foarte bine documentat la drojdiile de laborator. Puntea de legătură propusă pentru studiul comparat al acestor două tipuri de stres o constituie factorul de transcripție Yap1, principalul reglator al stresului oxidativ.

CERCETĂRI PRIVIND INFLUENȚA UNOR FACTORI DE STRES ASUPRA DROJDIILOR DE BERE

Pentru atingerea obiectivului major mai sus-amintit au fost urmărite și concretizate următoarele obiective specifice:

1. evaluarea rezistenței la stres oxidativ și etanolic a drojdiilor de bere industriale;
2. studiul viabilității și vitalității drojdiilor de bere în condiții de stres etanolic similare celor din industria berii;
3. analiza nivelului expresiei factorului de transcripție Yap1 în condiții de stres etanolic;
4. examinarea localizării proteinei Yap1 în celule de drojdii industriale supuse stresului etanolic;
5. testarea nivelului expresiei genelor antioxidante (*SOD1*, *GPH1*, *TPS1*) ca răspuns la stresul etanolic.

Pentru îndeplinirea acestor obiective specifice au fost utilizate tehnici de microbiologie și microbiologie previzională, însoțite de metode avansate de analiză genetică și biologie moleculară.

STRUCTURA TEZEI DE DOCTORAT

Teza de doctorat este prezentată pe 194 de pagini și se compune din două părți: o parte de studiu documentar care conține 3 capitole și o parte de cercetări originale, structurate pe 5 capitole. Lucrarea conține 167 figuri și grafice și 36 de tabele. Pentru elaborarea tezei s-au utilizat 104 referințe bibliografice din literatura de specialitate, dintre care 70% din publicații sunt apărute în ultimii 10ani.

A. STUDIU DOCUMENTAR

Studiul documentar a urmărit evidențierea importanței drojdiilor din genul *Saccharomyces* în procesele fermentative, precum și în cercetările fundamentale.

Astfel, **capitolul 1** al studiului documentar, *Noțiuni generale privind taxonomia și biologia drojdiilor de bere*, prezintă utilizările diverse ale drojdiilor în procesele biotehnologice, precum și evoluția taxonomiei drojdiilor, de la prima clasificare publicată în 1952, până la cea mai recentă, apărută în anul 2000. De asemenea, în acest capitol se regăsesc informații cu privire la clasificarea drojdiilor de bere în drojdii de fermentație inferioară (drojdii *lager*) și drojdii de fermentație superioară (drojdii *ale*).

În **capitolul 2**, intitulat *Ciclul de viață și genetica drojdiilor* sunt prezentate informații generale referitoare la expresia genelor și particularități ale procesului transcripțional și reglarea expresiei genelor la organismele eucariote, prin factorii de transcripție YAP. Principalul regulator al stresului oxidativ, Yap1, este detaliat în această parte a studiului documentar.

Capitolul 3 oferă într-o primă etapă informații generale despre *Stresul celular*, precum sisteme de recepție a stresului, fazele răspunsului la stres, pentru ca apoi să îngusteze aria de interes către tipuri specifice de stres manifestate asupra drojdiilor de bere și să detalieze stresul oxidativ și stresul etanolic.

Capitolul 1. Noțiuni generale privind taxonomia și biologia drojdiilor

Pentru om, drojdiile prezintă o importanță aparte datorită implicațiilor majore economice, sociale și de sănătate. Drojdiile au fost adesea considerate primele organisme domesticite, fiind utilizate la fermentarea băuturilor alcoolice și pentru obținerea aluatului de pâine din cele mai vechi timpuri (Walker, 2000). Pe lângă valoarea industrială, drojdiile prezintă importanță și în cercetările fundamentale. *Saccharomyces cerevisiae* este des utilizată ca model eucariot pentru studiile fundamentale și aplicative ale biologiei moleculare celulare, datorită similitudinilor cu organismul

mamiferelor, secvenționării complete a genomului și a capacității de supraviețuire în condiții diverse, precum și datorită ușurinței de manipulare a drojdiilor și costurilor reduse.

Taxonomia în general și a drojdiilor în particular este un domeniu în permanență dinamică, ce prezintă o sinteză actualizată continuu a tuturor cunoștințelor achiziționate în biologia organismelor la care se referă. În ceea ce privește studiile taxonomice asupra drojdiilor acestea au ca lucrare de referință *Yeast, a Taxonomic Study*. De la prima sa apariție, în 1952, sub îndrumarea cercetătorilor olandezi Lodder și Kreger- van Rij și până la studiul publicat în 2000 de Barnett și colaboratorii, numărul și denumirea speciilor și genurilor de drojdii au suferit transformări multiple. Clasificarea realizată de Barnett (Barnett et al., 2000) se bazează pe criteriile de taxonomie moleculară și împarte genul *Saccharomyces* în trei grupuri: *sensu stricto*, *sensu lato* și *grupul al III^{ea}*. Drojdiile de bere *Saccharomyces cerevisiae* și *Saccharomyces pastorianus* fac parte conform acestei ultime clasificări din grupul I, *Saccharomyces sensu stricto*. Drojdiile de bere sunt clasificate astăzi în funcție de tipul floculant în drojdii de fermentație inferioară, drojdii tip *lager* și drojdii de fermentație superioară, drojdii tip *ale*.

Capitolul 2. Ciclul de viață și genetica drojdiilor

Dogma ce guvernează biologia moleculară descrie expresia genelor prin două procese esențiale, **transcrierea** ADN-ului în ARNm și respectiv **translația** ARNm în polipeptide.

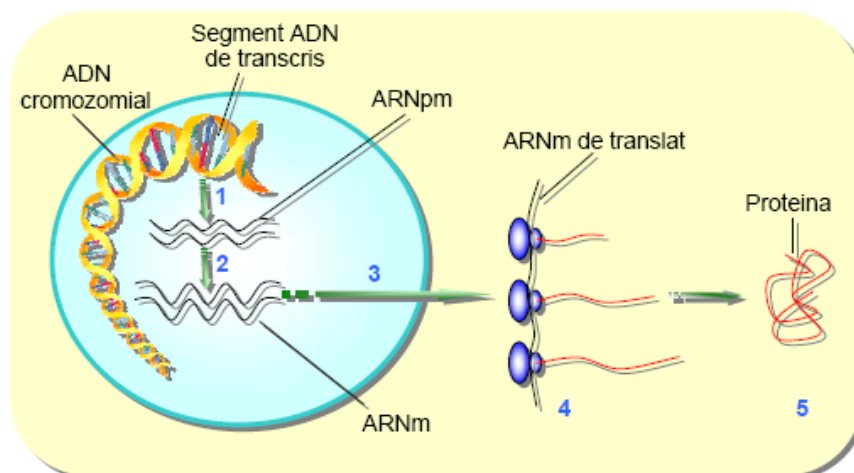


Figura 2.2. Transferul informației genetice în celulele eucariote

ADN-ul cromozomial localizat la nivelul nucleului conține întreaga cantitate de informație genetică. Anumite fragmente de ADN sunt transcrise într-o primă etapă în ARNpremesager (ARNpm) (1), care este transformat în ARNm (2). ARNm este apoi exportat din nucleu (3) către citoplasmă, unde are loc translația în polipeptide de către ribozomi care se deplasează de-a lungul ARNm (4). După translație lanțul polipeptidic se răsucește, ajungând la conformația proteică nativă (5).

Controlul expresiei genelor prezintă o importanță deosebită în funcționarea și supraviețuirea celulelor. Această funcție este îndeplinită de **factorii de transcripție**, proteine ce interacționează cu ADN-ul, ce au dimensiuni reduse și rol de reglare a procesului transcripțional. Astfel, fiecare etapă a sintezei proteice poate fi monitorizată prin sisteme de control specifice.

În vederea reglării expresiei genelor eucariote celulele sunt înzestrate cu următoarele tipuri de reglare: control transcripțional, control post-transcripțional, control translațional și control post-translațional. Studiile realizate pe drojdii *Saccharoyces cerevisiae* au arătat că aceste microorganisme sunt dotate cu o clasă de proteinele activatoare cunoscută sub numele de **YAP** (en. *yeast activator proteins*).

Cercetările realizate până în prezent (Rodrigues- Pousada, 2004) au demonstrat existența unei familii de factori de transcripție formată din opt membri, ce poartă denumiri formate din acronimul Yap și un număr desemnat de ordinea descoperirii respectivului factor de transcripție (Yap1, Yap2, ..., Yap8). Fiecare dintre cei opt factori de transcripție intervine în răspunsul la stres al eucariotelor. Cercetările realizate în domeniul mecanismelor de răspuns la stres au demonstrat implicarea familiei proteinelor YAP într-o gamă diversă de tipuri de stres, printre care se numără stresul oxidativ, osmotic, cel determinat de metale și metaloide sau stresul termic (Rodrigues-Pousada, 2006). Factorul de transcripție Yap1 s-a dovedit a fi reglatorul principal al răspunsului la stresul oxidativ.

Pornind de la studiile recente ce indică producerea de specii reactive ale oxigenului (ROS, en. *reactive oxygen species*) de către drojdiile de laborator supuse stresului etanolic, studiul de față propune investigarea mecanismului de răspuns la stres etanolic a drojdiilor de bere prin corelarea stresului oxidativ cu cel etanolic, puntea de legătură între cele două tipuri de stres fiind factorul de transcripție Yap1.

B. STUDIU EXPERIMENTAL

Experimentele tezei de doctorat sunt prezentate în 5 capitole, astfel:

Capitolul 4, *Materiale, metode analitice și aparatură de laborator*, prezintă materialele, echipamentele și metodele de analiză folosite în cercetările realizate.

În **capitolul 5, *Caracterizarea morfologică și fiziologică a tulpinilor de drojdii***, sunt caracterizate morfologic și fiziologic tulpinile de drojdii de bere utilizate în studiu, este analizată dinamica culturilor de drojdii industriale W 34/ 70 și W 210 în sistem submers discontinuu, este prezentată corelația dintre concentrația de celule de drojdii și densitatea optică la 600nm a culturilor și modelarea matematică a creșterii tulpinii de drojdie de bere industrială W 34/70.

Rezultatele cercetărilor ce au avut în vedere *evaluarea efectelor etanolului asupra celulelor de drojdii*, respectiv analiza fenotipică a drojdiilor în condiții de stres etanolic și oxidativ, studiul viabilității și vitalității drojdiilor de bere pe durata depozitării în condiții de stres etanolic, sunt prezentate detaliat în **capitolul 6**.

Capitolul 7, *Localizarea factorului de transcripție Yap1 în condiții de stres etanolic*, prezintă etapele parcurse în vederea analizei *in vivo* a activării factorului de transcripție Yap1 în condiții de stres etanolic și identificarea unor gene implicate în răspunsul la stres etanolic la drojdiile de bere. Pentru localizarea *in vivo* a factorului de transcripție Yap1 în condiții de stres etanolic s-a utilizat marcarea acestui factor cu proteina fluorescentă verde GFP (en. *Green Fluorescent Protein*), urmată de introducerea construcției chimere GFP- Yap1 în două tulpini de drojdii de laborator și două tulpini de drojdii industriale, folosind tehnica ADN-ului recombinant.

În **capitolul 8, *Analiza Northern pentru celule de drojdii supuse stresului etanolic***, sunt prezentate rezultatele studiului cinetic expresiei unor gene implicate în stresul oxidativ (*GPH1*, *TPS1* și *SOD1*) și a factorului de transcripție *Yap1* pe durata stresului etanolic aplicat asupra a patru tulpini de drojdii, dintre care trei tulpini sunt drojdii de laborator și o tulpină este o drojdie industrială.

Capitolul 4. Materiale, metode analitice și aparatură de laborator

Culturi pure de microorganism

➤ *Tulpini de drojdii* În studiile realizate s-au folosit două tulpini industriale utilizate în industria berii, achiziționate de la Colecția de drojdii Weihenstephan, Germania și 11 tulpini de drojdii de laborator, puse la dispoziția autoarei de către Laboratorul Genomics and Stress, ITQB, Universidade Nova de Lisboa, Portugalia. Toate tulpinile de drojdii sunt prezentate în tabelul 4.1.

**CERCETĂRI PRIVIND INFLUENȚA UNOR FACTORI DE STRES
ASUPRA DROJDIILOR DE BERE**

Tabelul 4.3. Enzime utilizate în studiile de biologie moleculară

Enzima	Scopul utilizării	Caracterizare	Firma producătoare
<i>Fosfatază alcalină (CIP)</i>	Catalizarea unei reacții enzimatiche de îndepărtare a grupărilor fosfat de la capătul 5' al catenelor polinucleotidice ale acizilor nucleici, împiedicând astfel unirea capetelor obținute în urma unei digestii cu endonucleaze.	10 U/μL	<i>New England BioLabs</i>
<i>T4 ADN- polimerază</i>	În reacția de <i>fill in</i> a catalizat polimerizarea ADN în direcția 5'- 3', în prezența unei matrice și a unor primeri.	20 U/μL	<i>New England BioLabs</i>
<i>T4 ADN- ligază</i>	Formarea legăturilor fosfodiesterice între două fragmente de ADN dublu catenar, cu capete netede.	40 U/μL	<i>Fermentas</i>
<i>Go-Taq ADN polimerază</i>	Obținerea prin amplificare PCR a sondelor pentru analiza Northern Blotting.	5 U/μL	<i>Promega</i>
<i>Klenow</i>	Marcarea radioactivă a sondelor ce urmează a fi utilizate la analiza Northern.	50 U/μL	<i>Amersham Biosciences</i>

Tabelul 4.4. Endonucleaze de restricție utilizate în studiu

Enzima	Sursa bacteriană	Secvența de recunoaștere	Concentrația	Firma producătoare
<i>Apal</i>	<i>E. coli</i> ce posedă gena <i>Apal</i> de la <i>Acetobacter pasteurianus</i> .	5' GGGCC↓C 3' *	10 U/μL	<i>Fermentas</i>
<i>BamHI</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> .	5' G↓GATCC 3'	20 U/μL	<i>New England BioLabs</i>
<i>Ecl134II (EcoICRI)</i>	<i>Escherichia coli</i> ICR.	5' GAG↓CTC 3'	10 U/μL	<i>Fermentas</i>
<i>EcoRI</i>	<i>Escherichia coli</i> ce posedă gena clonată <i>EcoRI</i> de la <i>E. coli</i> RY13.	5' G↓AATTC 3'	10 U/μL	<i>Fermentas</i>
<i>HinCI (HindII)</i>	<i>E. coli</i> ce posedă gena <i>HinCI</i> de la <i>Haemophilus influenzae</i> Rc.	5' GTY↓RAC 3'	10 U/μL	<i>Fermentas</i>
<i>NcoI</i>	<i>E. coli</i> ce posedă gena <i>NcoI</i> de la <i>Nocardia corallina</i>	5' C↓CATGG 3'	10 U/μL	<i>New England BioLabs</i>
<i>NotI</i>	<i>E. coli</i> ce posedă gena <i>NotI</i> de la <i>Nocardia otitidis-caviarum</i> .	5' GC↓GGCCGC 3'	10 U/μL	<i>New England BioLabs</i>
<i>SnaBI</i>	<i>E. coli</i> ce posedă gena <i>SnaBI</i> de la <i>Sphaerotilus natans</i> .	5' TAC↓GTA 3'	5 U/μL	<i>New England BioLabs</i>
<i>SpeI</i>	<i>E. coli</i> ce posedă gena <i>SpeI</i> de la specii de <i>Sphaerotilus</i> .	5' A↓CTAGT 3'	10 U/μL	<i>New England BioLabs</i>
<i>XhoI</i>	<i>E. coli</i> ce posedă gena <i>XhoI</i> de la <i>Xanthomonas holcicola</i> .	5' C↓TCGAG 3'	20 U/μL	<i>New England BioLabs</i>

* ↓ indică situsul de clivare

CERCETĂRI PRIVIND INFLUENȚA UNOR FACTORI DE STRES ASUPRA DROJDIILOR DE BERE

Primeri

Pentru sinteza sondelor folosite la analiza Northern Blotting s-au utilizat primerii prezentați în tabelul 4.5.

Tabelul 4.5. Genele și secvențele primerilor (direcția 5' – 3') folosite pentru obținerea sondelor

Gena	Denumirea	Secvența oligonucleotidică sens a primerului	Secvența oligonucleotidică antisens a primerului
<i>TPS1</i>	Trehaloz- fosfat- sintetază 1	TGCTTCCGTGCAAAGAGTG	AGATCATCGGTGTTCCAAGG
<i>SOD1</i>	Superoxid- dismutază 1	AACGTGGGTCCACATTCAT	CACCATTTTCGTCCGTCTTT
<i>GPH1</i>	Glicogen- fosforilază 1	ATCCACGCAAGTTTCAATC	TGCTAAAGAAGCCGACGTTT
<i>Yap1</i>	AP-1 la drojdii	TACACGTGATGGCGAGGATA	ACCAATCCATCGAAGTGGAG

Secvențele oligonucleotidice utilizate drept primeri sens și antisens au fost achiziționate de la firma *STABvida, Portugalia*.

Sonde moleculare



La analiza Northern s-au utilizat sonde moleculare calde, marcate radioactiv cu un izotop al fosforului (^{32}P), achiziționat de la firma *Amersham, UK*.

Kituri de analiză

Scopul utilizării	Firma producătoare
Determinarea enzimatică a etanolului	<i>LaRoche- Boehringer- Mannheim</i>
Purificarea unui fragment de ADN (80bp – 30kbp) din gel de agaroză	<i>Invitex, Germania</i>
Extracția ADN din celule de <i>Escherichia coli</i>	<i>Omega Bio-tek, SUA</i>
Purificarea ADN-ului obținut prin reacția PCR	<i>Omega Bio-tek, SUA</i>
Marcarea radioactivă a sondelor cu [α - ^{32}P]- dCTP pentru analiza Northern	<i>Amersham, UK</i>

**CERCETĂRI PRIVIND INFLUENȚA UNOR FACTORI DE STRES
ASUPRA DROJDIILOR DE BERE**

Aparatura de laborator

Aparatura de laborator utilizată pentru realizarea experimentelor prezentate face parte din

- ✚ platforma de formare și cercetare interdisciplinară *BIOALIMENT* din cadrul Facultății de Știința și Ingineria Alimentelor, Universitatea *Dunărea de Jos*- Galați și
- ✚ laboratorul *GENOMICS AND STRESS* din cadrul Instituto de Tecnologia Quimica e Biológica, Universidade *Nova de Lisboa*, Portugalia.

Tabelul 4.6. Aparatura de laborator

Echipament	Utilizare
Agitator orbital (200 rot/min) cu incintă termostată, <i>Lab Companion Comecta, Spania</i>	✓ Cultivarea aerobă a microorganismelor pe mediu lichid
Analizor de umiditate, <i>MF-50</i>	✓ Determinări de umiditate a biomasei.
Centrifugă cu răcire (4°C), <i>Eppendorf, Germania</i>	✓ Izolare de ADN și ARN ✓ Separări de biomasă
Congelator ultrafreezer (-70°C), <i>Angelantoni-Industrie Platinum 500, Italia</i>	✓ Depozitarea pe termen lung a <ul style="list-style-type: none"> ▪ culturilor pure de microorganisme ▪ celulelor competente de <i>Escherichia coli</i> ▪ probelor de ARN purificat
Detector Geiger- Müller, <i>Mini Monitor, Series 900, Mini-Instruments, Burnham-on-Crouch, UK</i>	✓ Monitorizarea radiațiilor emise de izotopul radioactiv ³² P utilizat pentru analiza expresiei genelor prin tehnica Northern.
Electroforeză în gel orizontal, <i>VWR, USA</i>	✓ Separarea moleculară a fragmentelor de ADN rezultate din digestii enzimaticice. ✓ Denaturarea probelor de ARN în vederea realizării analizei Northern blotting.
Microscopie cu epifluorescență, (a) <i>Olympus BX41</i> (b) <i>Leica DMRB 3501</i>	✓ Caracterizarea microscopică a tulpinilor de drojdii industriale ✓ Localizarea factorului de transcripție Yap1 în celulele de drojdii supuse stresului oxidativ și etanolic
Sistem de captare a imaginii gelurilor de electroforeză, <i>BioRad, USA</i>	✓ Înregistrarea în format electronic și pe hârtie fotografică a imaginilor gelurilor de electroforeză.
Stereomicroscop, <i>Leica EZ4D</i>	✓ Caracterizarea macroscopică a tulpinilor de drojdii industriale.
Termocycler pentru reacția PCR, <i>Eppendorf, Germania</i>	✓ Amplificarea de ADN prin reacția PCR. ✓ Realizarea reacțiilor de ligare prin menținere la 14°C a amestecurilor timp de 16 ore.
Termostate la 27°C sau 37°C, <i>Binder</i>	✓ Cultivarea aerobă a microorganismelor pe mediu solid

Metode analitice

Pentru realizarea experimentelor au fost utilizate:

A. Metode microbiologice

- Pentru caracterizarea morfo- fiziologică a tulpinilor de drojdii de bere: evaluarea morfologiei pe medii culturale lichide, analiza aspectului coloniilor pe medii culturale solide, morfologia coloniilor gigant.
- Pentru confirmarea tipului fermentativ al tulpinilor de drojdii de bere: capacitatea de dezvoltare la temperaturi ridicate și cultivarea pe mediu selectiv X- α- GAL.
- Verificarea tulpinilor de drojdii pentru apariția mutațiilor *petite* și testarea auxotrofiei tulpinilor de drojdii industriale
- Analiza cineticii multiplicării drojdiilor de bere industriale
- Evaluarea viabilității celulelor de drojdii supuse stresului etanolic prin metode directe de numărare cu camera Thoma, adaptată numărării celulelor stresate și prin metoda indirectă.
- Evaluarea vitalității celulelor de drojdii de bere supuse stresului etanolic prin metoda vitalității

B. Metode de biologie moleculară

- Tehnici de manipulare și analiză ADN: tratamentele enzimatică ale moleculelor ADN, electroforezele ADN în geluri de agaroză, reacțiile de polimerizare în lanț (PCR), secvențierea fragmentelor ADN.
- Tehnici de transformare a microorganismelor: obținerea celulelor competente și transformarea celulelor bacteriene de *Escherichia coli*, precum și a tulpinilor de drojdii de laborator și a tulpinilor de drojdii de bere.
- Hibridizarea Northern blotting

Modele matematice

Dezvoltarea drojdiei de bere W 34/ 70 a fost analizată cu ajutorul a trei modele de creștere, folosite uzual pentru descrierea creșterii microbiene (Legan, 2002) (tabelul 4.7).

Tabelul 4.7. Modele matematice folosite pentru estimarea dezvoltării drojdiei industriale W 34/ 70

Model	Ecuatie	Termeni
Exponențial	$\ln(N) = \ln(N_0) + \mu t$	N - număr microorganisme la timpul t ; N_0 - număr microorganisme la timpul t_0 ; t - timpul (ore); μ - viteza specifică de creștere (h^{-1});
Gompertz modificat	$L(t) = A + C \exp\{-\exp[-B(t - M)]\}$	$L(t) - \log_{10}(N_t)$; B - viteza relativă maximă de dezvoltare (h^{-1}); M - momentul la care se atinge viteza maximă de creștere (h); A - coeficient ce indică valoarea la care $\log_{10}(N_0)$ devine asimptotic inferior (faza de lag); C - diferența dintre A și valoarea la care $\log_{10}(N_t)$ devine asimptotic superior (faza staționară);
Logistic	$\ln(N) = \ln(N_0) + \frac{a}{1 + \exp(b - ct)}$	N - număr microorganisme la timpul t ; N_0 - număr microorganisme la timpul t_0 ; a, b și c - parametri; t - timpul (ore);

Softuri de biologie moleculară

Pentru analizele de biologie moleculară s-au utilizat programe specifice, prezentate în tabelul 4.8.

Tabelul 4.8. Lista programelor informatice de biologie moleculară utilizate în acest studiu

Denumirea programului	Scopul utilizării
<ul style="list-style-type: none">• <i>SE Central Clone Manager</i>, Professional, versiunea 7.11 (www.scied.com)	Alegerea enzimelor de restricție pentru realizarea fuziunii chimerice GFP- Yap1 și inserția în vectorul <i>pLEJ009</i>
<ul style="list-style-type: none">• <i>Primer 3 Plus</i>, versiunea online din noiembrie 2008 (www.bioinformatics.nl)	Alegerea primerilor pentru tehnica Northern blotting
<ul style="list-style-type: none">• Image Processing and Analysis in Java, <i>Image J</i>, versiunea 1.42 (http://rsbweb.nih.gov/ij)	Cuantificarea semnalelor genelor la analiza Northern
<ul style="list-style-type: none">• Baza de date <i>Saccharomyces Genome</i> (<i>Saccharomyces Genome Database, SGD</i>) (www.yeastgenome.org)	Identificarea secvențelor de codare ale genelor utilizate la analiza Northern

Capitolul 5. Caracterizarea morfologică și fiziologică a tulpinilor de drojdii

Pentru caracterizarea tulpinilor de drojdii de bere s-au realizat analize microbiologice ce au evidențiat diferențele fiziologice între drojdiile de fermentație inferioară și drojdiile de fermentație superioară.

În urma **studiului microscopic** al celor două tulpini de drojdii industriale, W 34/70 și W210, au fost evidențiate următoarele caracteristici:

Celulele drojdiei de fermentație inferioară W 34/70 au formă sferică și sunt dispuse singular sau în perechi, iar înmugurirea se realizează polar (figura 5.3).

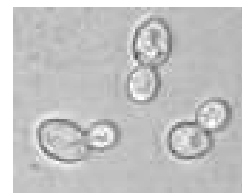
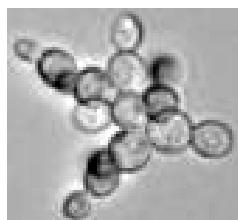


Figura 5.3. Aspectul microscopic al celulelor de drojdie de fermentație inferioară W 34/ 70 după dezvoltare pe mediul YPGlu la temperatura de 30°C, 200rpm



Celulele drojdiei de fermentație superioară W210 au formă elipsoidală și sunt dispuse în lanțuri. Înmugurirea se realizează polar, iar celulele fiice rămân lipite de celula mamă, formând pseudomicelii (figura 5.4).

Figura 5.4. Aspectul microscopic al celulelor de drojdie de fermentație superioară W 210 după dezvoltare pe mediul YPGlu la temperatura de 30°C, 200rpm

CERCETĂRI PRIVIND INFLUENȚA UNOR FACTORI DE STRES ASUPRA DROJDIILOR DE BERE

Analiza morfologică a coloniilor gigant de drojdii industriale, obținute prin cultivare timp de 28 zile la 17°C pe mediu YPGlu (figurile 5.9 și 5.10) indică formă circulară și profil crateriform al acestor colonii.



Figura 5.9.a Colonii gigant ale drojdiei W 34/70 după dezvoltare 28 zile pe mediu YPGlu, la temperatura de 17°C



Figura 5.9.b Margine netedă la coloniile gigant ale drojdiei W 34/70

Coloniile gigant ale drojdiilor de bere studiate au formă circulară și profil crateriform. Marginilor coloniilor- gigant ale celor două drojdiilor sunt diferite: drojdia *lager* W 34/70 (figura 5.9.b) prezintă o margine netedă, în timp ce la drojdia ale W210 marginea apare dantelată (figura 5.10.b).



Figura 5.10.a Colonii gigant ale drojdiei W210 după dezvoltare 28 zile pe mediu YPGlu, la temperatura de 17°C



Figura 5.10.b Margine dantelată la coloniile gigant ale drojdiei W 210

Prin inocularea tulpinilor de drojdii industriale W34/70 și W210 pe mediu selectiv cu X- α -Gal și cultivare la 27°C timp de șase zile s-a evidențiat capacitatea drojdiei de fermentație inferioară, W34/70 de a produce α -galactozidază (melibiază) și respectiv incapacitatea drojdiei de fermentație superioară, W210, de sinteză a acestei enzime. Astfel, coloniile dezvoltate pe acest mediu selectiv sunt de culoare alb- crem în cazul drojdiei de fermentație superioară (W210), în timp ce coloniile drojdiei de fermentație inferioară (W34/70) apar albastre-verzui (figura 5.12).



Figura 5.12. Diferențierea drojdiei de fermentație inferioară W34/70 de drojdia de fermentație superioară W210 prin cultivare pe mediu selectiv X- α -Gal

CERCETĂRI PRIVIND INFLUENȚA UNOR FACTORI DE STRES ASUPRA DROJDIILOR DE BERE

În vederea simplificării determinării concentrației de celule dintr-o cultură de drojzii industriale s-au realizat analize pentru realizarea curbelor standard de creștere și stabilirea unei corelații între concentrația de celule aflate în fază exponențială de creștere și densitatea optică determinată la lungimea de undă de 600nm.

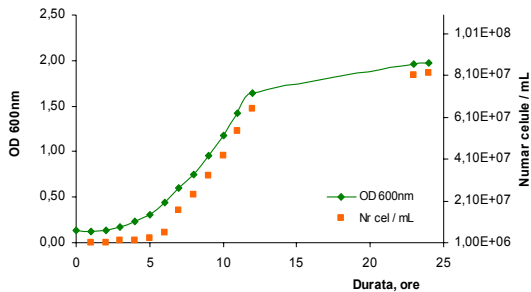


Figura 5.13. Dinamica de multiplicare a drojdiei W34/70

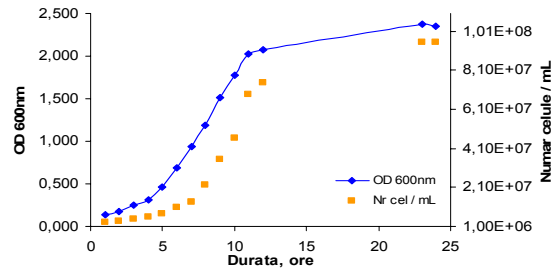


Figura 5.14. Dinamica de multiplicare a drojdiei W210

Pe durata fazei exponențiale există o corelare liniară între concentrația de celule și densitatea optică, astfel încât se poate trasa graficul acestei dependențe. Prin utilizarea analizei statistice au fost determinate ecuațiile dreptelor de regresie, precum și coeficienții de corelație R^2 (figurile 5.18 și 5.19 și tabelul 5.7).

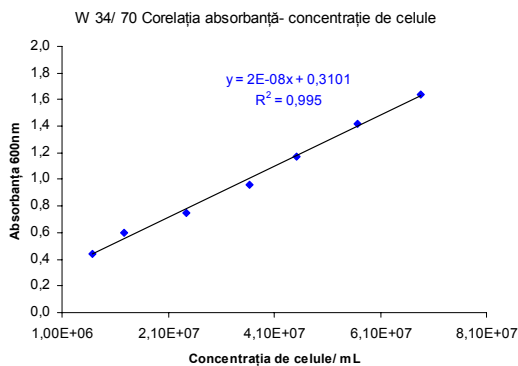


Figura 5.18. Corelația dintre concentrația de celule și densitatea optică la 600nm pentru tulpina W34/70 la cultivarea submersă pe mediu YPD, la 27°C și 150rpm

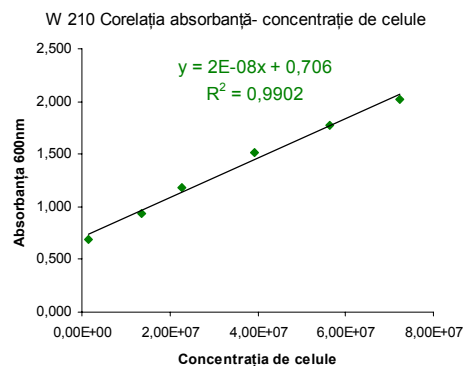


Figura 5.19. Corelația dintre concentrația de celule și densitatea optică la 600nm pentru tulpina W210 la cultivarea submersă pe mediu YPD, la 27°C și 150rpm

Tabelul 5.7. Ecuațiile dreptelor de regresie obținute prin corelarea concentrației de celule cu densitatea optică la 600nm pentru tulpinile de drojzii de bere W34/70 și W210, la cultivarea submersă pe mediu YPD, la 27°C și 150rpm

Tulpina	Ecuația dreptei de regresie	Coeficientul R^2
W34/70	$y = 2 \cdot 10^{-8}x + 0,310$	0,9950
W210	$y = 2 \cdot 10^{-8}x + 0,706$	0,9902

Valorile obținute pentru curbele standard de creștere ale drojdiei W34/70 au fost modelate matematic cu trei dintre cele mai des folosite modele pentru descrierea evoluției populațiilor de celule în culturi discontinue asincrone, în sistem submers de cultivare, respectiv modelul exponențial, Gompertz și Logistic. Parametrii ecuațiilor au fost estimați cu ajutorul funcțiilor de regresie liniară și neliniară, folosind programul SAS Windows 9.0. În tabelul 5.8 sunt prezentate ecuațiile fiecărui model testat, valorile coeficienților și coeficientul de corelație (R^2) corectat conform modelului.

**CERCETĂRI PRIVIND INFLUENȚA UNOR FACTORI DE STRES
ASUPRA DROJDIILOR DE BERE**

Tabelul 5.8. Modele matematice aplicate dezvoltării drojdiei W34/70

Modelul	Ecuția	Coeficienții				Coeficient de corelație (R ²)
Exponențial	$\ln(x)=\ln(x_0)+\mu t$	μ	0.17265			0,760900
Gompertz modificat	$\ln(t)=A+C\exp\{-\exp[-B(t-M)]\}$	A	C	B	M	0,988674
		6.38	1.56	0.38	6.06	
Logistic	$\ln(x)=\ln(x_0)+A/[1+\exp(B-Ct)]$	A	B	C		0,995022
		-3.70	-3.78	-0.54		

Diagramele de paritate (figurile 5.20- 5.22) reprezintă diferența dintre logaritmul parametrilor cinetici predicționați și valorile experimentale. Deviația de la bisectoare poate fi considerată un indicator al calității modelului. Aceste diagrame au fost realizate pentru toate cele trei modele matematice alese.

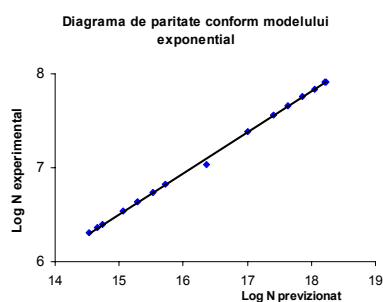


Figura 5.20

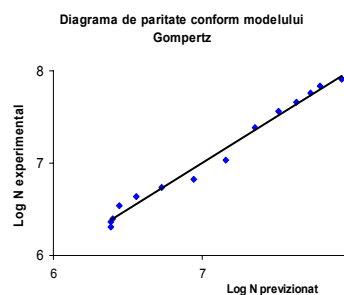


Figura 5.21

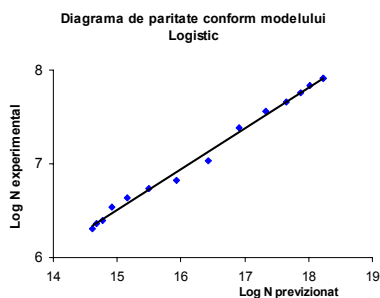


Figura 5.22

Figurile 5.20- 5.22. Diagrama de paritate conform modelelor exponențial, Gompertz și Logistic

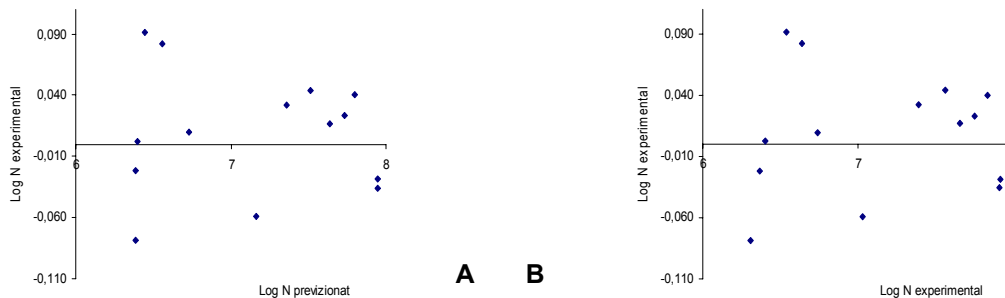


Figura 5.23. Graficul de distribuție a valorilor reziduale în raport cu A) valorile predicționate și B) valorile experimentale conform modelului Gompertz

CERCETĂRI PRIVIND INFLUENȚA UNOR FACTORI DE STRES ASUPRA DROJDIILOR DE BERE

Graficele valorilor reziduale exprimate ca diferența dintre valorile experimentale și cele predicționate pentru constanta de creștere prezintă o împrăștiere aleatorie, lipsită de tendință (figura 5.24). Distribuția aleatorie a valorilor reziduale sugerează o bună corelare a modelelor matematice Gompertz și Logistic cu rezultatele experimentale.

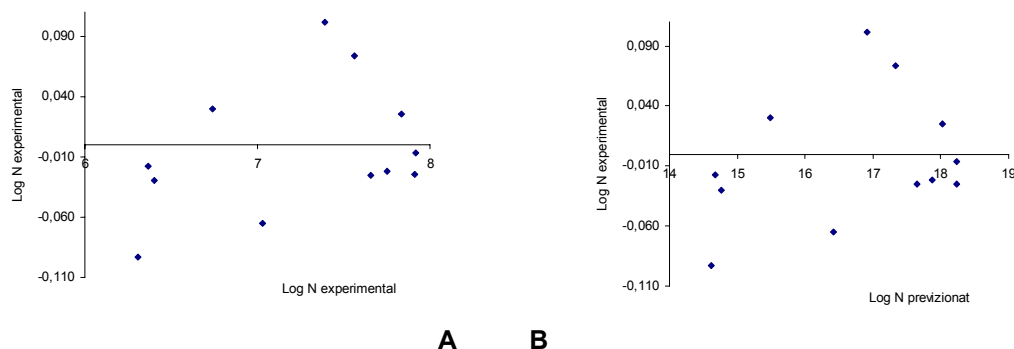


Figura 5.24. Graficul de distribuție a valorilor reziduale în raport cu A) valorile predicționate și B) valorile experimentale conform modelului Logistic

Concluzii parțiale

◆ Prin utilizarea metodelor clasice de investigare microbiologică au fost caracterizate morfologic și fiziologic două tulpini de drojdii de bere, W34/70, drojdie de fermentație inferioară și W210 drojdie de fermentație superioară, tulpini utilizate în prezent pe scară largă pentru producerea berii în Europa.

◆ S-a studiat evoluția dinamică a culturilor de drojdii W 34/ 70 și W 210 prin cultivare în condiții submerse, pe mediul de cultură YPD, la temperatura de 30°C și 200rpm. Prin corelarea concentrației de celule cu densitatea optică a culturii determinată la lungimea de undă de 600nm s-au stabilit ecuații ce caracterizează multiplicarea drojdiilor în fază exponențială pe baza cărora se poate determina concentrația de celule prin analiză spectrofotometrică directă. Această tehnică turbidimetrică de determinare a concentrației de celule permite dimensionarea rapidă a inoculului, în condiții analitice reproductibile.

◆ Prin interpretarea statistică a rezultatelor dinamicii culturii W 34/70 s-a concluzionat că rezultatelor obținute la cultivare în sistem submers, discontinuu asincron, evoluția culturii respectă modelul matematic Logistic.

Capitolul 6. Efectul etanolului asupra celulelor de drojdii

Testările prezentate în acest subcapitol au urmărit trei direcții:

- ✓ evaluarea implicării unuia dintre cei opt factori de transcripție Yap la răspunsul la stres etanolic prin analiza comparativă a fenotipurilor unor tulpini de drojdii de laborator și industriale în condiții de stres etanolic;
- ✓ studiul influenței ploidiei în răspunsul la stres etanolic;
- ✓ investigarea efectelor etanolului asupra viabilității și vitalității a două tulpini de drojdii industriale, în condiții de depozitare similare celor întâlnite în industrie.

La obținerea berii rolul principal al drojdiilor constă în producerea de etanol și dioxid de carbon, precum și alți compuși de aromă. Deși etanolul este considerat un compus metabolic dezirabil, acumularea acestuia pe durata fermentației poate determina apariția unui stres chimic semnificativ la nivelul celulei de drojdii.

Mecanismul din spatele răspunsului la stres etanolic nu a fost încă elucidat, însă studii recente indică o posibilă legătură între mecanismul răspunsului la stres oxidativ și cel al stresului etanolic.

**CERCETĂRI PRIVIND INFLUENȚA UNOR FACTORI DE STRES
ASUPRA DROJDIILOR DE BERE**

Stresul etanolic apare în industria berii când celulele sunt în fază exponențială de creștere, în timpul procesului fermentativ, precum și la celulele aflate în fază staționară de creștere, ce coincide cu perioada de depozitare. Din aceste considerente am testat drojdiile aflate în ambele faze de creștere, exponențială și respectiv staționară.

Pentru evaluarea implicării factorilor de transcripție aparținând familiei YAP în răspunsul la stres etanolic au fost utilizați opt mutații unici la care a fost îndepărtat câte un factor de transcripție (BY Δ yap1 - BY Δ yap8) și o tulpină mutant la care au fost îndepărtate toate genele responsabile de sinteza proteinelor corespunzătoare celor opt factori de transcripție (BY Δ yap \emptyset). În aceste teste au fost utilizate și două tulpini de laborator tip BY, una haploidă (BY 4741) și una diploidă (BY 4743), pentru testarea implicării ploidiei în răspunsul la stres. Ca drojdiile industriale au fost testate drojdiile de bere W 34/70 și W 210. În figura 6.1 sunt prezentate fenotipurile acestor tulpini în condiții de stres etanolic, pe mediul de cultură CAA.

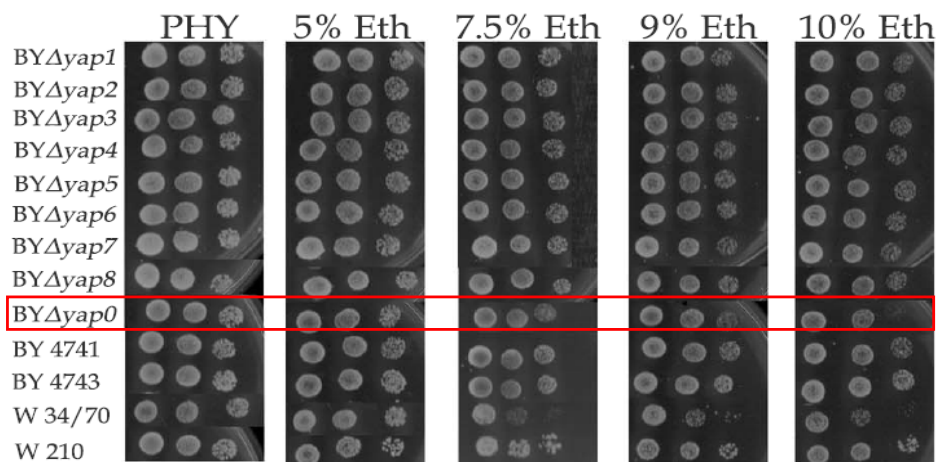


Figura 6.1.A. Colonii de drojdiile dezvoltate din celule aflate în fază exponențială de creștere, supuse stresului etanolic

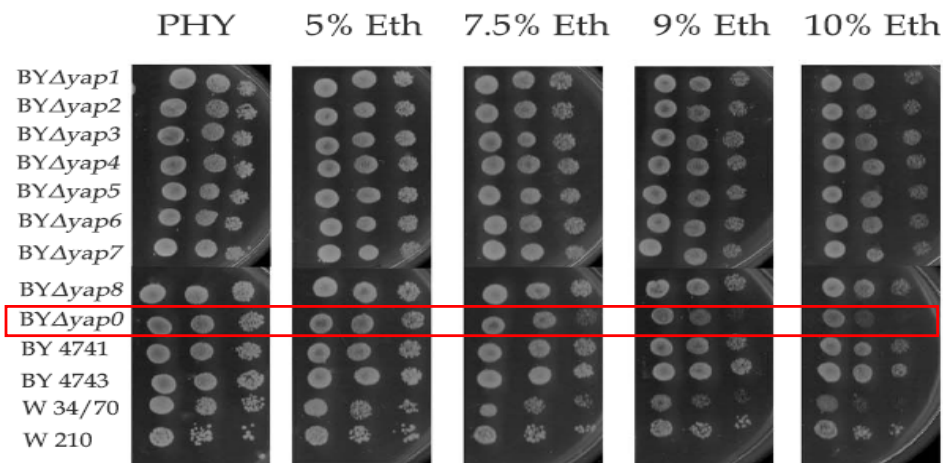


Figura 6.1.B. Colonii de drojdiile dezvoltate din celule aflate în fază staționară de creștere, supuse stresului etanolic

Figura 6.1. Sensibilitatea la etanol a tulpinilor de drojdiile

Ipoteza de lucru a avut în vedere o legătură între mecanismele de răspuns la stresul oxidativ și cel etanolic. Întrucât Yap1 este principalul reglator al stresului oxidativ la drojdiile am anticipat implicarea acestui factor de transcripție și în răspunsul la stres etanolic. Dacă această teorie ar fi corectă, tulpina BY Δ yap1 ar fi prezentat un fenotip clar în condiții de stres etanolic.

CERCETĂRI PRIVIND INFLUENȚA UNOR FACTORI DE STRES ASUPRA DROJDIILOR DE BERE

Testarea implicării proteinelor din grupul AP-1 ale drojdiilor în toleranța la etanol a arătat că deși mutantul $BY\Delta yap\emptyset$ prezintă un fenotip clar în condiții de stres etanolic cu peste 7.5% etanol, dezvoltarea celorlalți mutanți unici nu este afectată de condițiile de stres etanolic testate.

Mutantul $BY\Delta yap1$ are același comportament cu al tulpinii haploide BY 4741 în condiții de stres etanolic, neprezentând o sensibilitate crescută. Ipoteza inițială nu a fost deci confirmată, putând însă exista un mecanism de răspuns la stres etanolic la care să participe doi sau mai mulți factori de transcripție ai acestei familii.

Prin compararea răspunsurilor la stres etanolic ale tulpinilor de laborator haploide BY 4741 (n) și respectiv diploide BY 4743 (2n) cu ale drojdiile industriale W 34/70 și W 210, se observă o sensibilitate sporită a drojdiei lager W34/70, începând cu 7.5% etanol. Spre deosebire de drojdia lager, tulpina ale W210 crește la fel de bine precum drojdiile de laborator în condițiile de stres etanolic testate. În toate testele de creștere pe medii cu etanol drojdia W 210 s-a dovedit mai rezistentă decât W34/70.

Se poate concluziona astfel că toleranța la etanol este dependentă de tulpină, fapt menționat și în alte lucrări, pentru alte tulpini de drojdii (Smart, 2003).

Având în vedere rezultatele unor cercetări ce menționează un răspuns la stres dependent de faza de multiplicare în care se află drojdiile (Smart, 2000), am testat dezvoltarea în condiții de stres etanolic a celulelor aflate în fază exponențială și respectiv staționară de creștere. În condițiile testate, drojdiile aflate în fază exponențială și respectiv staționară nu au prezentat diferențe semnificative în ceea ce privește rezistența la stres etanolic.

Tulpinile de drojdii testate pentru rezistența la stres etanolic au fost supuse și unor teste de stres oxidativ, folosind ca agent oxidant apa oxigenată. Fenotipurile obținute sunt prezentate în figura 6.2.

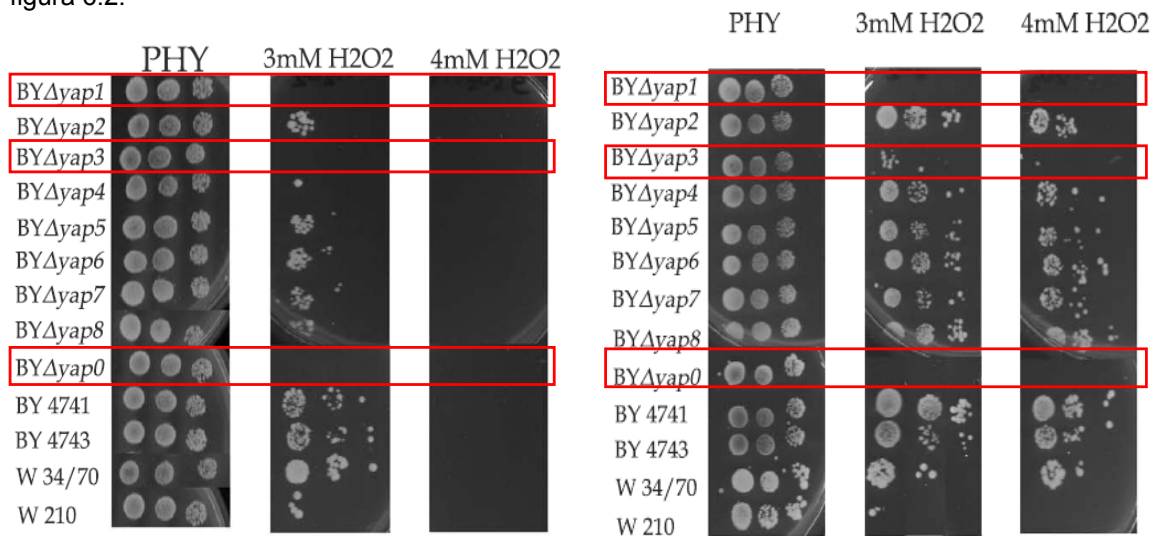


Figura 6.2.A. Colonii de drojdii dezvoltate din celule aflate în fază exponențială de creștere

Figura 6.2.B. Colonii de drojdii dezvoltate din celule aflate în fază staționară de creștere

Figura 6.2. Sensibilitatea la apă oxigenată a tulpinilor de drojdii

Tulpina mutantă $BY\Delta yap1$ a fost utilizată drept probă control întrucât teste anterioare realizate au dovedit capacitatea acestui mutant de a se dezvolta în condiții de stres oxidativ determinate de concentrații de maximum 0.3mM H₂O₂ (Azevedo, 2003, 2007).

Având în vedere faptul că mutantului $BY\Delta yap\emptyset$ i-a fost îndepărtată și gena responsabilă de codificarea factorului de transcripție Yap1, dezvoltarea acestei tulpini este imposibilă pe medii care conțin agenți cu efect puternic oxidant. În condițiile unei concentrații ridicate de apă oxigenată (3mM H₂O₂) un fenotip necunoscut a apărut, pentru tulpina $BY\Delta yap3$. Acest fenotip ar putea fi un

indiciu pentru o colaborare între cei doi factori de transcripție, Yap1 și Yap3, în răspunsul la stres oxidativ intens. Studiul ulterior va evalua corectitudinea acestei ipoteze.

Comparând răspunsul la stres oxidativ al drojdiilor de laborator cu al drojdiilor industriale, se observă o inversare între tulpinile industriale: de această dată drojdia *lager* W 34/70 este cea care prezintă o rezistență sporită la stres oxidativ, similară cu a drojdiilor de laborator BY 4741 (n) și respectiv BY 4743 (2n), în timp ce drojdia *ale* W 210 prezintă o hipersensibilitate la condițiile de stres oxidativ testate.

În condiții de stres oxidativ diferența între fenotipurile celulelor aflate în fază exponențială și cele în fază staționară este evidentă: toate celulele aflate în fază staționară de creștere prezintă o rezistență mai mare la stres oxidativ comparativ cu celulele aflate în fază exponențială de creștere (figurile 6.2.A și 6.2B), fiind capabile să se dezvolte chiar și la concentrații de 4mM H₂O₂.

Studiul viabilității și vitalității drojdiilor de bere pe durata depozitării în condiții de stres etanolic

Etanolul ca factor de stres chimic inhibă creșterea celulară și determină modificări metabolice, mărirea duratei de fermentare, dezechilibre la nivelul structurii pereților celulari și a membranelor celulare, precum și în expresia genelor implicate în răspunsul la stres.

Efectele unui agent stresor asupra unei culturi de microorganisme se cuantifică în mod obișnuit prin **determinarea viabilității**. Utilizarea acestui parametru permite stabilirea unui factor de corecție ce asigură un inocul egal pentru toate șarjele de fermentație.

Pentru determinarea viabilității se folosește în mod obișnuit tehnica directă ce utilizează camere de numărare. Suspensiile de celule ce urmează a fi numărate sunt în prealabil tratate cu o soluție acidă de albastru de metilen, care diferențiază celulele moarte de cele vii. Metoda este recomandată utilizării pentru suspensii de drojdii la care viabilitatea este mai mare de 90%.

Prin utilizarea unei soluții alcaline de albastru de metil pentru colorarea celulelor se poate face distincția între celule vii, stresate și moarte.

În acest mod metoda de colorare cu soluție alcalină de albastru de metilen poate oferi informații despre viabilitate, dar și despre vitalitatea celulelor de drojdii. Această tehnică de colorare a fost utilizată pentru determinarea viabilității culturilor în acest studiu.

În cazul unei populații de celule de drojdii ce urmează a fi utilizată ca inocul pentru o șarjă de fermentație a mustului de malț este de așteptat ca aceasta să conțină și celule care să nu prezinte toate caracteristicile celulelor viabile, dar totuși să aibă un rol activ la fermentație. De exemplu, este posibil ca acestea să nu fie capabile să se multiplifice, însă pot participa la fermentație prin asimilarea substanțelor nutritive din mustul de malț și să contribuie la producerea compușilor de aromă din bere. Testele de viabilitate nu pot preciza proporția acestui tip de celule.

Din aceste considerente au fost propuse mai multe tipuri de **teste de vitalitate**, ce oferă informații despre condiția fiziologică a populației de drojdii. Aceste tipuri de teste sunt extrem de utile pentru previzionarea performanțelor fermentative. În studiul realizat pentru determinarea vitalității s-a folosit metoda vitalitrării.

Suspensiile de drojdii de bere W 34/70 și W 210 au fost depozitate în soluție de tampon acetat cu pH 4.2, la 6°C și respectiv 12°C, timp de trei zile.

Pentru drojdia de fermentație inferioară W 34/ 70 rezultatele variației viabilității la depozitarea în condiții de stres etanolic la 6°C sunt prezentate în figura 6.4.a, iar pentru depozitarea la 12°C în figura 6.4.b. Valorile prezentate sunt media a două determinări independente. Figura 6.6 prezintă rezultatele testelor de viabilitate realizate la drojdia W 210, depozitată în condițiile mai sus- amintite.

**CERCETĂRI PRIVIND INFLUENȚA UNOR FACTORI DE STRES
ASUPRA DROJDIILOR DE BERE**

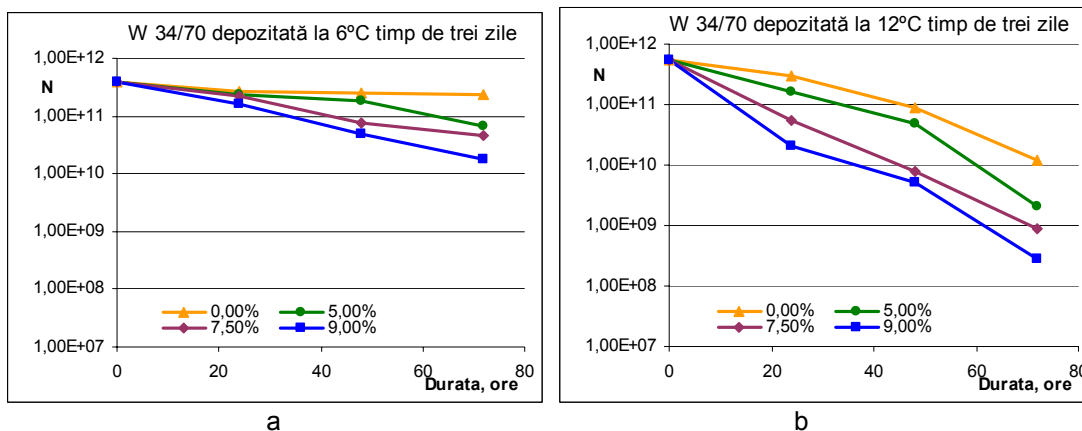


Figura 6.4. Curbe de supraviețuire a drojdiei de fermentație inferioară W 34/ 70 pe durata depozitării la temperaturi de 6°C (a) și 12°C (b) în prezență de etanol (0%, 5%, 7.5% și 9% (v/v)) (N reprezintă numărul de celule viabile)

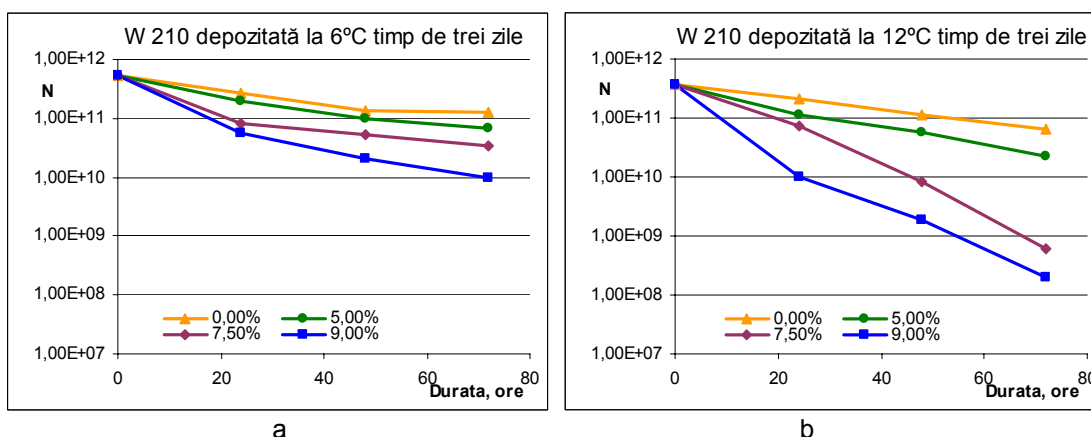


Figura 6.6. Curbe de supraviețuire a drojdiei de fermentație superioară W 210 pe durata depozitării la temperaturi de 6°C (a) și 12°C (b) în prezență de etanol (0%, 5%, 7.5% și 9% (v/v)) (N reprezintă numărul de celule viabile)

Testele de viabilitate realizate au folosit o suspensie de drojdie cu o concentrație inițială de $4 - 5 \cdot 10^{11}$ celule/mL. Conform ipotezei conform căreia o reducere cu un ordin de mărime pe durata depozitării este acceptabil vom considera că o viabilitate de $4 - 5 \cdot 10^{10}$ celule/mL la finalul perioadei de depozitare se încadrează în limite normale.

Din rezultatele obținute pentru determinarea viabilității celulelor de drojdie de bere la depozitarea în condiții de stres etanolic la temperaturi diferite se poate indica o perioadă maximă de păstrare, în care viabilitatea se reduce cu maxim un ordin de mărime. Astfel, pentru drojdia de fermentație inferioară W 34/ 70 durata maximă de păstrare la temperatura de 6°C este de trei zile în condiții des tres etanolic până la 7.5% (v/v) și de doar două zile pentru varianta cu 9% (v/v) etanol. Păstrarea la temperatura de 12°C reduce durata maximă de depozitare la două zile pentru concentrații de până la 5% (v/v), o zi la 7.5% (v/v) și la mai puțin de o zi pentru varianta cu 9% (v/v) etanol. Drojdia de fermentație superioară W 210 poate fi păstrată la temperatura de 6°C în condiții optime de viabilitate timp de trei zile la concentrații de etanol de până la 7.5% (v/v) și de o zi în prezența a 9% (v/v) etanol. Depozitarea la temperatura de 12°C se poate face trei zile la concentrații de până la 5% (v/v), o zi pentru 7.5% (v/v) și mai puțin de o zi pentru 9% (v/v) etanol. Aceste concluzii sunt prezentate în tabelul 6.1.

CERCETĂRI PRIVIND INFLUENȚA UNOR FACTORI DE STRES ASUPRA DROJDIILOR DE BERE

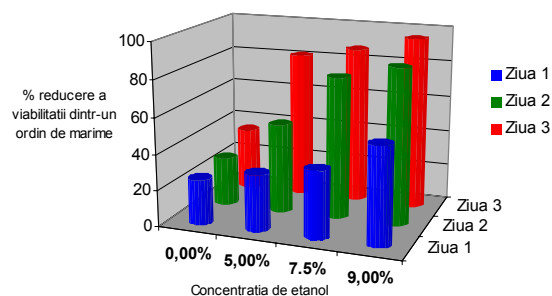


Figura 6.5. Reprezentarea procentuală a reducerii dintr-un ordin de mărime a viabilității drojdiei W 34/ 70 păstrată la temperatura de 6°C în prezență de etanol (0%, 5%, 7.5% și 9% (v/v))

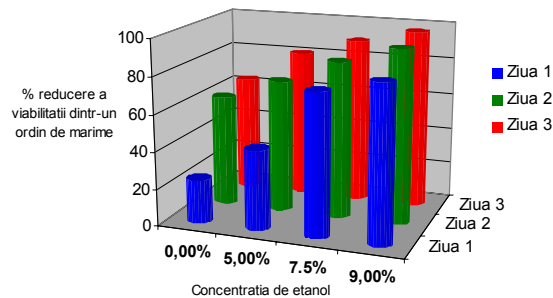


Figura 6.7. Reprezentarea procentuală a reducerii dintr-un ordin de mărime a viabilității drojdiei W 210 păstrată la temperatura de 6°C în prezență de etanol (0%, 5%, 7.5% și 9% (v/v))

Tabelul 6.1. Duratele maxime de păstrare în condiții de stres etanolic, determinate pe baza menținerii viabilității la același ordin de mărime

Drojdie de bere	Temperatura de păstrare	Condiții de stres etanolic			
		0% etanol	5% etanol	7.5% etanol	9% etanol
Durata de păstrare indicată					
W 34/ 70	6°C	3 zile	3 zile	3 zile	2 zile
	12°C	2 zile	2 zile	1 zi	< 1 zi
W 210	6°C	3 zile	3 zile	3 zile	1 zi
	12°C	3 zile	3 zile	1 zi	< 1 zi

Concluziile formulate doar pe baza viabilității drojdiilor depozitate în condiții de stres etanolic nu iau în considerare și performanțele fermentative ale drojdiilor ce au supraviețuit stresului etanolic.

Pentru evaluarea stării fiziologice a celulelor stresate cu etanol s-au realizat teste de vitalitate bazate pe măsurarea puterii de acidifiere, folosind metoda vitalitrării. În urma realizării vitalitrării pentru drojdia de fermentație inferioară W 34/ 70 depozitată timp de trei zile la temperatura de 6°C și respectiv 12°C în condiții de stres etanolic, s-au calculat indici metabolici conform ecuației 4.8. Variația indicilor metabolici este prezentată în figura 6.8 pentru drojdia W 34/ 70 depozitată la temperatura de 6°C și în figura 6.11 pentru aceeași drojdie, depozitată la temperatura de 12°C.

Concluzii parțiale

◆ Prin compararea răspunsurilor la stres etanolic ale tulpinilor de laborator haploide BY 4741 (n) și respectiv diploide BY 4743 (2n) cu ale drojdiile industriale poliploide W 34/70 și W 210, se observă o sensibilitate sporită a drojdiei lager W 34/70, începând cu 7.5% (v/v) etanol. Spre deosebire de drojdia lager, tulpina ale W 210 crește la fel de bine precum drojdiile de laborator în condițiile de stres etanolic testate. În toate testele de creștere pe medii cu etanol drojdia W 210 s-a dovedit mai rezistentă decât W 34/70.

CERCETĂRI PRIVIND INFLUENȚA UNOR FACTORI DE STRES ASUPRA DROJDIILOR DE BERE

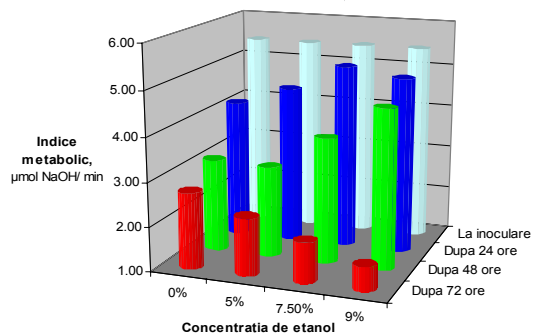


Figura 6.8. Variația indicelui metabolic pentru drojdia W 34/ 70 depozitată timp de trei zile la temperatura de 6°C, în tampon acetat 0.1M, pH 4.2

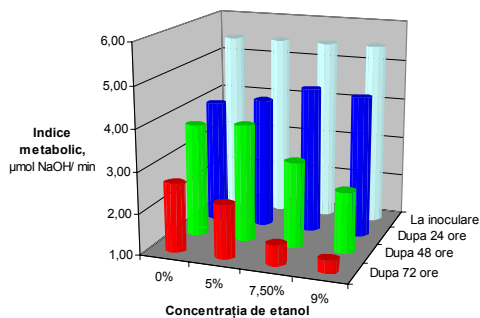


Figura 6.11. Variația indicelui metabolic pentru drojdia W 34/ 70 depozitată timp de trei zile la temperatura de 12°C, în tampon acetat 0.1M, pH 4.2

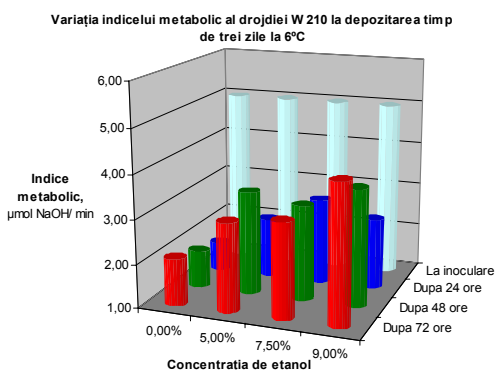


Figura 6.12. Variația indicelui metabolic pentru drojdia W 210 depozitată timp de trei zile la temperatura de 6°C, în tampon acetat 0.1M, pH 4.2

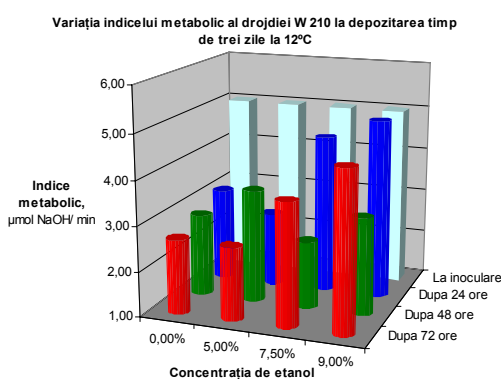


Figura 6.16. Variația indicelui metabolic pentru drojdia W 210 depozitată timp de trei zile la temperatura de 12°C, în tampon acetat 0.1M, pH 4.2

◆ Se poate concluziona astfel că toleranța la etanol este dependentă de tulpină, fapt menționat și în alte lucrări, pentru alte tulpini de drojzii (Smart, 2003).

◆ Având în vedere rezultatele unor cercetări ce menționează un răspuns la stres dependent de faza de creștere în care se află drojdiile (Smart, 2000), au fost testate creșterea în condiții de stres etanolic a celulelor aflate în fază exponențială și respectiv staționară de creștere. Drojdiile testate aflate în fază exponențială și respectiv staționară de creștere nu au prezentat diferențe semnificative în ceea ce privește rezistența la stres etanolic.

◆ Previzionarea performanțelor fermentative a inoculului de drojdie de bere este dificil de realizat întrucât comportamentul drojdiei este determinat de numeroase evenimente metabolice. Prin urmare, în încercarea de evaluare a capacității fermentative au fost dezvoltate multiple teste metabolice. Prezentul studiu a folosit tehnica vitalitricii pentru estimarea vitalității drojdiilor supuse unui stres etanolic, dublat de un stres termic prin depozitarea drojdiilor la temperaturi mai ridicate decât cele recomandate, de refrigerare. Rezultatele obținute prin vitalitricie pot fi utilizate ca o metodă de previzionare a performanțelor fermentative ale celulelor de drojdie care au fost supuse unui stres etanolic.

◆ Setul de rezultate obținute din acest studiu indică impactul negativ asupra viabilității și vitalității drojdiilor la depozitarea în condiții de temperatură mai mari decât cele recomandate, de refrigerare, dublat de exces de etanol. Aceste reduceri de viabilitate și vitalitate se reflectă în performanțele fermentative ale drojdiilor.

Capitolul 7. Localizarea factorului de transcripție Yap1 în condiții de stres etanolic

Studiul de față a avut drept scop analiza activării factorului de transcripție Yap1 în condiții de stres etanolic și identificarea unor gene implicate în răspunsul la stres etanolic la drojdiile de bere.

Celulele de drojzii *Saccharomyces cerevisiae* sunt des utilizate drept organisme- model în cercetări în general și în studiile de reglare a răspunsului la stres oxidativ în special. Factorul de transcripție Yap 1 este necesar răspunsului la stres oxidativ pentru reglarea expresiei genelor ce codifică semnalul proteinelor antioxidante.

Studii recente au arătat că proteina Yap1 își schimbă localizarea ca răspuns la stresul oxidativ (Kuge *et al.*, 1997, Yan *et al.*, 1998), concentrându-se în nucleu (figura 7.1). Această modificare se datorează modificărilor stării redox a două domenii bogate în cisteină (CRD en. *cysteine rich domains*) ce aparțin Yap1 și care împiedică interacțiunea factorului Yap1 cu factorul responsabil de exportul nuclear, Crm1.



Figura 7.1. Localizarea complexului GFP- Yap1 în condiții fiziologice (a) și după expunerea celulei de drojzii la stres oxidativ (b)

Pentru realizarea acestei analize s-a utilizat o construcție formată dintr-o genă Yap1 fuzionată cu o genă-raportor cu un markaj fluorescent (proteina fluorescentă verde, en. GFP- *Green Fluorescent Protein*), construcție ce a fost apoi introdusă în genomul drojdiilor printr-un proces de transformare genetică.

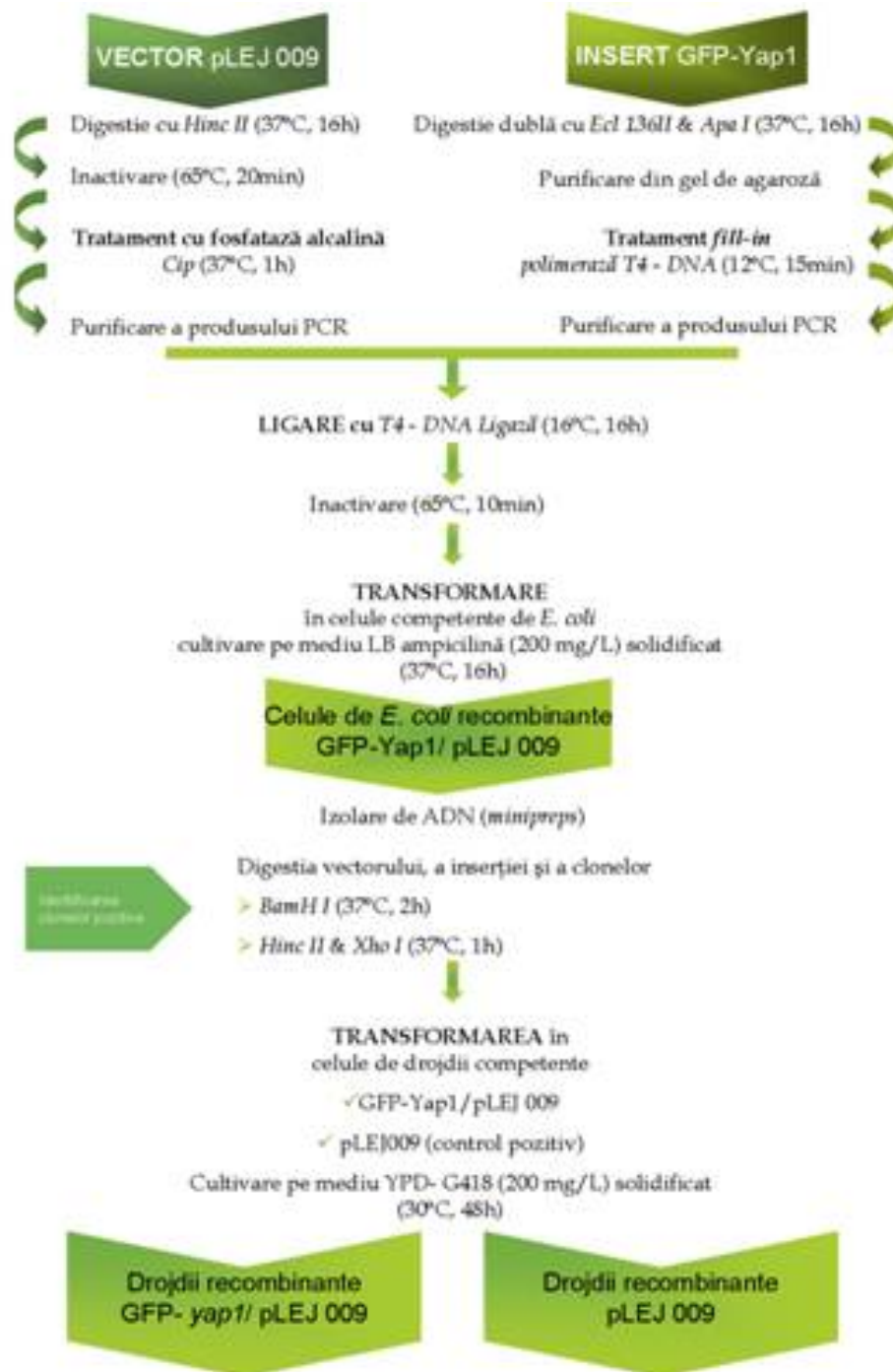
Pentru realizarea studiului *in vivo* al dinamicii localizării factorului de transcripție Yap1 în celule de drojzii supuse stresului etanolic s-a utilizat *tehnica ADN- ului recombinant*. Această tehnică constă în îmbinarea unui fragment de ADN exogen (pasager) cu o moleculă de ADN purtătoare (vector). Vectorul are capacitatea de transfer a unui fragment de ADN pasager într-o specie biologică neînrudită cu cea de la care provine ADN-ul purtător. Ulterior transferului, vectorul se poate replica autonom în genomul celulei gazdă și apoi exprima fenotipic.

Particularizând, pentru realizarea analizei cu GFP într-o primă etapă se realizează un ADN recombinant, la care regiunea de codificare a GFP este alăturată regiunii de codificare a proteinei de studiat (Yap1). Urmează introducerea ADN- ului recombinant în genomul celulelor de studiat, după care acestea vor sintetiza o proteină chimerică, alcătuită din proteina fluorescentă GFP și din proteina de studiat Yap1. Noutatea acestei tehnici constă în faptul că proteina marcată este implicată în activitățile celulare obișnuite.

În acest studiu, în vederea clonării construcției GFP- Yap1 în drojdiile testate s-au parcurs 11 etape, prezentate schematic în figura 7.5.

După obținerea construcției GFP- Yap1, pentru mărirea eficienței amplificării este necesară o etapă intermediară de transformare bacteriană, întrucât transformarea drojdiilor prezintă eficiență extrem de scăzută. Pentru verificarea inserției corecte în celule de *Escherichia coli* transformate s-a extras ADN de la 12 clone de *E. coli*. ADN-ul extras a fost supus unei digestii enzimice cu *Bam*HI, enzimă ce are capacitatea de a tăia în interiorul Yap1, precum și în polilinkerul vectorului *pLEJ009*. Fragmentele obținute în urma acestei digestii ar trebui să aibă dimensiuni de 1.3- 1.8 kpb (în funcție de orientarea inserției, corespunzătoare unei porțiuni din fragmentul de inserat) și

**CERCETĂRI PRIVIND INFLUENȚA UNOR FACTORI DE STRES
ASUPRA DROJDIILOR DE BERE**



un altul, în jur de 7.5- 8 kpb. Din cele 12 colonii testate (C1- C12), numai una prezintă profilul mai sus- menționat, respective clona C5 (figura 7.13).

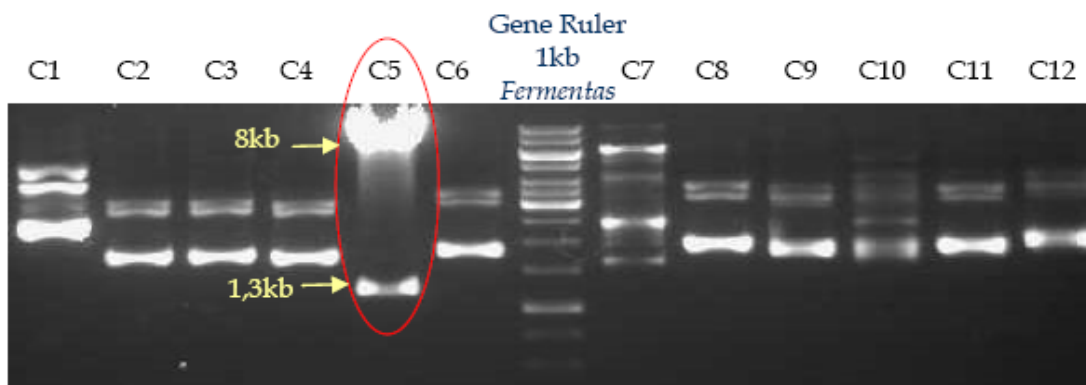


Figura 7.13. Electroforeza în gel a fragmentelor de ADN rezultate în urma digestiei cu *Bam*HI pentru verificarea inserției corecte a construcției GFP- Yap1 în celule de *E.coli*

Amplificarea clonei pozitive 5 s-a realizat prin transformarea celulelor bacteriene competente de *E. coli*. Verificarea amplificării corecte s-a realizat prin extracția ADN-ului clonelor obținute, digestia dublă cu *Hinc*II și *Xho*I și compararea profilurilor cu cel al clonei 5.

Toate cele cinci clone pentru care s-a realizat digestia ADN-ului prezintă profilul clonei pozitive 5 (figura 7.16).

ADN- ul clonei pozitive C5 de *Escherichia coli* a fost utilizat pentru transformarea celulelor de drojii competente obținute prin metoda cu acetat de litiu.

Verificarea transformării drojdiilor s-a realizat prin cultivarea pe mediu selectiv, YPGlu– G418.

Localizarea celulară a factorului de transcripție Yap1 în condiții de stres oxidativ și etanolic a fost studiată folosind microscopia cu fluorescență, ce permite localizarea anumitor componenți, folosind compuși cunoscuți sub denumirea de fluorocromi.

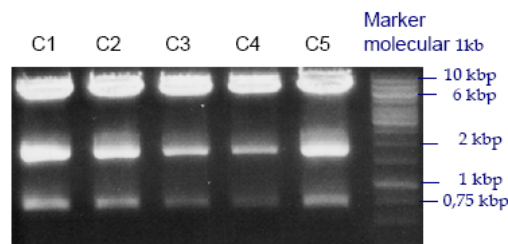


Figura 7.16. Confirmarea clonelor după digestie dublă cu *Hinc*II și *Xho*I

Celulele de drojii transformate au fost cultivate pe mediu YPD- G418 (200mg/L) până în fază exponențială de creștere (OD_{600nm} 0.4). Celulele au fost apoi supuse unui tratament de stres oxidativ sau etanolic, pe perioade și de intensități diferite. Fluorescența emisă de celulele transformate cu GFP au fost observate *in vivo* înainte și după tratamentul cu agentul de stres, utilizând microscopul cu fluorescență, la lungimi de undă cuprinse între 450 și 490nm.

Localizarea *in vivo* a fuziunii chimerice GFP- Yap1 în celule de drojii transformate, supuse unor tratamente de stres oxidativ este prezentată în figura 7.17 și stres etanolic în figura 7.18, tratamentele de stres având intensitate și durate diferite.

În condiții fiziologice (PHY) proteina GFP- Yap1 prezintă o distribuție omogenă în citoplasma celulelor de drojii (figura 7.17 și figura 7.18, PHY). La expunerea în condiții de stress oxidative, precum și etanolic se poate observa o translocare a acestui factor de transcripție la nivelul nucleului. Expunerea la 0.5 mM H_2O_2 timp de 25min sau la 10% etanol, pentru 30min au determinat doar inițierea acestei modificări de localizare. Tratamentele de stres oxidativ și etanolic mai intense, 0.6 mM H_2O_2 pentru 20min și respectiv 15% etanol timp de 15min, au determinat concentrarea evidentă a proteinei Yap1 la nivelul nucleului.

Aceste rezultate indică împreună cu rezultatele care demonstrează capacitatea de activare a factorului de transcripție Yap1 și de către alte tipuri de compuși (Wiatrowski, Carlson, 2003) decât cei cu activitate oxidantă, în acest caz etanolul.

**CERCETĂRI PRIVIND INFLUENȚA UNOR FACTORI DE STRES
ASUPRA DROJDIILOR DE BERE**

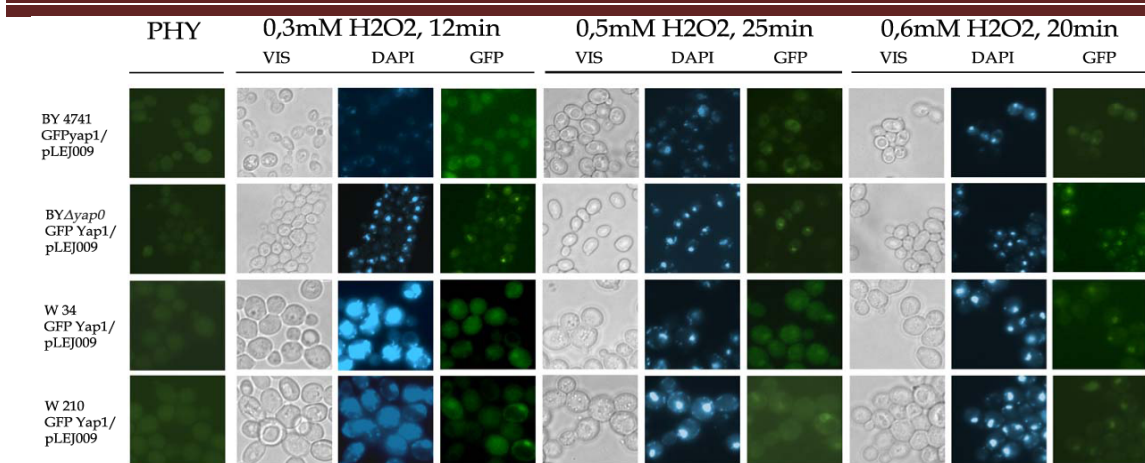


Figura 7.17. Localizarea GFP-Yap1 în condiții de stres etanolic

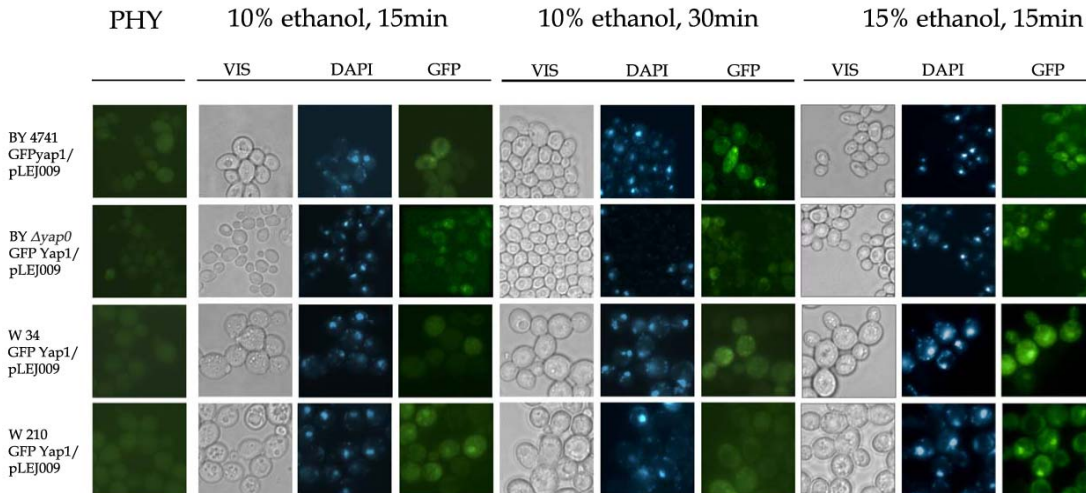


Figura 7.18. Localizarea GFP-Yap1 în condiții de stres oxidativ

Reversibilitatea acumulării nucleare a GFP- Yap1

Rezultatele cercetărilor ce vizau localizarea factorului de transcripție Yap1 în condiții de stres oxidativ indică o reversibilitate a acumulării nucleare, dependentă de adaptarea la stresul oxidativ la care sunt supuse celulele.

Studiile originale realizate de către autoare în condiții de stres etanolic confirmă acest comportament pentru stresul etanolic. Prin varierea intensității și perioadei de aplicare a etanolului ca factor de stres se observă natura tranzitorie a acumulării factorului de transcripție Yap1 în nucleu. Astfel, după adaptarea la stres etanolic, proteina chimerică GFP- Yap1 revine în citoplasmă (figura 7.19), ceea ce sugerează o mișcare de dute- vino a acestei proteine între citoplasmă și nucleu.

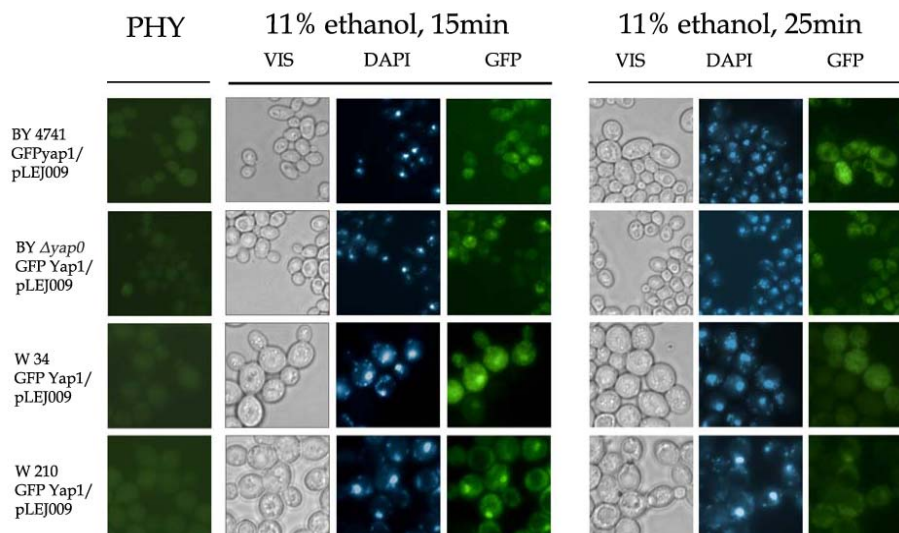


Figura 7.19. Natura tranzitorie a localizării nucleare a proteinei GFP-Yap1 în condiții de stres etanolic

Analiza fenotipică a drojdiilor transformate cu GFP- Yap1 în condiții de stres

Scopul realizării acestei analize a fost de a testa rolul factorului de transcripție Yap1 în toleranța la etanol, și anume dacă o copie suplimentară a acestei proteine poate determina recuperarea fenotipului tulpinii sălbatice. Pentru realizarea analizei fenotipice s-a utilizat tehnica de inoculare în picătură (en. *spotting*) pe mediu selectiv suplimentat cu etanol (10% v/v etanol) sau H₂O₂ (3mM). Aceste condiții de stres au fost alese pentru a fi similare celor folosite la testările de rezistență în condiții de stres pentru tulpinile netransformate.

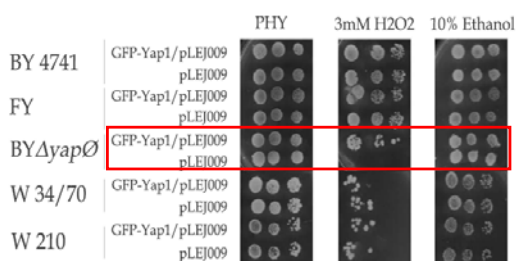


Figura 7.20. Fenotipurile tulpinilor de drojzii transformate, cultivate pe mediu selectiv YPD-G418 (200mg/L)

Analiza fenotipică a acestor recombinanți (figura 7.20) arată că o supra expresie a Yap1 la mutantul BYΔyap0 este suficientă pentru recuperarea rezistenței la stres oxidativ (3mM). Acest rezultat este în concordanță cu informațiile publicate despre regulatorul răspunsului la stres oxidativ, factorul de transcripție Yap1.

La tulpinile industriale însă nu se observă aceeași intervenție a factorului de transcripție Yap1, nici în condiții de stres oxidativ și nici în condiții de stres etanolic.

Concluzii parțiale

- ◆ Prin utilizarea tehnicilor de inginerie genetică s-a realizat includerea în genomurile a două tulpini de drojzii de laborator și a două tulpini de drojzii industriale a factorului de transcripție Yap1 marcat cu proteina fluorescență verde (GFP), ceea ce a avut ca finalitate analiza *in vivo* a localizării acestui factor de transcripție, în condiții de stres oxidativ și stres etanolic.
- ◆ Imaginile obținute prin microscopie cu epifluorescență indică o concentrare evidentă a proteinei Yap1 la nivelul nucleului celulelor supuse unui stres oxidativ cu 0.6 mM H₂O₂ timp de 20min. și respectiv la aplicarea unui stres etanolic cu 15% etanol (v/v) timp de 15min.

Aceste rezultate originale se alătură unor publicații recente în care se demonstrează capacitatea de activare a factorului de transcripție Yap1 și de către alte tipuri de compuși decât cei cu activitate oxidantă, în acest caz etanolul.

- ◆ Prin varierea intensității și perioadei de aplicare a etanolului ca factor de stres se observă natura tranzitorie a acumulării factorului de transcripție Yap1 în nucleu; când intervine adaptarea celulelor la stres etanolic, proteina chimerică GFP- Yap1 revine în citoplasmă.
- ◆ Cercetările din domeniu indică acumularea factorului de transcripție Yap1 la drojdiile de laborator în cazul aplicării stresului oxidativ, însă nu există până în prezent rezultate publicate care să indice același comportament în situația stresului etanolic și pentru drojdii industriale. Astfel, prezentul studiu este original prin realizarea modificării genetice a unor drojdii de bere industriale, precum și prin demonstrarea implicării factorului de transcripție Yap1 în răspunsul celular la stres etanolic.

Capitolul 8. Analiza Northern pentru celule de drojdii supuse stresului etanolic

Tehnica Northern blotting a fost utilizată pentru studiul cineticii expresiei unor gene implicate în stresul oxidativ (*GPH1*, *TPS1* și *SOD1*), pe durata stresului etanolic a patru tulpini de drojdii dintre care trei tulpini de laborator BY 4741 (n), BY 4743 (2n), BY $\Delta yap1$ și o tulpină de drojdie industrială, W 34/70.

Izolarea ARN-ului pentru această analiză a provenit de la culturi de celule de drojdii aflate în fază staționară sau exponențială, supuse unui stres etanolic cu 7.5% etanol (v/v). Pentru evaluarea dinamicii răspunsului la stres etanolic au fost prelevate probe imediat după aplicarea factorului de stres, reprezentând probele pentru condițiile fiziologice, apoi la 30min, 60min și respectiv 120min. după aplicarea agentului de stres.

Verificarea purității și evaluarea stării ARN-ului s-a realizat prin electroforeza în gel a câte 1 μ g ARN. Pentru confirmarea corectitudinii cuantificării și integrității ARN_{total} izolat sunt prezentate înregistrările electroforezelor în figura 8.1.

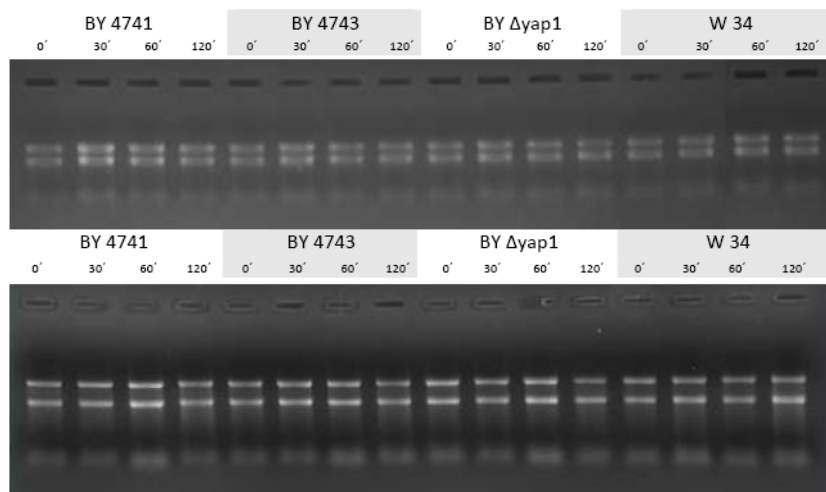
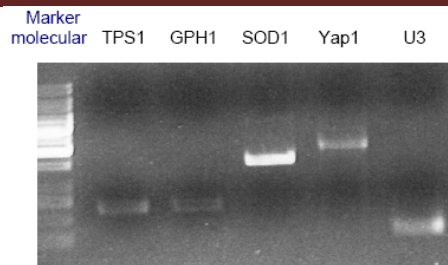


Figura 8.1. Cuantificarea și verificarea integrității probelor de ARN prin electroforeză în gel de agaroză: (a) celule în fază staționară și (b) celule în fază exponențială, stesate cu 7.5% (v/v) etanol

**CERCETĂRI PRIVIND INFLUENȚA UNOR FACTORI DE STRES
ASUPRA DROJDIILOR DE BERE**



Sondele *TPS1*, *SOD1*, *GPH1* și *Yap1* utilizate pentru analiza Northern au fost obținute prin **amplificare PCR**.

Verificarea produșilor de reacție PCR s-a realizat prin electroforeză în gel de agaroză a câte 3μL din fiecare produs de reacție PCR (figura 8.9).

Figura 8.9. Sondele utilizate la analiza Northern



În experimentele realizate ADN-ul a fost marcat folosind metoda primerilor randomizați. În acest scop ADN-ul a fost marcat cu [α - 32 P]-dCTP (*Amersham*) folosind kitul *Megaprime DNA Labelling System* (*Amersham*) conform instrucțiunilor producătorului.

În figura 8.11 sunt prezentate imaginile autoradiografice ale analizei Northern la celule de drojdie aflate în stare exponențială (a) și respectiv fază staționară (b) stresate cu 7.5% (v/v) etanol.

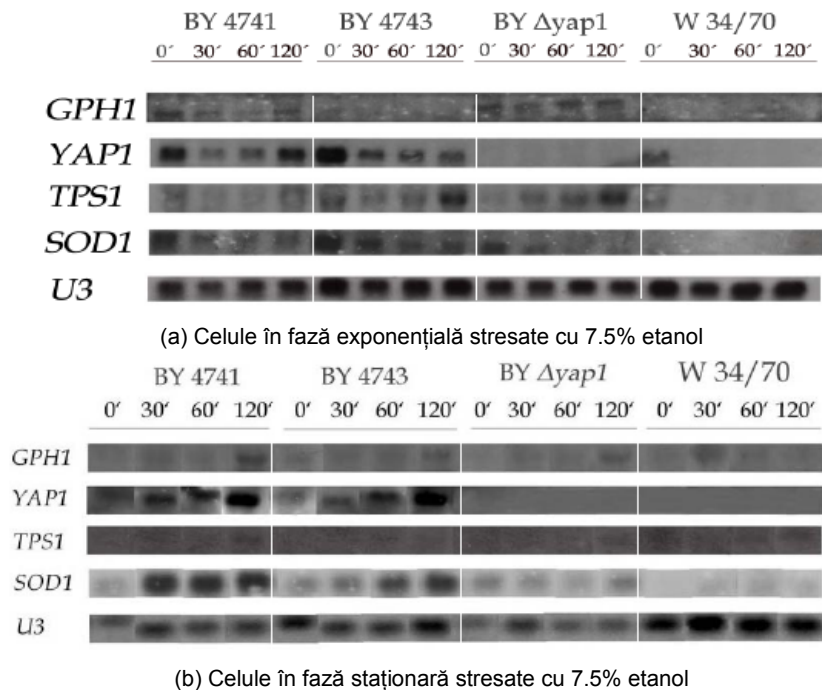


Figura 8.11. Activarea transcripțională a factorului de transcripție *Yap1* și a genelor antioxidante *GPH1*, *TPS1* și *SOD1* ca răspuns la stresul etanolic aplicat celulelor în fază exponențială de creștere (a) și staționară (b)

Din analiza proceselor transcripționale de la celulele drojdiei **BY 4741 (n)** aflate în **fază exponențială** de creștere se observă că *GPH1* este exprimată în condiții fiziologice. În urma stresului etanolic timp de 30min. și 60min. apare o reducere a semnalului transcripțional acestei gene, urmată de o creștere a semnalului la 120min. după aplicarea stresului etanolic. Rezultatele obținute arată un comportament similar al expresiei genei *TPS1*, responsabilă de acțiunea trehalozei ca moleculă protectoare: în lipsa stresului trehaloza este sintetizată, iar în condiții de stres etanolic se observă o reducere drastică a semnalului la 30min și respectiv 60min de stres etanolic, urmată de o revenire a semnalului la 120min. după aplicarea stresului.

CERCETĂRI PRIVIND INFLUENȚA UNOR FACTORI DE STRES ASUPRA DROJDIILOR DE BERE

SOD1 este exprimată și în condiții fiziologice. Ulterior expunerii la 7.5% (v/v) etanol semnalul se reduce pe durata întregului experiment, de două ore.

Același comportament de expresie pentru *Yap1* și genele antioxidante se observă la celulele drojdiei de laborator **BY 4743 (2n)** aflate în **fază exponențială de creștere**.

Analiza fenotipică arată o sensibilitate mărită la etanol a celulelor tulpinii de laborator mutante **BY 4741Δ*yap1*** aflate în **fază exponențială de creștere** comparativ cu celulele aflate în fază staționară de creștere (figura 8.1). Analiza transcripțională arată că la celulele acestei tulpini, aflate în fază exponențială de creștere, apare o creștere gradată a semnalului *GPH1* pe durata celor două ore de stres etanolic. De asemenea, la aplicarea stresului etanolic se observă o inducție constantă a genei responsabile de sinteza trehalozei, care lipsește în condiții fiziologice. O ipoteză ce trebuie confirmată prin analize ulterioare este posibilitatea utilizării trehalozei ca protector în condiții de stres etanolic. Expresia *SOD1* este abolită la această tulpină, rezultat ce este în concordanță cu faptul că *Yap1* este regulatorul principal al acestei gene.

La celulele drojdiei de bere W 34/ 70 aflate în fază exponențială de creștere nu se observă nici o creștere a activității *GPH1* la expunerea la stres etanolic. *GPH1*, *YAP1* și *TPS1* sunt exprimate doar în condiții fiziologice, la expunerea la etanol aceasta fiind compromisă. Nivelul *SOD1* nu a putut fi detectat în condițiile de stres etanolic aplicate. Lipsa activării transcripționale a *YAP1* și a genelor antioxidante *GPH1*, *TPS1* și *SOD1* poate fi o explicație pentru sensibilitatea la stres etanolic a tulpinii industriale comparativ cu drojdiile de laborator testate.

Analiza Northern pentru celulele drojdiei **BY 4741 (n)** în **fază staționară de creștere** arată o inducție constantă a *GPH1* pe durata expunerii la 7.5% etanol timp de două ore. Aceeași inducție poate fi observată și în cazul *TPS1*, dar cu o intensitate mult mai redusă. *YAP1* este exprimată atât în condiții fiziologice, cât și în prezența stresului etanolic: pe durata celor două ore de tratament cu etanol apare o inducție slabă a semnalului pentru *YAP1*, însă nu se poate concluziona că acest factor de transcripție este regulatorul principal în cazul stresului etanolic. Nivelul *SOD1* este redus în condiții fiziologice, dar la 30min de la aplicarea stresului se observă o intensificare a semnalului, care se menține constantă pe durata celor două ore de analiză.

Celulele aflate în **fază staționară de creștere** a drojdiei **BY 4743 (2n)** folosesc glicogenul ca moleculă protectoare împotriva stresului etanolic: semnalul *GPH1*, care indică o sinteză a glicogenului, crește constant pe durata celor 120min. de studiu cinetic. Trehaloza, cealaltă moleculă protectoare testată aici este de asemenea implicată în răspunsul la stres etanolic, dar într-o măsură mult mai redusă: expresia *TPS1* este vizibilă doar după 30min de la aplicarea stresului etanolic. *YAP1* este exprimată în condiții fiziologice, precum și în condiții de stres cu 7.5% etanol. Intensitatea semnalului acestei gene crește constant pe durata celor 120min, comportament similar cu al drojdiei haploide BY 4741. *SOD1* este exprimată în celulele diploide atât în absența, cât și în prezența stresului etanolic, fiind sesizat același tip de expresie ca în cazul *YAP1*. acest rezultat este în concordanță cu teoria care a demonstrat că *YAP1* este un regulator important al genelor antioxidante, precum *SOD1*.

Rezultatele obținute indică o implicare a genelor antioxidante și a factorului de transcripție *YAP1* în răspunsul la stres etanolic al celulelor de drojdie de laborator.

Lipsa expresiei *YAP1* la mutantul **BY 4741 Δ*yap1*** este în concordanță cu faptul că la această tulpină a fost îndepărtat acest factor de transcripție. *GPH1* și *TPS1* nu sunt exprimate în lipsa stresului, însă la aplicarea stresului expresia lor este indusă, la două ore după aplicarea stresului etanolic. *SOD1* este exprimată atât în condiții fiziologice, cât și în prezența stresului etanolic, dar în absența factorului de transcripție *Yap1* se observă o ușoară descreștere după 30min și respectiv 60min, urmată de o creștere a semnalului la 120min după aplicarea stresului etanolic.

De remarcat este faptul că expresia *SOD1*, demonstrată a fi o țintă a factorului de transcripție *Yap1*, nu este complet inhibată, ceea ce indică implicarea unui alt factor de transcripție, ce cooperează cu *Yap1* în inducerea *SOD1*, la celulele aflate în fază staționară de creștere.

Concluzii parțiale

Experimentul original de testare al implicării genelor antioxidante *GPH1*, *TPS1* și *SOD1* în răspunsul la stres etanolic al drojdiilor de laborator comparativ cu o tulpină industrială indică următoarele concluzii:

- ◆ activarea transcripțională a genelor antioxidante și a factorului de transcripție Yap1 este diferită la tulpinile de laborator față de tulpina industrială testată;
- ◆ reglarea expresiei genelor testate se realizează diferit în fază exponențială de creștere comparativ cu faza staționară de creștere pentru toate tulpinile de drojdie testate;
- ◆ rezultatele testelor de stres cu 7.5% (v/v) etanol nu indică o implicare exclusivă a factorului de transcripție Yap1 în răspunsul celular la acest tip de stres pentru nici una dintre tulpinile de drojdie testate.

C. CONCLUZII FINALE

Studiile realizate în cadrul tezei de doctorat au avut ca obiectiv general analiza influenței unor factori de stres asupra drojdiilor de bere. Din cercetările realizate s-au desprins concluzii parțiale prezentate la finalul fiecărui capitol. Pe baza acestor concluzii parțiale s-au formulat următoarele concluzii generale:

■ Studiul prezintă o abordare originală cu impact de cercetare fundamentală și aplicativă a mecanismului de răspuns la stres etanolic a drojdiilor, puțin cunoscut la nivel mondial, prin corelarea acestuia cu răspunsul celular la stres oxidativ, foarte bine documentat în literatura de specialitate pentru drojdiile de laborator.

■ Determinările realizate pentru evidențierea răspunsului la stres etanolic au utilizat două tulpini de drojdie de bere folosite pe scară largă în industria berii, W 34/ 70- drojdie de fermentație inferioară și W 210- drojdie de fermentație superioară. Calitatea certificată a celor două tulpini de drojdie sporește importanța rezultatelor obținute pentru industria berii și oferă posibilitatea aplicării recomandărilor formulate.

■ Prin modelarea matematică a dezvoltării celor două tulpini de drojdie industriale și corelarea concentrației de celule cu densitatea optică s-au obținut ecuațiile dreptelor de regresie ce caracterizează evoluția culturilor și faza exponențială de multiplicare. Prin aplicarea metodei turbidimetrice de evaluare a creșterii celor două tulpini de drojdie este posibilă stabilirea precisă, rapidă și cu efort diminuat a concentrației de celule pentru drojdiile de bere W 34/ 70 și W 210 cultivate în condiții de laborator, pe mediul de cultură YPD, la 27°C și 150rpm.

■ Testele comparative de dezvoltare a drojdiilor pe mediu solid în condiții de stres etanolic indică o rezistență sporită la etanol a drojdiei de fermentație superioară W 210 comparativ cu tulpina de fermentație inferioară W 34/ 70. Acest rezultat confirmă ipoteza dependenței rezistenței la etanol în funcție de caracterele fenotipice ale drojdiei.

■ Analiza fenotipică a rezistenței la etanol în funcție de faza de dezvoltare pentru cele două tulpini de drojdie de bere arată că nu există diferențe semnificative între celulele aflate în fază exponențială și cele în fază staționară de creștere.

■ Testele comparative de dezvoltare a celulelor de drojdie de bere pe mediu solid în condiții de stres oxidativ indică un răspuns diferit față de cultivarea în condiții de stres etanolic: drojdia de fermentație inferioară W 34/70 este mai rezistentă la stres oxidativ comparativ cu drojdia de fermentație superioară W210.

■ Analiza fenotipică a rezistenței la stres oxidativ în funcție de faza de dezvoltare indică o rezistență mai mare la stres a celulelor de drojdie aflate în fază staționară de creștere comparativ cu celulele aflate în fază exponențială de multiplicare.

■ Studiile comparative realizate cu tulpini de drojdie de laborator și industriale nu demonstrează o dependență clară între rezistența la stres etanolic sau oxidativ și ploidia acestora.

CERCETĂRI PRIVIND INFLUENȚA UNOR FACTORI DE STRES ASUPRA DROJDIILOR DE BERE

■ Pentru determinarea viabilității celulelor de drojzii menținute în condiții de stres a fost aplicată o metodă adaptată pe baza modificării indicatorului redox albastru de metilen în mediu alcalin, capabilă să facă distincția între celule vii, stresate și moarte.

■ Rezultatele obținute la determinarea viabilității celulelor de drojzii de bere la depozitarea în condiții de stres etanolic la temperaturi diferite poate fi un indicator al unei perioade maxime de păstrare, în care viabilitatea se reduce cu maxim un ordin de mărime. Pentru drojdia de fermentație inferioară W 34/ 70 durata maximă de păstrare la 6°C este de trei zile în condiții de stres etanolic până la 7.5% (v/v) și de doar două zile pentru varianta cu 9% (v/v) etanol. Păstrarea la 12°C reduce durata maximă de depozitare la două zile pentru concentrații de până la 5% (v/v), o zi la 7.5% (v/v) și la mai puțin de o zi pentru varianta cu 9% (v/v) etanol. Drojdia de fermentație superioară W 210 poate fi păstrată la 6°C în condiții optime de viabilitate timp de trei zile la concentrații de etanol de până la 7.5% (v/v) și de o zi în prezența a 9% (v/v) etanol. Depozitarea la 12°C se poate face trei zile la concentrații de până la 5% (v/v), o zi pentru 7.5% (v/v) și mai puțin de o zi pentru 9% (v/v) etanol.

■ Pentru ambele tulpini de drojzii de bere studiate combinația între stresul etanolic intens produs de 9% (v/v) etanol și temperatura de depozitare de 12°C determină o reducere a viabilității cu mai mult de un ordin de mărime pe zi, ceea ce implică necesitatea utilizării unor cantități de inocul mai mari pentru șarjele ulterioare de fermentație comparativ cu varianta păstrării în condiții fiziologice.

■ Studiul influenței etanolului asupra comportamentului fiziologic al drojdiilor industriale a avut în vedere și diminuarea activității metabolice cauzată de stres, realizându-se teste de vitalitate prin utilizarea vitalitrării la drojzii de bere depozitate în condiții diverse de stres etanolic.

■ Tehnica de analiză prin vitalitrare poate fi utilizată ca o metodă de previzionare a performanțelor fermentative ale celulelor de drojdie care au fost supuse unui stres etanolic.

■ Rezultatele evaluării stresului etanolic asupra viabilității și vitalității drojdiilor de bere studiate indică impactul negativ al depozitării drojdiei de bere în condiții de temperatură mai mari decât cele recomandate, de refrigerare, dublate de exces de etanol. Aceste reduceri de viabilitate și vitalitate se reflectă negativ în performanțele fermentative ale drojdiilor. Utilizarea culturilor starter de drojzii depozitate în condiții de stres conduc la obținerea de șarje de bere de calitate variabilă, cu repercursiuni negative asupra procesului biotehnologic și calității produsului finit.

■ Localizarea *in vivo* a factorului de transcripție Yap1 în condiții de stres etanolic, precum și realizarea modificării genetice a tulpinilor industriale pentru demonstrarea implicării factorului de transcripție Yap1 în răspunsul celular la stres etanolic constituie elemente de originalitate la nivel mondial.

■ Prin varierea intensității și perioadei de aplicare a etanolului ca factor de stres se observă natura tranzitorie a acumulării factorului de transcripție Yap1 în nucleu întrucât la apariția adaptării celulelor la stres etanolic, proteina chimerică GFP- Yap1 revine în citoplasmă.

■ S-a realizat și o amplificare parțială a unei biblioteci de gene special realizată pentru transformarea tulpinilor de drojzii industriale, care nu prezintă auxotrofie pentru aminoacizii utilizați în mod curent pentru selecția recombinanților. Această bibliotecă de gene va putea fi utilizată la transformarea unor drojzii industriale și la studiul implicării specifice a unor gene în răspunsul la stres etanolic.

■ Experimentul original de testare al implicării genelor antioxidante *GPH1*, *TPS1* și *SOD1* și a factorului de transcripție Yap1 în răspunsul la stres etanolic al drojdiilor de laborator comparativ cu o tulpină industrială indică:

- o diferență de activare transcripțională a genelor antioxidante și a factorului de transcripție Yap1 la drojdiile de laborator față de tulpina industrială W 34/ 70;
- reglarea diferită a expresiei genelor testate în fază exponențială comparativ cu faza staționară de creștere pentru toate tulpinile de drojdie testate.

CERCETĂRI PRIVIND INFLUENȚA UNOR FACTORI DE STRES ASUPRA DROJDIILOR DE BERE

Cercetarea realizată, prin natura complexă a temei abordate a condus la stabilirea unor **direcții ulterioare de cercetare**, orientate spre:

- investigarea implicării altor gene antioxidante în răspunsul la stres etanolic al tulpinilor de drojdii de bere industriale;
- identificarea unor potențiali protectori împotriva efectelor negative ale stresului etanolic asupra drojdiilor de bere;
- trecerea de la studiile în condiții de laborator la studii în stație pilot și respectiv condiții industriale privind comportamentul tulpinilor de drojdii de bere în prezența stresului etanolic.

Bibliografie selectivă

1. Alexandre H. *et al.*, 2001, *Global gene expression during short-term ethanol stress in Saccharomyces cerevisiae*, FEBS Letters **498**(1): 98-103
2. Archibald F., 2003, *Oxygen toxicity and the health and survival of eukaryote cells: A new piece is added to the puzzle*, PNAS, **100**(8): 10141- 10143
3. Amberg D.C., 2005, *Methods in Yeast Genetics. Lab Course Manual*, Cold Spring Harbor
4. Azevedo D. *et al.*, 2007, *The Saccharomyces cerevisiae Yap1 and Yap2 transcription factors share a common cadmium-sensing domain*, FEBS Letters, **581**: 187- 195
5. Bamforth C.W., 2001, *pH in Brewing. An Overview*, MBAA TQ, **38**(1):1-9
6. Barnett J. A., Payne R. W., Yarrow D., 2000, *Yeasts: Characteristics and Identification*, Third Edition, Cambridge University Press, UK
7. Belloch C., Orlic S., Barrio E., Querol A., 2008, *Fermentative Stress adaptation of hybrids within the Saccharomyces sensu stricto complex*, International Journal of Food Microbiology, **122**: 188-195
8. Bond U., 2009, *The Genomes of Lager Yeasts*, Advances in Applied Microbiology, **69**: 159-182
9. Boulton C., Quain D., 2006, *Brewing Yeast and Fermentation*, vol. I & II, Blackwell Science Publishing House
10. Briggs D.E., Boulton C. A., Brookes P. A., Stevens R., 2004, *Brewing Science and Practice*, CRC Press, Woodhead Publishing Limited
11. Burke D. *et al.*, 2000, *Methods in Yeast Genetics. A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
12. Chandler M. *et al.*, 2004, *A genomic approach to defining the ethanol stress response in the yeast Saccharomyces cerevisiae*, Annals of Microbiology, **54**(4): 427- 454
13. Du X., Takagi H., 2007, *N- Acetyltransferase Mpr1 confers ethanol tolerance on Saccharomyces cerevisiae by reducing reactive oxygen species*, Appl. Microbiol. Biotechnol, **75**: 1343- 1351
14. Dunn B., Sherlock G, 2008, *Reconstruction of the genome origins and evolution of the hybrid lager yeast Saccharomyces pastorianus*, Genome Research, **18**(10): 1610-1623
15. Folch- Mallol J.L., Garray- Arroyo A., Lledias F., Covarrubias Robles A., 2004, *La respuesta a estres en la levadura Saccharomyces cerevisiae*, Revista Latinoamericana de Microbiologia, **46**(1-2): 24- 46
16. Furukawa K., Kitano H., Mizoguchi H., Hara S., 2004, *Effect of Cellular Inositol Content on ethanol Tolerance of saccharomyces cerevisiae in Sake Brewing*, Journal of Bioscience and Bioengineering, **98**(2):107-113
17. Garay- Arroyo A., Covarrubias A., Clark I., nino I., Gosset G., Martinez A., 2004, *Response to different environmental stress conditions of industrial and laboratory Saccharomyces cerevisiae strains*, Appl. Microbiol. Biotechnol., **63**: 734- 741

18. Gibson B. R., Lawrence S. J., Boulton C.A., Box W.G., Graham N. S., Linforth R.S.T., Smart K., 2008, *The oxidative stress response of a lager brewing yeast strain during industrial propagation and fermentation*, FEMS Yeast Research, **8**:574-585
19. Gibson B. R., Lawrence S. J., Leclaire J. P. R., Powell C. D., Smart K., 2007, *Yeast response to stresses associated with industrial brewery handling*, FEMS Microbiological Review, **31**: 535- 569
20. Gietz R.D., Woods R.A., 2002, *Transformation of yeast by the LiAc/SS carrier DNA/PEG method*, Methods in Enzymology **350**: 87- 96
21. Hornsey I., 2003, *A History of Beer and Brewing*, Royal Society of Chemistry Paperbacks, Cambridge, UK
22. Hu X. H. et al., 2007, *Genetic Dissection of Ethanol Tolerance in the Budding Yeast Saccharomyces cerevisiae*, Genetics, **175**(3): 1479–1487
23. James T.C., Campbell S., Donnelly D, Bond U., 2003, *Transcription Profile of Brewery Yeast Under Fermentation Conditions*, Journal of Applied Microbiology, **94**: 432- 448
24. Jauert P., Jensen L.E., Kirkpatrick D.T., 2005, *A novel yeast genomic DNA library on a geneticin- resistance vector*, Yeast, **22**: 653-657
25. Karp G., 2008, *Cell and Molecular Biology. Concepts and Experiments*, Fifth Edition, John Wiley and Sons Publishing House
26. Kubota S. et al., 2004, *Effect of ethanol on Cell Growth of Budding Yeast: Genes that are important for cell growth in the presence of ethanol*, Biosci. Biotechnol. Biochem., **68**(4): 968-972
27. Kuge S. et al., 1997, *Regulation of yap-1 nuclear localization in response to oxidative stress*, EMBO Journal, **16**:1710- 1720
28. Lachance Marc- Andre, 2006, *Yeast Biodiversity: How Many and How Much?* în *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*, editors Rosa C., Peter G., Springer Publishing House
29. Lodolo E. J., Kock J. L. F., Axcell B. C., Brooks M., 2008, *The yeast Saccharomyces cerevisiae - the main character in beer brewing*, FEMS Yeast Research, **8**(7): 1018-1036
30. Medawar W., Strehaiano P., Delia M., 2003, *Yeast growth: lag phase modelling in alcoholic media*, Food Microbiology **20**:527–532
31. Menezes R. A. et al., 2008, *Contribution of Yap1 towards Saccharomyces cerevisiae adaptation to arsenic mediated oxidative stress*, *Biochemical Journal*, **414**(2):301-311
32. Nakao Y. et al., 2009, *Genome Sequence of the Lager Brewing Yeast, an Interspecies Hybrid*, *DNA Research*, **16** (2) : 115 - 129
33. Nevitt R., Rodrigues- Pousada C., 2006, *The stress response in the budding yeast*. In *Heat Shock Proteins in Biology and Medicine*, Radons J., Multhoff G. (ed.) 39-58
34. Pizarro F. et al., 2007, *A System Biology Perspective of Wine Fermentation*, Yeast, **24**:977-991
35. Rodrigues- Pousada C. et al., 2006, *The stress response in the budding yeast*,
36. Rodrigues- Pousada C. et al., 2004, *Role of the Yap family of b-ZIP transcription factors*
37. Rodrigues P. D., Barros A. A., Rodrigues J. A., Ferreira A.A., Gonçalves C., Hammond J.R.M., *Vitaltitration: A New Method for Assessment of Yeast Vitality*, MBAA TQ, **41**(3):277-281
38. Sambrook J., Russell, 2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, volume 1, 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
39. Scandalios J.G., 2005, *Oxidative Stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses*, Brazilian Journal of Medical and Biological Research, **38**:995-1014
40. Smart K., 2003, *Brewing Yeast Fermentation Performance*, 2nd ed., Blackwell Publishing House

41. Smart K., 2007, *Brewing yeast genomes and genome-wide expression and proteome profiling during fermentation*, *Yeast* **24**: 993-1013
42. Stoica I., Vassu T., Săsărman E., 2002, *Biologia și taxonomia moleculară a microorganismelor. Colecția de culturi microbiene*, Arvin Press, București
43. Okazaki S., Tachibana T., Naganuma A., Mano N., Kuge S., 2007, *Multistep Disulfide Bond Formation in Yap1 Is Required for Sensing and Transduction of H₂O₂ Stress Signal*, *Molecular Cell*, **27**:657-688
44. Vassu T., Stoica I., Csutak O., Mușat F., 2001, *Genetica microorganismelor și inginerie genetică microbială*, Editura Petron, București
45. van Voorst F. *et al.*, 2006, *Genome- wide identification of genes required for growth of Saccharomyces cerevisiae under ethanol stress*, *Yeast*, **23**: 351-359
46. Wiatrowski H., Carlson M., 2003, *Yap1 Accumulates in the Nucleus in Response to Carbon Stress in Saccharomyces cerevisiae*, *Eukaryotic Cell*, **2**(1): 19–26

Rezultatele științifice

Studii publicate în volumele unor manifestări științifice internaționale din străinătate și din țară

Bleoancă (Ionita) I., Menezes R., Rodrigues- Pousada C., 2009, *Relationship between oxidative and ethanol stress in industrial strains of brewing yeast*, 27th International Specialized Symposium on Yeasts: Pasteur's Legacy: Yeasts for health and biotechnologies, Institutul Pasteur, Paris, Franța, <http://www.pasteur.fr/infosci/conf/sb/ISSY27>

Bleoancă (Ionita) I., 2007, *Stress Adaptation Mechanisms for Microbial Psychrophiles*, 2nd International Conference on Polar Research, Bucharest – Romania, November 15-16, 2007, Book of Abstracts, vol. II, SIII-2, ISSN 1843-469X

Bleoancă (Ionita) I., Bahrim G., 2007, *Răspunsul microorganismelor la stresul indus de modificările mediului*, International Symposium on Polar Scientific Research, Bucharest, Romania, November 15-16, 2006, Book of Abstracts, vol. I, SI-10, ISSN 1843-469X

Articole/studii publicate în reviste din țară recunoscute de CNCSIS

Bahrim G., **Bleoancă (Ionita) I.**, 2007, *Fungic biodyes, natural additives with physiological effects on bread yeast's multiplication and stability*, *Milling and Pastry Magazine*, 18 (4), IV, 108-118, ISSN 1222-1120

Bahrim G., Geanta R., **Bleoancă (Ionita) I.**, 2007, *The Metabolic Response of Yeast as a Model Organism to Epicoccum nigrum Pigments' Antioxidant Activity*, *Innovative Romanian Food Biotechnology- Galati (Romania)*, 1(1), 12- 22, <http://www.bioaliment.ugal.ro/ejournal.htm>

Articol sub formă de manuscris la data susținerii tezei

Bleoancă I., Menezes R., Rodrigues- Pousada C., *Relationship between oxidative and ethanol stress in industrial strains of brewing yeast* (pentru o revistă de circulație internațională, cotate ISI)

Anexa 5 Colaborări internaționale cu laboratoare de specialitate

Pe durata stagiului doctoral autoarea a stabilit contacte de cercetare cu trei laboratoare internaționale de specialitate, menționate în continuare. Autoarea mulțumește reprezentanților acestor laboratoare pentru sprijinul acordat la realizarea tezei de doctorat.

Professor Claudina RODRIGUES- POUSADA

Department of Genomics and Stress,
Instituto de Tecnologia Química e Biológica,
Universidade Nova de Lisboa, **Portugalia**



Professor David T. KIRKPATRICK

Department of Genetics, Cell Biology, and Development,
University of Minnesota, Minneapolis,
Statele Unite ale Americii



Dr. rer. nat. Reiner SPRINGER

Center of Life and Food Sciences Weihenstephan,
Technischen Universitaet, Muenchen, **Germania**



Pe perioada stagiului doctoral autoarea a beneficiat de două stagii de specializare de câte trei luni, în domeniul Biologiei moleculare, desfășurate în laboratorul *Genomics and Stress* din cadrul Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Universidade Nova de Lisboa, Portugalia. Unul din aceste stagii a fost finanțat de *Federation of European Biochemical Societies* (FEBS) prin câștigarea unei burse tip Collaborative Experimental Scholarships for Central & Eastern Europe.

