



<b>Evento</b>	Salão UFRGS 2014: SIC - XXVI SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS
<b>Ano</b>	2014
<b>Local</b>	Porto Alegre
<b>Título</b>	Análise de vitalidade em cepas de leveduras cervejeiras por meio da expressão dos genes PMA1, UBI4 e HSP30
<b>Autor</b>	MARCELO MENONCIN
<b>Orientador</b>	DIEGO BONATTO

O estado metabólico das leveduras influencia diretamente no desempenho fermentativo durante a produção de cervejas e, por consequência, na qualidade do produto final. Todas as células que absorvem hexoses do mosto cervejeiro e bombeiam prótons para o meio extracelular com eficiência, além de promover a biossíntese de glicogênio e trealose, refletem um estado de vitalidade desejável para a fermentação cervejeira, resultando em uma boa taxa de atenuação. No entanto, as células que demonstram sinais de estresse devido a fatores externos, como a depleção de nutrientes ou exposição a concentrações elevadas de etanol, poderão não apresentar o mesmo desempenho, resultando em uma baixa vitalidade que resultará em uma cerveja mal atenuada e com metabólitos secundários indesejáveis. Há muitos métodos capazes de inferir a vitalidade da biomassa de leveduras a ser inoculada, como o teste de acidificação do meio, a incorporação do iodeto de propídeo, quantificação de trealose, análise espectrofluorimétrica, entre outros. No entanto, esses testes podem gerar resultados falso-positivos apresentando dados que não refletem a realidade fisiológica das leveduras. Com o objetivo de propor um teste de vitalidade que, combinado a outros métodos, permita observar de maneira mais acurada diferentes cepas de leveduras, foram analisadas a expressão de três genes: *PMA1*, *UBI4* e *HSP30*. *PMA1* codifica para uma proteína transmembrana que regula o pH intracelular liberando prótons para o meio extracelular. *UBI4* é essencial para a resposta celular ao estresse, codificando para uma ubiquitina que ao se ligar a proteínas, marca-as para degradação pela via proteolítica. *HSP30* codifica para uma proteína de choque térmico e também é expresso em resposta ao estresse, nas condições de choque térmico, altas concentrações de etanol e limitação de nutrientes, e regula negativamente a expressão gênica de *PMA1*. Para avaliar o uso dos três genes anteriormente citados como biomarcadores, foram usadas as leveduras comerciais WLP500 e WLP530, das cervejarias trapistas Chimay e Westmalle, respectivamente e WLP550 da cervejaria LaChoffe. Todas as cepas foram inoculadas em meio líquido YEDP e incubadas a 25 °C (condição normal de crescimento) e a 37 °C (condição de estresse térmico), 180 rpm, em incubadora com agitação. Após 48 h, uma alíquota de 2 mL foi retirada da cultura a 25 °C e procedeu-se com a extração de RNA total da mesma. Para tanto, a alíquota foi centrifugada (1000 × g por 10 minutos), seguido da extração do RNA total usando o kit illustra RNAspin mini (GE healthcare life sciences). Em seguida, as culturas foram incubadas em estufa a 37 °C por mais 48 h com o objetivo de induzir o envelhecimento celular por estresse térmico e depleção de nutrientes. Após, foram efetuadas extrações de RNA referentes à condição de estresse. A expressão de *PMA1*, *UBI4* e *HSP30* em ambas as condições de crescimento acima foram analisadas pela técnica de reação em cadeia da polimerase acoplada à transcrição reversa (RT-PCR). Os iniciadores para amplificação dos genes *PMA1*, *UBI4* e *HSP30*, além de *ACT1* (usado como controle positivo) foram desenhados com o programa Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>) a partir do genoma da levedura referência S288c. As amostras amplificadas de cDNA foram avaliadas em gel de agarose 0,8 (p/v) em tampão tris-acetato-EDTA (TAE) 1×. Os resultados obtidos até o momento demonstram que os *primers* utilizados foram capazes de amplificar os cDNAs relativos a *PMA1*, *UBI4* e *HSP30*. A análise de bandas, por sua vez, demonstrou que os genes mencionados possuem expressão diferencial aparente para as condições de crescimento testadas, possibilitando inferir se as células estão passando por um momento de estresse ou se estão em um estado metabólico desejável para a fermentação.