



REVISTA CIENTÍFICA DA UMC



ANÁLISE GENÔMICA DE ISOLADO DE UMA LEVEDURA SELVAGEM OBTIDA A PARTIR DA PLANTA *Sarcocornia ambigua*

Letícia Rodrigues Gonçalves Silva¹, Yara Natércia Lima Faustino de Maria², David Aciole Barbosa³,
Regina Costa de Oliveira⁴, Fabiano Bezerra Menegidio⁵, Luiz R. Nunes⁶, Daniela Leite Jabes⁷

1. Estudante de Biomedicina; e-mail: leticiargs98@gmail.com;
2. Doutoranda em Biotecnologia na Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: yaralima07@gmail.com;
3. Doutor em Biotecnologia pela Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: aciole.d@gmail.com;
4. Coordenadora do PPG em Biotecnologia da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: reginaco@umc.br;
5. Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; fabianomenegidio@umc.br;
6. Professor orientador do PPG em Biotecnologia da Universidade de Mogi das Cruzes; nunes1212@gmail.com;
7. Professora da Universidade de Mogi das Cruzes; danielaljabes@umc.br.

Área do Conhecimento: Genética Molecular e de Microrganismos

Palavras-Chave: *Saccharomyces*; Cerveja, NGS.

INTRODUÇÃO

A cerveja é a bebida alcoólica mais consumida em todo o mundo. É tradicionalmente produzida a partir de quatro ingredientes-chave: cereais maltados (cevada ou outro), água, lúpulo e levedura. Durante a fermentação, as células da levedura convertem açúcares derivados do cereal em etanol e CO₂. Ao mesmo tempo, são produzidos numerosos metabólitos secundários que influenciam o aroma e o sabor da cerveja. A variação desses metabólitos em é o que permite que a levedura influencie tão exclusivamente no sabor da cerveja (WALKER; STEWART, 2016; MAICAS, 2020). Comumente, dois tipos de levedura são utilizados na fabricação de cervejas: *Saccharomyces cerevisiae* (cervejas *Ales*, de alta fermentação) e *Saccharomyces pastorianus* (cervejas *Lagers*, de baixa fermentação) (MAICAS, 2020). No entanto, o mercado cervejeiro vem enfrentando uma demanda por mudanças devido ao perfil dos consumidores, cada vez mais interessados em novos sabores e combinações, abrindo caminho para a identificação e/ou melhoramento de leveduras para resolver desafios específicos, especialmente aqueles associados à sustentabilidade, aromatização e conteúdo alcoólico diferenciado (PERIS, 2012). Portanto, o presente trabalho propõe-se realizar uma análise genômica de uma levedura selvagem obtida da planta *Sarcocornia ambigua* a fim de ampliar o conhecimento acerca desse microrganismo, com vistas a uma possível aplicação no mercado cervejeiro.

OBJETIVOS

Realizar uma análise genômica de uma levedura selvagem isolada da *Sarcocornia ambigua*, crescida em um banco de areia (Palhoça-SC).

METODOLOGIA

Foram utilizadas culturas do isolado da levedura selvagem obtidas diretamente da planta *Sarcocornia ambigua*, coletadas em um banco de areia da cidade de Palhoça - Santa Catarina, cultivadas em YPD (*Yeast Peptone Dextrose*) modificado a 30°C, por 12 h (DYMOND, 2013). Inicialmente, foi realizado PCR (*Polymerase Chain Reaction*) de colônia a fim de amplificar parte da região do DNA ribossômico (incluindo as regiões ITS 1 e ITS2) da levedura selvagem e de controles de *Saccharomyces cerevisiae*. Foi realizado BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) para confirmar os dados gerados. Em seguida, a levedura selvagem foi submetida a protocolo de fermentação (quadruplicata), em meio DME (*Dry Malt Extract*). A levedura cervejeira S33 foi usada como controle do experimento. Os valores de Brix foram medidos diariamente por 7 dias. Em seguida, o protocolo para análise de ploidia por citometria de fluxo foi realizado de acordo com o descrito por Delobel & Tesniere (2014), utilizando colônias isoladas da levedura de interesse e das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* S288C (controle haploide) (MANGADO *et al.*, 2018) e EC1118 (controle diploide) (MANGADO *et al.*, 2018). Uma análise de Bioinformática usando a ferramenta *GenomeScope2* (VURTURE *et al.*, 2017) também foi realizada para validar os dados gerados pela citometria. Por fim, foi realizada a extração de DNA da levedura selvagem segundo as especificações do *Kit DNeasy Blood & Tissue* (QIAGEN). A amostra então foi purificada utilizando-se do *Kit GeneJET Genomic DNA Purification Kit* (*Thermo Scientific*) e visualizada por meio de eletroforese em gel de agarose a 2%, corados com brometo de etídeo. Por fim, encaminhada para a empresa chinesa BGI, que realizou o preparo de bibliotecas e sequenciamento de nova geração (NGS). Análises posteriores de Bioinformática foram realizadas na montagem e anotação funcional do rascunho do genoma sequenciado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados obtidos com o PCR de colônia e alinhamento BLAST indicaram um tamanho de *amplicon* compatível com o esperado para o gênero *Saccharomyces*, de 800 pb. A partir desse resultado, a levedura foi utilizada em experimentos de fermentação. Como resultado, a levedura alvo do nosso estudo apresentou valores de Brix similares aqueles observados quando a levedura cervejeira S33 é utilizada na fermentação. Dessa forma, acreditamos que a levedura isolada apresenta um elevado potencial comercial, visto que é a escala Brix é usada para um estimar a quantidade de açúcares fermentáveis, que potencialmente serão convertidos em álcool, por ser um indicativo de velocidade fermentativa, período de fermentação e teor alcoólico, fatores de grande relevância na produção da cerveja (SCARANO *et al.*, 2018). A partir das análises realizadas no citômetro de fluxo FACSCALIBUR 4C (BD®), de acordo com o descrito por Delobel P. e colaboradores (2014), comparamos os resultados obtidos pelo software *FlowJo* entre a levedura selvagem, o controle diploide

EC1118 e controle haploide S288C e foi possível constatar que a levedura selvagem obtida da *Salicornia* é tetraploide. Ademais, a fim de validar os dados obtidos a partir da análise por citometria de fluxo, aplicamos a ferramenta de bioinformática *GenomeScope2* (VURTURE *et al.*, 2017), que também gerou como resultado um genoma tetraploide (probabilidade de erro=0,445. O processo de sequenciamento dos dados gerou 24.026776 M leituras brutas. Após a seleção e corte de qualidade, ficamos com um total de 16.034314 M leituras (95,65% das leituras brutas). Por fim, os resultados do sequenciamento NGS, após a montagem do genoma e anotação funcional, foram condizentes com uma levedura da espécie *Saccharomyces cerevisiae*.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o presente projeto foi possível inferir que o isolado selvagem obtido de planta denominada *Sarcocornia ambigua* pertence ao gênero *Saccharomyces*, espécie *Saccharomyces cerevisiae*. Além disso, a levedura selvagem possui propriedades de fermentação que, em um primeiro momento, parecem ser muito similares àquelas observadas na fermentação da levedura S33, comumente utilizada na indústria cervejeira. Foi possível concluir, também, através de análises *in vivo* e *in silico*, que o isolado é tetraploide, característica que pode favorecer a expressão de genes favoráveis a qualidade da cerveja e resistência aos processos aos quais a levedura é submetida na indústria.

REFERÊNCIAS

- DELOBEL, Pierre; TESNIERE, Catherine. A simple FCM method to avoid misinterpretation in *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle assessment between G0 and sub-G1. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. e84645, 2014.
- DYMOND, Jessica S. *Saccharomyces cerevisiae* growth media. In: **Methods in Enzymology**. Academic Press, 2013. p. 191-204.
- MAICAS, Sergi. The role of yeasts in fermentation processes. **Microorganisms**, v. 8, n. 8, p. 1142, 2020.
- MANGADO, Ana *et al.* Evolution of a yeast with industrial background under winemaking conditions leads to diploidization and chromosomal copy number variation. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1816, 2018.
- PERIS, David *et al.* Comparative genomics among *Saccharomyces cerevisiae* x *Saccharomyces kudriavzevii* natural hybrid strains isolated from wine and beer reveals different origins. **BMC genomics**, v. 13, n. 1, p. 1-14, 2012.
- SCARANO, S. *et al.* Determination of fermentable sugars in beer mosto by gold nanoparticles@ polydopamine: a layer-by-layer approach for localized surface plasmon resonance measurements at fixed wavelength. **Talanta**, v. 183, p. 24-32, 2018.
- VURTURE, Gregory W. *et al.* GenomeScope: fast reference-free genome profiling from short reads. **Bioinformatics**, v. 33, n. 14, p. 2202-2204, 2017.

WALKER, Graeme M.; STEWART, Graham G. *Saccharomyces cerevisiae* in the production of fermented beverages. **Beverages**, v. 2, n. 4, p. 30, 2016.