



ANÁLISE GENÔMICA DE UMA LEVEDURA OBTIDA PARTIR DE UM APIÁRIO

Ana Carolina de Oliveira Ramos Siqueira¹; Yara Natércia Lima Faustino de Maria², David Aciole Barbosa³, Fabiano Bezerra Menegidio⁴, Regina Costa de Oliveira⁵; Daniela Leite Jabes⁶, Luiz R. Nunes⁷

1. Estudante do curso de Ciências Biológicas; e-mail: ana.carolors@gmail.com
2. Doutoranda em Biotecnologia da 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. Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: fabianomenegidio@umc.br;
5. Coordenadora do PPG em Biotecnologia da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: reginaco@umc.br;
6. Professora da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: danielajabes@umc.br.
7. Professor orientador do PPG em Biotecnologia da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail nunes1212@gmail.com.

Área de Conhecimento: Genética Molecular e de Microrganismos.

Palavras-Chave: Apiário; Cerveja, Gastronomia

INTRODUÇÃO

A cerveja é uma das bebidas mais consumidas do mundo, assim como umas das mais antigas, evidenciando sua importância econômica, cultural e histórica (GAROFALO *et al.*, 2015). Portanto, a busca por cervejas de alta qualidade, com características exclusivas e diferenciadas, vem aumentando nos últimos anos. Dessa forma, algumas estratégias vêm sendo implementadas para melhorar a produção, bem como as características sensoriais do produto, e tornaram-se prioridade para a indústria cervejeira (MORADO, 2009). Tentativas de obtenção de produtos com características sensoriais mais complexas têm levado cervejeiros a utilizarem leveduras não convencionais, ou seja, não *Saccharomyces*, que possam oferecer um novo leque de perspectivas. Além do uso de *Brettanomyces* para produção de cerveja azedas, outras espécies estão sendo identificadas por apresentarem características metabólicas diferentes, que incluem a produção de ésteres frutados (BASSO *et al.*, 2016). Nesse sentido, o trabalho aqui proposto visa uma análise genômica de uma levedura selvagem obtida de um apiário com vistas a sua utilização na indústria cervejeira.

OBJETIVOS

Realizar uma análise genômica da levedura isolada de um apiário localizado na cidade de Porto Feliz-SP.

METODOLOGIA

A levedura obtida a partir do apiário foi cultivada em placa de Petri com meio YPD (*Yeast Peptone Dextrose*) modificado no laboratório de Genômica Estrutural e Funcional de Mogi das

Cruzes, e mantida na estufa a 30°C por 12 h. Inicialmente, foi realizado um teste de ploidia da levedura isolada, juntamente com dois controles do gênero *Saccharomyces*: S288C (haploide) e EC1118 (diploide). Os testes foram realizados em duplicata e a análise foi realizada no citômetro de fluxo BD FACSCALIBUR 4C (BD®). Os resultados gerados foram analisados pelo *FlowJo*. Após a confirmação da ploidia da levedura selvagem, um PCR (*Polymerase Chain Reaction*) de colônia foi realizado a fim de amplificar as regiões ITS1 e ITS2 (*Internal transcribed spacer*). Adicionalmente, foi utilizada a ferramenta BLAST para validar os achados do ensaio de PCR. Adicionalmente, o isolado foi submetido a fermentação em meio DME (*Dry Malt Extract*). Posteriormente, esse material permaneceu por 7 dias a 22-25°C, sem aeração, com monitoramento diário de Brix. Os produtos da fermentação foram resfriados entre 2 e 4 graus por 14 dias (maturação). Por fim, foi realizado o sequenciamento NGS (*Next Generation Sequence*) da levedura isolada. Análises posteriores de Bioinformática foram realizadas na montagem e anotação funcional do rascunho do genoma sequenciado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos durante o teste de ploidia sugeriram que a levedura selvagem apresenta um genoma haploide. Os picos G1 e G2 gerados para o isolado foram comparados com o que se sabe sobre o conteúdo gênico dos controles, previamente identificados na literatura como haploide (S288c) e diploide (EC1118) (MANGADO *et al.*, 2018). Posteriormente, foi realizado um PCR de colônia, já que é possível identificar e diferenciar gêneros de leveduras a partir dos tamanhos dos *amplicons* gerados a partir de *primers* desenhados para regiões do DNA ribossomal. Como resultado, obtivemos uma banda de 800 pb para o controle (*Saccharomyces*) e 600 pb, para a levedura selvagem. Os dados obtidos indicam que a levedura foco deste estudo parece pertencer ao gênero *Wickerhamomyces*. Esses dados foram validados a partir de testes usando a ferramenta BLAST. O experimento de fermentação foi conduzido de maneira a verificar se a levedura do isolado do apiário apresenta potencial para ser usada na indústria cervejeira. Como resultado, o isolado não apresenta características fermentativas similares às leveduras comerciais, pelo menos quando usada de maneira isolada. Por fim, para identificar a espécie do isolado, foi realizado um sequenciamento NGS pela empresa chinesa BGI e, após análises de Bioinformática, a levedura foi identificada como *Wickerhamomyces anomalus*.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos ensaios conduzidos, a saber, citometria de fluxo, PCR de colônia, ensaios de fermentação e sequenciamento NGS, pode-se concluir que a levedura selvagem isolada neste trabalho é uma *Wickerhamomyces anomalus* haploide.

REFERÊNCIAS

BASSO, Rafael Felipe; ALCARDE, André Ricardo; PORTUGAL, Caure Barbosa. Could non-*Saccharomyces* yeasts contribute on innovative brewing fermentations? Food Research International, v. 86, p. 112-120, 2016

GAROFALO, Cristiana *et al.* The occurrence of beer spoilage lactic acid bacteria in craft beer production. Journal of food science, v. 80, n. 12, p. M2845-M2852, 2015.

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.

MORADO, R. Larousse da Cerveja. São Paulo, 2009.