

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL - UFRGS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE - ICBS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA MOLECULAR PARA
DETECÇÃO DE LEVEDURAS DOS GÊNEROS *Brettanomyces* E *Dekkera*
EM VINHOS TINTOS FINOS**

TESE DE DOUTORADO

TAÍS LETÍCIA BERNARDI

Orientador: Dra. Patrícia Valente

Coorientador: Dr. Gildo Almeida da Silva

Março, 2011.

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA MOLECULAR PARA
DETECÇÃO DE LEVEDURAS DOS GÊNEROS *Brettanomyces* E *Dekkera*
EM VINHOS TINTOS FINOS**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente (Área de Concentração: Microbiologia Industrial), da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do Grau de Doutor em Microbiologia.

TAÍS LETÍCIA BERNARDI

Mestre em Ciências /UFLA

Orientador: Dra. Patrícia Valente

Coorientador: Dr. Gildo Almeida da Silva

Catálogo na Publicação
UFRGS/ICBS/Biblioteca Setorial

B523d Bernardi, Taís Letícia

Desenvolvimento de metodologia molecular para detecção de leveduras dos gêneros *Brettanomyces* e *Dekkera* em vinhos tintos finos / Taís Letícia Bernardi – 2011.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Porto Alegre, BR-RS, 2011.

Orientação: Prof. Patrícia Valente da Silva

Co-orientação: Prof. Gildo Almeida da Silva

1. Leveduras 2. *Saccharomyces cerevisiae* 3. *Brettanomyces* 4. *Dekkera* 5. Vinho tinto I. Silva, Patrícia Valente da, orient. II. Silva, Gildo Almeida da, co-orient. III. Título.

CDU 579.2 (043)

TAÍS LETÍCIA BERNARDI
BACHAREL EM QUÍMICA DE ALIMENTOS
UFPEL

TESE

Submetida como parte dos requisitos
Para obtenção do Grau de

DOUTOR EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovada em: 25/03 2011
Pela Banca Examinadora



PATRICIA VALENTE DA SILVA
Orientadora -UFRGS

Homologado em: 23/05/ 2011
Por:



JOSÉ CARLOS GERMANI
Coordenador do PPGMAA



GIULIANO ELIAS PEREIRA
EMBRAPA UVA E VINHO



GERTRUDES CORÇÃO
PPGMAA - UFRGS



ROSANE DA SILVA RODRIGUES
UFPEL



MARIA CRISTINA FACCIÓNI HEUSER
Diretora do ICBS - UFRGS

"...Para viver de verdade, pensando e repensando a existência, para que ela valha a pena, é preciso ser amado; e amar; e amar-se. Ter esperança; qualquer esperança. Questionar o que nos é imposto, sem rebeldias insensatas mas sem demasiada sensatez. Saborear o bom, mas aqui e ali enfrentar o ruim. Suportar sem se submeter, aceitar sem se humilhar, entregar-se sem renunciar a si mesmo e à possível dignidade. Sonhar, porque se desistimos disso apaga-se a última claridade e nada mais valerá a pena. Escapar, na liberdade do pensamento, desse espírito de manada que trabalha obstinadamente para nos enquadrar, seja lá no que for. E que o mínimo que a gente faça seja, a cada momento, o melhor que afinal se conseguiu fazer." (Lya Luft)

A meus pais, Erní e Nilsa

E meus irmãos, Eduardo e Tamiris,

Dedico.

À Deus,

Ofereço.

AGRADECIMENTOS

Agradecer não é simplesmente dizer: Muito Obrigada! É deixar nossos sentimentos mais profundos aflorarem em palavras que demonstram o quanto cada pessoa foi importante na nossa caminhada em busca de um sonho, um ideal, e acima de tudo, de nos tornarmos uma pessoa mais digna, responsável, humana.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente (UFRGS) e à Capes, pela oportunidade de realização do doutorado e pela concessão da bolsa de estudos, respectivamente.

À professora Patrícia Valente, pela orientação, amizade e paciência. Pelos muitos ensinamentos, os quais levarei sempre comigo.

Aos amigos da UFRGS, Magali, Anaméli, Fran, Eliandra, Laura, Mica, Nai, Igor, Nicole, Ana Paula, Nicolas e Eduardo, pelos momentos passados juntos, de aprendizado, crescimento e diversão.

Ao professor José Carlos Germani, coordenador do curso, pela amizade, brincadeiras de corredor e principalmente pela sua sensibilidade.

À todos os professores. Tanto aqueles que ensinaram teorias quanto aqueles que me transmitiram conhecimentos a respeito do que ser ou não ser daqui para a frente.

Aos membros da banca, Gertrudes Corção e Giuliano Elias Pereira, por disponibilizarem parte de seu precioso tempo para ler o trabalho desenvolvido.

Às queridas professoras da graduação, Míriam e Rosane (também membro da banca) e suas famílias, pelo carinho, amizade, palavras amigas nos momentos difíceis. Vocês também são responsáveis por eu ter chegado até aqui.

Aos amigos Gilce, Marta e Volmir, por todos os momentos passados juntos, pela amizade, carinho e orações a mim dedicadas nos momentos que mais precisei.

Às amigas do laboratório de Microbiologia da Embrapa Uva e Vinho, Chica, Pati, Morgana e Ana Paula, pela convivência diária, crescimento mútuo e infindáveis ajudas.

Aos amigos da Embrapa Uva e Vinho, Joceani, Rosane, Rafaela, Gabriel, Felipe, Celso, Rovana, Aline e André. A convivência com cada um muito me ensinou. As experiências trocadas servirão como exemplo para situações que ainda vou enfrentar.

Aos funcionários da Embrapa Uva e Vinho, independente de cargo hierárquico, que não apenas cruzaram meu caminho, mas que deixaram alguma lição. Em especial, aqueles que ainda, ajudaram em alguma etapa do desenvolvimento do trabalho.

À Loiva, pelas risadas e brincadeiras e acima de tudo, conversas amigas e de incentivo.

Ao Dr. Gildo, pela coorientação. E muito mais que isso, pela amizade, bom-humor e ensinamentos. O que em seu laboratório aprendi como profissional e ser humano irá sempre me acompanhar.

Aos meus pais, Erní e Nilsa e meus irmãos, Eduardo e Tamiris, o mais profundo agradecimento. Mesmo as palavras mais belas, serão insuficientes para expressar o amor que sinto por vocês e a importância de tê-los ao meu lado nesta longa jornada.

À Deus, presença constante em minha vida, luz em meu caminho.

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA MOLECULAR PARA DETECÇÃO DE LEVEDURAS DOS GÊNEROS *Brettanomyces* E *Dekkera* EM VINHOS TINTOS FINOS

Autor: Taís Letícia Bernardi

Orientador: Patrícia Valente

Coorientador: Gildo Almeida da Silva

¹RESUMO

O vinho é a bebida obtida por meio da fermentação alcoólica do mosto simples de uva sã, fresca e madura. Durante o processo fermentativo, realizado por leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, ocorre uma sucessão de microrganismos. Espécies pertencentes aos gêneros *Brettanomyces* e *Dekkera* permanecem no produto final podendo influenciar de forma negativa ao produzirem compostos fenólicos voláteis. Estas leveduras apresentam como uma de suas características a lenta taxa de crescimento. Com isto, este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de meio de cultivo para isolamento e detecção destas leveduras e de metodologia molecular para detecção independente de cultivo. O meio de cultivo desenvolvido permitiu o isolamento e também a diferenciação de leveduras dos gêneros *Brettanomyces* e *Dekkera* das demais leveduras comumente encontradas em vinho. Uma metodologia molecular, baseada em PCR convencional, foi desenvolvida para a detecção dos gêneros em vinhos. Inicialmente foram construídos dois pares de oligonucleotídeos. Um par universal para leveduras e outro específico para *D. bruxellensis*. O primeiro par apresentou ampla aplicabilidade na avaliação da efetividade de diferentes processos de extração de DNA e na detecção de compostos inibidores presentes em amostras de vinho. A utilização de ambos os pares permitiu o desenvolvimento de um protocolo de extração e amplificação de DNA diretamente de amostras de vinho, facilitando a identificação de leveduras *D. bruxellensis* e permitindo a tomada de decisão em tempo hábil de evitar perdas econômicas.

¹Tese de Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Linha de Pesquisa: Microbiologia de Matérias-primas e Bioprocessos, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (199p.)

DEVELOPMENT OF MOLECULAR METHODS FOR DETECTION OF YEAST OF THE GENERA *Brettanomyces* E *Dekkera* IN RED WINES

Author: Taís Letícia Bernardi

Advisor: Dra. Patrícia Valente

Co-Advisor: Dr. Gildo Almeida da Silva

²ABSTRACT

The wine is a beverage obtained by alcoholic fermentation of simple must of healthy, fresh and mature grape. During the fermentation process, carried out by *Saccharomyces cerevisiae* yeasts, there is a succession of microorganisms. Species belonging to the genera *Brettanomyces* and *Dekkera* remain in the final product can influence negatively by producing volatile phenolic compounds. These yeasts present as one of the features of the slow rate of growth. This work aimed at the development of culture media for isolation and detection of these strains and molecular methods for detection of independent culture. The medium developed also allowed the isolation and differentiation of yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera* yeasts from other commonly found in wine. A molecular approach, based on conventional PCR, was developed for the detection of genera in wines. Initially we constructed two sets of primers. A universal pair for yeast and other specific for *D. bruxellensis*. The first pair showed a broad applicability in evaluating the effectiveness of various procedures for DNA extraction and detection of inhibitory compounds present in wine samples. The use of both pairs allowed development of a protocol for extracting and amplifying DNA directly from wine samples, facilitating the identification of yeasts *D. bruxellensis* and allowing the decision-making in a timely manner to avoid economic losses.

²Doctoral thesis in Agricultural and Environmental Microbiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (1999p.)

SUMÁRIO

RELAÇÃO DE TABELAS	x
RELAÇÃO DE FIGURAS	xi
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA:	5
3. CAPÍTULO 1:	23
DESENVOLVIMENTO DE MEIO DE CULTIVO SELETIVO E/OU DIFERENCIAL PARA O ISOLAMENTO DE LEVEDURAS <i>BRETTANOMYCES/DEKKERA</i>	23
RESUMO	24
ABSTRACT	25
3.1 INTRODUÇÃO	26
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	30
3.2.1 Desenvolvimento de meio de cultivo seletivo e/ou diferencial para o isolamento de leveduras <i>Brettanomyces/Dekkera</i>	30
3.2.2 Isolamento de leveduras <i>Brettanomyces/Dekkera</i> de amostras de vinho	32
3.2.3 Recuperação de células de <i>Dekkera</i> e de <i>Brettanomyces</i> em meio de cultivo líquido	33
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
3.4 REFERÊNCIAS	44
4. CAPÍTULO 2:	50
CONSTRUÇÃO E PADRONIZAÇÃO DE PARES DE OLIGONUCLEOTÍDEOS UNIVERSAIS PARA LEVEDURAS E ESPECÍFICOS PARA <i>Dekkera</i> <i>bruxellensis</i>	50
Resumo	51
Abstract	52
4.1 INTRODUÇÃO	53
4.2 MATERIAIS E MÉTODOS	61
4.2.1 Construção e padronização de oligonucleotídeos	61
4.2.2 Extração de DNA com tampão de lise celular	64
4.2.3 Eletroforese	65
4.2.4 Teste de sensibilidade	65
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
4.4 REFERÊNCIAS	78
5. CAPÍTULO 3:	86
RAPID YEAST DNA EXTRACTION BY BOILING AND FREEZE-THAWING WITHOUT USING CHEMICAL REAGENTS AND DNA PURIFICATION	86
6. CAPÍTULO 4:	97
DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO DE DNA DIRETA DE AMOSTRA DE VINHO	97
Resumo	98
Abstract	99
6.1 INTRODUÇÃO	100
6.2. MATERIAL E MÉTODOS	105
6.2.1 Extração direta de DNA de vinho	105

6.2.3 Utilização de processos físicos para extração direta de DNA de vinho	107
6.2.4 Amplificação de DNA diretamente do vinho com diferentes enzimas	109
6.2.5 Ação da quercitina, resveratrol, tanino, ácido gálico e catequina no processo de amplificação.....	109
6.2.6 Extração de DNA direta do vinho e amplificação com oligonucleotídeos universais para leveduras e <i>D. bruxellensis</i>	110
6.2.7 Reação em Cadeia da Polimerase	111
6.2.8 Eletroforese.....	112
6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	113
6.3.1 Extração direta de DNA de vinho	113
6.3.2 Amplificação direta de DNA de vinho diluído	114
6.3.3 Utilização de processos físicos para extração direta de DNA de vinho	115
6.3.4 Amplificação de DNA diretamente do vinho com diferentes enzimas	116
6.3.5 Ação da quercitina, resveratrol, tanino, ácido gálico e catequina no processo de amplificação.....	118
6.3.6 Extração direta de DNA do vinho e amplificação com oligonucleotídeos universais para leveduras e <i>D. bruxellensis</i>	124
6.4 REFERÊNCIAS	129
7. CAPÍTULO 5:	134
INHIBITION OF PCR AND YEAST ACTIVITY BY PHTHALIMIDES	134
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	156
9. REFERÊNCIAS.....	158
10 VITA	193

RELAÇÃO DE TABELAS

Tabela 1- Diferentes formulações testadas para o desenvolvimento de meio de cultivo seletivo e/ou diferencial para <i>Brettanomyces/Dekkera</i>	31
Tabela 2 - Novas formulações desenvolvidas com base nos resultados apresentados no meio M15 (Controle)	35
Tabela 3– Isolados obtidos após plaqueamento em Meio para Isolamento.....	38
Tabela 4– Linhagens de microrganismos utilizadas para padronização dos oligonucleotídeos universais para leveduras e específicos para <i>D. bruxellensis</i>	63

RELAÇÃO DE FIGURAS

- Figura 1- Crescimento de células de levedura *D. bruxellensis* em placa após 30 dias de inoculação em vinho. (A) meio sólido desenvolvido neste trabalho; (B) meio sólido DBDM (Rodrigues et al., 2001)..... 41
- Figura 2 - Produto de amplificação de um segmento específico de 375 pb da região 18S do rDNA de leveduras de diferentes espécies. M – Marcador 100 bp; 1 – *Sacch. cerevisiae* NRRL Y-12632; 2 – *D. bruxellensis* NRRL Y-12961; 3 – *Br. custersianus* NRRL Y-6653; 4 – *H'spora valbyensis* NRRL Y-1626; 5 – *H'spora vineae* NRRL Y-17529; 6 – *Br. nanus* NRRL Y-17527; 7 – *D. anomala* NRRL Y-17522; 8 – *H'spora uvarum* NRRL Y-1614; 9 – *H'spora osmophila* NRRL Y-1613. 67
- Figura 3 - Produto de amplificação de um segmento específico de 375 pb da região 18S do rDNA de diferentes linhagens de fungos filamentosos. M - Marcador 100 bp; 1 – An 29; 2 – *Botrytis cinerea*; 3 – *Aspergillus ochraceus* Aoch; 4 – *Penicillium* sp.; 5 – *Aspergillus niger* (Anl 29); 6 – An 2; 7 – *Aspergillus ochraceus* (Ao 2774); 8 – *Cladosporium* sp.; 9 – B5; 10 – DTR; 11 – *Aspergillus niger* (An); 12 – OSM; 13 – *Aureobasidium pullulans* (ABP); 14 – *Fusarium graminearum* (Fg) .. 67
- Figura 4 - Produto de amplificação de um segmento específico de 375 pb da região 18S do rDNA de diferentes linhagens de leveduras. M – Marcador 100 bp; 1 – *Sacch. cerevisiae* Embrapa 1vvt/97; 2 – *Picchia norvegensis* Embrapa 2 vvt/97; 3 – *Zigosaccharomyces rouxii* Embrapa 4 vvt/97; 4 – *Sacch. cerevisiae* Embrapa 21 vvt/97; 5 – *Sacch. cerevisiae* Embrapa 22 vvt/97; 6 – *Sacch. cerevisiae* Embrapa 25 vvt/97; 7 – *Sacch. cerevisiae* Embrapa 27 vvt/97; 8 – *Sacch. cerevisiae* Embrapa 33 vvt/97; 9 – *Sacch. cerevisiae* Embrapa 39 vvt/97..... 68
- Figura 5 – Produto de amplificação de um segmento específico de 375 pb da região 18S do rDNA de *Sacch. cerevisiae* e *D. bruxellensis* após PCR utilizando DNA molde extraído por diferentes processos. M – Marcador 100 bp; 1 – *Sacch. cerevisiae* Embrapa 1vvt/97 – tampão de lise celular; 3 – *Sacch. cerevisiae* Embrapa 1vvt/97 – processo de fervura; 4 – *D. bruxellensis* NRRL Y-12961 – processo de fervura; 5 – *Sacch. cerevisiae* Embrapa 1vvt/97 – processo de congelamento/descongelamento; 6 – *D. bruxellensis* NRRL Y-12961 – processo de congelamento/descongelamento. 71
- Figura 6 – Produto de amplificação de um segmento específico de 690 pb da região 18S do rDNA de *D. bruxellensis*. M – Marcador 100 bp; 1 – *D. bruxellensis* NRRL Y-12961; 2 – *Sacch. cerevisiae* NRRL Y-12632; 3 – *Sacch. cerevisiae* Embrapa 1vvt/97; 4 – *Br. custersianus* NRRL Y-6653; 5 – *Br. naardenensis* NRRL Y-17526; 6 – *Br. nanus* NRRL Y-

17527; 7 – *D. anomala* NRRL Y-17522; 8 – *H'spora uvarum* NRRL Y-1614; 9 – *H'spora osmophila* NRRL Y-1613; 10 – *H'spora valbyensis* NRRL Y-1626; 11 – *H'spora vineae* NRRL Y-17529. 72

Figura 7– Eletroforese em gel de agarose 1,0% do produto de amplificação de 375 pb da região 18S do rDNA de *Sacch. cerevisiae* na presença de diferentes concentrações de vinho em substituição à água da PCR com a enzima Tth DNA polimerase. M – Marcador 100 pb; Soluções de vinho em substituição à água da reação: 1 – vinho 100%; 2 – vinho 75%; 3 – vinho 50%; 4 - vinho 25%; 5 – vinho 20%; 6 – vinho 15%; 7 – vinho 10%; 8 – vinho 5%; 9 – controle positivo. 117

Figura 8 – Eletroforese em gel de agarose 1,0% do produto de amplificação de 375 pb da região 18S do rDNA de *Sacch. cerevisiae* na presença de diferentes concentrações de vinho em substituição à água da PCR com a enzima Taq DNA polimerase. M – Marcador 100 pb; Soluções de vinho em substituição à água da reação: 1 – vinho 100%; 2 – vinho 75%; 3 – vinho 50%; 4 - vinho 25%; 5 – vinho 20%; 6 – vinho 15%; 7 – vinho 10%; 8 – vinho 5%; 9 – controle positivo. 117

Figura 9 – Eletroforese em gel de agarose 1,0% do produto de amplificação de 375 pb da região 18S do rDNA de *Sacch. cerevisiae* na presença de diferentes concentrações de quercitina em substituição à água da PCR. M – Marcador 100 pb; 1 – 0,01%; 2 – 0,05%; 3 – 0,001%; 4 – 0,002%; 5 – 0,003%; 6 – 0,004%; 7 – 0,005%; 8 – controle positivo 119

Figura 10 – Eletroforese em gel de agarose 1,0% do produto de amplificação de 375 pb da região 18S do rDNA de *Sacch. cerevisiae* na presença de diferentes concentrações de resveratrol em substituição à água da PCR. M – Marcador 100 pb; 1 – controle positivo; 2 – 0,01%; 3 – 0,05%; 4 – 0,001%; 5 – 0,002%; 6 – 0,003%; 7 – 0,004; 8 – 0,005%. 120

Figura 11 – Eletroforese em gel de agarose 1,0% do produto de amplificação de 375 pb da região 18S do rDNA de *Sacch. cerevisiae* na presença de diferentes concentrações de tanino em substituição à água da PCR. M – Marcador 100 pb; 1 – 0,01%; 2 – 0,05%; 3 – 0,001%; 4 – 0,002%; 5 – 0,003%; 6 – 0,004; 7 – 0,005%; 8 – controle positivo. 120

Figura 12 – Produto de amplificação de um segmento específico de 375 pb da região 18S do rDNA de *Sacch. cerevisiae* na presença de ácido gálico e catequina no momento que as soluções foram preparadas. M - Marcador 100 bp; A: 1 - ácido gálico 250 μ molar; 2 - ácido gálico 500 μ molar; 3 - ácido gálico 750 μ molar; 4 - ácido gálico 1000 μ molar; 5 - catequina 250 μ molar; 6 - catequina 500 μ molar; 7 - catequina 750 μ molar; 8 - catequina 1000 μ molar; B: 1 - ácido gálico 25 μ molar; 2 - ácido gálico 50 μ molar; 3 - ácido gálico 75 μ molar; 4 - ácido gálico 100

μ molar; 5 - catequina 25 μ molar; 6 - catequina 50 μ molar; 7 - catequina 75 μ molar; 8 - catequina 100 μ molar. 121

Figura 13 – Produto de amplificação de um segmento específico de 375 pb da região 18S do rDNA de *Sacch. cerevisiae* na presença de ácido gálico + catequina no momento que as soluções foram preparadas. M - Marcador 100 bp; A: 1 - ácido gálico 250 μ molar + catequina 250 μ molar; 2 - ácido gálico 500 μ molar + catequina 500 μ molar; 3 - ácido gálico 750 μ molar + catequina 750 μ molar; 4 - ácido gálico 1000 μ molar + catequina 1000 μ molar; B: 1 - ácido gálico 25 μ molar + catequina 25 μ molar; 2 - ácido gálico 50 μ molar + catequina 50 μ molar; 3 - ácido gálico 75 μ molar + catequina 75 μ molar; 4 - ácido gálico 100 μ molar + catequina 100 μ molar; 122

Figura 14 – Produto de amplificação de um segmento específico de 375 pb da região 18S do rDNA de *Sacch. cerevisiae* na presença de ácido gálico + catequina após 4 horas de incubação a 25°C. M - Marcador 100 bp; A: 1 - ácido gálico 250 μ molar + catequina 250 μ molar; 2 - ácido gálico 500 μ molar + catequina 500 μ molar; 3 - ácido gálico 750 μ molar + catequina 750 μ molar; 4 - ácido gálico 1000 μ molar + catequina 1000 μ molar; B: 1 - ácido gálico 25 μ molar + catequina 25 μ molar; 2 - ácido gálico 50 μ molar + catequina 50 μ molar; 3 - ácido gálico 75 μ molar + catequina 75 μ molar; 4 - ácido gálico 100 μ molar + catequina 100 μ molar..... 122

Figura 15 – Produto de amplificação de um segmento específico de 375 pb da região 18S do rDNA de *Sacch. cerevisiae* na presença de ácido gálico + catequina após 4 horas de incubação a 25°C e 150 rpm. M - Marcador 100 bp; A: 1 - ácido gálico 250 μ molar + catequina 250 μ molar; 2 - ácido gálico 500 μ molar + catequina 500 μ molar; 3 - ácido gálico 750 μ molar + catequina 750 μ molar; 4 - ácido gálico 1000 μ molar + catequina 1000 μ molar; B: 1 - ácido gálico 25 μ molar + catequina 25 μ molar; 2 - ácido gálico 50 μ molar + catequina 50 μ molar; 3 - ácido gálico 75 μ molar + catequina 75 μ molar; 4 - ácido gálico 100 μ molar + catequina 100 μ molar. 123

Figura 16 – Produto de amplificação de um segmento específico de 375 pb da região 18S do rDNA obtido com oligonucleotídeos universais para leveduras utilizando DNA extraído diretamente de vinho. M – Marcador 100 pb; 1 a 18 – diferentes amostras de vinho tinto; 19 – controle positivo. 126

Figura 17 – Produto de amplificação de um segmento específico de 690 pb da região 18S do rDNA obtido com oligonucleotídeos específicos para *D. bruxellensis* utilizando DNA extraído diretamente de vinho das amostras. M – Marcador 100 pb; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 12, 13, 14,

16, 18 – amostras que amplificaram com oligonucleotídeos universais para leveduras..... 127

Figura 18 – Produto de amplificação de um segmento específico de 690 pb da região 18S do rDNA obtido com oligonucleotídeos específicos para *D. bruxellensis* utilizando DNA extraído diretamente de amostras de vinho propositalmente contaminadas com *D. bruxellensis*. M – Marcador 100 pb; 1 e 2 – amostras; 3 – controle positivo..... 127

LISTA DE ABREVIATURAS

DNA: Ácido Desoxirribonucléico

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

mL: mililitro

mM: mili Molar

NRRL: Coleção de culturas ARS, National Center for Agricultural Utilization Research, USA

PCR: Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)

pH: logaritmo decimal do inverso da atividade de íons hidrogênio em uma solução

rDNA: Ácido Desoxirribonucléico ribossômico

SDS: dodecil sulfato de sódio

TE: Tris-EDTA

Tris: Tris (hidroximetil) aminometano

μ L: microlitro

1. INTRODUÇÃO GERAL

De acordo com a Lei nº 7.678 de 08 de novembro de 1988, o vinho é a bebida obtida por meio da fermentação alcoólica do mosto simples de uva sã, fresca e madura. O processo fermentativo é conduzido por linhagens de leveduras *Sacch. cerevisiae*. A uniformidade da fermentação é conseguida por meio da inoculação do mosto com linhagens selecionadas desta levedura. O mosto possui uma gama diversa de bactérias, fungos filamentosos e leveduras. Estas últimas, quando presentes nas bagas, são classificadas como *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces*. Bactérias e leveduras não-*Saccharomyces* de um modo geral, apresentam baixa tolerância ao etanol. Isto leva a uma significativa redução no número de microrganismos ou sua substituição pela *Sacch. cerevisiae* ao longo do processo de vinificação. Estes microrganismos, no entanto, antes de serem substituídos, produzem compostos que auxiliam na complexidade aromática do vinho.

Leveduras dos gêneros *Brettanomyces* e *Dekkera*, embora não sejam predominantes nas bagas da uva ou no mosto em fermentação, podem se desenvolver durante a conservação ou após o envase, influenciando de forma negativa o produto final. Estas leveduras são capazes de produzir ácido acético e compostos fenólicos voláteis como 4-etil-fenol e 4-etil-guaiacol, responsáveis por conferir aromas e gosto estranho ao vinho, depreciando-o.

Uma das principais características dessas leveduras é a baixa velocidade de crescimento em meios de cultura, tornando muitas vezes difícil sua identificação e detecção em estudos ecológicos. Em meio de cultivo sólido, outros microrganismos com maior velocidade de crescimento limitam ou impedem o pleno desenvolvimento e o isolamento destes gêneros.

O desenvolvimento de técnicas que permitam a detecção e identificação destes gêneros de leveduras presentes em vinho é importante, por auxiliar na tomada de decisão antes que ocorram perdas significativas de qualidade. As técnicas utilizadas fazem uso de meios de cultivo seletivos e/ou diferenciais e de ferramentas de biologia molecular. O uso de meios de cultivo, especialmente para estas leveduras, possui como inconveniente a demora na visualização das colônias sobre a superfície do meio. Com as ferramentas de biologia molecular os resultados são obtidos relativamente em um reduzido espaço de tempo. Embora as técnicas de biologia molecular sejam rápidas, seguras e reproduzíveis, dependendo da amostra a ser analisada, apresentam o inconveniente de suscetibilidade a compostos inibidores presentes, os quais podem ser carregados durante o processo de extração de DNA. No caso do vinho, o emprego de técnicas de biologia molecular não é tarefa fácil devido ao elevado número de compostos químicos intrínsecos e extrínsecos presentes. Estes compostos podem exercer efeito inibitório sobre as polimerases, dificultando a identificação.

O presente trabalho teve como objetivos: desenvolvimento de um meio de cultivo seletivo e/ou diferencial para a detecção de leveduras pertencentes aos gêneros *Dekkera/Brettanomyces*; construção e padronização

de oligonucleotídeos universais para leveduras e específicos para *Dekkera bruxellensis*; desenvolvimento de metodologia para amplificação de DNA diretamente das amostras de vinho. Para facilitar a compreensão, o trabalho foi dividido em uma revisão bibliográfica sob a forma de artigo aceito para publicação na Revista Brasileira de Viticultura e Enologia, seguida por cinco capítulos. O Capítulo 1 descreve o desenvolvimento de um meio de cultivo seletivo e/ou diferencial para isolamento de leveduras pertencentes aos gêneros *Brettanomyces/Dekkera*. A construção e padronização dos dois pares de oligonucleotídeos estão descritas no Capítulo 2. Estes oligonucleotídeos se encontram em processo de patenteamento. O par de oligonucleotídeos universais para leveduras foi utilizado na padronização de protocolos de extração rápida de DNA de leveduras. Os métodos de extração sem uso de reagentes químicos e purificação do DNA estão descritos no Capítulo 3. Neste capítulo os resultados foram descritos na forma de artigo científico e submetidos à Revista *Brazilian Archives of Biology and Technology*. No Capítulo 4 estão descritos os diferentes testes realizados para extração direta de DNA a partir de amostras de vinho. Ao verificar que este DNA não era amplificado por PCR, a influência de diferentes compostos do vinho sobre a reação de PCR foi avaliada, empregando o par de oligonucleotídeos universais aqui construídos. Ao final do capítulo, uma metodologia de extração de DNA com poucos estágios é apresentada. A influência de dois fungicidas, amplamente empregados durante o ciclo produtivo da videira, sobre a PCR, sobre a atividade metabólica e sobre a integridade celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* Embrapa 1vvt/97 também foi avaliada. Estes

resultados estão descritos na forma de artigo científico que foi submetido à Revista *World Journal of Microbiology and Biotechnology* e estão no Capítulo 5.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA:

CONSIDERAÇÕES SOBRE A PRESENÇA DOS GÊNEROS

***Dekkera* E *Brettanomyces* EM VINHOS**

**Artigo de revisão aceito para publicação na "Revista Brasileira de
Viticultura e Enologia"**

Considerações sobre a presença dos gêneros *Brettanomyces* e *Dekkera* em vinhos

Taís Letícia Bernardi⁽¹⁾, Gildo Almeida da Silva⁽²⁾ e Patrícia Valente⁽³⁾

⁽¹⁾Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente/ICBS/UFRGS/Bolsista Capes/Embrapa Uva e Vinho – Bento Gonçalves/RS – 95700-000 – tisleticia@yahoo.com.br

⁽²⁾Embrapa Uva e Vinho/Departamento de Microbiologia – Bento Gonçalves/RS – 95700-000 – gildo@cnpuv.embrapa.br

⁽³⁾Departamento de Microbiologia/UFRGS – Porto Alegre/RS – 90050-170 – patricia.valente@ufrgs.br

Resumo

Leveduras dos gêneros *Brettanomyces* e *Dekkera* são conhecidas por sua capacidade de crescer em baixa concentração de açúcar e em elevado teor de etanol. Nos vinhos, esses microrganismos convertem ácidos hidroxicinâmicos em compostos fenólicos voláteis, que em determinadas concentrações ocasionam o aparecimento de “off-flavours”. Esta transformação pode provocar perdas econômicas ao setor vinícola. A síntese de fenóis voláteis ocorre pela ação de duas enzimas sobre os ácidos hidroxicinâmicos, os quais são descarboxilados e em seguida reduzidos. Para prevenir a ação de leveduras *Brettanomyces* e *Dekkera* é necessário empregar práticas enológicas adequadas, como uso de dióxido de enxofre, sanitização adequada dos equipamentos que entram em contato com o mosto e o vinho, envelhecimento em baixas temperaturas e baixa disponibilidade de oxigênio. Os métodos de detecção destes microrganismos, na maioria das vezes, têm como princípio básico a viabilidade celular naquela determinada

condição de cultivo. Assim, técnicas como cultivo em meios seletivos ou diferenciais podem não representar o real perigo de uma contaminação por tais microrganismos. As técnicas que independem de cultivo consistem em métodos moleculares, com destaque para a reação em cadeia da polimerase e suas variações.

Termos para indexação: *Dekkera*, *Brettanomyces*, fenóis-voláteis, medidas preventivas, detecção

Considerations about the presence of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera* in wines

Abstract

Yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera* are known for their ability to grow in low concentrations of sugar and high ethanol content. In wines, these microorganisms convert hydroxycinnamic acids in volatile phenolic compounds, which in certain concentrations cause the appearance of off-flavors. These transformations may cause economic losses to the wine industry. The synthesis of volatile phenols occurs through the action of two enzymes on the hydroxycinnamic acids, which are decarboxylated and then reduced. To prevent the action of *Brettanomyces* and *Dekkera* yeasts is necessary to employ appropriate oenological practices such as use of sulfur dioxide, sanitizing of equipment that comes into contact with the must and wine, aging at low temperatures and low oxygen availability. The methods for detection of these microorganisms, most often, depend on the basic principle of cell viability in determined culture conditions. Thus, techniques such as cultivation on selective or differential media may not represent the real danger of contamination by these microorganisms. The techniques that do not

depend upon cultivation consist of molecular methods, especially the polymerase chain reaction and its variations.

Index therms: *Dekkera*, *Brettanomyces*, volatile phenols, preventive measures, detection

Introdução

Vinho, de acordo com a Lei nº 7.678 de 08 de novembro de 1988, é a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto simples de uva sã, fresca e madura. O teor alcoólico, quantidade de açúcares e coloração variam com o tipo de vinho, e o pH situa-se entre 3,0-3,5, devido a presença de ácidos orgânicos. O processo fermentativo para elaboração de vinhos tem a participação direta de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*. Para garantir uma fermentação mais uniforme, o mosto é inoculado com linhagens selecionadas desta levedura. Esta técnica ameniza os riscos de se obter um produto com defeitos de origem microbiológica. O mosto possui uma flora microbiana diversa composta por bactérias, fungos filamentosos e leveduras. Entre as bactérias, encontram-se principalmente aquelas pertencentes aos gêneros *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* e *Enterococcus*. Para efeito puramente didático, as leveduras provenientes das bagas podem ser classificadas como *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces*. Gêneros pertencentes a este último grupo possuem baixa atividade fermentativa e nele estão os gêneros *Hanseniaspora*, *Candida*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Issatchenkia* e *Kluyveromyces* (di Maro et al., 2007). Embora bactérias e leveduras não-*Saccharomyces* apresentem baixa tolerância ao etanol e, ao longo do processo, sejam substituídas por linhagens de *Sacch. cerevisiae*, desempenham papel importante nas características sensoriais do vinho por produzirem compostos que contribuem com a

complexidade aromática. Estas características permanecerão no produto final, mesmo após a remoção do microrganismo. Existem, no entanto, gêneros responsáveis por deteriorações durante a conservação nos barris ou após envase. Em vinhos, o desenvolvimento de leveduras pertencentes aos gêneros *Brettanomyces* e sua forma teleomorfa *Dekkera*, é causa de grande preocupação quando se trata de microrganismos contaminantes (Ibeas et al., 1996; Renouf & Lonvaud-Funel, 2007). Estas leveduras não estão entre os microrganismos predominantes do mosto durante a fermentação, mas sua presença pode ter grande influência no produto final (Ciani & Ferraro, 1997). São frequentemente encontradas em vinhos após 6 a 10 meses de armazenamento, e também em outras bebidas fermentadas, como cerveja e cidra (Cocolin et al., 2004). Leveduras dos gêneros *Brettanomyces* e *Dekkera* são capazes de produzir ácido acético e compostos fenólicos voláteis como 4-etil-fenol e 4-etil-guaiacol, que dependendo da concentração, são responsáveis por conferir *off-flavours* ao vinho, levando à depreciação do produto.

O gênero *Brettanomyces* é conhecido desde 1904. Esta levedura foi isolada no final da fermentação de uma cerveja inglesa. A descrição morfológica e fisiológica como boa produtora de ácido acético, crescimento lento em ágar malte ou extrato de malte, curto período de sobrevivência, frequência de células ogivais e ausência de ascósporos, só foi realizada em 1940 (da Silva, 2005). O gênero *Dekkera* foi introduzido em 1964 quando a formação de esporos foi observada. Atualmente, são reconhecidas cinco espécies pertencentes aos gêneros *Brettanomyces* e *Dekkera*: *Br. custersianus*, *Br. naardenensis*, *Br. nanus*, *Br. anomalus* e *Br. bruxellensis*. Destas, a forma perfeita (teleomorfa) é conhecida para as últimas duas espécies, sendo denominadas *D. anomala* e *D. bruxellensis*, respectivamente (Oelofse et al., 2008).

Considerando-se as perdas econômicas que a presença de leveduras *Brettanomyces* e *Dekkera* podem causar ao setor vinícola, é importante conhecer o mecanismo de formação dos fenóis voláteis, bem como determinar medidas preventivas e de detecção destes microrganismos. Desta forma, torna-se possível a tomada de ações profiláticas em tempo hábil de evitar contaminações de outros recipientes de armazenamento.

A síntese dos fenóis voláteis

O desenvolvimento de leveduras *Brettanomyces* e *Dekkera*, durante o processo de envelhecimento a que são submetidos os vinhos tintos, pode resultar em alteração organoléptica denominada “Brett”, devido à produção de fenóis voláteis, especialmente os etil-fenóis. A partir de determinadas concentrações, estes compostos conferem características organolépticas estranhas (*off-flavours*). Estas alterações são descritas como animal, medicinal, couro, entre outros e são prejudiciais ao perfil aromático do vinho ao atingirem níveis superiores ao limiar de percepção, que correspondem a $230\mu\text{g.L}^{-1}$ para o 4-etil-fenol e a $47\mu\text{g.L}^{-1}$ para o 2-etil-guaiacol (Suarez et al., 2007).

A origem dos fenóis voláteis está relacionada à atividade de duas enzimas. Há, inicialmente, uma descarboxilação dos ácidos hidroxicinâmicos, *p*-cumárico, ferrúlico e caféico, catalisada pela enzima hidroxicinamato descarboxilase, formando os derivados hidroxiestirenos correspondentes, 4-vinil-fenol, 4-vinil-guaiacol e 4-vinil-catecol (Harris et al., 2009). Logo em seguida, estes compostos são, respectivamente, reduzidos a 4-etil-fenol, 4-etil-guaiacol e 4-etil-catecol pela enzima vinilfenol redutase (Suarez et al., 2007).

As enzimas cinamato descarboxilase e vinil-fenol redutase são intracelulares. São liberadas para o meio quando as células de *Brettanomyces* e de *Dekkera* atingem a fase

estacionária de crescimento e sofrem lise. Uma vez no meio, estas enzimas podem atuar diretamente sobre os ácidos hidroxicinâmicos. Atividades de descarboxilação dos ácidos hidroxicinâmicos não são exclusivas de *Brettanomyces* e *Dekkera*. Podem também ser encontradas em leveduras como *Sacch. cerevisiae* e *P. guilliermondii*, e bactérias como *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli*. Alguns destes microrganismos são encontrados durante o processo de vinificação (Harris et al., 2008). Estes microrganismos, no entanto, não são capazes de reduzir os compostos vinil-fenóis formados a etil-fenóis. Os gêneros *Brettanomyces* e *Dekkera* podem atuar diretamente sobre compostos vinil-fenóis liberados por outras leveduras e bactérias durante a vinificação, produzindo derivados 4-etil-fenóis (Harris et al., 2009). As atividades redutivas ocorrem menos frequentemente entre microrganismos, sendo particularmente efetivas em vinhos quando as espécies *D. bruxellensis* e *D. anomala* estão presentes (Oelofse et al., 2008). *Sacch. cerevisiae* não tem capacidade para produzir etil-fenóis e bactérias ácido lácticas, principalmente *Lactobacillus* spp., em condições enológicas produzem pequenas quantidades (Chatonnet et al., 1995; Couto et al., 2005). A síntese de quantidades significativas de fenóis-voláteis está diretamente ligada a espécies de *Brettanomyces* e *Dekkera*.

Os ácidos hidroxicinâmicos são compostos originários das uvas. Encontram-se esterificados com o ácido tartárico ou os ésteres de antocianinas. Estão naturalmente presentes no suco de uva e no vinho (Dugelay et al., 1993). Estes ácidos são liberados para suas formas livres fracas, por meio da ação de enzimas do grupo esterase (Gerbaux et al., 2002). É importante salientar que as formas livres podem exercer efeito inibitório para o crescimento de muitos microrganismos. Leveduras dos gêneros *Brettanomyces* e *Dekkera* podem reduzir este efeito inibidor convertendo os ácidos hidroxicinâmicos

fracos em fenóis voláteis (Oelofse et al., 2008). Segundo Harris et al. (2009) esta atividade se dá em resposta ao estresse. O mecanismo de desintoxicação do meio por estas leveduras poderá ser prejudicial à qualidade do vinho se a quantidade de fenóis voláteis formada for superior ao limiar de percepção.

Os odores desagradáveis formados por *Brettanomyces* e por *Dekkera* causam perdas econômicas importantes ao setor vinícola. Com isso, torna-se de fundamental importância o monitoramento e controle destes microrganismos no vinho e em superfícies que entram em contato com o mesmo. O monitoramento é realizado por meio de uma rigorosa limpeza e desinfecção das superfícies de contato juntamente com práticas de vinificação adequadas que limitem o desenvolvimento de *Brettanomyces* e de *Dekkera* nos vinhos.

Medidas preventivas do desenvolvimento de *Brettanomyces/Dekkera*

A produção de fenóis voláteis pode ocorrer em diferentes estádios do processo de vinificação (Couto et al., 2005). Barris de madeira insuficientemente sanitizados são considerados o principal habitat dessas leveduras (Chatonnet et al., 1995). Estas são capazes de crescer a partir de açúcares residuais contidos nos vinhos (Oelofse et al., 2008). Técnicas como redução no valor de pH, o emprego de níveis adequados de dióxido de enxofre (0,8 ppm na forma molecular) e o envelhecimento a baixas temperaturas (10 a 15°C) podem reduzir os riscos de deterioração.

Na vinificação, a adição de dióxido de enxofre (SO₂) ao mosto é prática bastante comum. O dióxido de enxofre atua como agente antifúngico, antibacteriano, antioxidante e seletivo. As bactérias são mais sensíveis à ação do SO₂ do que as leveduras. Devido à relativa resistência às concentrações normalmente utilizadas de

dióxido de enxofre para a estabilização do vinho, leveduras dos gêneros *Brettanomyces* e *Dekkera* são difíceis de controlar durante a vinificação (Miot-Sertier & Lonvaud-Funel, 2007). Du Toit et al. (2005), testando a sensibilidade às várias formas de SO₂, mostraram que *Br. bruxellensis* apresentou sensibilidade a concentrações entre 0,25 e 0,38 mg.L⁻¹ de SO₂ molecular. O SO₂ usado na sua forma combinada não apresentou efeito sobre o crescimento celular. Assim, uma concentração de 160 mg.L⁻¹ de SO₂ total pode não apresentar inibição se a fração combinada for elevada (du Toit et al., 2005).

A disponibilidade de oxigênio no meio é outro fator que exerce influência sobre o crescimento, produção de etanol e ácido acético pelas leveduras *Brettanomyces* e *Dekkera*. A influência da concentração de oxigênio sobre a produção de ácido acético por estas leveduras foi verificada por Ciani & Ferraro (1997). Em condições aeróbicas, os autores verificaram que o metabolismo é desviado para a produção de ácido acético. Condições semi-anaeróbicas resultaram em boa combinação entre produção de etanol e formação de ácido acético. Em anaerobiose, a produção de ácido acético foi baixa. Leveduras *Brettanomyces* e *Dekkera* quando em condições anaeróbicas apresentam um metabolismo particular, que consiste na inibição da fermentação alcoólica, denominado Efeito Custer. Em leveduras *Brettanomyces* e *Dekkera*, o efeito Custer é atribuído a um desbalanço redox causado pela redução de NAD⁺ durante a oxidação de acetaldeído a ácido acético (Ciani & Ferraro, 1997). As observações feitas por Ciani & Ferraro (1997) e a característica de possuir Efeito Custer positivo, induzem a se pensar que não há necessidade de um controle rigoroso e efetivo destes microrganismos para evitar a contaminação dos vinhos. Por possuir efeito Custer positivo, valores extremamente baixos de oxigênio, como ocorre durante o envelhecimento e estocagem, a atividade destas leveduras e consequente a produção de compostos indesejáveis não deveria ser

favorecida. Em condições anaeróbicas, no entanto, a fermentação por estas espécies de leveduras pode ser estimulada por substâncias formadas por *Sacch. cerevisiae* durante a elaboração de vinho tinto ou por compostos da própria uva tinta, que atuam como receptores de elétrons em substituição às condições micro-aerófilas (da Silva, 2005).

A eliminação de microrganismos do mosto pode ser realizada por meio de tratamento com dimetil dicarbonato (DMDC). Seu uso é permitido nos EUA, Europa e Austrália, nas concentrações máximas de 200 ppm, 200 mg.L⁻¹ e 200 mg.kg⁻¹, respectivamente (Costa et al., 2008). O DMDC atua desnaturando as enzimas da rota fermentativa como gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e álcool desidrogenase (Fugelsang & Edwards, 2006; Renouf et al., 2008). O efeito inibitório máximo do DMDC ocorre imediatamente após sua adição. Efeitos sinérgicos entre DMDC e dióxido de enxofre tem sido observados. Nestes casos, 50 mg.L⁻¹ de DMDC e 25 mg.L⁻¹ de SO₂ livre são eficientes no controle microbiano. O DMDC não pode substituir o SO₂, pois este age como antioxidante durante a fermentação e o envelhecimento do vinho (Renouf et al., 2008). O DMDC pode ser utilizado para eliminar microrganismos, entre eles *Brettanomyces* e *Dekkera*, no mosto ou no vinho antes de ser envasado. A eliminação de microrganismos no mosto quando se utiliza DMDC depende da contaminação inicial e da resistência apresentada por cada uma das espécies presentes. O uso do DMDC permite a diminuição da carga microbiana para posterior inoculação do mosto com a linhagem de *Sacch. cerevisiae* responsável pela fermentação. A eliminação total dos microrganismos, no entanto, poderá ocasionar redução na complexidade do vinho, devido a não formação de compostos por parte da flora microbiana do mosto. O uso no momento do envase serve como agente preventivo.

Para a esterilização de barris de madeira e equipamentos, o emprego de ozônio (O₃) pode ser realizado. O ozônio decompõe-se rapidamente, não deixa traços, não produz qualquer composto halogenado tóxico, proporciona taxa de morte bacteriana 3125 vezes mais elevada que o cloro, tem poder oxidante 50% mais forte que o cloro, é 25 vezes mais eficiente que o ácido hipocloroso, 2500 e 5000 vezes mais efetivo que o hipoclorito e a cloramina, respectivamente. Sua aplicação direta no vinho, no entanto, não é satisfatória. Estudos realizados mostram um aumento no grau de oxidação e o aparecimento de odores estranhos durante o envelhecimento (da Silva, 2005). Além disso, apresenta riscos à saúde do manipulador.

Principais técnicas de detecção

A detecção de *Brettanomyces* e de *Dekkera* em vinhos pode ser realizada por meio de técnicas dependentes ou independentes de cultivo. Nos métodos que dependem de cultivo, ocorre uma pressão seletiva durante o crescimento em substrato sólido. Esta pressão origina o crescimento de uma subpopulação mais adaptada e não da comunidade microbiana em geral. As técnicas que não dependem de cultivo, podem auxiliar na detecção e na identificação desses microrganismos. Técnicas tradicionais de identificação, baseadas em características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas, são complexas, trabalhosas e consomem tempo. O uso de meios e condições de cultivo inadequados pode levar à classificação incorreta. O meio e as condições de cultivo podem causar alterações morfológicas e fisiológicas das linhagens que poderão conduzir a uma identificação duvidosa. A detecção de *Brettanomyces* e *Dekkera* por meio de técnicas tradicionais durante o processo de vinificação tem sido realizada com o uso de meios seletivos e/ou diferenciais (Couto et al., 2005; Rodrigues et al., 2001).

Estas técnicas, no entanto, possuem uma eficácia limitada, devido à baixa velocidade de crescimento destas leveduras e sua baixa densidade populacional em relação a outras espécies de microrganismos presentes no mosto e no vinho. Além disso, as condições estressantes induzem algumas células, embora viáveis, a entrarem em um estado não cultivável, o que torna difícil sua detecção (Agnolucci et al., 2009). Técnicas de biologia molecular podem identificar as linhagens por meio de suas características genéticas, sem depender da expressão gênica e nem das condições de cultivo. Fornecem a identificação de espécies em grupos em função dos diferentes graus de variabilidade apresentados pelo DNA. Variações da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando oligonucleotídeos espécie e gênero-específicos têm sido utilizadas para a detecção de leveduras *Brettanomyces* e *Dekkera*. Entre estas variações estão a PCR em tempo real (QPCR) (Hierro et al., 2006; Phister & Mills, 2003), PCR-aninhada (Ibeas et al., 1996), PCR com enzima de restrição (Cocolin et al., 2004), PCR-DGGE (Renouf et al., 2006), RAPD-PCR e PCR *fingerprinting* (Miot-Sertier & Lounvaud-Funel, 2007). A caracterização direta de microrganismos do vinho por meio de métodos moleculares tem como vantagens em relação aos métodos de enriquecimento e cultivo seletivo o fato de superar as dificuldades apresentadas por populações de microrganismos que não respondem ao enriquecimento, que não usam os nutrientes empregados por não serem adequados ou que se apresentam no estado viável mas não cultivável. As análises diretas, sendo mais rápidas, permitem tomada de ações corretivas em tempo hábil (Phister & Mills, 2003). A utilização de técnicas diretas de detecção de *Brettanomyces* e *Dekkera*, no entanto, exige cuidado no momento da interpretação dos resultados. A amplificação do DNA alvo pode ser apenas um indicativo de histórico de contaminação em alguma etapa do processamento, sem necessariamente significar

células viáveis ou em atividade. A análise direta, portanto, poderá detectar DNA de célula lisada ou não metabolicamente ativa. Para minimizar esta limitação algumas estratégias devem ser estabelecidas. Entre as técnicas diretas existem as análises químicas. Estas análises consistem basicamente em técnicas cromatográficas como GC/MS Sniffing, HS-SPME, HPLC/MS, HPLC/UV e GC/DIC (da Silva, 2005). Estas técnicas, apesar de bem padronizadas e conhecidas, têm como limitação a dificuldade de obtenção de resultados que remetam à presença do agente etiológico.

Conclusões

1 – A produção de fenóis voláteis em vinho por *Brettanomyces* e *Dekkera* em quantidades superiores ao limiar de percepção causa perdas econômicas ao setor vinícola. Isto torna de fundamental importância o desenvolvimento de metodologias que permitam a detecção destas leveduras para que práticas enológicas adequadas sejam adotadas objetivando evitar ou minimizar tais perdas.

Referências

AGNOLUCCI, M.; VIGENTINI, I.; CAPURSO, G.; MERICO, A.; TIRELLI, A.; COMPAGNO, C.; FOSCHINO, R.; NUTI, M. Genetic Diversity and physiological traits of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from Tuscan Sangiovese wines. **International Journal of Food Microbiology**, v.130, n.3, 238-244, 2009.

BRASIL. Lei nº 7.678, de 08 de novembro de 1988.

CHATONNET, P.; DUBOURDIEU, D.; BOIDRON, J.N. The influence of *Brettanomyces/Dekkera* sp. yeasts and lactic acid bacteria on the ethylphenol content of red wines. **American Journal of Viticulture and Enology**, v. 46, n. 4, 463-468, 1995.

CIANI, M.; FERRARO, L. Role of oxygen on acetic acid production by *Brettanomyces/Dekkera* in winemaking. **Journal Science Food Agriculture**, 75, 489-495, 1997.

COCOLIN, L.; RANTSIOU, K.; IACUMIN, L.; ZIRONI, R.; COMI, G. Molecular detection and identification of *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* and *Brettanomyces/Dekkera anomalous* in spoiled wines. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n.3, 1347-1355, 2004.

COSTA, A.; BARATA, A.; MALFEITO-FERREIRA, M.; LOUREIRO, V. Evaluation of the inhibitory effect of dimethyl dicarbonate (DMDC) against wine microorganisms. **Food Microbiology**, v. 25, 422-427, 2008.

COUTO, J.A.; BARBOSA, A.; HOGG, T. A simple cultural method for the presumptive detection of the yeasts *Brettanomyces/Dekkera* in wines. **Letters in Applied Microbiology**, 41, 505-510, 2005.

da SILVA, G. A. *Dekkera* e *Brettanomyces*: leveduras não competitivas que deterioram vinhos: características, problemas e identificação. Embrapa Uva e Vinho. **Documento**, v.1, p.1-62, 2005.

di MARO, E.; ERCOLINI, D.; COPPOLA, S. Yeast dynamics during spontaneous wine fermentation of the Catalanesca grape. **International Journal of Food Microbiology**, 117, 201-210, 2007.

du TOIT, W.J.; PRETORIUS, I.S.; LONVAUD-FUNEL, A. The effect of sulphur dioxide and oxygen on the viability and culturability of a strain of *Acetobacter pasteurianus* and a strain of *Brettanomyces bruxellensis* isolated from wine. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, 862-871, 2005.

DUGELAY, I.; GUNATA, Z.; SAPIS, J.C.; BAUMES, R.; BAYONOVE, C. Role of cinnamoyl esterase activities from enzyme preparations on the formation of volatile phenols during winemaking. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 41, 2092-2096, 1993.

FUGELSANG, K.C.; EDWARDS, C.G. **Wine Microbiology: Pratical Applications and Procedures**. 2ed. 393p. 2006.

GERBAUX, V.; VINCENT, B.; BERTRAND, A. Influence of maceration temperature and enzymes on the content of volatile phenols in Pinot Noir wines. **American Journal of Enology and Viticulture**, 53, 131-137, 2002.

HARRIS, V.; FORD, C.M.; JIRANEK, V.; GRBIN, P.R. *Dekkera* and *Brettanomyces* growth and utilization of hydroxycinnamic acids in synthetic media. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 78, 997-1006, 2008.

HARRIS, V.; FORD, C.M.; JIRANEK, V.; GRBIN, P.R. Survey of enzyme activity responsible for phenolic off-flavour production by *Dekkera* and *Brettanomyces* yeast. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 81, 1117-1127, 2009.

HIERRO, N.; GONZÁLEZ, A.; MAS, A.; GUILLAMÓN, J.M. New PCR-based methods for yeast identification. **Journal of Applied Microbiology**, 97, 792-801, 2004.

IBEAS, J.I.; LOZANO, I.; PERDIGONES, F.; JIMENEZ, J. Detection of *Dekkera-Brettanomyces* in sherry by a nested PCR method. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, n.3, 998-1003, 1996.

MIOT-SERTIER, C.; LONVAUD-FUNEL, A. Development of a molecular method for the typing of *Brettanomyces bruxellensis* (*Dekkera bruxellensis*) at the strain level. **Journal of Applied Microbiology**, 102, 555-562, 2007.

OELOFSE, A.; PRETORIUS, I.S.; du TOIT, M. Significance of *Brettanomyces* and *Dekkera* during winemaking: a synoptic review. **South African Journal of Enology and Viticulture**, 29, 128-144, 2008.

PHISTER, T.G.; MILLS, D.A. Real-time PCR assay for detection and enumeration of *Dekkera bruxellensis* in wine. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 12, 7430-7434, 2003.

RENOUF, V.; FALCOU, M.; MIOT-SERTIER, C.; PERELLO, M.C.; REVEL, G. de.; LONVAUD-FUNEL, A. Interactions between *Brettanomyces bruxellensis* and other yeast species during the initial stages of winemaking. **Journal of Applied Microbiology**, 100, 1208-1219, 2006.

RENOUF, V.; LONVAUD-FUNEL, A. Development of an enrichment medium to detect *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis*, a spoilage wine yeast, on the surface of grape berries. **Microbial Research**, 162, 154-167, 2007.

RENOUF, V.; STREHAIANO, P.; LONVAUD-FUNEL, A. Effectiveness of dimethyldicarbonate to prevent *Brettanomyces bruxellensis* growth in wine. **Food Control**, 19, 208-216, 2008.

RODRIGUES, N.; GONÇALVES, G.; PEREIRA-DA-SILVA, S.; MALFEITO-FERREIRA, M.; LOUREIRO, V. Development and use of a new medium to detect yeasts of the genera *Dekkera/Brettanomyces*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, 588-599, 2001.

SUÁREZ, R.; SUÁREZ-LEPE, J.A.; MORATA, A.; CALDERÓN, F. The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera*: a review.

Food Chemistry, n. 102, 10-21, 2007.

3. CAPÍTULO 1:

DESENVOLVIMENTO DE MEIO DE CULTIVO SELETIVO

E/OU DIFERENCIAL PARA O ISOLAMENTO

DE LEVEDURAS *BRETTANOMYCES/DEKKERA*

DESENVOLVIMENTO DE MEIO DE CULTIVO SELETIVO E/OU DIFERENCIAL PARA O ISOLAMENTO DE LEVEDURAS *Brettanomyces* e *Dekkera*

Autor: Taís Letícia Bernardi

Orientador: Patrícia Valente

Coorientador: Gildo Almeida da Silva

RESUMO

Leveduras pertencentes aos gêneros *Brettanomyces/Dekkera* são difíceis de serem recuperadas em estudos ecológicos devido ao seu lento crescimento em meios de cultivo comumente utilizados para isolamento de microrganismos de um modo geral. Este fato ocorre porque fungos filamentosos e demais leveduras de crescimento rápido, impedem ou limitam o seu desenvolvimento. Meios de cultivo seletivos e/ou diferenciais constituem uma importante ferramenta para isolamento destes gêneros. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um meio de cultivo seletivo e/ou diferencial para estas leveduras. Meios de cultivo contendo diferentes fontes de carbono e nitrogênio, indicadores de pH e concentrações de etanol e cicloheximida foram preparados e inoculados com espécies de leveduras comumente encontradas em vinho. O meio para *Brettanomyces/Dekkera* foi composto de YCB 1,17%, peptona 0,50%, extrato de levedura 0,25%, azul de bromofenol 22 mg.L⁻¹, extrato de malte 1,0%, cicloheximida 0,005%, etanol 7,0% e ágar 2,0%. Este meio, com algumas modificações, foi utilizado para isolamento de leveduras pertencentes ao gênero de amostras de vinho. Foram obtidos 62 isolados, os quais foram submetidos à PCR com oligonucleotídeos específicos para *D. bruxellensis*. Do total de isolados, 51 (81,26%) demonstraram pertencer a esta espécie, fato que não significa que os demais não pertençam ao gênero. O uso do meio de cultivo associado à PCR mostrou possuir elevada aplicabilidade no isolamento e identificação de leveduras *Brettanomyces/Dekkera* de vinhos e outras fontes.

DEVELOPMENT OF SELECTIVE AND/OR DIFFERENTIAL CULTURE MEDIA FOR THE ISOLATION OF YEASTS *Brettanomyces* AND *Dekkera*

Author: Taís Letícia Bernardi

Advisor: Dra. Patrícia Valente

Co-Advisor: Dr. Gildo Almeida da Silva

ABSTRACT

Yeasts belonging to the genera *Brettanomyces* and *Dekkera* are difficult to recovering in ecological studies due to its slow growth in culture media commonly used for isolation of microorganisms in general. This occurs because filamentous fungi and yeasts growing too fast, prevent or limit their development. Selective and/or differential culture media are an important tool for isolation of these genera. The aim of this study was to develop a selective and/or differential culture media for these yeasts. Culture media containing different source of carbon and nitrogen, pH indicators and concentrations of ethanol and cycloheximide were prepared and inoculated with yeast species commonly found in wine. The media for *Brettanomyces* and *Dekkera* was composed of 1.17% YCB, 0.50% peptone, 0.25% yeast extract, 22 mg.L⁻¹ bromophenol blue, 1.0% malt extract, 0.005% cycloheximide, 7.0% ethanol and 2.0% agar. This media, with some modifications, was used for isolation of yeasts belonging to this genera from wine samples. Sixty-two isolates were obtained and subjected to PCR with specific primers for *D. bruxellensis*. From the total isolates, 51 (81.26%) showed to belong to this species. This fact does not mean that others do not belong to the genera. The use of culture media associated with PCR revealed its high applicability in the isolation and identification of *Brettanomyces* and *Dekkera* yeasts in wines and other sources.

3.1 INTRODUÇÃO

A deterioração microbiana é um problema no setor produtivo de alimentos e bebidas. Pode ter início nos diferentes estádios da produção, desde a colheita, armazenagem da matéria-prima, processo de manufatura e até mesmo durante a comercialização. No caso de bebidas, um dos segmentos que pode ser afetado é a produção de vinhos. Em vinhos, muitos estudos têm sido realizados para determinar a origem da sua contaminação, melhorar as técnicas de detecção e erradicar a contaminação (Renouf & Lonvaud-Funel, 2007). Dentre os microrganismos contaminantes de vinho, leveduras pertencentes aos gêneros *Brettanomyces/Dekkera* são os mais preocupantes devido a perdas econômicas que estas podem ocasionar.

Brettanomyces/Dekkera já foram encontradas em barris, no ar da sala de esmagamento, em tanques e em linhas de fermentação (Connel et al., 2002). No entanto, a presença na superfície das bagas de uvas tem sido investigada, mas não claramente demonstrada (Renouf & Lonvaud-Funel, 2007). O tamanho da população parece ser de fundamental importância na identificação de leveduras em um sistema microbiano, mas o estado do microrganismo também desempenha papel importante (Renouf & Lonvaud-Funel, 2007). As condições limitantes ou estressantes do meio onde estão os microrganismos pode dificultar e até mesmo inibir seu bom desenvolvimento

em meio de cultivo. Na superfície da casca da uva, a limitação de nutrientes, mudanças súbitas nas condições climáticas ou pulverização de defensivos agrícolas constituem condições de estresse que podem levar os microrganismos a um estado específico, diferente do estado atingido em condições favoráveis como o mosto (Roszak & Cowell, 1987). O vinho influencia o estado fisiológico dos microrganismos (Millet & Lonvaud-Funel, 2000) podendo modificar sua detecção (Renouf & Lonvaud-Funel, 2007).

Em vinhos tintos, depois das fermentações alcoólica e malolática, estas leveduras crescem em baixo número durante o envelhecimento em barris, tanques e garrafas (Miot-Sertier & Lonvaud-Funel, 2007), tornando necessário o desenvolvimento de meios de cultivo enriquecidos, seletivos e diferenciais, que propiciem o crescimento desses microrganismos, para sua detecção e isolamento. É importante também o desenvolvimento de métodos moleculares que permitam a detecção e a identificação rápida e segura destes microrganismos.

Em muitos estudos ecológicos, os gêneros *Brettanomyces/Dekkera* não são referidos, fato que pode ser explicado pela dificuldade de recuperação de utensílios contaminados com outras leveduras ou fungos filamentosos que possuem crescimento mais rápido, o que limita ou impede seu crescimento em meio de cultivo em placa (Rodrigues et al., 2001).

Rodrigues et al., (2001), desenvolveram um meio de cultivo seletivo e/ou diferencial sólido para recuperar leveduras *Brettanomyces/Dekkera* de vinho e de outros ambientes relacionados. A seletividade do meio foi conseguida por Rodrigues et al. (2001) utilizando etanol como única fonte de

carbono e cicloheximida como inibidor de *Saccharomyces* sp, e a capacidade diferencial através da adição de corante, indicador de pH, verde de bromocresol e de um precursor de 4-etil-fenol, ácido *p*-cumárico. Outro meio diferencial líquido de enriquecimento para detecção preventiva de *Brettanomyces/Dekkera* foi desenvolvido por Couto et al. (2005). O meio é composto por glicose como fonte de carbono e energia, cicloheximida e cloranfenicol para prevenir crescimento de leveduras e bactérias, respectivamente, tendo o ácido *p*-cumárico como precursor de compostos fenólicos. O monitoramento do crescimento de leveduras pertencentes ao gênero neste meio foi realizado por meio de análise visual de turbidez e olfatória de compostos fenólicos. Mais recentemente, Renouf e Lonvaud-Funel (2007) desenvolveram um meio de cultivo para melhorar a detecção de leveduras *Br. bruxellensis* por técnicas moleculares. Com o auxílio de ambas as técnicas, com 10 dias de cultivo foi possível detectar claramente esta espécie. Os autores conseguiram demonstrar que leveduras *Br. bruxellensis* estão presentes na uva ainda no campo.

O principal campo de aplicação de meios de cultivo seletivos e/ou diferenciais encontra-se na área médica. Estes meios são utilizados na identificação de fungos e bactérias patogênicos. A capacidade seletiva ou diferencial dos meios é geralmente conseguida pelo uso de antibióticos, corantes e emprego de determinados açúcares. Estes três itens podem discriminar determinados microrganismos possibilitando sua detecção.

Meios seletivos também têm sido propostos para outros fins. O isolamento de espécies de *Lactobacillus* de amostras fecais, por exemplo, foi

proposto por Hartemink et al. (1997). O meio permitiu a obtenção de lactobacilos fecais comuns e nenhuma bactéria ácido-lática, permitindo, assim, sua aplicação na detecção de lactobacilos em probióticos. George et al. (1979) propuseram um meio seletivo e diferencial para o isolamento de *Clostridium difficile* de amostras fecais. As colônias de *C. difficile* apresentaram propriedades fluorescentes que foram suficientes para a sua identificação presuntiva. Para isolamento e diferenciação morfológica de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* de cáries um meio de cultivo foi desenvolvido por Saraiva et al. (2011). Peixoto et al. (2006) testaram diferentes antibióticos na formulação de um meio de cultivo semi-seletivo para isolamento de *Xanthomonas campestris* da videira. Um meio de cultivo que promovesse principalmente o isolamento de *Metarhizium acridum* de solo foi desenvolvido por Fernandes et al. (2010). O meio promoveu o crescimento de colônias maiores e com maior quantidade de conídios, os quais facilitam a identificação deste fungo entomopatogênico.

Analisando-se os trabalhos descritos, é possível perceber a importância do desenvolvimento de meios de cultivo seletivos e/ou diferenciais tanto para obtenção de diagnóstico clínico quanto para obtenção de gêneros importantes. Como o desenvolvimento de meios de cultivo pode ser uma ferramenta adequada para a detecção e isolamento de microrganismos, este trabalho teve como objetivo desenvolver um meio de cultivo seletivo e/ou diferencial para isolamento de leveduras dos gêneros *Brettanomyces* e *Dekkera*.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Desenvolvimento de meio de cultivo seletivo e/ou diferencial para o isolamento de leveduras *Brettanomyces/Dekkera*

Um meio de cultivo seletivo e/ou diferencial foi desenvolvido seguindo a estratégia para obtenção de cultivo diferencial descrita por Rodrigues et al. (2001) para *Dekkera/Brettanomyces*. O meio DBDM possui a seguinte composição: Yeast Nitrogen Base (YNB) 0,67%, etanol 6%, cicloheximida 10mg.L⁻¹, ácido *p*-cumárico 100mg.L⁻¹, verde de bromocresol, 22mg.L⁻¹, ágar 2%, pH 5,4. Diferentes modificações em relação ao meio descrito foram testadas e estão apresentadas na Tabela 1. Como indicador de pH, foram testados os corantes vermelho de metila, vermelho de fenol, azul de bromotimol e azul de bromofenol. Como fontes de carbono foram empregados glicose, etanol, galactose, celobiose, salicina e lactato. Como fontes de nitrogênio foram usados peptona, extrato de levedura, lisina e extrato de malte.

Tabela 1- Diferentes formulações testadas para o desenvolvimento de meio de cultivo seletivo e/ou diferencial para *Brettanomyces/Dekkera*

Meio	Indicador de pH	Fonte de Carbono ¹	Fonte de Nitrogênio ²	Cicloheximida	Etanol
DBDM modificado*	Verde de bromocreso I	-	YNB	0,01%	6%
M1	Vermelho de metila	-	YNB	0,01%	6%
M2	Vermelho de fenol	-	YNB	0,01%	6%
M3	Azul de bromotimol	-	YNB	0,01%	6%
M4	Azul de bromofenol	-	YNB	0,01%	6%
M5 (Controle)	-	Glicose	YNB	-	-
M6	-	-	YNB	0,01%	6%
M7	-	Galactose	YNB	0,01%	6%
M8	-	Celobiose	YNB	0,01%	6%
M9	-	Salicina	YNB	0,01%	6%
M10	-	Lactato	YNB	0,01%	6%
M11	-	Galactose	YNB	0,01%	-
M12	-	Lactato	YNB	0,01%	-
M13	-	Celobiose	YNB	-	6%
M14	-	Salicina	YNB	-	6%
M15 (Controle)	-	YCB	Peptona Extrato de levedura	-	-
M16	-	YCB	Peptona Extrato de levedura	0,01%	6%
M17	-	YCB	Lisina	-	6%
M18	-	YCB	Lisina Extrato de levedura	-	6%

*sem adição de ácido *p*-cumárico e correção de pH.

¹YCB: 0,67%; demais fontes: 0,50%

²YNB: 0,67%; peptona: 0,5%; extrato de levedura: 0,25%; lisina: 0,56%

Os meios foram inoculados com linhagens de leveduras: *Br. custersianus* NRRL Y-6653, *Br. naardenensis* NRRL Y-17526, *Br. nanus* NRRL Y-17527, *D. anomala* NRRL Y-17522 e *D. bruxellensis* NRRL Y-12961. Como controle negativo foram usadas as linhagens *Sacch. cerevisiae* NRRL Y-12632, *H'spora uvarum* NRRL Y-1614, *H'spora osmophila* NRRL Y-1613, *H'spora valbyensis* NRRL Y-1626, *H'spora vineae* NRRL Y-17529, *H'spora guillermondii* NRRL Y-1625 e *H'spora occidentalis* NRRL Y-7946. A avaliação foi realizada

por meio da observação da capacidade de crescimento e a alteração da cor do meio de cada uma das leveduras. A partir dos resultados obtidos para as formulações da Tabela 1, novas modificações foram propostas até a obtenção do meio de cultivo que se mostrou adequado.

3.2.2 Isolamento de leveduras *Brettanomyces*/*Dekkera* de amostras de vinho

O isolamento de leveduras pertencentes aos gêneros *Brettanomyces* e *Dekkera* foi realizado a partir de garrafas de vinho fino tinto seco produzido no Rio Grande do Sul e de amostras de vinho comum. As amostras de vinho comum e algumas amostras de vinho tinto seco foram coletadas diretamente da pipa em uma vinícola da Região de Bento Gonçalves/RS. De cada amostra, uma alíquota de 50 mL foi filtrada em membrana de 0,45 μm , em condições estéreis. As membranas foram colocadas no meio de cultivo anteriormente desenvolvido. As placas foram incubadas a 28°C por duas semanas. De cada amostra que apresentou crescimento, até 5 colônias foram escolhidas para isolamento e purificação. Foram selecionadas apenas as linhagens capazes de crescer e alterar a cor do meio de cultivo. As linhagens foram mantidas em tubos contendo meio de cultivo sólido cuja composição foi a seguinte: Yeast Carbon Base (YCB) 1,17%, peptona 0,5%, extrato de levedura 0,25%, extrato de malte 0,75%, glicose 0,25%, carbonato de cálcio 0,5% e ágar 2,0%. Os tubos foram cobertos com vaselina líquida estéril e mantidos em temperatura ambiente.

3.2.3 Recuperação de células de *Dekkera* e de *Brettanomyces* em meio de cultivo líquido

Para recuperação de células dos gêneros *Brettanomyces* e *Dekkera* de amostras de vinho, foram testados três meios líquidos: Brain-Heart Infusion (BHI (Infusão cérebro-coração)) (Acumedia/Neogen), triptona de soja (Himedia) e triptona de soja contendo extrato de levedura (Himedia). Cada meio foi preparado na concentração indicada pelo fabricante. A linhagem *D. bruxellensis* NRRL Y-12961 foi crescida em 50 mL de meio de cultivo líquido (YCB 1,17%, peptona 0,5%, extrato de levedura 0,25%, extrato de malte 1,0%, pH 5,0) sob agitação, por 7 dias. Após o crescimento, foi utilizado para inocular 450 mL de vinho esterilizado por filtração em membrana com poros de 0,22 μ m (Millipore, USA). O vinho propositalmente contaminado foi transferido para garrafa, a qual foi fechada com rolha e armazenada na posição vertical ao abrigo de luz. O espaço superior não foi tratado com nenhum gás inerte. Alíquotas de 20 mL do vinho, deliberadamente contaminado, foram inoculadas em 100 mL de cada um dos meios de recuperação. As culturas foram mantidas em temperatura ambiente. Após 24, 48 e 168 horas, alíquotas de 20 mL de cada um dos caldos de recuperação foram filtradas em membrana estéril com poro de 0,45 μ m (Millipore, USA). As membranas foram colocadas em placas contendo o meio DBDM (Rodrigues et al., 2001) e o Meio para *Brettanomyces/Dekkera* (Meio BD) - desenvolvido no presente trabalho. As placas foram incubadas a 28°C por até 14 dias para acompanhamento do crescimento.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para o isolamento de leveduras pertencentes aos gêneros *Brettanomyces/Dekkera*, o uso de meios de cultivo que favoreçam o seu crescimento em detrimento dos demais microrganismos que possam estar presentes na amostra é de fundamental importância. Estas leveduras possuem como uma de suas características o lento crescimento em meio de cultivo, levando aproximadamente 14 dias para o aparecimento de suas colônias sobre o meio. Como os demais microrganismos possuem maior velocidade de crescimento, muitas vezes impedem ou limitam o crescimento de leveduras destes gêneros. Com isso, a disponibilidade de meios de cultivo seletivos e/ou diferenciais constitui importante fator quando se deseja obter linhagens destas leveduras.

O meio de cultivo seletivo e/ou diferencial para leveduras pertencentes aos gêneros *Brettanomyces/Dekkera* foi desenvolvido baseando-se no meio descrito por Rodrigues et al. (2001). Inicialmente, de todas as formulações testadas, o melhor crescimento das linhagens inoculadas pode ser observado no meio M15 - Controle. Esta formulação, no entanto, permitiu o crescimento de todos os microrganismos utilizados, inclusive *Sacch. cerevisiae* e espécies de *Hanseniaspora*, sem permitir nenhum tipo de diferenciação ou seletividade. A partir desta, outras formulações foram desenvolvidas (Tabela 2),

adicionando-se cicloheximida e etanol para inibir o crescimento de leveduras *Sacch. cerevisiae* e *Hanseniaspora* sp., respectivamente.

Tabela 2 - Novas formulações desenvolvidas com base nos resultados apresentados no meio M15 (Controle)

Meio	Indicador de pH	Fonte de Carbono	Fonte de Nitrogênio	Cicloheximida	Etanol
M15 (Controle)	Azul de bromofenol	YCB	Peptona	-	-
M15A	Azul de bromofenol	YCB	Extrato de levedura	0,01%	6,0%
M15B	Azul de bromofenol	YCB	Peptona	0,01%	5,0%
M15C	Azul de bromofenol	YCB	Extrato de levedura	0,005%	6,0%
M15D	Azul de bromofenol	YCB	Peptona	0,005%	5,0%
			Extrato de levedura		

Nos meios da Tabela 2, verificou-se que a adição de 0,005% de cicloheximida foi suficiente para inibição de *Sacch. cerevisiae*, mas ainda foi possível observar o crescimento de *Hanseniaspora* sp. A concentração de etanol foi elevada para 7,0%, o que se mostrou suficiente para a inibição de espécies *Hanseniaspora*. Como as leveduras *Brettanomyces/Dekkera* apresentaram crescimento fraco e lento, extrato de malte foi adicionado ao meio. A lenta taxa de crescimento e o requerimento nutricional fastidioso apresentado por estas leveduras requerem períodos de incubação de duas semanas, tempo superior ao normalmente utilizado para diagnóstico de rotina, o qual varia de 3 a 6 dias (Oelofse et al., 2008).

O meio para *Brettanomyces/Dekkera* (Meio BD) foi composto de YCB 1,17%, peptona 0,50%, extrato de levedura 0,25%, azul de bromofenol 22 mg.L⁻¹, extrato de malte 1,0%, cicloheximida 0,005%, etanol 7,0% e ágar 2,0%. O presente meio difere daquele desenvolvido por Rodrigues et al. (2001) por

não utilizar precursor fenólico e por utilizar como indicador de pH o azul de bromofenol. A faixa de pH para a viragem do indicador azul de bromofenol é mais baixa (3,0 – 4,6) do que para o verde de bromocresol (3,8 – 5,4), o que, na prática, apresenta vantagens, pois permitiu que o meio fosse preparado em pH mais baixo (pH 5), servindo como agente inibidor do crescimento de bactérias. A cicloheximida é um inibidor da biossíntese de proteínas em organismos eucarióticos com largo espectro de efeito antifúngico, tornando-se um excelente agente seletivo (Fernandes et al., 2010).

O meio de cultivo desenvolvido neste trabalho permitiu o crescimento de leveduras *Brettanomyces/Dekkera* inibindo as demais. As leveduras *Brettanomyces/Dekkera* foram capazes de alterar a coloração do meio. Esta mudança de coloração é devida à produção de ácido por estas leveduras, que são conhecidas pela sua elevada capacidade de produzir ácido acético (Ciani & Ferraro, 1997). No caso específico de vinho, isto torna-se um fator importante por se constituir em um indicativo de que o microrganismo isolado pertence aos gêneros *Brettanomyces/Dekkera*.

Comparando-se com o meio desenvolvido por Couto et al. (2005), o presente meio também difere pela não utilização de compostos fenólicos e por permitir que colônias isoladas sejam obtidas, por se tratar de um meio sólido. Colônias de *Brettanomyces/Dekkera*, no entanto, podem ser perdidas quando seu cultivo é realizado em meio sólido devido à sua baixa taxa de crescimento.

O isolamento de leveduras pertencentes aos gêneros *Brettanomyces/Dekkera* foi realizado com o meio desenvolvido no presente trabalho, seguido de algumas modificações. Não foi utilizado o corante azul de

bromofenol, pois na prática, foi verificado que antes mesmo que surgissem as primeiras colônias na superfície da membrana depositada sobre o meio, já ocorria a mudança da sua coloração. Isto ocorre porque a faixa de viragem de pH deste indicador situa-se entre 3,0 e 4,6, enquanto que o pH do vinho está próximo ao limite inferior de viragem, entre 3,0 – 3,5. Além disso, como era utilizada membrana filtrante e a mesma era depositada sobre a placa, não havia justificativa para a adição do corante.

Como no processo de vinificação em tinto pode ser permitido que ocorra a fermentação malolática, realizada por bactérias lácticas, foi acrescido cloranfenicol ao meio. O uso de agente antibacteriano é importante em meios onde há uma mistura de microrganismos. Em ambientes onde há a presença de leveduras e bactérias, estas podem dificultar a detecção de leveduras (Sandven et al., 1999). O cloranfenicol é um antibiótico de largo espectro, possuindo efetividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo grande parte das bactérias anaeróbicas (Fernandes et al., 2010).

Para o isolamento de leveduras de amostra de vinho, o meio foi constituído de YCB 1,17%, peptona 0,5%, extrato de levedura 0,25%, extrato de malte 1,0%, ágar 1,5%, cloranfenicol 0,05%, etanol 7,0%, cicloheximida 0,005%, pH 4,5-5,0 (Meio BD1). Das amostras que apresentaram crescimento, foram escolhidas até 5 colônias. Estas colônias foram purificadas por meio de dois isolamentos consecutivos no meio anterior acrescido de corante indicador de pH (Meio BD2, composto por YCB 1,17%, peptona 0,5%, extrato de levedura 0,25%, extrato de malte 1,0%, azul de bromofenol 0,0022%, ágar 1,5%, etanol 7,0%, cicloheximida 0,005%, pH 5,0-5,5). Nesta avaliação foi

observada a capacidade de cada levedura em alterar a coloração. A escolha destas linhagens se deu devido a uma característica destas leveduras, em mudar a coloração do meio. Esta mudança se deve à produção de ácido acético, o que torna maior a possibilidade das mesmas pertencerem ao gênero *Brettanomyces/Dekkera*. Foram obtidas 62 linhagens (Tabela 3).

Tabela 3 – Isolados obtidos após plaqueamento em Meio para Isolamento

Vinho	Isolados	Total
Comum 1: Cabernet Sauvignon	VT001, VT002, VT003, VT004, VT005	12
Comum 2: Cabernet Sauvignon	VT006, VT007, VT008, VT009, VT010	
Comum 3: vinho branco	VT011	
Comum 4: vinho tinto	VT012	
Garrafa 1: Tanat	VTSF001, VTSF002, VTSF003, VTSF004, VTSF005	27
Garrafa 2: Cabernet Sauvignon/Merlot	VTSF006, VTSF007, VTSF008, VTSF009, VTSF010	
Garrafa 3: Cabernet Sauvignon/Merlot	VTSF011	
Garrafa 4: Cabernet Sauvignon	VTSF016	
Garrafa 5: Cabernet Sauvignon/Merlot	VTSF017, VTSF018, VTSF019, VTSF020, VTSF021	
Garrafa 6: Merlot/Tanat/Cabernet	VTSF026	
Garrafa 7: Cabernet Sauvignon	VTSF027, VTSF029, VTSF030, VTSF031	
Garrafa 8: Merlot	VTSF050, VTSF051, VTSF052, VTSF053, VTSF054	
Barrica 1: Merlot – safra 2007 – amostra 5	LVB001, LVB002, LVB003, LVB004, LVB005	23
Barrica 2: Merlot – safra 2007 – amostra 4	LVB006, LVB007, LVB008, LVB009, LVB010	
Barrica 3: Merlot – safra 2006 – amostra 3	LVB011, LVB012, LVB013, LVB014, LVB015	
Barrica 4: Tempranillo – safra 2004 – amostra 2	LVB016, LVB017, LVB018, LVB019, LVB020	
Barrica 5: Cabernet Sauvignon – safra 2007 – amostra 3	LVB021, LVB022	
Barrica 6: Cabernet Sauvignon – safra 2007 – amostra 4	LVB023	
		62

O uso de meios de cultura disponíveis para a seleção e/ou a diferenciação de microrganismos é um procedimento útil e aplicado a diversas

áreas da microbiologia. A seleção e/ou diferenciação pode ser realizada para identificar grupos de microrganismos, gêneros e espécies. O meio de cultura Candida CHROMagar tem sido utilizado para isolamento, *screening* rápido e identificação presuntiva do gênero *Candida* (Tornai-Lehoczki et. al., 2003). O desenvolvimento de um meio seletivo para detecção de bífido-bactérias foi desenvolvido por Hartemink et al. (1996). Outro meio seletivo foi proposto por Sakai et al. (2010) para distinguir *Lactobacillus casei* e *L. paracasei* de *L. rhamnosus* presentes em amostras de fezes humanas. A quantificação de *Lactobacillus plantarum*, uma bactéria probiótica, foi conseguida com o desenvolvimento de um meio seletivo e diferencial contendo ciprofloxacina como inibidor da maioria das bactérias intestinais (Bujalance et al., 2006). Um meio seletivo e diferencial para *Vibrio cholerae* e *Vibrio vulnificus* foi desenvolvido por Massad & Oliver (1987). Jawad et al. (1994) propuseram um meio seletivo e diferencial para isolamento de *Acinetobacter* spp. de amostras clínicas. A comparação deste com outros meios seletivos e diferenciais mostrou que o mesmo se destaca pela recuperação e seletividade. Para outra espécie clínica, *Corynebacterium urealyticum*, um meio seletivo e diferencial para seu isolamento foi proposto por Garcia-Bravo et al. (1997).

O uso de meios de cultivo seletivo e/ou diferencial facilita o isolamento por fornecer um *screening* inicial. Após, a confirmação desta identificação pode ser realizada por meio de critérios taxonômicos ou técnicas moleculares. O uso de meios de cultivo associado à identificação molecular tem se tornado uma ferramenta muito importante por fornecer o resultado da identificação em um espaço de tempo menor quando comparado aos critérios

taxonômicos, fato que se torna ainda mais importante quando se trabalha com os gêneros *Brettanomyces/Dekkera*. Estas leveduras, quando submetidas à identificação por assimilação e fermentação de diferentes fontes de carbono e a utilização de fontes de nitrogênio específicas, apresentam comportamento variável, dificultando a correta identificação.

Para leveduras pertencentes aos gêneros *Brettanomyces/Dekkera*, muitos estudos envolvendo técnicas moleculares têm sido efetuados com o objetivo de facilitar e agilizar a identificação. Ibeas et al. (1996) isolaram leveduras de vinho xerez e submeteram estas leveduras à identificação de acordo com critérios taxonômicos padrões. Aquelas pertencentes aos gêneros *Brettanomyces/Dekkera* foram submetidas à técnica da PCR aninhada com oligonucleotídeos específicos. A técnica confirmou a identificação pelo método tradicional. Martorell et al. (2006) isolaram leveduras *D. bruxellensis* de diferentes fontes relacionadas com a produção de vinho e de diferentes regiões geográficas com o meio DBDM desenvolvido por Rodrigues et al. (2001) e efetuaram tipificação molecular por meio de análise de restrição do DNA mitocondrial (RFLP-mtDNA) para verificar o predomínio de cada padrão em cada uma das diferentes fontes. Os autores verificaram 3 padrões, sendo que um deles esteve presente em todas as fontes, enquanto os outros dois estavam presentes apenas em isolados de vinhos portugueses.

Como leveduras pertencentes aos gêneros *Brettanomyces/Dekkera* apresentam lento crescimento e se encontram em condições de estresse no vinho, diferentes meios de cultivo líquido foram testados com a finalidade de promover uma melhor recuperação destas células. Após filtração dos meios

líquidos, as membranas foram depositadas em placas contendo meios de cultivo sólido. Os meios utilizados foram DBDM (Rodrigues et. al., 2001) e Meio para Isolamento - desenvolvido neste trabalho. Foi observado o crescimento de um elevado número de colônias, impossibilitando a contagem das mesmas.

Quando uma alíquota de vinho, após 30 dias da inoculação com *D. bruxellensis*, foi filtrada e a membrana colocada nos meios sólidos DBDM (Rodrigues et al., 2001) e no Meio para Isolamento, verificou-se maior crescimento das células neste último (Figura 1). Para as filtrações realizadas em diferentes tempos de inoculação de uma alíquota de vinho nos caldos de recuperação, foi observado um maior crescimento no meio de cultivo desenvolvido aliado à recuperação das células em caldo contendo triptona de soja acrescido de extrato de levedura.

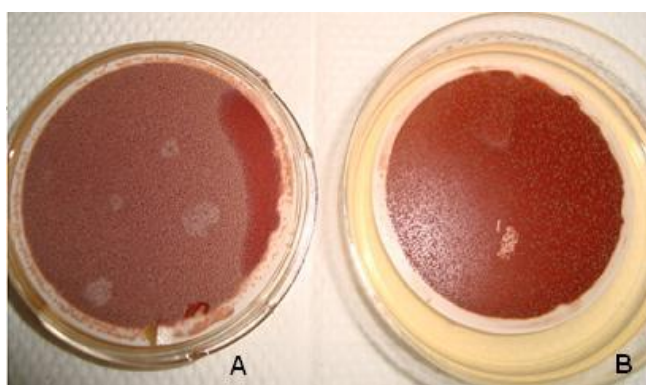


Figura 1- Crescimento de células de levedura *D. bruxellensis* em placa após 30 dias de inoculação em vinho. (A) meio sólido desenvolvido neste trabalho; (B) meio sólido DBDM (Rodrigues et al., 2001)

O resultado obtido neste trabalho está de acordo com os resultados obtidos por Renouf & Lonvaud-Funel (2007), que desenvolveram um meio de

enriquecimento que promoveu crescimento de leveduras *Br. bruxellensis* e possibilitou o aumento do limite de detecção por meio de técnicas moleculares.

Meios de enriquecimento são largamente utilizados para recuperação e seleção de microrganismos de difícil crescimento, que ao mesmo tempo se encontram em baixo número na amostra ou que podem estar na presença de substâncias inibidoras. Kenters et al. (2011) desenvolveram um meio para isolamento de bactérias fermentativas do rúmen. Com o meio, foi possível a detecção de novas bactérias do rúmen, resolvendo problemas de perdas de grupos de microrganismos quando outros métodos são usados. Meio de cultivo de pré-enriquecimento seguido de amplificação do DNA por meio de PCR para identificação de espécies de *Bartonella* foi utilizado por Bai et al. (2010). Van Damme et al. (2010) após usar diferentes meios de enriquecimento para quantificação de *Yersinia enterocolitica*, verificaram que o meio contendo peptona, sorbitol e bile, após 5 dias de incubação, não foi o mais adequado para a recuperação de células. No entanto, ao diminuir o tempo para 2 dias, o meio aumentou significativamente sua capacidade de recuperação mostrando que não apenas o meio de cultivo, mas também o tempo de incubação exerce efeito sobre o processo de recuperação. Diferentes meios para enriquecimento e isolamento de *Salmonella* spp. de filés de peixe foram avaliados por Pal & Marshall (2009). Dentre as diferentes combinações feitas o enriquecimento em caldo Rappaport-Vassiliadis seguido de isolamento em ágar bismuto-sulfito foi o que apresentou melhor resultado.

Com os dados aqui apresentados, é possível afirmar que o desenvolvimento de meio de cultivo seletivo e/ou diferencial para leveduras

Brettanomyces/Dekkera é importante não apenas para o setor vinícola como também para outros segmentos da indústria de bebidas e alimentos. Além de permitir o isolamento destas leveduras, que são de crescimento lento, permite também um *screening* rápido. O uso deste meio seguido de PCR com oligonucleotídeos específicos para *D. bruxellensis* agilizam o processo de identificação.

O isolamento de leveduras *Brettanomyces/Dekkera* de amostras de vinho pode ser facilitado por meio do uso de meio de enriquecimento contendo triptona de soja e extrato de levedura. O uso de meios de cultivo e a PCR com oligonucleotídeos específicos possuem, respectivamente, elevada aplicabilidade no isolamento e identificação de leveduras *Brettanomyces/Dekkera* de vinhos e de outras fontes.

3.4 REFERÊNCIAS

BAI, Y.; KOSOY, M.Y.; BOONMAR, S.; SAWATWONG, P.; SANGMANEEDET, S.; PERUSKI, L. F. Enrichment culture and molecular identification of diverse *Bartonella* species in stray dogs. **Vet Microbiol**, 146(3-4), 314–319. 2010.

BUJALANCE, C.; JIMÉNEZ-VALERA, M.; MORENO, E.; RUIZ-BRAVO, A. A selective differential medium for *Lactobacillus plantarum*. **J Microbiol Methods**, 66(3), 572–575. 2006.

CIANI, M.; FERRARO, L. Role of oxygen on acetic acid production by *Brettanomyces/Dekkera* in winemaking. **J Sci Food Agric**, 75, 489–495. 1997.

CONNELL, L.; STENDER, H.; EDWARDS, C.G. Rapid detection and identification of *Brettanomyces* from winery air samples based on peptide nucleic acid analysis. **Am. J. Enol. Vitic.**, 53(4), 322–324. 2002.

COUTO, J.A.; BARBOSA, A.; HOGG, T. A simple cultural method for the presumptive detection of the yeasts *Brettanomyces/Dekkera* in wines. **Lett Appl Microbiol**, 41(6), 505–510. 2005.

FERNANDES, E.K.; KEYSER, C.A.; RANGEL, D.E.; FOSTER, R.N.; ROBERTS, D.W. CTC medium: A novel dodine-free selective médium for isolating entomopathogenic fungi, especially *Metarhizium acridum*, from soil. **Biological Control**, 54, 197–205. 2010.

GARCIA-BRAVO, M.; AGUADO, J.M.; MORALES, J.M.; NORIEGA, A.R. Efficacy of a selective and differential medium for isolating *Corynebacterium urealyticum* from urine specimens. **Clin Microbiol Infect**, 3(5), 555–558. 1997.

GEORGE, W. L.; SUTTER, V.L.; CITRON, D.; FINEGOLD, S.M. Selective and differential medium for isolation of clostridium difficile. **J Clin Microbiol**, 9(2), 214–219. 1979.

HARTEMINK, R.; KOK, B.; WEENKB, G.; ROMBOUTS, F. Raffinose-*Bifidobacterium* (RB) agar, a new selective medium for bifidobacteria. **Journal of Microbiological Methods**, 27, 33–43. 1996.

IBEAS, J. I.; LOZANO, I.; PERDIGONES, F.; JIMENEZ, J. Detection of *Dekkera/Brettanomyces* strains in sherry by a nested PCR method. **Appl Environ Microbiol**, 62(3):998–1003. 1996.

JAWAD, A.; HAWKEY, P.M.; HERITAGE, J.; SNELLING, A.M. Description of leeds *Acinetobacter* medium, a new selective and differential medium for

isolation of clinically important *Acinetobacter* spp., and comparison with Herellea agar and Holton's agar. **J Clin Microbiol**, 32(10), 2353–2358. 1994.

KENTERS, N.; HENDERSON, G.; JEYANATHAN, J.; KITTELMANN, S.; JANSSEN, P.H. Isolation of previously uncultured rumen bacteria by dilution to extinction using a new liquid culture medium. **J Microbiol Methods**, 84(1), 52–60. 2011.

LAPOLLI, J.N.; MELLO, L.M.R.; TRARBACH, C.; BRENNER, G.; TEIXEIRA, A.N.; SANTIAGO, R.W.; COMIN, J.C. A competitividade da Vitivinicultura Brasileira: análise sensorial e programa de ação com destaque para o Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS: BANRISUL/EMBRAPA-CNPUV/SEBRAE/RS, 1995. 200p.

MARTORELL, P.; BARATA, A.; MALFEITO-FERREIRA, M.; FERNÁNDEZ-ESPINAR, M.T.; LOUREIRO, V.; QUEROL, A. Molecular typing of the yeast species *Dekkera bruxellensis* and *Pichia guilliermondii* recovered from wine related sources. **Int J Food Microbiol**, 106(1), 79–84. 2006.

MASSAD, G; OLIVER, J.D. New selective and differential medium for *Vibrio cholerae* and *Vibrio vulnificus*. **Appl Environ Microbiol**, 53(9), 2262–2264. 1987.

MILLET, V.; LONVAUD-FUNEL, A. The viable but non-culturable state of wine microorganisms during storage. **Lett Appl Microbiol**, 30(2), 136–141. 2000.

MIOT-SERTIER, C.; LONVAUD-FUNEL, A. Development of a molecular method for the typing of *Brettanomyces bruxellensis* (*Dekkera bruxellensis*) at the strain level. **J Appl Microbiol**, 102(2), 555–562. 2007.

OELOFSE, A.; PRETORIUS, I.; DU TOIT, M. Significance of *Brettanomyces* and *Dekkera* during winemaking: a synptic review. **S. Afr. J.Enol. Vitc.**, 29(2), 128–144. 2008.

PAL, A.; MARSHALL, D.L.. Comparison of culture media for enrichment and isolation of *Salmonella* spp. from frozen channel catfish and vietnamese basa fillets. **Food Microbiol**, 26(3), 317–319. 2009.

PEIXOTO, A.R.; MARIANO, R.L.R; VIANA, I.O. Meio semi-seletivo para isolamento de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Ciência Rural**, Santa Maria, 36(4), 1317–1320. 2006.

RENOUF, V.; LONVAUD-FUNEL, A. Development of an enrichment medium to detect *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis*, a spoilage wine yeast, on the surface of grape berries. **Microbiol Res**, 162(2), 154–167. 2007.

RODRIGUES, N.; GONÇALVES, G.; DA SILVA, S.P.; MALFEITO-FERREIRA, M.; LOUREIRO, V. Development and use of a new medium to detect yeasts of the genera *Dekkera/Brettanomyces*. **J Appl Microbiol**, 90(4), 588–599. 2001.

ROSZAK, D.B.; COLWELL, R.R. Survival strategies of bacteria in the natural environment. **Microbiol Rev**, 51(3), 365–379. 1987.

SAKAI, T.; OISHI, K.; ASAHARA, T.; TAKADA, T.; YUKI, N.; MATSUMOTO, K.; NOMOTO, K.; KUSHIRO, A. M-rtlv agar, a novel selective medium to distinguish *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus paracasei* from *Lactobacillus rhamnosus*. **Int J Food Microbiol**, 139(3), 154–160. 2010.

SANDVEN, P.; LASSEN, J. Importance of selective media for recovery of yeasts from clinical specimens. **J Clin Microbiol**, 37(11), 3731–3732. 1999.

SARAVIA, M.E.; NELSON-FILHO, P.; ITO, I.Y.; DA SILVA, L.A.B.; DA SILVA, R.A.B.; EMILSON, C.G. Morphological differentiation between *S. mutans* and *S. sobrinus* on modified sb-20 culture medium. **Microbiol Res**, 166(1), 63–67. 2011.

TORNAI-LEHOCZKI, J.; PÉTER, G.; DLAUCHY, D. Chromagar candida medium as a practical tool for the differentiation and presumptive identification of yeast species isolated from salads. **Int J Food Microbiol**, 86(1-2), 189–200. 2003.

VAN DAMME, I.; HABIB, I.; DE ZUTTER, L. *Yersinia enterocolitica* in slaughter pig tonsils: enumeration and detection by enrichment versus direct plating culture. **Food Microbiol**, 27(1), 158–161. 2010.

4. CAPÍTULO 2:

**CONSTRUÇÃO E PADRONIZAÇÃO DE PARES DE
OLIGONUCLEOTÍDEOS UNIVERSAIS PARA LEVEDURAS
E ESPECÍFICOS PARA *Dekkera bruxellensis***

CONSTRUÇÃO E PADRONIZAÇÃO DE PARES DE OLIGONUCLEOTÍDEOS UNIVERSAIS PARA LEVEDURAS E ESPECÍFICOS PARA *Dekkera bruxellensis*

Autor: Taís Letícia Bernardi

Orientador: Patrícia Valente

Coorientador: Gildo Almeida da Silva

Resumo

Leveduras pertencentes aos gêneros *Brettanomyces/Dekkera* quando presentes no vinho produzem compostos fenólicos voláteis que ao ultrapassarem o limiar de percepção conferem *off-flavours*, levando à depreciação do produto. A detecção e identificação destas leveduras por técnicas dependentes de cultivo nem sempre é satisfatória devido à baixa taxa de crescimento apresentada por estes gêneros. Técnicas de biologia molecular com oligonucleotídeos específicos constituem excelente alternativa, fornecendo o resultado em menor período de tempo. Com o objetivo de promover a identificação rápida de leveduras em vinhos, dois pares de oligonucleotídeos foram construídos: um par universal para leveduras e outro específico para *D. bruxellensis*. Os pares de oligonucleotídeos foram padronizados, separadamente, para utilização por meio da PCR. O par de oligonucleotídeos universal para leveduras apresentou produto de amplificação de 375 pb da região 18S do rDNA das diferentes espécies de leveduras testadas e o par específico para *D. bruxellensis* apresentou produto de amplificação de 690 pb da região 18S do rDNA apenas quando DNA desta levedura estava presente. Devido a aplicabilidade e importância de utilização destes oligonucleotídeos, os mesmos encontram-se em processo de patenteamento, para objetivos distintos.

CONSTRUCTION AND STANDARDIZATION OF PRIMERS PAIRS UNIVERSAL FOR YEAST AND SPECIFIC TO *Dekkera bruxellensis*

Author: Taís Letícia Bernardi

Advisor: Dra. Patrícia Valente

Co-Advisor: Dr. Gildo Almeida da Silva

Abstract

Yeasts belonging to the genera *Brettanomyces* and *Dekkera* when present in the wine producing volatile phenolic compounds to overcome the perception threshold confer off-flavors, leading to the depreciation of the product. The detection and identification of these yeasts by cultivation-dependent techniques are not always satisfactory due to low growth rate presented by these genera. Molecular biology techniques using primers are excellent alternative, providing the results in a shorter period of time. Aiming to promote the rapid identification of yeasts in wine, two pairs of primers were constructed: a universal pair for yeast and other specific for *D. bruxellensis*. The pairs of primers were standardized separately for use by means of PCR. The pair of universal primers for yeast showed amplification product of 375 bp of 18S rDNA region of different species of yeasts and the pair specific to *D. bruxellensis* showed amplification product of 690 bp 18S rDNA region only when DNA of this yeast was present. Because the applicability and importance of using these primers, they are in the process of patenting, for distinct objectives.

4.1 INTRODUÇÃO

O vinho é a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto simples de uva sã, fresca e madura. A denominação vinho é privativa ao produto assim obtido, sendo vetada sua utilização para produtos obtidos de quaisquer outras matérias-primas. O teor alcoólico, quantidade de açúcares residuais e coloração variam em função do tipo de vinho, apresentando valores de pH entre 3,0 – 4,0, dependendo da origem, proveniente da presença de ácidos orgânicos (Lei nº 7.678 de 08 de novembro de 1988).

Linhagens de leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* são responsáveis pelo processo fermentativo na elaboração de vinho e, juntamente com a matéria-prima, pela qualidade final do produto. Durante a conservação ou após envase, no entanto, há espécies de leveduras capazes de causar deterioração. No caso específico da indústria vinícola, atenção especial tem sido dada para leveduras pertencentes aos gêneros *Dekkera* e *Brettanomyces*, as quais são responsáveis por perdas no padrão de qualidade e econômicas. O desenvolvimento destas leveduras em vinho é preocupante, pois estas são encontradas frequentemente em vinhos após 6 a 10 meses de armazenamento (Cocolin et al., 2004).

Algumas linhagens de leveduras pertencentes aos gêneros *Brettanomyces* e *Dekkera* são altamente acidogênicas. São capazes de

produzir grandes quantidades de ácido acético por meio da oxidação do etanol (Ibeas, et al., 1996). Outros produtos provenientes do metabolismo destas leveduras são compostos fenólicos voláteis, como 4-etil-fenol e 4-etil-guaiacol, que são responsáveis por conferir *off-flavours* ao vinho, levando à depreciação do produto. A produção de fenóis voláteis está ligada à atividade sequencial de duas enzimas. Os ácidos hidroxicinâmicos são descarboxilados em derivados vinil pela ação da enzima hidroxicinamato descarboxilase. Estes derivados são reduzidos a derivados etil pela enzima vinil-fenol redutase (Suarez et al., 2007). Os fatores que afetam a produção de 4-etil-fenol, particularmente aqueles relacionados à produção do vinho, não são bem estabelecidos (Dias et al., 2003). A produção de fenóis voláteis pode ocorrer em diferentes estádios do processo de vinificação (Couto et al., 2005). A deterioração de vinhos por leveduras dos gêneros *Brettanomyces* e *Dekkera*, no entanto, está associada ao envelhecimento em barris de madeira insuficientemente sanitizados (Chatonnet et al., 1993), sendo considerado o principal habitat dessa levedura, onde podem crescer a partir de pequenas quantidades de açúcares residuais presentes nos vinhos (Chatonnet et al., 1995).

Brettanomyces e *Dekkera* já foram encontradas em barris, no ar da sala de esmagamento, tanques e linhas de fermentação (Connel et al., 2002). Sua presença, no entanto, na superfície das cascas das uvas tem sido investigada, mas não claramente demonstrada (Renouf & Lonvaud-Funel, 2007). O tamanho da população parece ser de fundamental importância na identificação de leveduras em um sistema microbiano, mas o estado do microrganismo também desempenha papel importante (Renouf & Lonvaud-

Funel, 2007). O vinho influencia o estado fisiológico dos microrganismos (Millet & Lonvaud-Funel, 2000), podendo modificar sua detecção (Renouf & Lonvaud-Funel, 2007). Na superfície da casca da uva, a limitação de nutrientes, as mudanças súbitas nas condições climáticas ou o uso de fungicidas constituem condições de estresse para os microrganismos, diferentes daquelas oferecidas pelo mosto fresco, consideradas favoráveis ao seu desenvolvimento (Roszak & Cowell, 1987).

Em vinhos, depois das fermentações alcoólica e malolática, leveduras *Brettanomyces* e *Dekkera* crescem em baixo número durante o envelhecimento em barris, tanques e garrafas (Miot-Sertier & Lonvaud-Funel, 2007). A detecção e identificação destas leveduras são realizadas com o uso de meios de cultivo seletivos e/ou diferenciais seguido de identificação tradicional, análises cromatográficas e técnicas moleculares. Uma das principais características destas leveduras é o lento crescimento em meio de cultivo, o qual pode chegar a aproximadamente 14 dias. Este fato, associado à identificação tradicional, por testes fisiológicos e bioquímicos e características morfológicas, faz com que o tempo para identificação torne-se ainda mais prolongado. Além do que, estas leveduras apresentam comportamento variável para a maioria dos testes de assimilação e fermentação utilizados para identificação tradicional (van-Rij, 1984; Silva, 2005), dificultando ainda mais a identificação.

Técnicas cromatográficas também têm sido empregadas para a detecção da presença de fenóis voláteis em vinhos, como um indicativo da presença destas leveduras. Dentre as técnicas têm-se GC/MS Sniffing, HS-

SPME, HPLC/MS, HPLC/UV e GC/DIC (da Silva, 2005). Todas são técnicas bem padronizadas e bem conhecidas, no entanto, apresentam como inconveniente a dificuldade de identificação do agente etiológico. Diferentes espécies de microrganismos podem produzir fenóis voláteis mesmo que em quantidades reduzidas quando em presentes no vinho. Entre os microrganismos estão bactérias ácido-láticas e a levedura *Pichia guillermondii* (Romano et al., 2009; Suarez et al., 2007).

A dificuldade de recuperação de leveduras dos gêneros *Brettanomyces* e *Dekkera* presentes em materiais contaminados com outras leveduras e fungos filamentosos está relacionada com a velocidade de crescimento. Como esses últimos possuem crescimento rápido, a detecção de *Brettanomyces* e de *Dekkera* é limitada ou dificultada em meio de cultivo em placa. Pode ser esta a explicação pela qual estas leveduras não são referidas em estudos ecológicos feitos por Rodrigues et al. (2001) e nos relatos de Renouf & Lonvaud-Funel (2007). Estes fatos tornam ainda mais importante o desenvolvimento de ferramentas moleculares para identificação destes microrganismos que não dependam de cultivo em placa. Estas podem auxiliar na rápida tomada de decisão na necessidade de intervir e, assim, evitar perdas significativas de qualidade. Além disso, técnicas moleculares bem ajustadas, apresentam-se como excelente alternativa não apenas por sua rapidez, mas também pela segurança, pela especificidade relativa e reprodutibilidade.

De acordo com Phister & Mills (2003), a detecção direta de microrganismos do vinho por meio de métodos moleculares apresenta vantagens em relação aos métodos de enriquecimento e plaqueamento. Uma

das vantagens se deve ao fato de detectar populações de microrganismos que não respondem ao cultivo em meios enriquecidos ou aqueles onde há escassez de nutrientes. As células podem se encontrar em um estado viável mas não cultivável. Análises diretas são rápidas, permitindo que os dados sejam usados para a tomada de decisões sobre ações profiláticas e assim reduzir ou evitar problemas graves de deterioração. Métodos moleculares, além de tudo, permitem o processamento de um maior número de amostras que demais técnicas de plaqueamento.

Os métodos de identificação tradicional de leveduras são trabalhosos, consomem tempo, dispendiosos e necessitam de pessoal habilitado no processo de identificação. Levam de 3 a 4 semanas e muitas vezes fornecem resultados ambíguos. Com os métodos moleculares, o tempo de análise é geralmente reduzido, melhorando a fidelidade por meio da análise direta do DNA, não variando com o estado fisiológico da levedura (Mitrakul et al., 1999). O desenvolvimento de métodos moleculares tem tornado a identificação de leveduras mais sensível e específica em muitos países produtores de vinhos, como Itália (Cocolin et al., 2004), França (Barbin et al., 2008; Miot-Sertier & Lonvaud-Funel, 2007; Renouf et al., 2006), Austrália (Curtin et al., 2007), Espanha (Ibeas et al., 1996) e Estados Unidos (Stender et al., 2001).

Ibeas et. al. (1996) diagnosticaram por meio de análises químicas a presença de grandes quantidades de ácido acético em vinho xerez na ausência de bactéria. As leveduras isoladas foram identificadas como pertencentes ao gênero *Brettanomyces* e *Dekkera* de acordo com critérios taxonômicos

tradicionais. Para se certificarem desta identificação, os autores desenvolveram um método de PCR aninhada para detectar linhagens destes gêneros. O método consiste em duas reações de amplificação consecutivas. O produto da primeira reação serve como DNA molde para a segunda reação, aumentando assim, a especificidade. A técnica mostrou-se eficiente para a detecção e identificação de linhagens pelo uso direto de uma suspensão aquosa de células. Também não houve interferência de células de *Saccharomyces* presentes em quantidade superior.

A Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (QPCR) é um método que oferece vantagens em relação a outros em termos de velocidade e habilidade para quantificar o DNA da população microbiana (Phister & Mills, 2003). O método, porém, exige uso de equipamento especial, de valor superior ao usado para PCR, e de corantes especiais, além de sua padronização ser mais trabalhosa. Este método foi utilizado por Phister & Mills (2003) para detecção e identificação de *D. bruxellensis* em vinho. Inicialmente, seqüências do gene 26S do DNA ribossômico (rDNA) para as cinco espécies de *Brettanomyces* e *Dekkera* e de *Sacch. cerevisiae* foram alinhadas e regiões específicas para *D. bruxellensis* foram utilizadas para a construção do par de oligonucleotídeos. O limite de detecção conseguido com a técnica e os oligonucleotídeos desenvolvidos foi de aproximadamente 1 UFC.mL⁻¹. Além disso, a técnica apresentou reprodutibilidade na presença de DNA não-molde de *Sacch. cerevisiae*. O método QPCR quantificou eficientemente as populações de *D. bruxellensis*.

Cocolin et al. (2004), por meio de análise de PCR com enzima de restrição, buscaram otimizar um protocolo independente de cultivo para detecção e identificação de *Br. bruxellensis* e *Br. anomalus*. Para isso, inicialmente, os autores construíram um par de oligonucleotídeos específico para as espécies, baseando-se na região D1/D2 da subunidade 26S do rDNA. Após amplificação, os produtos de PCR correspondentes às espécies foram submetidos à análise de restrição com diferentes enzimas, dentre as quais, apenas a enzima *Ddel* foi capaz de diferenciar as espécies estudadas. O par de oligonucleotídeos apresentou elevada especificidade para *Br. bruxellensis* e *Br. anomalus*, tornando possível a amplificação de DNA extraído diretamente de vinho. No entanto, observou-se a desvantagem de um elevado limite de detecção, $10^4 - 10^5$ células.mL⁻¹, fazendo com que a extração do DNA seja realizada de um maior volume de vinho. Para confirmação dos resultados as técnicas de DGGE (Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante), RT-PCR com oligonucleotídeos universais e hibridização de RNA foram utilizadas.

No Brasil, poucas são as pesquisas envolvendo leveduras contaminantes dos gêneros *Brettanomyces* e *Dekkera*. As existentes estão relacionadas à contaminação por estes gêneros em processos fermentativos para a produção de cachaça (Dato et al., 2005) e etanol (Liberal et al., 2005; Liberal et. a., 2007). A presença destes gêneros em vinho tem sido pouco explorada. Guillen et al. (2007) realizaram análises microbiológica e química de amostras de vinhos provenientes do Vale dos Vinhedos (RS) para determinação da presença destas leveduras. A análise microbiológica foi realizada por meio de plaqueamento em meio de cultivo seletivo para

Brettanomyces e *Dekkera*. Quanto às análises químicas, foi determinado SO₂ livre e total, pH, álcool, açúcares residuais, acidez total e acidez volátil. Os autores verificaram que 15,38% dos vinhos apresentaram colônias típicas de *Brettanomyces* e *Dekkera* e que os níveis de SO₂ estavam baixos e de açúcares elevados. Os resultados levaram os autores a concluir que o vinho apresentava-se favorável ao desenvolvimento destes microrganismos por sua prevenção não estar sendo realizada adequadamente.

Com o objetivo de ampliar as informações sobre leveduras pertencentes aos gêneros *Brettanomyces* e *Dekkera*, dois pares de oligonucleotídeos foram construídos. Um par universal para leveduras e o outro específico para a espécie *D. bruxellensis*. Estes pares foram construídos com o objetivo final de serem utilizados em uma metodologia rápida de identificação de leveduras *D. bruxellensis* diretamente do vinho, dispensando etapa de cultivo.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Construção e padronização de oligonucleotídeos

Dois pares de oligonucleotídeos foram construídos e padronizados. Um par universal para leveduras e o outro específico para leveduras *D. bruxellensis*. Para a construção dos oligonucleotídeos, sequências pertencentes à região 18S do rDNA de leveduras disponíveis no GenBank foram alinhadas com o programa MegAlign e os pares de oligonucleotídeos foram construídos com o auxílio do Gene Link Software. As sequências alinhadas pertencem às espécies de leveduras *Brettanomyces* e *Dekkera* e *Hanseniaspora* e *Sacch. cerevisiae* (Tabela 4). A análise de PCR *in silico* foi realizada com o programa FastPCR com culturas-tipo das espécies anteriormente citadas. Para o par de oligonucleotídeos universais para leveduras (YeastF e YeastR), a análise mostrou a amplificação de um segmento de 375 pb. Para o par de oligonucleotídeos específico para *D. bruxellensis* (DbrF e DbrR) houve a amplificação de um segmento de 690 pb.

A padronização das concentrações de reagentes e das condições térmicas de amplificação foi realizada em um volume final de 25 μ L. Para ambos os pares foram usados tampão da enzima Taq DNA polimerase 1x (Invitrogen Corporation, USA), 1,5 U de Taq DNA polimerase Platinum (Invitrogen Corporation, USA), 0,1 mM de cada dNTP (dATP, dTTP, dCTP e

dGTP) (Invitrogen Corporation, USA), 2,5 mM de MgCl₂ (Invitrogen Corporation, USA), 0,8 pmol de cada oligonucleotídeo (Integrated DNA Technologies Inc., USA) e 1 µL de DNA extraído.

As condições térmicas de amplificação foram padronizadas para 25 ciclos. Para o par de oligonucleotídeos universais para leveduras, foram efetuadas desnaturação a 94°C por 30 segundos, pareamento a 68°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos. Foram utilizadas uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos e uma extensão final a 72°C por 5 minutos. E para o par de oligonucleotídeos específicos para *D. bruxellensis* empregaram-se desnaturação a 94°C por 30 segundos, pareamento a 60°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos. Também foram utilizadas uma desnaturação inicial a 94°C e uma extensão final a 72°C, ambos por 5 minutos.

Para a padronização do par de oligonucleotídeos universais de leveduras foi utilizado DNA molde de leveduras e de fungos filamentosos extraído por método fenol-clorofórmio (Tabela 4). Enquanto que, para o par de oligonucleotídeos específicos para *D. bruxellensis*, foi utilizado DNA molde apenas de leveduras (Tabela 4).

Tabela 4 – Linhagens de microrganismos utilizadas para padronização dos oligonucleotídeos universais para leveduras e específicos para *D. bruxellensis*

Leveduras	Fungos filamentosos
<i>Brettanomyces custersianus</i> NRRL Y-6653	An 29*
<i>Bretanomyces naardenensis</i> NRRL Y-17526	Botrytis cinerea
<i>Brettanomyces nanus</i> NRRL Y-17527	<i>Aspergillus ochraceus</i>
<i>Dekkera anomala</i> NRRL Y-17522	<i>Penicillium</i>
<i>Dekkera bruxellensis</i> NRRL Y-12961	<i>Aspergillus niger</i> Aln 29
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> NRRL Y-12632	<i>Aspergillus ochraceus</i> Ao 2774
<i>Hanseniaspora uvarum</i> NRRL Y-1614	<i>Cladosporium</i>
<i>Hanseniaspora osmophila</i> NRRL Y-1613	B5*
<i>Hanseniaspora valbyensis</i> NRRL Y-1626	DTR*
<i>Hanseniaspora vineae</i> NRRL Y-17529	<i>Aspergillus niger</i> Na
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i> NRRL Y-1625	OSM*
<i>Hanseniaspora occidentalis</i> NRRL Y-7946	<i>Aureobasidium pullulans</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Embrapa 1vvt/97	<i>Fusarium graminearum</i>
<i>Picchia norvegensis</i> Embrapa 2vvt/97	
<i>Zigosaccharomyces rouxii</i> Embrapa 4vvt/97	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Embrapa 1vvt/97	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Embrapa 21vvt/97	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Embrapa 22vvt/97	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Embrapa 25vvt/97	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Embrapa 27vvt/97	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Embrapa 33vvt/97	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Embrapa 39vvt/97	

* linhagens de fungos filamentosos ainda não identificadas.

4.2.2 Extração de DNA com tampão de lise celular

Para a extração de DNA as linhagens foram crescidas em YEPG sólido (glicose 2,0%, peptona 1,0%, extrato de levedura 0,5% e ágar 1,5%) ou mosto ágar (da Silva, 1996). Uma alçada de células foi transferida para tubo contendo 500 μ L de tampão de lise (cloreto de sódio 0,15M (Vetec, BR), Tris-HCl 50mM (Invitrogen Life Technologies, USA), EDTA 10mM (Sigma-Aldrich CO., USA), SDS 2,0% (Labsynth, BR); pH 8,0). Os tubos foram homogeneizados e incubados em banho-maria a 60°C durante 1 hora. Foram adicionados 500 μ L de uma mistura fenol (Sigma Chemical, CO., USA) : clorofórmio (Reagen, BR) (1:1). A amostra foi homogeneizada e centrifugada a 10000 x g por 15 minutos (Sorval, USA). A fase aquosa foi transferida para novo tubo e igual volume de clorofórmio foi adicionado. A amostra foi homogeneizada e centrifugada a 10000 x g por 15 minutos. As etapas de transferência da fase aquosa para novo tubo, adição de clorofórmio e a centrifugação foram repetidas. A fase aquosa foi transferida para novo tubo e o DNA foi precipitado pela adição de igual volume de isopropanol (Chimie Test, BR) a frio. Os tubos foram homogeneizados e deixados em repouso por 30 minutos sob refrigeração. A amostra foi centrifugada a 10000 x g por 20 minutos. O isopropanol foi descartado e o precipitado lavado com etanol 70% (v/v) a frio. Deixou-se o DNA secar a temperatura ambiente e dissolveu-se em 100 μ L de TE (Tris-HCl 10mM pH 7,6, EDTA 1mM pH 8,0). O DNA foi estocado a -18°C para usos futuros.

4.2.3 Eletroforese

Após cada teste, o produto resultante da amplificação, realizado em termociclador PTC-100 Peltier (Bio-Rad Life Sciences, USA) foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,2% (Sigma Chemical, USA) com tampão TBE 1X (Tris-Base 0,1M (Invitrogen Life Technologies, USA), ácido bórico 0,09 M (Merck, Germany), EDTA 1 mM (Sigma-Aldrich CO., USA) pH 8,3), revelado com brometo de etídeo e fotografado utilizando transiluminador UV Eagle Eye II Video Imaging System (Stratagene, California, USA).

4.2.4 Teste de sensibilidade

O limite de detecção da PCR com cada par de oligonucleotídeo foi realizado substituindo-se a água da reação por suspensão contendo diferentes concentrações de células. Para o par de oligonucleotídeos Yeast foi utilizada a linhagem de levedura *Sacch. cerevisiae* Embrapa 1vvt e para o par de oligonucleotídeos Dbr a linhagem *D. bruxellensis* NRRL Y-12961. As reações foram preparadas para um volume final de 25 μ L de acordo com os volumes e concentrações estabelecidos. As condições térmicas de amplificação foram realizadas conforme estabelecidas para cada par de oligonucleotídeos contendo 30 ciclos cada. Após, o produto da amplificação foi submetido à eletroforese em gel de agarose.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um par de oligonucleotídeos universais para leveduras foi construído e padronizado para ser utilizado em PCR como controle positivo de amplificação de DNA, para a padronização de extração, padronização da amplificação e detecção de contaminação por leveduras nos casos de controle negativo não operante. A PCR utilizando DNA molde de leveduras de diferentes espécies mostrou, após eletroforese, produto de amplificação de 375 pb (Figura 2). Inicialmente, os oligonucleotídeos foram construídos visando a amplificação de fungos filamentosos e de leveduras. Com DNA molde de fungos filamentosos foi observada amplificação para poucas linhagens (Figura 3), e assim mesmo as bandas se apresentaram muito fracas. Estes resultados indicam que o par de oligonucleotídeos desenvolvido tem especificidade mais efetiva para leveduras, uma vez que para fungos filamentosos a amplificação foi fraca ou inexistente. Pode também indicar que o processo de extração do DNA de fungos filamentosos deva ser otimizado para maior disponibilidade de DNA molde. O objetivo de amplificação universal de fungos, portanto, não foi atingido pelo menos com o processo de extração empregado. Deve-se levar em consideração que a metodologia usada para a construção dos oligonucleotídeos partiu do alinhamento de apenas espécies de leveduras. A busca no GenBank de sequências homólogas aos oligonucleotídeos

desenvolvidos demonstra que os mesmos possuem 100% de homologia apenas com espécies de leveduras, corroborando com os dados de amplificação obtidos apenas para esses microrganismos. Ao utilizar DNA molde de diferentes linhagens de leveduras pertencentes à coleção de microrganismos da Embrapa Uva e Vinho sempre foi possível observar produto de amplificação de 375 pb como está apresentado na Figura 4.

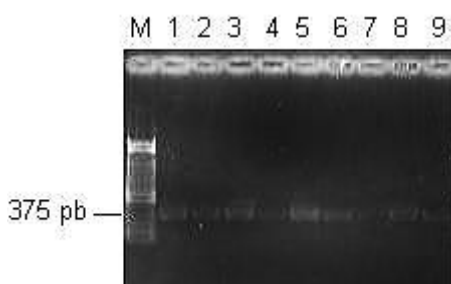


Figura 2 - Produto de amplificação de um segmento específico de 375 pb da região 18S do rDNA de leveduras de diferentes espécies. M – Marcador 100 bp; 1 – *Sacch. cerevisiae* NRRL Y-12632; 2 – *D. bruxellensis* NRRL Y-12961; 3 – *Br. custersianus* NRRL Y-6653; 4 – *H'spora valbyensis* NRRL Y-1626; 5 – *H'spora vineae* NRRL Y-17529; 6 – *Br. nanus* NRRL Y-17527; 7 – *D. anomala* NRRL Y-17522; 8 – *H'spora uvarum* NRRL Y-1614; 9 – *H'spora osmophila* NRRL Y-1613.

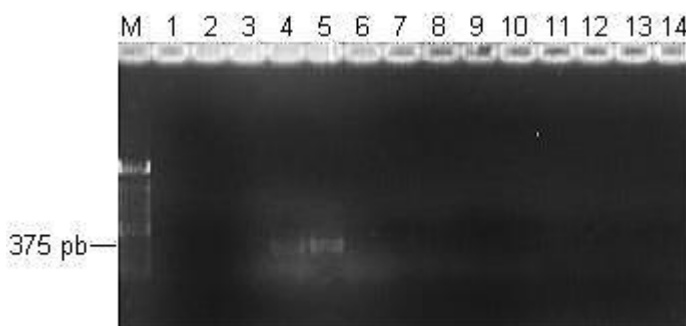


Figura 3 - Produto de amplificação de um segmento específico de 375 pb da região 18S do rDNA de diferentes linhagens de fungos filamentosos. M - Marcador 100 bp; 1 – An 29; 2 – *Botrytis cinerea*; 3 – *Aspergillus ochraceus* Aoch; 4 – *Penicillium* sp.; 5 – *Aspergillus niger* (Anl 29); 6 – An 2; 7 – *Aspergillus ochraceus* (Ao 2774); 8 – *Cladosporium* sp.; 9 – B5; 10 – DTR; 11 – *Aspergillus niger* (An); 12 – OSM; 13 – *Aureobasidium pullulans* (ABP); 14 – *Fusarium graminearum* (Fg)

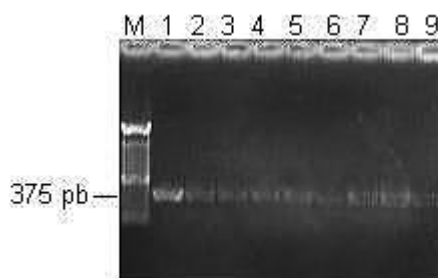


Figura 4 - Produto de amplificação de um segmento específico de 375 pb da região 18S do rDNA de diferentes linhagens de leveduras. M – Marcador 100 bp; 1 – *Sacch. cerevisiae* Embrapa 1 vvt/97; 2 – *Picchia norvegensis* Embrapa 2 vvt/97; 3 – *Zigosaccharomyces rouxii* Embrapa 4 vvt/97; 4 – *Sacch. cerevisiae* Embrapa 21 vvt/97; 5 – *Sacch. cerevisiae* Embrapa 22 vvt/97; 6 – *Sacch. cerevisiae* Embrapa 25 vvt/97; 7 – *Sacch. cerevisiae* Embrapa 27 vvt/97; 8 – *Sacch. cerevisiae* Embrapa 33 vvt/97; 9 – *Sacch. cerevisiae* Embrapa 39 vvt/97.

A construção e padronização de oligonucleotídeos gerais e/ou universais têm sido realizadas tanto para identificação de todas as espécies de um determinado gênero quanto para um determinado grupo de microrganismos. Um par de oligonucleotídeos construído para amplificar a região ITS de ascomicetos foi desenvolvido por Larena et al. (1999). Os autores foram capazes de amplificar eficientemente todas as amostras de DNA de ascomicetos testadas com um limite de sensibilidade de 10^{-8} μ g de DNA. Shen et al. (2005) desenvolveram um par de oligonucleotídeos específicos para o gênero de bactérias *Gordonia*, o qual possui espécies com habilidade para degradar poluentes ambientais, xenobióticos ou polímeros naturais que lentamente se degradam. O par de oligonucleotídeos construído foi capaz de amplificar um fragmento de 829 pb da região 16S do rDNA por meio da PCR. Com o objetivo de detectar, de maneira geral, populações bacterianas capazes de degradar compostos aromáticos, Sei et al. (1999) desenvolveram dois pares

de oligonucleotídeos que amplificam fragmentos dos genes da catecol 1,2-dioxigenase e catecol 2,3-dioxigenase. A aplicabilidade dos pares de oligonucleotídeos foi validada por meio de PCR de DNA de bactérias ambientais que degradam fenol e/ou benzoato. Os resultados obtidos mostraram que com os oligonucleotídeos desenvolvidos foi possível detectar uma considerável quantidade de bactérias que degradam compostos aromáticos por quebra como a do catecol. Martin & Rygiewicz (2005) desenvolveram oligonucleotídeos da região ITS do rDNA de basidiomicetos e ascomicetos com a finalidade de amplificar DNA de fungos de plantas sem que o DNA destas últimas pudesse interferir na amplificação. A discriminação foi possível, o que tornou os oligonucleotídeos úteis em estudos de fungos ectomicorrízicos e de comunidades da filosfera. A PCR usando oligonucleotídeos para a região 18S do rRNA também foi utilizada para detecção de leveduras presentes em presunto (Sanz et al., 2005). Os autores verificaram que a amplificação da região conservada de espécies de leveduras pode ser utilizada como uma ferramenta para detecção de baixos níveis de células em produtos cárneos.

Os resultados obtidos com o par de oligonucleotídeos aqui desenvolvido demonstraram que o mesmo pode ser usado como controle positivo de amplificação sempre que o DNA de leveduras estiver presente. O par de oligonucleotídeos em questão possui grande potencial de utilização para verificar a eficiência de processos de extração de DNA e a presença de substâncias inibidoras da Taq DNA polimerase. Para testar estas hipóteses, diferentes métodos de extração e a capacidade de inibição da PCR por

diferentes compostos foram testados. Além disso, os oligonucleotídeos podem ser usados para mostrar se o controle negativo não operante está contaminado com DNA de levedura.

Como métodos de extração alternativos ao método padrão com tampão de lise foram utilizados fervura e congelamento/descongelamento. A extração consistiu em submeter uma suspensão de células de leveduras *Dekkera bruxellensis* NRRL Y-12961 e *Saccharomyces cerevisiae* Embrapa 1vvt/97 a fervura a 90°C por 2 minutos e congelamento/descongelamento, seguidos de breve agitação vigorosa. Após cada um dos procedimentos, alíquotas de 1 µl foram usadas como DNA molde na PCR. As alíquotas não foram submetidas a nenhum procedimento de purificação, ou seja, juntamente com o DNA havia restos celulares. A Figura 5 mostra o produto de amplificação obtido para as espécies *D. bruxellensis* NRRL Y-12961 e *Sacch. cerevisiae* Embrapa 1vvt/97 após extração pelos três diferentes métodos. Verifica-se que o par de oligonucleotídeos pode ser facilmente utilizado por meio da PCR como ferramenta para verificar a eficiência de diferentes metodologias de extração de DNA.

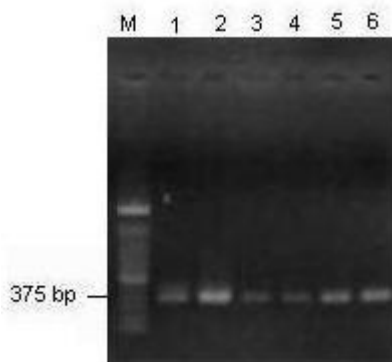


Figura 5 – Produto de amplificação de um segmento específico de 375 pb da região 18S do rDNA de *Sacch. cerevisiae* e *D. bruxellensis* após PCR utilizando DNA molde extraído por diferentes processos. M – Marcador 100 bp; 1 – *Sacch. cerevisiae* Embrapa 1vvt/97 – tampão de lise celular; 2 – *D. bruxellensis* NRRL y-12961 – tampão de lise celular; 3 – *Sacch. cerevisiae* Embrapa 1vvt/97 – processo de fervura; 4 – *D. bruxellensis* NRRL Y-12961 – processo de fervura; 5 – *Sacch. cerevisiae* Embrapa 1vvt/97 – processo de congelamento/descongelamento; 6 – *D. bruxellensis* NRRL Y-12961 – processo de congelamento/descongelamento.

Depois de confirmar a capacidade de utilização do par de oligonucleotídeos como controle positivo de extração, a hipótese de que o mesmo pode ser utilizado com êxito na detecção de substâncias inibidoras da PCR foi testada. Reações onde a água foi substituída por soluções de diferentes concentrações de quercitina, resveratrol, tanino, ácido gálico e catequina foram preparadas. Dependendo da concentração utilizada de cada um dos compostos, foi possível observar a inibição da PCR. Para quercitina e resveratrol a inibição ocorreu apenas em concentrações elevadas. Para o tanino, o ácido gálico e a catequina, baixas concentrações foram capazes de inibir a reação. Estes resultados confirmam as hipóteses de utilidade deste par de oligonucleotídeos, para avaliar processos de extração e inibição da PCR.

A detecção de *Dekkera* e *Brettanomyces* pode ser realizada por meios de cultivo seletivos e/ou diferenciais associados à identificação

tradicional, por cromatografia e por técnicas moleculares. Como estas leveduras apresentam, como característica, um crescimento lento, é importante que as técnicas sejam rápidas e sempre que possível independentes de cultivo. Técnicas de biologia molecular são capazes de atender a estes requisitos. Dentre as técnicas disponíveis, a PCR é amplamente utilizada por ser simples, rápida e de baixo custo, em relação às demais.

Um par de oligonucleotídeos específicos para *D. bruxellensis* foi construído para a detecção desta espécie por PCR. O par de oligonucleotídeos foi capaz de amplificar apenas quando DNA de *D. bruxellensis* foi utilizado (Figura 6). Este resultado mostra a concordância com a busca de sequências homólogas no GenBank para os oligonucleotídeos construídos, a qual remete a 100% de homologia apenas para *D. bruxellensis*.

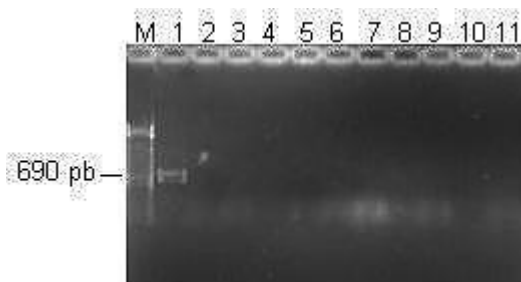


Figura 6 – Produto de amplificação de um segmento específico de 690 pb da região 18S do rDNA de *D. bruxellensis*. M – Marcador 100 bp; 1 – *D. bruxellensis* NRRL Y-12961; 2 – *Sacch. cerevisiae* NRRL Y-12632; 3 – *Sacch. cerevisiae* Embrapa 1vvt/97; 4 – *Br. custersianus* NRRL Y-6653; 5 – *Br. naardenensis* NRRL Y-17526; 6 – *Br. nanus* NRRL Y-17527; 7 – *D. anomala* NRRL Y-17522; 8 – *H'spora uvarum* NRRL Y-1614; 9 – *H'spora osmophila* NRRL Y-1613; 10 – *H'spora valbyensis* NRRL Y-1626; 11 – *H'spora vineae* NRRL Y-17529.

Considerando-se os riscos da presença de *D. bruxellensis* em vinhos, poucos são os oligonucleotídeos disponíveis para sua detecção e

identificação. Um par de oligonucleotídeos específico para detecção de *D. bruxellensis* foi construído por Phister & Mills (2003). Os autores, por meio de PCR em tempo real (QPCR), promoveram a amplificação de um segmento de 79 pb do gene 26S do DNA ribossômico. A QPCR também foi utilizada por Delaherche et al. (2004) para amplificação de um segmento específico do gene *rad4* de *D. bruxellensis*. O mesmo gene e a mesma técnica foram utilizados por Tessonnière et al. (2009) para amplificação de um fragmento de 108 pb. O uso da QPCR tem como principal vantagem em relação à PCR convencional a combinação de detecção do DNA alvo e a quantificação do produto amplificado (Smith & Osborn 2008). A técnica, no entanto, requer uma curva-padrão para cada gene, o que pode variar em diferentes laboratórios, dificultando a comparação de dados (Ginzinger, 2002). Além disso, tanto o equipamento quanto os reagentes utilizados são de alto custo, inviabilizando o uso da técnica para fins práticos e para diagnóstico de rotina. Cocolin et al. (2004) otimizaram um protocolo de detecção e identificação por meio da PCR convencional seguida da digestão do produto amplificado com enzimas de restrição. O uso de PCR na detecção de *Br. bruxellensis* também tem sido proposto por Contreras et al. (2008). A opção dos autores pela técnica foi devido ao fato de a mesma fornecer resultado em 48 horas quando comparado com técnicas microbiológicas que necessitam de 120 a 240 horas e também pelo menor custo quando comparada a outras técnicas moleculares.

São vários os exemplos de construção, padronização e uso de oligonucleotídeos específicos para uma dada espécie de microrganismos, objetivando uma detecção e/ou identificação rápida. A região 18S do rRNA foi

utilizada por Mayoral et al. (2005) para construção de oligonucleotídeos específicos para detecção de *Kluyveromyces marxianus* em iogurte por meio da PCR. Um par de oligonucleotídeos específicos para identificar *Leishmania (Viannia) braziliensis* por PCR foi desenvolvido por Marcussi et al. (2008). Com a técnica, os autores obtiveram a amplificação de um fragmento de 536 pb apenas com o DNA desta espécie, indicando a potencialidade de uso para diagnóstico e estudos epidemiológicos. Zeng et al. (2004) desenvolveram dois pares de oligonucleotídeos para a detecção rápida de *Wallemia sebi*, um fungo comumente encontrado em ambientes agrícolas, por meio de PCR convencional ou PCR em tempo real. Ambos os métodos mostraram-se rápidos, sensíveis e específicos para a espécie, facilitando a investigação da sua distribuição, ecologia e diagnóstico. A identificação de *Sacch. cerevisiae*, com oligonucleotídeos específicos e PCR, provenientes de diferentes alambiques produtores de cachaça foi realizada por Bernardi et al. (2008). Oligonucleotídeos específicos para *Zygosaccharomyces bailli* foram construídos por Rawsthorne & Phister (2006) para amplificar um segmento do gene D1/D2 da subunidade 26S do rRNA. Os mesmos foram utilizados por meio de QPCR de amostras de sucos e vinho consistindo em um método rápido e acurado para estabelecer a população de células viáveis e não-viáveis de *Zygosacch. bailli*.

O teste de sensibilidade realizado para ambos pares de oligonucleotídeos mostrou que os mesmos são capazes de detectar 5 células na reação.

Os isolados obtidos com os meios desenvolvidos (Meio para Isolamento e Meio para Confirmação) foram submetidos a PCR com oligonucleotídeos específicos para *D. bruxellensis*. Do total de 62 linhagens (Tabela 3), 51 (82,26%) apresentaram produto de amplificação. Considerando-se as linhagens obtidas de vinhos comuns, 11 (91,67%) apresentaram produto de amplificação. É importante destacar que os vinhos comuns são aqueles que não se enquadram nas categorias de vinhos de mesa, finos e especiais (Lapolli et al., 1995). Para as linhagens obtidas de vinhos engarrafados e de pipas, foram obtidos produto de amplificação para 22 (81,48%) e 18 (78,26%) linhagens, respectivamente. Foram analisados 40 vinhos engarrafados, e destas, 8 (20%) apresentaram contaminação por *D. bruxellensis*. Foram obtidas 14 linhagens diretamente de uma vinícola do Rio Grande do Sul. O isolamento foi realizado pela própria vinícola em placas contendo Meio de Cultura para *Brettanomyces* (Millipore, USA). Este meio é usado para monitoramento de *Brettanomyces/Dekkera* durante o envelhecimento do vinho em pipas de madeira. Os isolados foram submetidos à PCR com oligonucleotídeos específicos para *D. bruxellensis* com o objetivo de comparar a eficiência de detecção entre os dois diferentes métodos. Após amplificação por PCR com oligonucleotídeos específicos para *D. bruxellensis*, 10 (71,43%) isolados apresentaram produto de amplificação. Tanto para os isolados obtidos com o meio desenvolvido no presente trabalho quanto para os obtidos da vinícola, não se pode afirmar que aqueles que não apresentaram produto de amplificação não pertençam às demais espécies dos gêneros *Brettanomyces* e *Dekkera*. Esta afirmação só poderia ser feita se fossem utilizados

oligonucleotídeos para as demais espécies ou para os gêneros. Mesmo no caso da vinícola, onde menor número de isolados foi identificado como *D. bruxellensis*, não se pode afirmar que o meio não é adequado, uma vez que o mesmo é designado para isolamento de todas as leveduras do gênero.

Comparando-se os resultados obtidos no presente trabalho com aqueles descritos na literatura para *Brettanomyces* e *Dekkera*, algumas considerações positivas e/ou vantajosas podem ser feitas. Inicialmente, a técnica apresentada utiliza a PCR convencional, que consiste em um procedimento bem estabelecido, fácil de ser executado e de baixo custo quando comparada principalmente à QPCR. A obtenção de um fragmento de amplificação maior, quando comparado ao trabalho de Phister & Mills (2003), permite a visualização em gel de agarose menos concentrado, significando economia no processo. O uso da PCR com oligonucleotídeos específicos permitiu a obtenção do resultado em menor espaço de tempo e por meio da utilização de uma única reação, dispensando o uso de sondas ou enzimas.

Oligonucleotídeos desenvolvidos especificamente para uma determinada espécie de microrganismo são importantes por facilitarem os trabalhos de identificação principalmente quando a espécie em questão apresenta crescimento lento ou seu cultivo em meio de cultura é difícil de ser conseguido. Pode ser ainda empregado quando os processos auxográficos e quimiográficos são dúbios e de difícil discriminação como ocorre com os gêneros *Brettanomyces* e *Dekkera*. Além disso, auxiliam na detecção de espécies importantes em diversas áreas como agrícola, de alimentos, de bebidas, médica e ambientais. É relevante, do ponto de vista prático, que estes

oligonucleotídeos sejam utilizados em procedimentos simples, rápidos e de baixo custo, favorecendo que os diferentes setores da economia possam usufruir facilmente, obtendo resultados que auxiliem na rápida tomada de decisão. A PCR, dentre as técnicas moleculares, é a que melhor atende a esses requisitos. No caso da presença de *D. bruxellensis* em vinho, a detecção com técnicas moleculares permite que ações preventivas e/ou corretivas sejam tomadas em menor espaço de tempo, antes que significativas perdas econômicas aconteçam.

A técnica da PCR com os oligonucleotídeos desenvolvidos consiste em mais uma ferramenta de detecção e de identificação de *D. bruxellensis*, a qual poderá ser utilizada para detectar a presença deste microrganismo em alimentos e bebidas. Convém salientar que não há discriminação entre *Dekkera bruxellensis* e *Brettanomyces bruxellensis*.

4.4 REFERÊNCIAS

BARBIN, P.; CHEVAL, J.L.; GILIS, J.F.; STREHAIANO, P.; TAILLANDIER, P. Diversity in spoilage yeast *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* isolated from French red wine. Assessment during fermentation of synthetic wine medium. **Journal of Institute of Brewing**, v. 114, n. 1, 69-75. 2008.

BERNARDI, T.L; PEREIRA, G.V.M.; CARDOSO, P.G.; DIAS, E.S.; SCHWAN, R. *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with the production of cachaça: identification and characterization by traditional and molecular methods (PCR, PFGE and mtDNA-RFLP). **World Journal Microbiology and Biotechnology**, 2008.

CHATONNET, P.; DUBOURDIEU, D.; BOIDRON, J.N. The influence of *Brettanomyces/Dekkera* sp. yeasts and lactic acid bacteria on the ethylphenol content of red wines. **American Journal of Viticulture and Enology**, v. 46, n. 4, 463-468. 1995.

CHATONNET, P.; DUBOURDIEU, D.; BOIDRON, J.N.; LAVIGNE, V. Synthesis of volatile phenols by *Saccharomyces cerevisiae* in wines. **Journal Science of Food and Agriculture**, 62, 191-202. 1993.

COCOLIN, L.; RANTSIOU, K.; IACUMIN, L.; ZIRONI, R.; COMI, G. Molecular detection and identification of *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* and *Brettanomyces/Dekkera anomalus* in spoiled wines. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n.3, 1347-1355.2004.

CONTRERAS, A.; SALINAS, F.; GANGA, A.; MARTÍNEZ, C. Polymerase chain reaction confirmatory method for microbiological detection of *Brettanomyces bruxellensis* in wines. **Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology**, 16, 308-319. 2008.

COUTO, J.A.; NEVES, F.; CAMPOS, F.; HOGG, T. Thermal inactivation of the wine spoilage yeasts *Dekkera/Brettanomyces*. **International Journal Food Microbiology**, 104, 337-344. 2005.

DA SILVA, G.A. *Dekkera* e *Brettanomyces*: leveduras não competitivas que deterioram vinhos – características, problemas e identificação. Embrapa Uva e Vinho, **Documento 41**, v.1, p. 1-62. 2005.

DATO, M.C.F.; PIZAURO JÚNIOR, J.M.; MUTTON, M.J.R. Analysis of secondary compounds produced by *Saccharomyces cerevisiae* and wild yeast strains during the production of “cachaça”. **Brazilian Journal of Microbiology**, 36, 70-74. 2005.

DELAHERCHE, A.; CLAISSE, O.; LONVAUD-FUNEL, A. Detection and quantification of *Brettanomyces bruxellensis* and 'ropy' *Pediococcus damnosus* strains in wine by real-time polymerase chain reaction. **Journal of Applied Microbiology**, 97, 910-915. 2004.

DIAS, L.; PEREIRA-DA-SILVA, S.; TAVARES, M.; MALFEITO-FERREIRA, M.; LOUREIRO, V. Factors affecting the production of 4-ethylphenol by the yeast *Dekkera bruxellensis* in enological conditions. **Food Microbiology**, 20, 377-384. 2003.

GINZINGER, D.G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. **Experimental Hematology**, 30, 503-512. 2002

GUILLEN, A.C.; ÁVILA, L.D.; CELSO, P.G.; AYUB, M.A.Z. Presença de *Brettanomyces/Dekkera* em vinhos finos tintos. In: XIX Salão de Iniciação Científica. **Anais**. Porto Alegre: UFRGS, 2007, 126.

IBEAS, J.I.; LOZANO, I.; PERDIGONES, F.; JIMENEZ, J. Detection of *Dekkera-Brettanomyces* in sherry by a nested PCR method. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, n.3, 998-1003. 1996.

LARENA, I.; SALAZAR, O.; GONZÁLEZ, V.; JULIÁN, M.C.; RUBIO, V. Design of a primer for ribosomal DNA internal transcribed spacer with enhanced specificity for ascomycetes. **Journal of Biotechnology**, 75, 187-194. 1999.

LIBERAL, A.T.S.; BASÍLIO, A.C.M.; RESENDE, A.M.; BRASILEIRO, B.T.V.; SILVA FILHO, E.A.; MORAIS, J.O.F.; SIMÕES, D.A.; MORAIS JÚNIOR, M.A. Identification of *Dekkera bruxellensis* as a major contaminant yeast in continuous fuel ethanol fermentation. **Journal of Applied Microbiology**, 102, 538-547. 2007.

LIBERAL, A.T.S.; SILVA FILHO, E.A.; MORAIS, J.O.F.; SIMÕES, D.A.; MORAIS JÚNIOR, M.A. Contaminant yeast detection in industrial ethanol fermentation must by rDNA-PCR. **Letters in Applied Microbiology**, 40, 19-23. 2005.

MARCUSSI, V.M.; MARCUSSI, L.M.; BARBOSA-TESSMANN, L.P.; LONARDONI, M.V.C.; SILVEIRA, T.G.V. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: New primers for identification using polymerase chain reaction. **Experimental Parasitology**, 120, 300-305. 2008

MARTIN, K.J.; RYGIEWICZ, P.T. Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. **BMC Microbiology**, 5:28. 2005.

MAYORAL, M.B.; MARTÍN, R.; SANZ, A.; HERNÁNDEZ, P.E.; GONZÁLEZ, I.; GARCÍA, T. Detection of *Kluyveromyces marxianus* and other spoilage yeasts in yoghurt using a PCR-culture technique. **International Journal of Food Microbiology**, 105, 27-34. 2005

MILLET, V.; LONVAUD-FUNEL, A. The viable but non culturable state of wine micro-organisms during storage. **Letters in Applied Microbiology**, 30, 136-141. 2000.

MIOT-SERTIER, C.; LONVAUD-FUNEL, A. Development of a molecular method for the typing of *Brettanomyces bruxellensis* (*Dekkera bruxellensis*) at the strain level. **Journal of Applied Microbiology**, 102, 555-562. 2007.

MITRAKUL, C.M.; HENICK-KLING, T.; EGLI, C.M. Discrimination of *Brettanomyces/Dekkera* yeast isolates from wine by using various DNA fingerprinting methods. **Food Microbiology**, 16, 3-14. 1999.

PHISTER, T.G.; MILLS, D.A. Real-time PCR assay for detection and enumeration of *Dekkera bruxellensis* in wine. **Applied and Environmental Microbiology**, 69 (12), 7430-7434. 2003.

RAWSTHORNE, H.; PHISTER, T.G. A real-time PCR assay for the enumeration and detection of *Zygosaccharomyces bailli* from wine and fruit juices. **International Journal of Food Microbiology**, 112, 1-7. 2006.

RENOUF, V.; LONVAUD-FUNEL, A.; Development of an enrichment medium to detect *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis*, a spoilage wine yeast, on the surface of grape berries. **Microbiological Research**, n. 162, 154-167. 2007.

RENOUF, V.; FALCOU, M.; MIOT-SERTIER, C.; PERELLO, M.C.; REVEL, G. de.; LONVAUD-FUNEL, A. Interactions between *Brettanomyces bruxellensis* and other yeast species during the initial stages of winemaking. **Journal of Applied Microbiology**, 100, 1208-1219. 2006.

RODRIGUES, N.; GONÇALVES, G.; PEREIRA-DA-SILVA, S.; MALFEITO-FERREIRA, M.; LOUREIRO, V. Development and use of a new médium to detect yeasts of the genera *Dekkera/Brettanomyces*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, 588-599. 2001.

ROMANO, A.; PERELLO, M.C.; LONVAUD-FUNEL, A.; SICARD, G.; REVEL, G. Sensory and analytical re-valuation of "Brett character". **Food Chemistry**, v. 114, n. 1, 15-19. 2009.

ROSZAK, D.B.; COLWELL, R.R. Survival strategies of bacteria in the natural environment. **Microbiological Reviews**, 51 (3), 365-379. 1987.

SANZ, A.; MARTÍN, R.; MAYORAL, M.B.; HERNÁNDEZ, P.E.; GONZÁLEZ, I.; LACARRA, T.G. Development of a PCR-culture technique for rapid detection of yeast species in vacuum packed ham. **Meat Science**, 71, 230-237. 2005.

SHEN, F.T.; YOUNG, C.C. Rapid detection and identification of the metabolically diverse genus *Gordonia* by 16S rRNA-gene-targeted genus-specific primers. **FEMS Microbiology Letters**, 250, 221-227. 2005.

SEI, K.; ASANO, K.I.; TATEISHI, N.; MORI, K.; IKE, M.; FUJITA, M. Design of PCR and gene probes for the general detection of bacterial populations capable of degrading aromatic compounds via catechol cleavage pathways. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 88 (5), 542-550. 1999.

SMITH, C.J.; OSBORN, A.M. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. **FEMS Microbiology and Ecology**, 67, 6-20. 2009.

STENDER, H.; KURTZMAN, C.; HYLDIG-NIELSEN, J.J.; SORENSEN, D.; BROOMER, A.; OLIVEIRA, K.; PERRY-O'KEEFE, H.; SAGE, A.; YOUNG, B.; COULL, J. Identification of *Dekkera bruxellensis* (*Brettanomyces*) from wine by fluorescence in situ hybridization using peptide nucleic acid probes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, n.2, 938-941. 2001.

SUÁREZ, R.; SUÁREZ-LEPE, J.A.; MORATA, A.; CALDERÓN, F. The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera*: a review. **Food Chemistry**, n. 102, 10-21. 2007.

TESSONIÈRE, H.; VIDAL, S.; BARNAVON, L.; ALEXANDRE, H.; REMIZE, F.; Design and performance testing of a real-time PCR assay for sensitive and reliable direct quantification of *Brettanomyces* in wine. **International Journal of Food Microbiology**, 129, 237-243. 2009.

van Rij, N. J. W. K., (editor) The yeasts a taxonomic study. Elsevier - Amsterdam, P.O. Box 211, Amsterdam, The Netherlands, third edition. 1984.

ZENG, Q.Y.; WESTERMARK, S.O.; RASMUSON-LESTANDER, A.; WANG, X.R. Detection and quantification of *Wallemia sebi* in aerosols by real-time PCR, conventional PCR, and cultivation. **Applied and Environmental Microbiology**, 70 (12), 7295-7302. 2004.

5. CAPÍTULO 3:

**RAPID YEAST DNA EXTRACTION BY BOILING AND FREEZE-THAWING
WITHOUT USING CHEMICAL REAGENTS AND DNA PURIFICATION**

Artigo submetido a Revista

“Brazilian Archives of Biology and Technology”

Rapid yeast DNA extraction by boiling and freeze-thawing without using chemical reagents and DNA purification

Gildo Almeida da Silva^{1*}; Taís Letícia Bernardi²; Patrícia D. C. Schaker³; Morgana Menegotto⁴; Patricia Valente⁵

¹Embrapa Uva e Vinho, Department of Microbiology, 95700-000, Bento Gonçalves, RS, Brazil. ²Departament of Microbiology – ICBS/UFRGS-Capes-PhD Scholarship/Embrapa Uva e Vinho, 95700-000, Bento Gonçalves, RS, Brazil. ³Embrapa Uva e Vinho/UERGS-CNPq-PIBIC Scholarship, 95700-000, Bento Gonçalves, RS, Brazil. ⁴Embrapa Uva e Vinho/UERGS-Embrapa Scholarship, 95700-000, Bento Gonçalves, RS, Brazil. ⁵Department of Microbiology - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, Brazil

ABSTRACT

Common protocols for DNA extraction from microorganism are time-consuming, laborious and utilize expensive and toxic reagents. Therefore, the purpose of this work was to obtain PCR-grade product extracted by boiling and freeze-thawing processes without using chemical reagents or any purification procedures in order to amplify a specific DNA fragment of the 18S region of Dekkera bruxellensis and Saccharomyces cerevisiae. The described boiling and freeze-thawing protocols generated PCR-grade product preparations and can be used to process many samples. The amplification of the fragments could be observed after 30 and 35 cycles. These processes of extraction without using any kind of chemical reagents, especial water, and purification procedures proved to be efficient, reproducible, simple, fast, and inexpensive.

Key words: Boiling, freeze-thawing, DNA extraction, *Dekkera bruxelensis*, *Saccharomyces cerevisiae*

INTRODUCTION

The success of DNA amplification by PCR depends on the availability of cellular DNA free of Taq polymerase inhibitors. The extraction and purification protocols are used to disrupt microorganism cell walls and eliminate inhibitors interference, respectively. Many current protocols are too laborious and time-consuming for routine diagnostic or identification work. All protocols described so far, use centrifugation or chemicals in one of the steps for extraction or purification. Even the so-called rapid and efficient protocols require expensive or toxic reagents (Paterson et al. 1993; Harju et al. 2004; Borman et al. 2006; Cheng and Jiang 2006; Melo et al.

2006), utilize either glass beads (Melo et al. 2006) or enzymatic digestion (Borman et al. 2006; Jin et al. 2004) and specific equipments (Müller et al. 1998; Galán et al. 2006) to disrupt yeast cell wall. Galán et al. (2006) described six fungal DNA extraction methods for comparative analysis and in all extractions some kind of chemical compound was employed.

A device that allows fast heating/cooling rates and therefore giving efficient thermocycling suitable for DNA amplification has been developed (Ke et al. 2004). A novel device involving cell lysis and DNA amplification performed in a single step have been proposed

by Ke et al. (2007). A simple and rapid protocol for the preparation of total genomic DNA from yeast and mould was proposed by Borman et al. (2006, 2008). Filter paper (Whatman FTA) has been used as a DNA immobilizer matrix. The matrix was subjected to cycles of microwaving at full power, being subsequently washed with Whatman FTA wash reagent, followed by two washes with TE buffer. FTA filter papers are, in fact, fibrous matrices impregnated with chemicals like chelators and denaturing compounds that lyse and inactivate microorganisms (Borman et al. 2006, 2008), thus, it cannot be considered a completely chemical-free extraction protocol. The heat treatment for fungal DNA preparation uses glass beads and the sample is heated up to 95 °C for 20 min. The freeze-thawing process performed by Borman et al. (2006) submits the samples to six cycles of freeze-thawing in liquid nitrogen. The heat procedure developed by Liguori et al. (2007) uses phosphate-buffered saline solution followed by centrifugation to pellet, the DNA which is resuspended in sterile distilled water and heated to 95 °C for 3 min. In the boiling-freezing protocol for DNA-extraction used by de Baere et al. (2002) cells were suspended in distilled water and heated at 95°C for 15 min and submitted to freezing at -70°C. The samples were thawed at room temperature, and centrifuged to remove the cell debris. In the boiling process described by Freschi et al. (2005) the samples were centrifuged, followed by resuspension in sterile distilled water, heated to 95°C for 10 min, cooled on ice and centrifuged at 13,000 x g for 3 min. The supernatant was used for PCR assay. Medici et al. (2003) compared the boiling, alkaline lysis, Nucleospin, and Dynabeads DNA Direct System I methods for DNA extraction from *Salmonella enterica*. In the boiling process, the sample was also centrifuged three times and DNase-RNase-free distilled water was used to resuspend the pellet. The simple boiling methods described by Deak et al. (2000) and by Araújo et al. (2004) use centrifugation to collect the cells, to eliminate

cell debris after the boiling procedure, and to pellet total precipitated DNA. These last six procedures are by far simpler and more rapid than those described by Borman et al. (2006, 2008) but these protocols require centrifugation as an essential step and some of them require especial care to handle the samples. Nowadays, researchers seek to employ low cost methods, lower volumes analysis reagent and shorter analysis time procedures. Therefore, the current work describes a reliable, robust, effective and easy-to-perform method of DNA extraction for PCR-based amplification of a specific DNA fragment of the 18S region of *Dekkera bruxellensis* and *Saccharomyces cerevisiae*.

MATERIALS AND METHODS

Microorganism

The *Saccharomyces cerevisiae* Embrapa 1vvt/97 and the *Dekkera bruxelensis* NRRL Y-12961 strains were used. The yeasts were maintained in G7 (da Silva and de Almeida, 2006) and must agar (da Silva, 1996).

DNA Preparation

Boiling process

An aliquot of 1000 µL of cell suspension containing 10⁷ cells/mL of *Sacch. cerevisiae* and *D. bruxelensis* NRRL Y-12961 was transferred to microtubes and incubated at 90°C in a boiling water-bath for 5 min. The suspension containing DNA was vigorously homogenized by vortex for 10 s and the tube was frozen on ice. The DNA sample was stored at -18 °C.

Freeze-thawing process

An aliquot of 1000 µL of cell suspension containing 10⁷ cells/mL of *Sacch. cerevisiae* and *D. bruxelensis* was transferred to microtubes and incubated at -18°C until ice formation. The samples were allowed to thaw at room temperature and homogenized by vortex for 10 s.

DNA extraction process with standard cell lysis buffer

An aliquot of 1000 μL of cell suspension containing 10^7 cells/mL of *Sacch.cerevisiae* and *D. bruxelensis* were cultured in must agar medium for 24 to 48 hours at 25 °C and transferred to microtubes containing 500 μL of lysis buffer (NaCl 0.15M (Vetec, BR), Tris-HCl 50 mM (Invitrogen Life Technologies, USA), EDTA 10 mM (Sigma-Aldrich CO., USA), SDS 2.0 % (w/v) (Labsynth, BR); pH 8,0). The mixture was incubated for 1 hour at 60°C in a water-bath. An equal volume (500 μL) of buffer-saturated phenol (Sigma Chemical CO., USA) : chloroform (Reagen, BR) (1:1) was added to the DNA solution. The mixture was vigorously mixed by vortex, and centrifuged to phase separation in a Sorval centrifuge (Sorval, USA) at 10,000 x g for 15 minutes. The upper aqueous layer (containing the DNA) was carefully transferred to a clean tube, avoiding the phenol interface and equal volume of chloroform was added. The mixture was vigorously mixed by vortex and centrifuged at 10,000 x g for 15 min. The chloroform extraction was repeated. The upper aqueous layer was transferred to a clean centrifuge tube and equal volume of cold isopropanol (Chimie Test, BR) was added to the DNA sample. The mixture was vigorously mixed by vortex, the tube was allowed to stand in an ice-water bath for 30 minutes and then centrifuged at 10,000 x g for 20 min. To recover the precipitated DNA, the samples were centrifuged and the supernatant was discarded. The pellets were washed with ice-cold 70% ethanol, centrifuged at 10,000 x g for 15 min. The resulting DNA pellet was air dried and dissolved in 100 μL of TE (Tris-HCl 10 mM pH 7.6, EDTA 1 mM pH 8.0). The DNA sample was stored at -18 °C.

PCR procedure

Primers YeastF and YeastR (submitted to Regional Patent Office) targeting the conserved region of 18S rDNA were used to amplify a 375-bp segment. PCR amplification was performed at final volume of 25 μL . One

microlitre of each DNA sample from boiling, freeze-thawing and chemical extraction protocols was added to the PCR master mixture, which consisted of buffer Taq DNA polymerase enzyme 1x (Invitrogen Corporation, USA), 1.5U Platinum® Taq DNA polymerase (Invitrogen Corporation, USA), 100 μmol each dNTP (Invitrogen Corporation, USA), 0.8 pmol/ μL (0.8 μM) of each primer (Integrated DNA Technologies Inc., USA), 2.5mM MgCl₂. Amplification consisted of an initial denaturation step at 94°C for 5 min, followed by 25, 30, or 35 cycles comprising a denaturation step at 94°C for 30 s, an annealing step at 68°C for 45 s, and an extension step at 72°C for 30 s, followed by a final extension at 72°C for 5 min. A PTC-100 Peltier thermal cycler (Bio-Rad Life Sciences, USA) was used.

Precipitation with isopropanol

A cell suspension in water containing 10^7 cells/mL of *Sacch. cerevisiae* Embrapa 1vvt/97 and *D. bruxellensis* NRRL Y-12961 was prepared and an aliquot of 1000 μL was transferred to microtubes. After the boiling and freeze-thawing processes the cell debris were separated by centrifugation at 10,000 x g for 15 min and resuspended in 100 μL TE buffer. The supernatant was precipitated with cold isopropanol and again centrifuged at 10,000 x g for 15 min. The resulting DNA sediment obtained was air-dried and resuspended in 100 μL TE buffer. The DNA present in supernatant and the cell debris were submitted to 25 and 30-cycle PCR for amplification separately.

Retention of DNA in the cell

After 25 and 30-cycle PCR of the cell debris, the products of amplification were centrifuged at 10,000 x g for 15 min. The supernatant and debris were again submitted to electrophoresis separately.

Reduction of primers concentration

The concentration of each primer was reduced from 0.8 pmol/ μL (0.8 μM) to 0.4 pmol/ μL

(0.4 μ M) (Integrated DNA Technologies Inc., USA). The concentration of all the other reagents was the same as described before. An aliquot of 1 μ L of debris was used as template DNA and submitted to 25 and 30-cycle PCR

Electrophoresis

Aliquots of 5 μ L of PCR-amplified products and the 100 bp DNA Ladder (100 to 1500 bp) (Invitrogen Life Technologies, USA) were loaded onto 1.5% agarose electrophoresis gels (Sigma Chemical, USA). The run was performed with 1 x Tris-acetate- EDTA (TAE) buffer, containing 40 mM Tris-HCl (Invitrogen Life Technologies, USA), pH 8.3, 20 mM acetic acid (Merck, Germany) and 1 mM EDTA (Sigma-Aldrich CO., USA), at 90 V/cm for 45 min. The gels were stained with GelRed (TM Biotium, Inc. California, USA). The stained gels were photographed using UV transilluminator Eagle Eye II Video Imaging System (Stratagene, California, USA).

RESULTS AND DISCUSSION

Protocols for PCR require extraction and purification of DNA from yeast cells. The extraction procedures of yeast cells are either time-consuming or generate poor yields compared to methods of DNA extraction from animal cells or viruses (Galán et al. 2006). The extraction using standard cell lysis buffer appeared to be more efficient than both boiling and freeze-thawing processes, since the band corresponding to the 375-bp fragment of the 18S region of both *Sacch. cerevisiae* and *D. bruxellensis* could be clearly visualized after 25 PCR cycles (Fig. 1-A), meaning that this extraction process is genus-

independent. The bands corresponding to the boiling and freeze-thawing processes, although very weak, could also be visualized. The low yield of PCR products in the boiling and freeze-thawing extraction procedures may indicate low concentration of DNA in comparison to the standard cell lysis procedure. In fact, when the number of PCR cycles was increased from 25 to 30, the bands from all three extraction processes were clearly detected (Fig. 1-B). Since the PCR products could be better revealed with the freeze-thawing procedure than with the boiling process (Fig. 1-B), it is reasonable to conclude that the former technique allows a better exposition of the 18S region to the Taq polymerase than the later procedure. As the number of PCR cycles is increased to 35, the 375 bp PCR fragment is clearly observed in all three extraction procedures with approximately the same resolution (Fig. 1-C), meaning that the enzymatic reaction is in more limiting substrate conditions when the physical procedures are used than when the standard cell lysis buffer is employed. This is probably due to the step of DNA precipitation with cold isopropanol described in the chemical protocol. It should be stressed that the entire extraction by standard cell lysis buffer, boiling and freeze-thawing processes took approximately 4-5 hours, 30 min, and 1h, respectively. The cellular debris remaining in the samples did not interfere with PCR amplification, which means that the centrifugation step commonly used to remove this sediment is not required. Similar results were obtained by Harju et al. (2004).

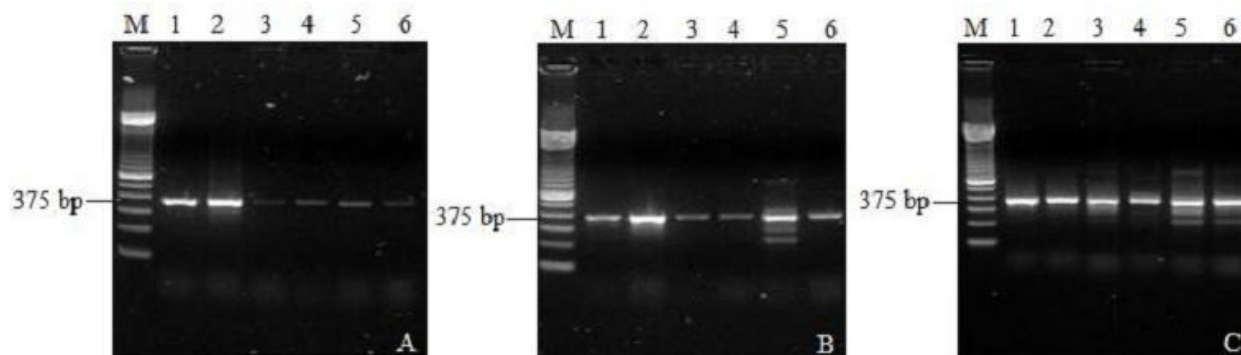


Figure 1: Amplification of a 375 bp specific DNA fragment of the 18S region of *Dekkera* and *Saccharomyces*: M- 100 bp DNA Ladder; 1- *Sacch. cerevisiae* - standard cell lysis buffer; 2- *D. bruxellensis* - standard cell lysis buffer; 3- *Sacch. cerevisiae* - boiling process; 4- *D. bruxellensis* - boiling process; 5 - *Sacch. cerevisiae* - freeze-thawing process; 6- *D. bruxellensis* - freeze-thawing process; A- 25 cycles; B- 30 cycles; C- 35 cycles

From Figure 1-B, the boiling assay appeared to disrupt the cell wall less efficiently than the freeze-thawing procedure. It is possible that during the former procedure the target DNA remains into the cell and the later provides a higher target DNA leakage from the cell interior. To check this hypothesis, after the boiling and freeze-thawing processes the cell debris were precipitated with cold isopropanol. After 25-cycle PCR, the bands could be better visualized in both boiling and freeze-thawing processes after 25-cycle PCR (Fig. 2-A), showing better resolution for both yeast species in the freeze-thawing process than with the mixture cell debris/supernatant (Fig. 1-A). The DNA precipitation with cold isopropanol could help to explain the advantage of the traditional procedure over the physical processes. The concentration of DNA was at threshold conditions in the supernatants of both yeast species since the 375-bp fragments were more efficiently observed when the PCR cycles increases to the number

of 30 (Fig. 2-B). In these two physical processes, a significant amount of the target DNA is still retained in the cell debris as showed in the Figures 2-C and 2-D. This shows that the reactions could be initiated directly from cell debris and that the amplification system has access to the fragment of the 18S region contained in this cell debris. Hirano et al. (1997) showed the results of PCR amplification of ρ^+ and ρ^0 DNA and of DNA from the supernatant and the pelleted cell debris after 10 min of boiling of the buffy coat, using primers corresponding to the three COX genes. They noted that the yield of supernatant amplified PCR products by using the DNA obtained after 10 min of boiling was surprisingly low. In contrast, the yield of pelleted cell-debris amplified PCR products was high and the yield of supernatant amplified PCR products was greater only when the cells were boiled for at least 20 min.

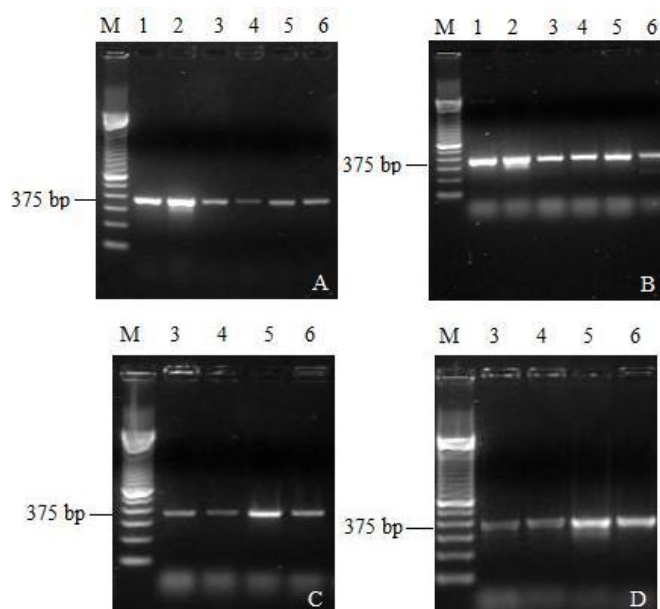


Figure 2: Amplification of a 375 bp specific DNA fragment of the 18S region of *Dekkera* and *Saccharomyces* only present in the cell-free supernatants after extraction process: M- 100 bp DNA Ladder; 1 - *Sacch. cerevisiae* - standard cell lysis buffer; 2- *D. bruxellensis* - standard cell lysis buffer; 3- *Sacch. cerevisiae* - boiling process; 4- *D. bruxellensis* - boiling process; 5 - *Sacch. cerevisiae* - freeze-thawing process; 6- *D. bruxellensis* - freeze-thawing process: A- 25-cycle PCR-cell-free supernatants; B- 30-cycle PCR - cell-free supernatants; C-25-cycle cell debris; D- 30-cycle cell debris

Based on the assumption that amplification efficiency is constant from the very first cycle to all over the number of thermal cycles, the DNA amplification number depends both upon the initial number of target molecules and the number of thermocycles. Considering an efficiency of 100%, a number of DNA target molecules of 1, a 25-cycle PCR will give a DNA amplification number of 6.71×10^7 . An increase of five more cycles will generate a total of DNA amplification number of 2.15×10^9 .

The cell debris was submitted to PCR for amplification. The 375 bp fragment was detected with a 25-cycle PCR (Fig. 2-C) with similar intensity as that previously showed from the supernatants (Fig. 2-A). If the thermal cycles were exactly the same, the similar intensity of the bands could be due to a similar amount of target DNA in cell debris and in the supernatant. This fact confirms the hypothesis of trapping of the target DNA by the cell debris. The amplification of the 375 bp fragment containing cell-debris with 30-cycle did not improve the resolution of the bands (Fig. 2-D). The results also show

substantial advantage of freeze-thawing treatment over boiling-based system irrespective of whether *D. bruxellensis* or *Sacch. cerevisiae* was used. As a rule, the bands obtained from DNA of all three extraction processes were detected after 30-cycle PCR (Fig. 2-B). The retention of amplified DNA in yeast cell debris submitted to physical processes was also examined. Both cell debris and supernatant were separately used. The cell debris corresponded to 6×10^4 cells and the components of the supernatant were resultant of the same amount of cells. Once again, the 25-cycle PCR amplification (Fig. 3-A) proved to be enough to amplify the target DNA containing cell-debris free supernatants of *Sacch. cerevisiae* and *D. bruxellensis* submitted to both boiling and freeze-thawing processes. This shows that the great majority of the target DNA is in the supernatant or the amplified DNA has moved to the supernatant after amplification. Little improvement was obtained with 30-cycle PCR (Fig. 3-B). Weaker amplification was obtained with the cell debris (Fig. 3-C) when compared with 25-cycle PCR of supernatant (Fig. 3-A).

The 375-bp bands from cell debris of both yeasts could be clearly detected with 30-cycle PCR amplification (Fig. 3-D) irrespective of the two extraction methods used. It seems that cell debris subjected either to boiling or freeze-thawing processes has a fewer amount of target DNA for amplification than the supernatant. As the cell debris is the unique source of DNA, this provides evidence that an important amount of DNA flows out the cells either during the PCR cycles or during the centrifugation process. It seems reasonable to suppose that, before centrifugation, the cellular debris retains significant amount of

amplified DNA and does not interfere with subsequent PCR amplification. In conclusion, the physical procedures of yeast DNA extraction were reliable and reproducible preparative methods to amplify the DNA without centrifugation and purification steps. The use of cell debris as showed in Figures 2-C and 2-D should be more useful for PCR amplification than the supernatant resultant of boiling or freeze-thawing. It is reasonable to think that it is much easier to get rid of inhibitors tied up to the cell debris than of inhibitors present in liquid phase.

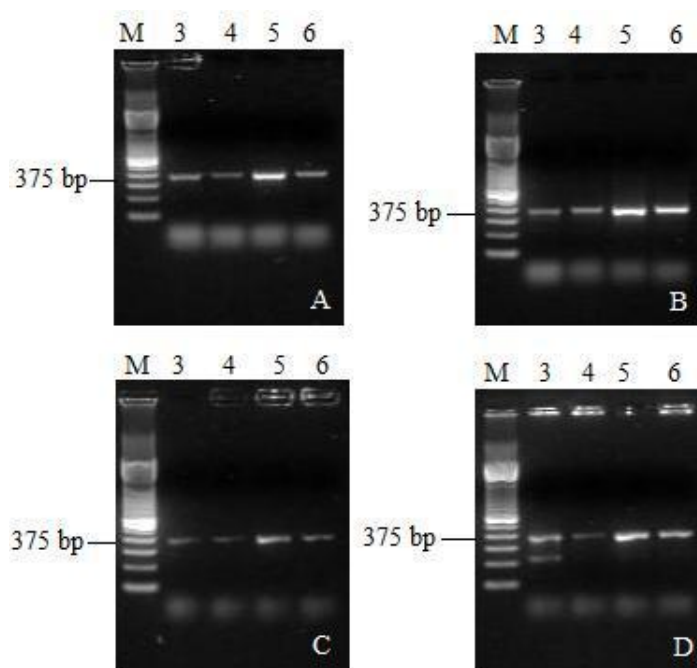


Figure 3: Amplification of a 375 bp specific DNA fragment of the 18S region of *Dekkera* and *Saccharomyces*: M- 100 bp DNA Ladder; 3- *Sacch. cerevisiae* - boiling process; 4- *D. bruxellensis* - boiling process; 5 - *Sacch. cerevisiae* - freeze-thawing process; 6- *D. bruxellensis* - freeze-thawing process; A- 25-cycle PCR of cell-debris free supernatants from a cell suspension of 10^7 cells/mL after PCR amplification; B- 30-cycle PCR of cell-debris free supernatants from a cell suspension of 10^7 cells/mL after PCR amplification; C- 25-cycle PCR of cell-debris from a cell suspension of 10^7 cells/mL after PCR amplification; D- 30-cycle PCR of cell-debris from a cell suspension of 10^7 cells/mL after PCR amplification.

According to Pruvost and Geigl (2004), small number of initial target-DNA molecules gives less reliable PCR products. Moreover, small amount of target DNA may increase the risk of contamination from anything that can come into contact with the DNA solution. It should be stressed that an environment, like wine, in which the cells of *Saccharomyces* or *Dekkera*

and several other yeasts are collected from, is not sterile and can not be sterilized. To ensure cleaner PCR product and lower background, a lower concentration of primer ($0.4 \mu\text{M}$) than the one used so far ($0.8 \mu\text{M}$) was tested. Despite the typical PCR primer concentrations range from 0.1 to $1 \mu\text{M}$, in general, optimal primer concentrations are from 0.1 to $0.5 \mu\text{M}$

(Innis and Gelfand 1990) and this range of primer concentration is, in fact, used with a relative frequency (Maneu et al. 2000; Andrighetto et al. 2000, 2004; Freschi et al. 2005; Galán et al. 2006; Liguori et al. 2007). The usual dNTP concentration between 20mM and 200mM of each of the four dNTPs gives optimal balance among yield, specificity and fidelity (Innis and Gelfand 1990). The recommended amount of Taq polymerase is approximately 1 unit for a 25 μ L reaction. As described in Material and Methods, the unique PCR reaction component that is above the optimum concentration range stated by Innis and Gelfand (1990) and previous authors is the primer. Its concentration was decreased from 0.8 μ M to 0.4 μ M (Fig. 4-A and Fig 4-B) and the results can be compared with primers concentration of 0.8 μ M depicted in Figures 2-C and 2-D. The fundamental difference between both primer concentrations is in 25-cycle PCR with boiling procedure. With 0.4

μ M, the bands corresponding to DNA from boiling process for both yeasts were weaker than that with 0.8 μ M. These two bands were better resolved with 30-cycle PCR. Once again, the freeze-thawing extraction was demonstrated to be a better protocol for PCR amplification than the boiling procedure. The freezing-thawing can alter the expression of genes and trigger responses to cell damage process.

Sharma et al. (2006) have provided evidence of structural community changes and expression dynamics of denitrifiers as a result of freeze-thawing stress. The expression levels of periplasmic nitrate reductase gene (*napA*) and cytochrome cd1 nitrite reductase (*nirS*) were higher just after thawing began, followed by a decrease. If there are several degrees of damage provoked by freeze-thawing procedure, changes in this process can better expose components of PCR reaction to the target DNA and improve the detection.

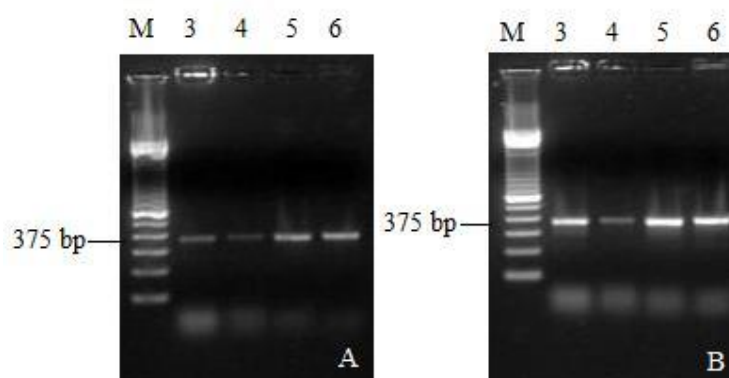


Figure 4: Amplification of a 375 bp specific DNA fragment of the 18S region of *Dekkera* and *Saccharomyces* with 0.4 mM of each primer: M- 100 bp DNA Ladder; 3- *Sacch. cerevisiae* - boiling process; 4- *D. bruxellensis* - boiling process; 5 - *Sacch. cerevisiae* - freeze-thawing process; 6- *D. bruxellensis*- freeze-thawing process; A- 25-cycle PCR of cell-debris from a cell suspension of 10^7 cells/mL; B- 30-cycle PCR of cell-debris from a cell suspension of 10^7 cells/mL.

Park et al. (1997) observed that the cell damage is related to both freezing duration and growth phase. High resistance was found during lag phase and low resistance was observed during the log phase. Decrease in cell viability was observed at temperatures between 0°C and -5°C and the cell mortality in this temperature range depended on the

cooling rate (Dumont et al. 2006). The DNA extraction and the PCR amplification could be improved by choosing both, the best yeast cell growth phase and a proper freezing rate to increase the physical cell damage. Although cooling to very low temperatures is applied to preserve living cells and their biological activity, loss of cell viability is

suggested to be caused by membrane damage (Moussa et al. 2008). At supercooled state, according to Moussa et al. (2008), the membrane permeability is increased, there is an uncontrolled mass transfer to and from the cells, the cells suffer an abrupt shrinkage, are exposed to cold osmotic shock and the cell membrane becomes disrupted. These facts play an important role in yeast cell death. The results presented suggest that freeze-thawing treatment is more injurious to the membrane of the yeast cells than the boiling treatment and may explain the advantage of this procedure over the boiling process for PCR amplification.

In this work, reproducible, rapid, and robust processes of yeast DNA extraction for PCR assay are described. These protocols can be used for routine diagnostic practice. The consistent protocols are characterized by physical procedures of yeast DNA extraction and without using any kind of chemical reagents.

RESUMO

Os usuais métodos de extração de DNA de microrganismos consomem tempo, são laboriosos e usam alguns reagentes tóxicos e de alto custo. Este trabalho avaliou a amplificação de um fragmento de DNA específico da região 18S de *Deffera bruxellensis* e *Saccharomyces cerevisiae* extraído por processos de fervura e congelamento-descongelamento sem o uso de reagentes químicos e sem procedimentos de purificação de DNA. O emprego da centrifugação no processo é opcional. A amplificação dos segmentos foi observada com 30 e 35 ciclos. Pela rapidez da extração, diversas amostras poderão ser processadas. Os processos físicos de extração descritos mostraram-se confiáveis, simples, rápidos e eficientes. Além disso, dispensa o uso de reagentes químicos, de água especial e de procedimentos de purificação.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors thank Capes, CNPq, and Embrapa for financial support.

REFERENCES

- Andrighetto C, Marcazzan G, Lombardi A (2004) Use of RAPD-PCR and TTGE for the evaluation of biodiversity of whey cultures for grana padano cheese. *Lett Appl Microbiol*, 38(5):400–405. doi: 10.1111/j.1472-765X.2004.01504.x
- Andrighetto C, Psomas E, Tzanetakis N, Suzzi G, Lombardi A (2000) Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) PCR for the identification of yeasts isolated from dairy products. *Lett Appl Microbiol*, 30(1):5–9. doi: 10.1046/j.1472-765x.2000.00589.x
- Araújo WL, de Angelis DA, Azevedo JL (2004) Direct RAPD evaluation of bacteria without conventional DNA extraction. *Braz Arch Biol Technol*, 47:375–380.
- Borman AM, Linton CJ, Miles SJ, Campbell CK, Johnson EM (2006) Ultrarapid preparation of total genomic DNA from isolates of yeast and mould using Whatman FTA filter paper technology - a reusable DNA archiving system. *Med Mycol*, 44(5):389–398. doi: 10.1080/13693780600564613
- Borman AM, Linton CJ, Miles SJ, Johnson EM (2008) Molecular identification of pathogenic fungi. *J Antimicrob Chemother*, 61 Suppl 1:i7–12. doi:10.1093/jac/dkm425
- Cheng HR, Jiang N (2006) Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts. *Biotechnol Lett*, 28(1):55–59. doi: 10.1007/s10529-005-4688-z
- da Silva GA (1996). The occurrence of killer, sensitive, and neutral yeasts in Brazilian Riesling Italic grape must and the effect of neutral strains on killing behaviour. *Appl Microbiol Biotechnol*, 46(2):112–121. doi: 10.1007/s002530050791
- da Silva GA, de Almeida EA (2006) Production of yellow-green fluorescent pigment by *Pseudomonas fluorescens*. *Braz Arch Biol Technol*, 49(3):411–419.
- de Baere T, Claeys G, Swinne D, Verschraegen G, Muylaert A, Massonet C, Vaneechoutte M (2002) Identification of cultured isolates of clinically important yeast species using fluorescent fragment length analysis of the amplified internally transcribed rRNA spacer 2 region (ITS2). *BMC Microbiol*, 2:21. doi: 10.1186/1471-2180-2-21
- Deak T, Chen J, Beuchat LR (2000) Molecular characterization of *Yarrowia lipolytica* and *Candida*

- zeylanoides* isolated from poultry. *Appl Environ Microbiol*, 66(10):4340–4344.
- Dumont F, Marechal PA, Gervais P (2006) Involvement of two specific causes of cell mortality in freeze-thaw cycles with freezing to -196 degrees C. *Appl Environ Microbiol*, 72(2):1330–1335.
- Freschi CR, Carvalho LFOS, de Oliveira CJB (2005) Comparison of DNA-extraction methods and selective enrichment broths on the detection of *Salmonella typhimurium* in swine feces by polymerase chain reaction (PCR). *Braz J Microbiol*, 36:363–367. doi: 10.1590/S1517-83822005000400011
- Galán A, Veses V, Murgui A, Casanova M, Martínez JP (2006) Rapid PCR-based test for identifying *Candida albicans* by using primers derived from the pH-regulated KER1 gene. *FEMS Yeast Res*, 6(7):1094–1100. doi: 10.1111/j.1567-1364.2006.00114.x
- Harju S, Fedosyuk H, Peterson KR (2004) Rapid isolation of yeast genomic DNA: Bust n' Grab. *BMC Biotechnol*, 4:8. doi: 10.1186/1472-6750-4-8
- Hirano M, Shtilbans A, Mayeux R, Davidson MM, di Mauro S, Knowles JA, Schon EA (1997) Apparent mtDNA heteroplasmy in Alzheimer's disease patients and in normals due to PCR amplification of nucleus embedded mtDNA pseudogenes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94(26):14894–14899.
- Innis MA, Gelfand DH (1990) Optimization of PCRs. In: Innis MA (ed) *PCR protocols. A guide to methods and applications*. Academic Press, Inc. Harcourt Brace Jovanovich, Academic Press, Limited, 24-28 Oval Road, London NW1 7DX.
- Jin J, Lee YK, Wickes BL (2004) Simple chemical extraction method for DNA isolation from *Aspergillus fumigatus* and other *Aspergillus* species. *J Clin Microbiol*, 42(9):4293–4296. doi: 10.1128/JCM.42.9.4293-4296.2004
- Ke C, Kelleher AM, Mathewson A, Sheehan M (2004) Design and fabrication of a silicon microreactor for DNA amplification. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, 3:1964–1967.
- Ke C, Kelleher AM, Sheehan M, Mathewson A (2007) Single step cell lysis/PCR detection of *Escherichia coli* in an independently controllable silicon microreactor. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 120:538–544. doi:10.1016/j.snb.2006.03.019
- Liguori G, Lucariello A, Colella G, Luca AD, Marinelli P (2007) Rapid identification of *Candida* species in oral rinse solutions by PCR. *J Clin Pathol*, 60(9):1035–1039. doi:10.1136/jcp.2006.040782
- Maneu V, Martínez JP, Gozalbo D (2000) Identification of *Candida albicans* clinical isolates by PCR amplification of an *efb1* gene fragment containing an intron-interrupted open reading frame. *Med Mycol*, 38(2):123–126.
- Medici DD, Croci L, Delibato E, Pasquale SD, Filetici E, Toti L (2003) Evaluation of DNA extraction methods for use in combination with SYBR green I real-time PCR to detect *Salmonella enterica* serotype enteritidis in poultry. *Appl Environ Microbiol*, 69(6):3456–3461. doi: 10.1128/AEM.69.6.3456-3461.2003
- Melo SCO, Pungartnik C, Cascardo JCM, Brendel M (2006) Rapid and efficient protocol for DNA extraction and molecular identification of the basidiomycete *Crinipellis perniciosa*. *Genet Mol Res*, 5(4):851–855.
- Moussa M, Dumont F, Perrier-Cornet JM, Gervais P (2008) Cell inactivation and membrane damage after long-term treatments at sub-zero temperature in the supercooled and frozen states. *Biotechnol Bioeng*, 101(6):1245–1255. doi: 10.1002/bit.21981
- Müller FM, Werner KE, Kasai M, Francesconi A, Chanock SJ, Walsh TJ (1998) Rapid extraction of genomic DNA from medically important yeasts and filamentous fungi by high-speed cell disruption. *J Clin Microbiol*, 36(6):1625–1629.
- Park JI, Grant CM, Attfield PV, Dawes IW (1997) The freeze-thaw stress response of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is growth phase specific and is controlled by nutritional state via the ras-cyclic amp signal transduction pathway. *Appl Environ Microbiol*, 63(10):3818–3824.
- Paterson AH, Brubaker CL, Wendel JF (1993) A rapid method for extraction of cotton (*Gossypium* spp.) genomic DNA suitable for RFLP or PCR analysis. *Plant Molecular Biology Reporter*, 11(2):122–127.
- Pruvost M, Geigl EM (2004) Real-time quantitative PCR to assess the authenticity of ancient DNA amplification. *Journal of Archaeological Science*, 31:1191–1197. doi:10.1016/j.jas.2002.05.002
- Sharma S, Szele Z, Schilling R, Munch JC, Schloter M (2006) Influence of freeze-thaw stress on the structure and function of microbial communities and denitrifying populations in soil. *Appl Environ Microbiol*, 72(3):2148–2154. doi:10.1128/AEM.72.3.2148-2154.2006

6. CAPÍTULO 4:**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO
DE DNA DIRETA DE AMOSTRA DE VINHO**

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO DE DNA DIRETA DE AMOSTRA DE VINHO

Autor: Taís Letícia Bernardi

Orientador: Patrícia Valente

Coorientador: Gildo Almeida da Silva

Resumo

A detecção e identificação de microrganismos presentes no vinho por meio de técnicas moleculares são importantes não apenas por agilizarem a tomada de decisão quando há presença de microrganismos deteriorantes, mas também por permitirem o conhecimento da diversidade microbiana e o monitoramento de linhagens inoculadas. Dentre estas técnicas, a PCR tem sido amplamente utilizada por sua rapidez e por seu baixo custo. Esta técnica permite a amplificação de quantidades traços de DNA, desde que compostos inibidores estejam ausentes. Como o vinho possui compostos que podem exercer efeito inibitório sobre a PCR, este trabalho teve como objetivos o desenvolvimento de uma metodologia de extração direta de DNA de amostras de vinho e verificação da influência isolada de alguns destes compostos presentes no vinho sobre a reação. Para a extração direta, foram testados diferentes pré-tratamentos. Também foi realizada amplificação direta de vinho diluído com o uso de diferentes enzimas, Taq (*Thermus aquaticus*) DNA polimerase e Tth (*Thermus thermophilus*) DNA polimerase. Os diferentes pré-tratamentos não permitiram a visualização do DNA extraído e nem mesmo a enzima Tth, aclamada como menos sensível a inibidores, se mostrou eficiente no processo de amplificação. A capacidade de inibição da PCR pelos compostos isolados quercitina, resveratrol, tanino, ácido gálico e catequina foi testada. Dentre estes compostos, apenas quercitina e resveratrol não apresentaram efeito inibitório mesmo em concentrações elevadas. Com estes resultados, um protocolo de extração de DNA com poucos estágios foi desenvolvido. Este protocolo permitiu a amplificação de DNA.

DEVELOPMENT OF METHODOLOGY FOR DNA DIRECT EXTRACTION OF WINE SAMPLES

Author: Taís Letícia Bernardi

Advisor: Dra. Patrícia Valente

Co-Advisor: Dr. Gildo Almeida da Silva

Abstract

The detection and identification of microorganisms present in wine using molecular techniques are important not only streamline the decision-making when there is spoilage microorganisms, but also by allowing the knowledge of microbial diversity and monitoring of inoculated strains. Among these techniques, PCR has been widely used because of its quickness and its low cost. This technique allows the amplification of trace amounts of DNA, provided that inhibitors are absent. Like wine has compounds that may exert an inhibitory effect on PCR, this study aimed to develop a methodology for direct extraction of DNA from wine samples and verified the influence of some of these isolated compounds of wine on the reaction. For direct extraction, we tested different pre-treatments. It was also performed direct amplification of diluted wine with the use of different enzymes, Taq (*Thermus aquaticus*) DNA polymerase and Tth (*Thermus thermophilus*) DNA polymerase. The different pre-treatments did not allow visualization of the extracted DNA and the Tth DNA polymerase, known as less sensitive to inhibitors, was not efficient in the amplification process. The ability of PCR inhibition by compounds isolated quercetin, resveratrol, tannin, gallic acid and catechin was tested. Among these compounds, only quercetin and resveratrol did not inhibit even at high concentrations. With these results, a DNA extraction protocol was developed with few stages. This protocol allowed the amplification of DNA.

6.1 INTRODUÇÃO

A qualidade dos vinhos depende de inúmeros fatores. Dentre eles temos os fatores naturais, como o clima (temperaturas, pluviosidade, radiação solar, ventos) e o solo (características físico-químicas, profundidade, drenagem). Além de fatores induzidos, de acordo com a intervenção do homem, como a escolha do local de plantio, o porta-enxerto, o clone da variedade, a nutrição mineral, manejo e tratos culturais (poda, desponde, desfolha, controle de pragas e doenças), data da colheita, os protocolos de vinificação adotados (tipo de levedura, temperatura das fermentações, tempo de maceração, aeração, higiene, duração das fermentações, filtração, clarificação, estabilização, local de armazenamento, tipo de rolha). Os fatores clima, solo e homem caracterizam um *terroir* vitivinícola. Também é influenciada por uma multiplicidade de reações bioquímicas, que iniciam com o amadurecimento das uvas e seguem durante todo o processo de envelhecimento, inclusive após o engarrafamento (Sturm et al., 2006). A qualidade do vinho também depende da influência de diferentes microrganismos durante o processo, principalmente leveduras e bactérias. Durante o processo de elaboração de vinhos, ocorre uma sucessão de microrganismos. À medida que a produção de álcool por *Sacch. cerevisiae* é iniciada, leveduras e bactérias mais sensíveis começam a ter sua atividade reduzida. No entanto, o pouco tempo em contato é suficiente para que estes

microrganismos liberem seus metabólitos no vinho. Estes metabólitos, uma vez produzidos, permanecem no produto conferindo complexidade ao mesmo. Quando a concentração de etanol atinge 12 – 13%, a população de leveduras *Sacch. cerevisiae* começa a diminuir, devido a mortalidade natural. Leveduras pertencentes aos gêneros *Brettanomyces/Dekkera*, no entanto, conseguem sobreviver a esta concentração de álcool, bem como em ambientes com baixas concentrações de açúcares e oxigênio. Estas são as características do produto final. Estas leveduras são responsáveis pela conversão de ácidos hidroxicinâmicos, naturalmente presentes nas uvas, em compostos fenólicos, os quais, ao ultrapassarem o limiar de percepção, conferem *off flavours* ao vinho, ocasionando o aparecimento de defeitos olfativos, podendo reduzir a qualidade e levar a perdas econômicas.

A detecção e identificação dos microrganismos do vinho são importantes não só do ponto de vista técnico e econômico, por permitir que medidas profiláticas sejam tomadas em tempo hábil quando há a presença de algum microrganismo deteriorante, como também permitem o conhecimento da diversidade microbiana presente e o monitoramento do microrganismo quando inoculado. Para leveduras pertencentes aos gêneros *Brettanomyces* e *Dekkera* presentes em vinho, a detecção e identificação tem sido realizadas pelo uso de meios de cultivo seletivos e/ou diferenciais (Rodrigues et al., 2001; Couto et al., 2005) e por técnicas moleculares.

Métodos que empregam sequência de nucleotídeos do DNA estão se tornando práticas comuns na detecção e identificação de microrganismos de fontes ambientais. Constituem ferramentas valiosas para detectar microrganismos de difícil cultivo em meios de cultura. Permitem também o

monitoramento de microrganismos propositalmente introduzidos em determinado ambiente. Dentre as técnicas, tem-se PCR-aninhada (Ibeas et al, 1996), PCR em tempo real (Phister & Mills, 2003), PCR com enzima de restrição (Cocolin et al., 2004) e sequenciamento (Conterno et al., 2006). O uso destas técnicas consiste em uma excelente alternativa na identificação e detecção especialmente de *Brettanomyces* e *Dekkera* que são de crescimento lento, precisando de até 14 dias ou mais para surgimento de colônias. A Reação em Cadeia da Polimerase é uma técnica que pode detectar quantidades traços de DNA, promovendo sua amplificação quando condições adequadas são utilizadas e na ausência de inibidores enzimáticos.

A eficiente extração e amplificação de DNA de mosto e vinho nem sempre é possível devido a interferência de polissacarídeos, taninos e polifenóis ou degradação pela ação bioquímica e enzimática e tratamentos pós-processamento (Savazzini & Martinelli, 2006). A extração de DNA também pode ser afetada por fatores como lise celular incompleta, adsorção do DNA ao material da amostra, co-extração de inibidores enzimáticos e degradação ou danos ao DNA. A aplicação de um protocolo de extração de DNA adequado para uma determinada amostra é essencial para estimar a correta diversidade microbiana. O método precisa ser simples, rápido e eficiente, fornecendo DNA livre de compostos inibidores (Jara et al., 2008). A qualidade e a quantidade de DNA extraído de alimentos tende a diminuir com o decorrer do processamento. A exposição ao aquecimento resulta na fragmentação do DNA de alto peso molecular, e tratamentos físicos e químicos ocasionam quebras aleatórias nas fitas de DNA, reduzindo o tamanho dos fragmentos (Demeke & Jenkis, 1990).

Para vinho e vinagre, não há método de extração de DNA padronizado disponível e os métodos descritos envolvem lise química e enzimática. Estes métodos frequentemente combinam detergentes, rompimento físico, extração com solvente e lise enzimática para obter ácidos nucléicos (Jara et al., 2008). A maioria dos protocolos de extração de DNA de vinho e de amplificação por técnicas moleculares utiliza kit comercial para purificação do DNA (Phister & Mills, 2003; Delaherche et al., 2004; Tessonnière et al., 2009).

A presença de inibidores pode modificar a cinética de amplificação por PCR. Estes inibidores podem atuar como quelantes de íons magnésio, um co-fator para todas as polimerases, incluindo a Taq DNA polimerase, ou podem se ligar ao DNA alvo ou a DNA polimerase (Demeke & Jenkis, 1990). Em amostras onde é comum o elevado número de substâncias inibidoras da PCR, outras polimerases têm sido utilizadas, principalmente a Tth DNA polimerase. A enzima Tth DNA polimerase, quando comparada à Taq DNA polimerase, é considerada possuir menor sensibilidade aos compostos inibidores (Shames et al., 1995).

A PCR em tempo real (QPCR) é uma técnica que permite estimar a quantidade de DNA molde, que é diretamente relacionada à quantidade de produto gerado com o progresso dos ciclos da reação. Esta técnica permite quantificar, no momento em que a reação se processa, se a amplificação está ocorrendo normalmente. O efeito do ácido tânico sobre a QPCR foi avaliado por Kontanis & Reed (2006). De acordo com estes mesmos autores, os taninos e outros compostos com grupos fenólicos livres ligam-se covalentemente à Taq DNA polimerase promovendo sua inativação. Como resultado, a eficiência da

amplificação é reduzida. A agressividade da inibição é diretamente relacionada à quantidade de taninos presentes, com inibição completa ocorrendo em concentrações maiores que 1,4 ng por reação de 25 μ L. No caso da QPCR, concentrações de tanino inferiores a esta, podem também impedir a amplificação e a quantificação correta.

Uma variedade de substâncias com diferentes propriedades ou mecanismos inibitórios podem não ser identificados facilmente. O efeito de moléculas termo-sensíveis pode diminuir à medida que o número de ciclos da PCR se repete. Durante os primeiros ciclos da reação, estes compostos podem ser potentes inibidores, diminuindo seus efeitos à medida que o número de ciclos aumenta. A degradação do inibidor poderá permitir que a eficiência da reação seja recuperada (Kontanis & Reed, 2006).

A diversidade de leveduras presentes nos vinhos é monitorada por meio de testes fisiológicos e métodos moleculares. Com o avanço da biologia molecular, novas técnicas para a identificação e tipagem de microrganismos têm surgido. Para vinhos, no entanto, muitas vezes as técnicas são de difícil aplicação devido à dificuldade de obtenção de DNA livre de substâncias inibidoras da Taq DNA polimerase. Com isso, este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de uma metodologia de extração de DNA direta de amostras de vinho, sem o uso de reagentes de custo elevado e de kits para purificação do DNA. Para tanto, foi verificada a ação isolada de alguns compostos naturalmente presentes no vinho sobre a PCR.

6.2. MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1 Extração direta de DNA de vinho

Alíquotas de 10, 25 e 50 mL de vinho foram centrifugadas a 10000 x g por 10 minutos (Centrífuga Incibrás, Modelo Spin T, Brasil) e o *pellet* foi utilizado para extração de DNA seguindo protocolo descrito por Divol & Lonvaud-Funel (2005) com modificações. O *pellet* foi lavado duas vezes com cloreto de sódio 0,9%, e novamente centrifugado a 10000 x g por 10 minutos e transferido para 500 µL de tampão de lise (cloreto de sódio 0,15 M, Tris-HCl 50 mM, EDTA 10 mM, SDS 2,0%; pH 8,0). Após incubação por 1 hora em temperatura ambiente, foram adicionados 200 µL de fenol:clorofórmio (1:1) e os tubos foram agitados durante 3 minutos. Adicionaram-se 200 µL de TE e a mistura foi centrifugada a 10000 x g durante 5 minutos. Ao sobrenadante foi adicionado 1 mL de etanol puro a frio. Após homogeneização por imersão, a mistura foi deixada em repouso durante 10 minutos sob refrigeração e centrifugada a 10000 x g por 10 minutos. O *pellet* resultante foi ressuspensão em 400 µL de TE e 40 µL de acetato de sódio 5M. A mistura foi homogeneizada por inversão e centrifugada a 10000 x g por 10 minutos. O *pellet* foi seco a temperatura ambiente e suspenso em 50 µL de TE.

Diferentes pré-tratamentos para obtenção de DNA de amostras de vinho foram realizadas de acordo com Ohtsubo et al. (2008) e Savazzini & Martinelli (2006). Os pré-tratamentos estão descritos na Tabela 5. Todas as

amostras foram armazenadas a -18°C por 48 horas. O precipitado formado foi removido e o sobrenadante centrifugado para obtenção de *pellet* para extração de DNA. O *pellet* foi lavado com NaCl 0,9%, centrifugado a $10000 \times g$ por 10 minutos e adicionado de 1 mL de tampão de lise (cloreto de sódio 0,15 M, Tris-HCl 50 mM, EDTA 10 mM, SDS 2,0%; pH 8,0). Após incubação de 1 hora a 60°C , foi adicionado 200 μL de fenol:clorofórmio (1:1), o tubo foi agitado vigorosamente por 3 minutos e em seguida adicionaram-se 200 μL de TE. A amostra foi homogeneizada e centrifugada a $10000 \times g$ por 10 minutos. Ao sobrenadante foi adicionado igual volume de clorofórmio. Após homogeneização, a mistura foi centrifugada a $10000 \times g$ por 10 minutos. O sobrenadante foi removido e precipitado com igual volume de etanol puro a frio seguido de incubação a -18°C por 30 minutos. A amostra foi centrifugada a $10000 \times g$ por 15 minutos. O *pellet* foi lavado com etanol 70% a frio, seco em temperatura ambiente e suspenso em 50 μL de TE.

Tabela 5 – Diferentes pré-tratamentos aplicados a amostras de vinho para a extração de DNA

Volume de vinho (mL)	Volume do tratamento (mL)	Composto
45	5	Cloreto de Sódio 1,2 M
10	10	2-propanol 70%
10	10	2-propanol
7	43	Acetato de sódio 3 M pH 5,2
10	10	Isopropanol 70%
10	10	Isopropanol
10	10	Etanol 80%
10	10	Etanol 70%
10	10	Etanol 60%

Para verificar a eficiência de cada um dos pré-tratamentos e procedimentos de extração de DNA, uma alíquota de 2 μL foi submetida a

eletroforese em gel de agarose 1,0%, revelada com brometo de etídeo e visualizada sob luz UV.

6.2.2 Amplificação direta de DNA de vinho diluído

Testes de amplificação de DNA direto do vinho foram realizados, substituindo-se a água da reação por soluções de vinho na concentração de 0,001% ou vinho diluído nas proporções de 0,1:24,9 (mL vinho : mL água) e 0,1:49,9 (mL vinho : mL água). Para cada solução foram preparadas reações com e sem adição de DNA extraído por fenol-clorofórmio. As reações foram preparadas para um volume final total de 25 μ L contendo 1 μ L de DNA extraído pelo método do fenol-clorofórmio.

6.2.3 Utilização de processos físicos para extração direta de DNA de vinho

A extração de DNA direta de vinho foi realizada com base em diferentes processos físicos:

6.2.3.1 Fervura

O DNA de uma alíquota de vinho, inoculado com *D. bruxellensis* NRRL Y-12961, foi extraído por choque térmico a 90°C por 2 minutos. O sobrenadante foi separado por centrifugação a 10000 x g por 10 minutos e precipitado com isopropanol puro a frio. O DNA precipitado e o *pellet* obtido da centrifugação foram suspensos em água destilada estéril.

6.2.3.2 Congelamento-descongelo

O DNA de uma alíquota de vinho inoculado com *D. bruxellensis* NRRL Y-12961 foi extraído por congelamento-descongelo. O sobrenadante foi separado por centrifugação a 10000 x g por 10 minutos e precipitado com isopropanol (Chimie Test, BR). O DNA precipitado e o *pellet* obtido da centrifugação foram suspensos em água destilada estéril.

6.2.3.3 Filtração

Alíquotas de vinho tratadas termicamente a 90°C por 1 minuto e não tratadas foram filtradas em membranas com poros de 0,22 µm (Millipore, Brasil). O filtrado foi precipitado com isopropanol (Chimie Test, BR) a frio, deixado em repouso e centrifugado. O *pellet* resultante foi suspenso em água destilada estéril.

6.2.3.4 Centrifugação

Alíquotas de vinho inoculado com *D. bruxellensis* NRRL Y-12961 ou *Sacch. cerevisiae* Embrapa 1vvt/97 foram submetidas a diferentes etapas de centrifugação a 10000 x g por 10 a 15 minutos e lavagem do *pellet*. O sobrenadante, em alguns casos, foi precipitado com isopropanol (chimie Test, BR) e centrifugado (Centrífuga Sorval, USA). O *pellet* foi diluído em água destilada estéril e o DNA extraído por fervura a 90 °C por 2 minutos ou congelamento-descongelo.

A efetividade de cada um dos métodos de extração de DNA direta de amostra de vinho foi verificada por meio de PCR com oligonucleotídeos

universais para leveduras. Para tanto, reações foram preparadas para um volume final total de 25 μ L contendo 1 μ L das soluções acima como DNA molde.

6.2.4 Amplificação de DNA diretamente do vinho com diferentes enzimas

A amplificação do DNA diretamente do vinho foi realizada por substituição da água da reação por vinho nas concentrações 100 (puro), 75, 50, 25, 20, 15, 10 e 5%. Foram avaliadas as enzimas Taq DNA Polimerase Platinum (Invitrogen Corporation, USA) e Tth DNA Polimerase. As reações foram preparadas para um volume final de 25 μ L contendo 6,0 U da enzima.

6.2.5 Ação da quercitina, resveratrol, tanino, ácido gálico e catequina no processo de amplificação

Alguns compostos naturalmente presentes no vinho foram testados quanto à capacidade de inibição da PCR. O teste foi realizado por meio da substituição da água da reação por soluções de diferentes concentrações dos compostos quercitina (quercitina-3- β -D-glicosidade (Fluka)), resveratrol (Sigma), tanino (Grap'tan[®] PC, Ferco Quartier Viressac), ácido gálico Extrasynthèse, França) e catequina ((+)-Catechin Hydrate, Fluka Chemika). Para quercitina, resveratrol e tanino as concentrações utilizadas foram: 0,01, 0,05, 0,001, 0,002, 0,003, 0,004 e 0,005%. E para ácido gálico e catequina foram: 1000, 750, 500, 250, 100, 75, 50 e 25 μ M. As reações foram preparadas para um volume final total de 25 μ L.

A água da reação também foi substituída por soluções de vinho contendo catequina e ácido gálico nas concentrações de 1000, 750, 500, 250,

100, 75, 50 e 25 μM de cada substância. A partir destas soluções, misturas 1:1 de catequina:ácido gálico para cada concentração foram preparadas. As PCR foram realizadas no momento do preparo das soluções e também após 4 horas de incubação a 25°C com agitação de 150 rpm e sem agitação.

6.2.6 Extração de DNA direta do vinho e amplificação com oligonucleotídeos universais para leveduras e *D. bruxellensis*

Uma metodologia de extração de DNA direta do vinho com poucos estádios de processamento foi desenvolvida. Para extração foram utilizadas diferentes amostras de vinho fino tinto seco e vinho propositalmente contaminado com *D. bruxellensis* NRRL Y-12961. Uma alíquota de 1 mL de cada uma das amostras foi centrifugada e o sobrenadante descartado. O *pellet* foi cuidadosamente lavado com água destilada estéril. Após lavagem, centrifugou-se novamente e o *pellet* foi dissolvido em 20 μL de água destilada estéril. A extração de DNA foi realizada por congelamento-descongelamento do *pellet* diluído. A eficiência da extração foi verificada por meio de PCR com oligonucleotídeos universais para leveduras, conforme anteriormente descrito. As amostras que apresentaram produto de amplificação, indicando a eficiência da extração de DNA, foram submetidas à PCR com oligonucleotídeos específicos para *D. bruxellensis*. Cada reação foi preparada para um volume final de 25 μL contendo tampão da enzima Taq DNA polimerase 1x (Invitrogen Corporation, USA), 6,0U de enzima Taq DNA Polimerase Platinum (Invitrogen Corporation, USA), 0,1mM de cada dNTP (Invitrogen Corporation, USA), 2,5mM de MgCl_2 (Invitrogen Corporation, USA), 0,8pmol de cada oligonucleotídeo (DbrF e DbrR) (Integrated DNA Technologies Inc., USA) e 1 μL

de DNA extraído. As reações foram submetidas a 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, pareamento a 60°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos. Foram utilizadas uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos e uma extensão final a 72°C por 5 minutos. O produto de amplificação foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,2% (Sigma Chemical, USA) com tampão TBE 1X (Tris-Base 0,1M (Invitrogen Life Technologies, USA), ácido bórico 0,09M (Merck, Germany), EDTA 1mM (Sigma-Aldrich CO., USA) pH 8,3), revelado com brometo de etídeo e fotografado utilizando transiluminador UV Eagle Eye II Video Imaging System (Stratagene, California, USA).

6.2.7 Reação em Cadeia da Polimerase

Cada reação foi preparada para um volume final total de 25 µL contendo tampão da enzima Taq DNA polimerase 1x (Invitrogen Corporation, USA), 1,5 U de enzima Taq DNA Polimerase Platinum (Invitrogen Corporation, USA), 0,1 mM de cada dNTP (Invitrogen Corporation, USA), 2,5 mM de MgCl₂ (Invitrogen Corporation, USA), 0,8 pmol de cada oligonucleotídeo (Yf e Yr) (Integrated DNA Technologies Inc., USA) e 1 µL de DNA extraído da linhagem *Sacch. cerevisiae* Embrapa 1vvt/97. As reações foram submetidas a 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, pareamento a 68°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos. Foram utilizadas uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos e uma extensão final a 72°C por 5 minutos.

6.2.8 Eletroforese

O produto de amplificação foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,2% (Sigma Chemical, USA) com tampão TBE 1X (Tris-Base 0,1M (Invitrogen Life Technologies, USA), ácido bórico 0,09M (Merck, Germany), EDTA 1mM (Sigma-Aldrich CO., USA) pH 8,3), revelado com brometo de etídeo e fotografado utilizando transiluminador UV Eagle Eye II Video Imaging System (Stratagene, California, USA).

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.3.1 Extração direta de DNA de vinho

Métodos de extração de DNA direto de vinho são importantes por tornarem mais rápidos os procedimentos de identificação e detecção de microrganismos e, desta forma, quando necessário, auxiliar na tomada de decisão para se efetuar medidas corretivas em tempo hábil. Diferentes protocolos de extração descritos na literatura foram utilizados como base para modificações e testes de extração. Nenhuma das modificações realizadas a partir do protocolo descrito por Divol & Lonvaud-Funel (2005) teve sucesso. Nenhum dos diferentes pré-tratamentos das amostras de vinho realizados com base nos procedimentos descritos por Ohtsubo et al. (2008) e Savazzini & Martinelli (2006) se mostrou adequado para aumentar a eficiência da extração.

Independente do procedimento adotado, não foi verificada a presença de DNA total na amostra por eletroforese em gel de agarose. Estes resultados não descartam a possibilidade de ter alguma quantidade de DNA presente após a extração, uma vez que, pequenas quantidades são suficientes para amplificação. Salonen et al. (2010) compararam o rendimento da extração de DNA de quatro diferentes protocolos por meio de PCR em tempo real. Os métodos apresentaram variação no rendimento de até 35 vezes. As diferenças encontradas entre as metodologias servem como um passo para a comparação e análise confiável dos resultados obtidos em diferentes laboratórios. A

avaliação da qualidade e da quantidade de DNA extraído com seis diferentes protocolos foi realizada por meio de espectrometria, eletroforese em gel de agarose e PCR em tempo real (Psifidi et al, 2010). Os autores verificaram que diferentes protocolos extraem diferentes quantidades de DNA. Jara et al. (2008) para verificar a qualidade de DNA extraído de amostras de vinho e de vinagre, submeteram este DNA à amplificação por meio de PCR convencional. Os diferentes métodos utilizados para extração de DNA de vinho e de vinagre mostraram a necessidade de tratamentos (lavagem com polivinil pirrolidona ou cloreto de sódio) para recuperar DNA de qualidade adequada para amplificação. Os piores resultados obtidos pelos autores para a recuperação e amplificação de DNA foi com o procedimento de choque térmico para extração.

6.3.2 Amplificação direta de DNA de vinho diluído

Muitos trabalhos sobre amplificação direta de vinho fazem o uso de kits de purificação do DNA (Phister & Mills, 2003; Delaherche et al., 2004; Tessonnière et al., 2009). Como estes kits são de difícil aquisição e de custo elevado, vinho diluído foi usado diretamente na PCR em substituição à água da reação, objetivando desenvolver um procedimento rápido, de baixo custo e de fácil aplicação para amplificação direta de DNA contido em vinho. Das diluições testadas, produto de amplificação foi observado apenas quando vinho diluído na proporção de 0,1:49,9 (mL vinho : mL de água) foi utilizado. Componentes fenólicos da amostra ou carreados do procedimento de purificação do DNA podem inibir a PCR por ligarem-se ou promoverem a desnaturação da polimerase (Wilson, 1997). Como a PCR apresenta uma natureza exponencial do número de moléculas amplificadas, um pequeno número de moléculas de

DNA molde é suficiente no início da reação. Então, as amostras podem ser frequentemente diluídas para que os componentes inibidores tornem-se incapazes de atuar na inibição da amplificação do DNA remanescente (Kontanis & Reed, 2006).

6.3.3 Utilização de processos físicos para extração direta de DNA de vinho

Diferentes processos físicos foram utilizados com o objetivo de aumentar a capacidade de extração de DNA, promover um aumento na concentração do DNA presente na amostra e remover compostos que atuam como inibidores. Os processos utilizados foram fervura, congelamento-descongelamento, filtração e centrifugação. Precipitação com etanol a frio foi utilizada em alguns casos. Para verificar a eficiência da extração, alíquotas do DNA extraído foram utilizadas diretamente na PCR, evitando, desta forma, que a baixa concentração fosse adotada como ausência de DNA. A PCR para verificar o procedimento de extração não mostrou produto de amplificação em nenhum dos testes. Os resultados tanto para o uso de vinho diluído quanto para os procedimentos físicos mostram que o vinho possui muitos compostos capazes de inibir a PCR, indicando a necessidade de otimizar ainda mais os processos de extração bem como buscar outras alternativas para amplificação.

A extração de DNA é usualmente afetada por fatores como lise celular incompleta, adsorção do DNA a partículas do material, co-extração de inibidores enzimáticos e degradação ou danos do DNA (Jara et al., 2008). A qualidade do DNA é um fator crítico para a maioria das análises baseadas na amplificação. Isso ocorre em função da amplificação do DNA ser influenciada pela presença de inibidores da amostra ou dos reagentes da extração, os quais

podem reduzir a eficiência da PCR. Danos ao DNA também podem ocorrer durante a extração por meio de oxidação e hidrólise enzimática. Com isso, tampões de extração precisam ser cuidadosamente preparados (Smith et al., 2005).

6.3.4 Amplificação de DNA diretamente do vinho com diferentes enzimas

Assumindo que a enzima sofre ação inibitória por parte dos compostos presentes no vinho, a enzima Tth DNA polimerase foi utilizada. Esta enzima foi escolhida pela sua ampla utilização em PCR de amostras clínicas, as quais são notadamente conhecidas por apresentarem elevado número de compostos inibidores. Para amplificação direta de vinho foi adotado o uso de 6,0U de enzima em função dos testes feitos com a enzima Tth DNA polimerase que indicaram ser esta a melhor concentração para amplificação de DNA na ausência de inibidores. Com a utilização da enzima Tth DNA polimerase e soluções de vinho em substituição à água da reação, não foi possível observar produto de amplificação do fragmento de 375 pb da região 18S do rDNA para nenhuma das concentrações, nem mesmo quando solução contendo apenas 5% de vinho foi utilizada (Figura 7). O mesmo resultado foi obtido para a enzima Taq DNA polimerase (Figura 8). Estes resultados indicam que as substâncias presentes no vinho exercem um forte efeito inibidor sobre a PCR e que nem mesmo o uso da enzima Tth DNA polimerase possibilitou a amplificação em concentrações mais elevadas. Em vinhos e vinagres, a presença de polissacarídeos e compostos polifenólicos pode interferir com reações enzimáticas e ainda degradar o DNA durante extração direta (Jara et

al., 2008). Diferentes procedimentos precisam ser desenvolvidos para que amplificação direta do vinho tenha sucesso.

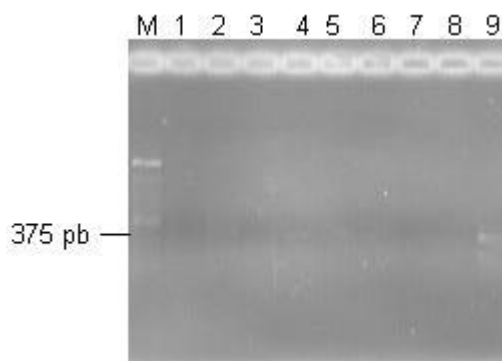


Figura 7– Eletroforese em gel de agarose 1,0% do produto de amplificação de 375 pb da região 18S do rDNA de *Sacch. cerevisiae* na presença de diferentes concentrações de vinho em substituição à água da PCR com a enzima Tth DNA polimerase. M – Marcador 100 pb; Soluções de vinho em substituição à água da reação: 1 – vinho 100%; 2 – vinho 75%; 3 – vinho 50%; 4 - vinho 25%; 5 – vinho 20%; 6 – vinho 15%; 7 – vinho 10%; 8 – vinho 5%; 9 – controle positivo.

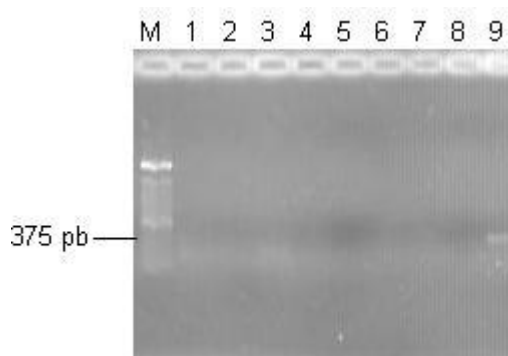


Figura 8 – Eletroforese em gel de agarose 1,0% do produto de amplificação de 375 pb da região 18S do rDNA de *Sacch. cerevisiae* na presença de diferentes concentrações de vinho em substituição à água da PCR com a enzima Taq DNA polimerase. M – Marcador 100 pb; Soluções de vinho em substituição à água da reação: 1 – vinho 100%; 2 – vinho 75%; 3 – vinho 50%; 4 - vinho 25%; 5 – vinho 20%; 6 – vinho 15%; 7 – vinho 10%; 8 – vinho 5%; 9 – controle positivo.

A comparação entre as enzimas Tth DNA polimerase e Taq DNA polimerase foi realizada por Shames et al. (1995) para identificação por meio de PCR de *Helicobacter hepaticus* de fezes de rato. Em condições idênticas, a

sensibilidade foi aumentada em 100 vezes quando a enzima Tth DNA polimerase foi empregada. Outro estudo comparativo entre estas duas enzimas foi realizado por Kim et al. (2001), para detecção de *Staphylococcus aureus* em leite. Com a enzima Tth DNA polimerase, a sensibilidade da PCR aumentou. O efeito da hemoglobina sobre a enzima Tth DNA polimerase foi verificado com PCR a partir DNA de *Listeria monocytogenes* (Al-Soud & Radstrom, 2001). Os autores verificaram que a Tth DNA polimerase foi menos sensível que a enzima Ampli Taq Gold e que, dependendo da concentração de hemoglobina presente, esta é uma das enzimas que não é completamente inibida. Todos estes resultados diferem daqueles encontrados para vinho, onde a enzima Tth DNA polimerase não se mostrou capaz de promover a amplificação.

6.3.5 Ação da quercitina, resveratrol, tanino, ácido gálico e catequina no processo de amplificação

A PCR pode sofrer a interferência de diferentes compostos que em determinadas concentrações inibem o processo de amplificação. Após verificar que amplificação direta de vinho não foi conseguida, nem mesmo com o uso de enzimas tida como menos sensível e em concentração elevada, a influência de alguns compostos do vinho foi avaliada isoladamente quanto à capacidade de inibição da PCR.

A água da PCR foi substituída por soluções de diferentes concentrações de quercitina, resveratrol e tanino para verificar a capacidade de inibição por parte destes compostos. Inicialmente, foi observado que quercitina e resveratrol, mesmo em concentrações elevadas não quantificadas não exerciam interferência sobre a PCR, enquanto que tanino independentemente

da concentração usada promoveu a inibição (Bernardi et al., 2009; da Silva et al., 2009). Os compostos quercitina (Figura 9) e resveratrol (Figura 10) não exerceram efeito inibitório sobre a PCR independente da concentração utilizada. Resultado contrário foi observado para tanino (Figura 11) que foi capaz de inibir a PCR em todas as concentrações, exceto para a concentração de 0,001% de tanino. É importante destacar que o tanino utilizado nestes testes, trata-se de uma mistura complexa, denominada tanino enológico. Esta mistura é a única que pode ser utilizada em vinificação (Ferco, 2010). Taninos são conhecidos por sua capacidade de inibir a PCR, sendo um contaminante importante do DNA que requer protocolos de purificação específicos (Kontanis & Reed, 2006).

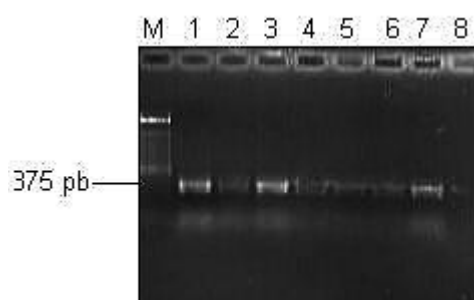


Figura 9 – Eletroforese em gel de agarose 1,0% do produto de amplificação de 375 pb da região 18S do rDNA de *Sacch. cerevisiae* na presença de diferentes concentrações de quercitina em substituição à água da PCR. M – Marcador 100 pb; 1 – 0,01%; 2 – 0,05%; 3 – 0,001%; 4 – 0,002%; 5 – 0,003%; 6 – 0,004%; 7 – 0,005%; 8 – controle positivo

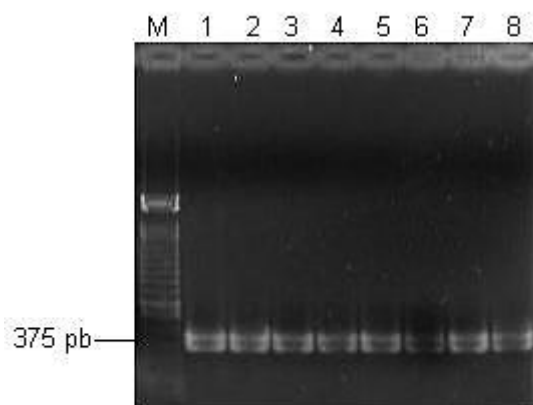


Figura 10 – Eletroforese em gel de agarose 1,0% do produto de amplificação de 375 pb da região 18S do rDNA de *Sacch. cerevisiae* na presença de diferentes concentrações de resveratrol em substituição à água da PCR. M – Marcador 100 pb; 1 – controle positivo; 2 – 0,01%; 3 – 0,05%; 4 – 0,001%; 5 – 0,002%; 6 – 0,003%; 7 – 0,004; 8 – 0,005%.

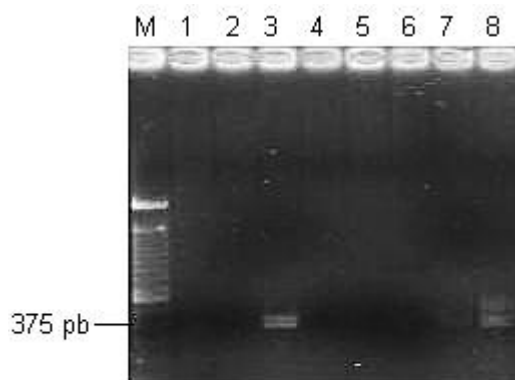


Figura 11 – Eletroforese em gel de agarose 1,0% do produto de amplificação de 375 pb da região 18S do rDNA de *Sacch. cerevisiae* na presença de diferentes concentrações de tanino em substituição à água da PCR. M – Marcador 100 pb; 1 – 0,01%; 2 – 0,05%; 3 – 0,001%; 4 – 0,002%; 5 – 0,003%; 6 – 0,004; 7 – 0,005%; 8 – controle positivo.

Outros dois compostos, o ácido gálico e a catequina, também foram testados. Para ácido gálico, houve amplificação para as concentrações de 75, 50 e 25 μM . Quando a água da reação foi substituída por soluções de catequina, foi possível obter amplificação nas concentrações de 100, 75, 50 e 25 μM .

Misturas de soluções de ácido gálico e catequina foram preparadas e utilizadas em substituição à água da PCR para verificar se algum tipo de

interação ocorria entre os compostos, eliminando, assim, o efeito inibitório. Não foi possível observar produto de amplificação no momento em que as soluções (Figura 12) e misturas (Figura 13) foram preparadas e utilizadas na PCR, nem após 4 horas de incubação com agitação (Figura 14) e sem agitação (Figura 15).

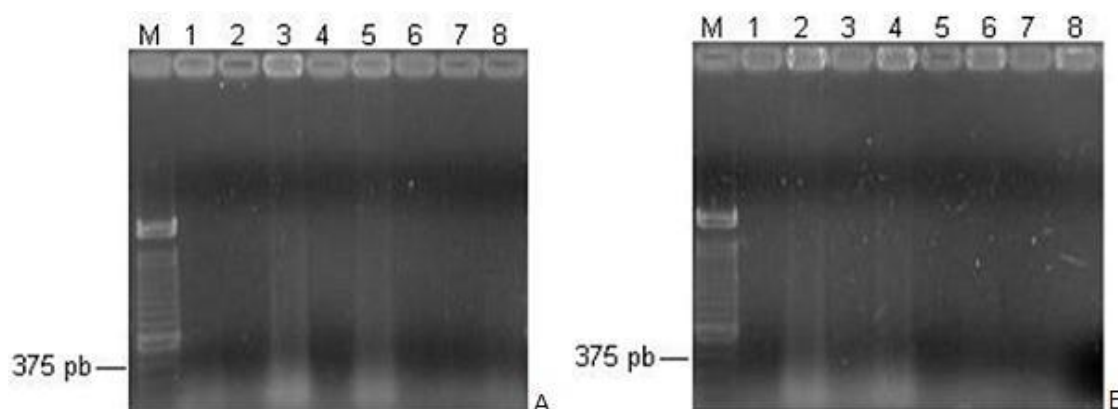


Figura 12 – Produto de amplificação de um segmento específico de 375 pb da região 18S do rDNA de *Sacch. cerevisiae* na presença de ácido gálico e catequina no momento que as soluções foram preparadas. M - Marcador 100 bp; **A**: 1 - ácido gálico 250 μ molar; 2 - ácido gálico 500 μ molar; 3 - ácido gálico 750 μ molar; 4 - ácido gálico 1000 μ molar; 5 - catequina 250 μ molar; 6 - catequina 500 μ molar; 7 - catequina 750 μ molar; 8 - catequina 1000 μ molar; **B**: 1 - ácido gálico 25 μ molar; 2 - ácido gálico 50 μ molar; 3 - ácido gálico 75 μ molar; 4 - ácido gálico 100 μ molar; 5 - catequina 25 μ molar; 6 - catequina 50 μ molar; 7 - catequina 75 μ molar; 8 - catequina 100 μ molar.

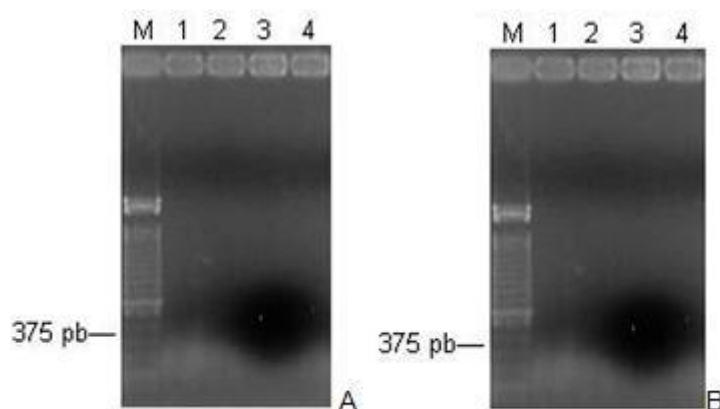


Figura 13 – Produto de amplificação de um segmento específico de 375 pb da região 18S do rDNA de *Sacch. cerevisiae* na presença de ácido gálico + catequina no momento que as soluções foram preparadas. M - Marcador 100 bp; **A**: 1 - ácido gálico 250 μ molar + catequina 250 μ molar; 2 - ácido gálico 500 μ molar + catequina 500 μ molar; 3 - ácido gálico 750 μ molar + catequina 750 μ molar; 4 - ácido gálico 1000 μ molar + catequina 1000 μ molar; **B**: 1 - ácido gálico 25 μ molar + catequina 25 μ molar; 2 - ácido gálico 50 μ molar + catequina 50 μ molar; 3 - ácido gálico 75 μ molar + catequina 75 μ molar; 4 - ácido gálico 100 μ molar + catequina 100 μ molar;

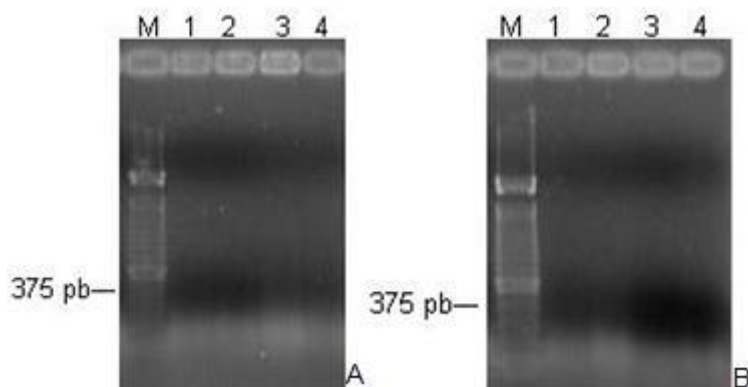


Figura 14 – Produto de amplificação de um segmento específico de 375 pb da região 18S do rDNA de *Sacch. cerevisiae* na presença de ácido gálico + catequina após 4 horas de incubação a 25°C. M - Marcador 100 bp; **A**: 1 - ácido gálico 250 μ molar + catequina 250 μ molar; 2 - ácido gálico 500 μ molar + catequina 500 μ molar; 3 - ácido gálico 750 μ molar + catequina 750 μ molar; 4 - ácido gálico 1000 μ molar + catequina 1000 μ molar; **B**: 1 - ácido gálico 25 μ molar + catequina 25 μ molar; 2 - ácido gálico 50 μ molar + catequina 50 μ molar; 3 - ácido gálico 75 μ molar + catequina 75 μ molar; 4 - ácido gálico 100 μ molar + catequina 100 μ molar.

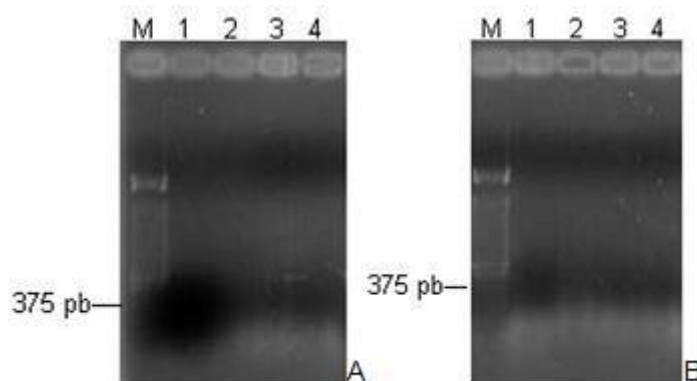


Figura 15 – Produto de amplificação de um segmento específico de 375 pb da região 18S do rDNA de *Sacch. cerevisiae* na presença de ácido gálico + catequina após 4 horas de incubação a 25°C e 150 rpm. M - Marcador 100 bp; **A:** 1 - ácido gálico 250 μ molar + catequina 250 μ molar; 2 - ácido gálico 500 μ molar + catequina 500 μ molar; 3 - ácido gálico 750 μ molar + catequina 750 μ molar; 4 - ácido gálico 1000 μ molar + catequina 1000 μ molar; **B:** 1 - ácido gálico 25 μ molar + catequina 25 μ molar; 2 - ácido gálico 50 μ molar + catequina 50 μ molar; 3 - ácido gálico 75 μ molar + catequina 75 μ molar; 4 - ácido gálico 100 μ molar + catequina 100 μ molar.

A amplificação de DNA por meio da PCR pode ser frequentemente inibida por substâncias que estão presentes na alíquota de DNA molde utilizada. Estas substâncias podem ser co-extraídas da amostra com o DNA ou resíduos de reagentes utilizados nos protocolos químicos padrões de extração. As substâncias inibidoras atuam em um ou mais dos três pontos essenciais da reação. Podem interferir na lise celular, na degradação de ácidos nucléicos e na inibição da atividade da polimerase (Davalieva & Efremov, 2010). A detecção de microrganismos por meio da PCR pode ser inibida ou ter sua eficiência de amplificação reduzida na presença destas substâncias, principalmente quando se objetiva a amplificação de DNA contido em amostras como sangue, fluídos, vinho e solo. A interferência destas substâncias na PCR pode ocasionar resultados falso-negativos. Entre estes compostos estão os sais, grupos heme no sangue, compostos fenólicos entre outros. A presença de inibidores aumenta os erros, reduz a resolução do ensaio e produz falsos

resultados tanto em PCR quantitativo quanto qualitativo (Hugget et al., 2008). A redução ou remoção de inibidores da PCR é essencial na detecção de microrganismos de amostras ambientais. De modo geral, a redução ou remoção de inibidores tem sido realizada por meio do isolamento do microrganismo antes da extração de DNA, remoção de inibidores durante ou depois da extração e diminuição ou supressão dos efeitos da inibição (Jiang et al., 2005).

A amplificação ineficiente pode ser resultante de insuficiente quantidade de DNA de peso molecular adequado ou então devido à presença de inibidores no DNA extraído. O efeito inibitório pode estar ligado à precipitação do DNA, à desnaturação das proteínas ou à inibição da ligação entre a enzima polimerase com íons magnésio (Demeke & Jenkis, 1990). No que se refere ao presente trabalho, a hipótese de insuficiente quantidade de DNA pode ser descartada, uma vez que uma alíquota de DNA concentrada foi usada como DNA molde em cada reação.

6.3.6 Extração direta de DNA do vinho e amplificação com oligonucleotídeos universais para leveduras e *D. bruxellensis*

Observando-se que procedimentos físicos simples e o uso de enzima especial utilizando oligonucleotídeos universais para leveduras, não foram suficientes para promover a amplificação de DNA diretamente de amostras de vinho, e ainda que, compostos naturalmente presentes exercem forte inibição, um protocolo de extração com poucos estádios foi desenvolvido. O uso de centrifugação, lavagem do *pellet* e extração por congelamento-descongelamento seguida de PCR com oligonucleotídeos universais para

leveduras mostrou-se eficiente na extração e amplificação de DNA diretamente de vinho (Figura 16). Este protocolo dispensou o uso de etapa de precipitação do DNA do vinho. Esta etapa pode também ser responsável pela precipitação de compostos que atuam como inibidores. Métodos de extração de DNA para uso de rotina devem ser simples, rápidos e eficientes. As amostras que apresentaram produto de amplificação com oligonucleotídeos universais para leveduras, foram submetidas à PCR com oligonucleotídeos específicos para *D. bruxellensis*. Com oligonucleotídeos universais para leveduras, 14 amostras de vinho apresentaram produto de amplificação. Destas, nenhuma amplificou com oligonucleotídeos específicos para *D. bruxellensis* (Figura 17). É conveniente destacar que as amostras que não amplificaram com oligonucleotídeos universais para leveduras apresentaram um precipitado escuro após o procedimento. Neste precipitado devem estar presentes compostos com capacidade inibitória da Taq DNA polimerase. Alíquotas de vinho propositalmente contaminadas também foram submetidas à extração e amplificação com os dois pares de oligonucleotídeos em momentos diferentes. Após verificar que, com o par de oligonucleotídeos universais para leveduras, o procedimento de extração foi eficiente, as amostras foram submetidas à amplificação com oligonucleotídeos específicos para *D. bruxellensis* (Figura 18). Com base no resultado da Figura 18, verificou-se que o protocolo proposto, envolvendo procedimento de extração de DNA direta do vinho, seguida de amplificação com os pares de oligonucleotídeos desenvolvidos, podem ser facilmente empregados para a detecção de leveduras *D. bruxellensis* contaminantes de vinhos e alimentos. Considerando-se algumas características destas leveduras como a lenta taxa de crescimento em meio de

cultivo, dificuldade de identificação por técnicas taxonômicas tradicionais e as perdas econômicas que podem ocasionar ao produzir compostos fenólicos voláteis em quantidades superiores ao limiar de percepção no vinho, a metodologia de detecção e identificação desenvolvida apresenta grande importância e potencial de aplicação ao setor vinícola. Com a presente metodologia, a detecção e identificação podem ser realizadas em menos de 48 horas, tempo bem inferior aquele necessário para identificação taxonômica tradicional, considerando apenas o tempo necessário para a identificação, sem levar em conta o tempo para obtenção da cultura pura.

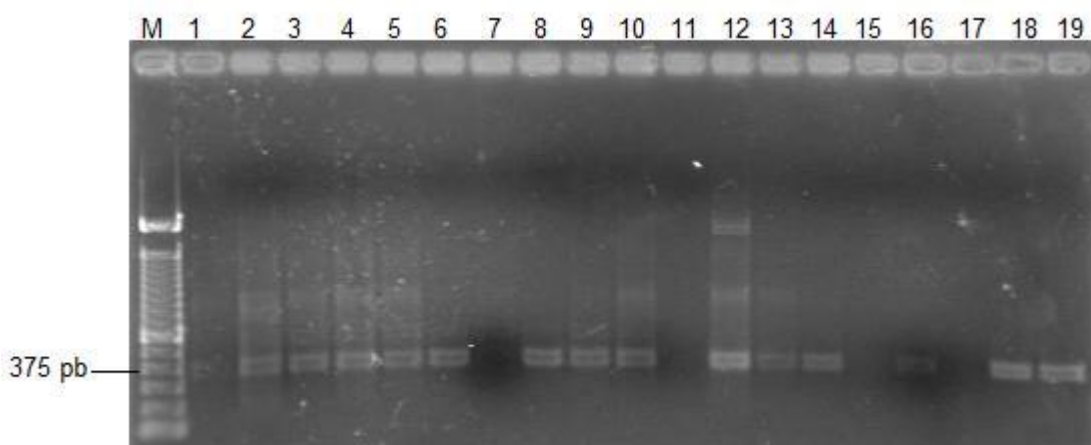


Figura 16 – Produto de amplificação de um segmento específico de 375 pb da região 18S do rDNA obtido com oligonucleotídeos universais para leveduras utilizando DNA extraído diretamente de vinho. M – Marcador 100 pb; 1 a 18 – diferentes amostras de vinho tinto; 19 – controle positivo.

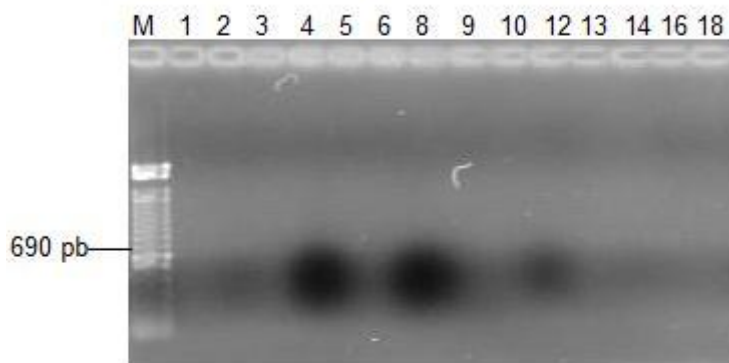


Figura 17 – Produto de amplificação de um segmento específico de 690 pb da região 18S do rDNA obtido com oligonucleotídeos específicos para *D. bruxellensis* utilizando DNA extraído diretamente de vinho das amostras. M – Marcador 100 pb; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 16, 18 – amostras que amplificaram com oligonucleotídeos universais para leveduras.

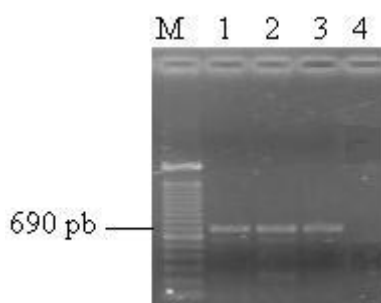


Figura 18 – Produto de amplificação de um segmento específico de 690 pb da região 18S do rDNA obtido com oligonucleotídeos específicos para *D. bruxellensis* utilizando DNA extraído diretamente de amostras de vinho propositalmente contaminadas com *D. bruxellensis*. M – Marcador 100 pb; 1 e 2 – amostras; 3 – controle positivo.

Analisando-se os resultados obtidos, algumas considerações sobre extração e amplificação direta de DNA contido em vinho e sobre a influência de diferentes compostos presentes no vinho, e testados isoladamente, podem ser feitas. Pode-se dizer que o não aparecimento de bandas de DNA total após eletroforese em gel de agarose não significa necessariamente ausência de DNA amplificável. Se for considerado que a amplificação de DNA é constante a partir do primeiro ciclo, que a quantidade de DNA amplificado depende do número de ciclos e que a eficiência de amplificação é de 100%, após 25 ciclos uma molécula de DNA produzirá $6,7 \times 10^7$ moléculas. A presença de

compostos presentes no vinho, no entanto, poderão atuar como inibidores da amplificação. Este fato pode ser claramente demonstrado pela utilização de vinho diluído como DNA molde na PCR. As diferentes metodologias de extração pelos processos físicos também não foram suficientes para remover os inibidores da PCR. Nem a utilização da enzima menos sensível a inibidores, Tth DNA polimerase, e nem a concentração elevada da Taq DNA polimerase foram capazes de promover a amplificação do DNA quando vinho tinto em concentrações iguais ou superiores a 5% foram utilizadas, demonstrando o forte potencial inibidor dos diferentes compostos presentes no vinho. Após testar a influência isolada dos compostos quercitina, resveratrol, tanino, ácido gálico e catequina e verificar que apenas os dois primeiros não exercem influência, um protocolo de extração direta foi proposto com o objetivo de eliminar estas substâncias. Pode-se observar que a extração e amplificação direta de DNA de vinho é possível, desde que o protocolo envolva limpeza eficiente do *pellet* seguido de amplificação com oligonucleotídeos específicos na presença de elevada concentração de enzima. É conveniente ressaltar que mesmo utilizando elevada quantidade de enzima (6,0 U), a técnica proposta não perde sua validade, considerando-se as perdas econômicas que podem ocorrer ao longo do período necessário para obtenção da identificação por técnicas tradicionais.

6.4 REFERÊNCIAS

AL-SOUD, W. A.; RÅDSTRÖM, P. Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. **J Clin Microbiol**, 39(2), 485–493. 2001

COCOLIN, L.; RANTSIOU, K.; LACUMIN, L.; ZIRONI, R.; COMI, G. Molecular detection and identification of *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* and *Brettanomyces/Dekkera anomalus* in spoiled wines. **Appl Environ Microbiol**, 70(3), 1347–1355. 2004.

COUTO, J.A.; BARBOSA, A.; HOGG, T. A simple cultural method for the presumptive detection of the yeasts *Brettanomyces/Dekkera* in wines. **Lett Appl Microbiol**, 41(6), 505–510. 2005.

DAVALIEVA, K.; EFREMOV, G.D. Influence of salts and PCR inhibitors on the amplification capacity of three thermostable DNA polymerases. **Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering**, 29(1), 57–62. 2010.

DELAHERCHE, A.; CLAISSE, O.; LONVAUD-FUNEL, A. Detection and quantification of *Brettanomyces bruxellensis* and 'ropy' *Pediococcus damnosus* strains in wine by real-time polymerase chain reaction. **J Appl Microbiol**, 97(5), 910–915. 2004.

DEMEKE, T.; JENKINS, G.R. Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. **Anal Bioanal Chem**, 396(6), 1977–1990. 2010.

HUGGETT, J.F.; NOVAK, T.; GARSON, J.A.; GREEN, C.; MORRIS-JONES, S.D.; MILLER, R.F.; ZUMLA, A. Differential susceptibility of PCR reactions to inhibitors: an important and unrecognised phenomenon. **BMC Res Notes**, 1:70. 2008

IBEAS, J.I.; LOZANO, I.; PERDIGONES, F.; JIMENEZ, J. Detection of *Dekkera-Brettanomyces* strains in sherry by a nested PCR method. **Appl Environ Microbiol**, 62(3), 998–1003. 1996

JARA, C.; MATEO, E.; GUILLAMÓN, J.M.; TORIJA, M.J.; MAS, A. Analysis of several methods for the extraction of high quality DNA from acetic acid bacteria in wine and vinegar for characterization by PCR-based methods. **Int J Food Microbiol**, 128(2):336–341. 2008.

JIANG, J.; ALDERISIO, K.A.; SINGH, A.; XIAO, L. Development of procedures for direct extraction of *Cryptosporidium* DNA from water concentrates and for relief of PCR inhibitors. **Appl Environ Microbiol**, 71(3), 1135–1141. 2005.

KIM, C.H.; KHAN, M.; MORIN, D.E.; HURLEY, W.L.; TRIPATHY, D.N.; KEHRLI, M.; OLUOCH, A.O.; KAKOMA, I. Optimization of the PCR for detection of

Staphylococcus aureus nuc gene in bovine milk. **J Dairy Sci**, 84(1), 74–83. 2001.

KONTANIS, E. J. AND REED, F. A. Evaluation of real-time PCR amplification efficiencies to detect PCR inhibitors. **J Forensic Sci**, 51(4), 795–804. 2006.

NAKAMURA, S.; HARAGUCHI, K.; MITANI, N.; OHTSUBO, K. Novel preparation method of template DNAs from wine for pcr to differentiate grape (*Vitis vinifera* L.) cultivar. **J Agric Food Chem**, 55(25), 10388–10395. 2007.

OHTSUBO, K.; SUZUKI, K.; HARAGUCHI, K.; NAKAMURA, S. Novel method for preparation of the template DNA and selection of primers to differentiate the material rice cultivars of rice wine by PCR. **J Biochem Biophys Methods**, 70(6), 1020–1028. 2008

PHISTER, T. G.; MILLS, D. A. Real-time PCR assay for detection and enumeration of *Dekkera bruxellensis* in wine. **Appl Environ Microbiol**, 69(12), 7430–7434. 2003.

PSIFIDI, A.; DOVAS, C.I.; BANOS, G. A comparison of six methods for genomic DNA extraction suitable for PCR-based genotyping applications using ovine milk samples. **Mol Cell Probes**, 24(2), 93–98. 2010.

RODRIGUES, N.; GONÇALVES, G.; DA SILVA, S.P.; MALFEITO-FERREIRA, M.; LOUREIRO, V. Development and use of a new medium to detect yeasts of the genera *Dekkera/Brettanomyces*. **J Appl Microbiol**, 90(4), 588–599. 2001.

SALONEN, A.; NIKKILÄ, J.; JALANKA-TUOVINEN, J.; IMMONEN, O.; RAJILIĆ-STOJANOVIĆ, M.; KEKKONEN, R.A.; PALVA, A.; DE VOS, W.M. Comparative analysis of fecal DNA extraction methods with phylogenetic microarray: effective recovery of bacterial and archaeal DNA using mechanical cell lysis. **J Microbiol Methods**, 81(2), 127–134. 2010.

SAVAZZINI, F.; MARTINELLI, L. DNA analysis in wines: Development of methods for enhanced extraction and real-time polymerase chain reaction quantification. **Analytica Chimica Acta**, 563, 274–282. 2006.

SHAMES, B.; FOX, J.G.; DEWHIRST, F.; YAN, L.; SHEN, Z.; TAYLOR, N.S. Identification of widespread *Helicobacter hepaticus* infection in feces in commercial mouse colonies by culture and PCR assay. **J Clin Microbiol**, 33(11), 2968–2972. 1995.

SMITH, D.S.; MAXWELL, P.W.; BOER, S.H.D. Comparison of several methods for the extraction of DNA from potatoes and potato-derived products. **J Agric Food Chem**, 53(26), 9848–9859. 2005.

STURM, J.; GROSSMANN, M.; SCHNELL, S. Influence of grape treatment on the wine yeast populations isolated from spontaneous fermentations. **J Appl Microbiol**, 101(6), 1241–1248. 2006.

TESSONNIÈRE, H.; VIDAL, S.; BARNAVON, L.; ALEXANDRE, H.; REMIZE, F. Design and performance testing of a real-time PCR assay for sensitive and reliable direct quantification of *Brettanomyces* in wine. **Int J Food Microbiol**, 129(3), 237–243. 2009.

URSO, R.; RANTSIOU, K.; DOLCI, P.; ROLLE, L.; COMI, G.; COCOLIN, L. Yeast biodiversity and dynamics during sweet wine production as determined by molecular methods. **FEMS Yeast Res**, 8(7):1053–1062. 2008.

WILSON, I. G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. **Appl Environ Microbiol**, 63(10), 3741–3751. 1997.

7. CAPÍTULO 5:

INHIBITION OF PCR AND YEAST ACTIVITY BY PHTHALIMIDES

**Artigo preparado de acordo com as instruções do
“World Journal Of Microbiology and Biotechnology”**

PCR and yeast activity inhibition by phthalimides

Gildo Almeida da Silva^{1*}; Taís Letícia Bernardi²; Patrícia D. C. Shacker³; Loiva M.R. de Mello¹; Patricia Valente⁴

¹Embrapa Uva e Vinho, Department of Microbiology, 95700-000, Bento Gonçalves, RS, Brazil

²Embrapa Uva e Vinho/UFRGS-Capes-PhD Scholarship, 95700-000, Bento Gonçalves, RS, Brazil

³Embrapa Uva e Vinho/UFRGS-CNPq-PIBIC Scholarship, 95700-000, Bento Gonçalves, RS, Brazil

⁴Department of Microbiology - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, Brazil

Abstract

The off-flavour metabolites produced by contaminant yeasts is often economically disastrous to wine quality, resulting in a lower sale price. These microorganisms are difficult to detect because of their slow growth. The polymerase chain reaction (PCR) can overcome several microbiological difficulties but this essentially enzymatic reaction can also be susceptible to specific problems. Besides the presence of wine naturally occurring inhibitors, agricultural practices, like fungicide treatments may also be external sources of inhibiting factors of PCR. Phthalimides compounds are widely employed in Brazilian vineyards to control fungal threats. The action of different concentrations of N-trichloromethylthio-4-cyclohexane-1,2-dicarboximide (1200, 600, 300, 150, 75, and 37.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and N-trichloromethylthio-phthalimide (675, 337.5, 168.8, 84.4, 42.2 and 21.1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) upon PCR amplification of a 375 bp DNA fragment specific for the 18S region and on the metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* was evaluated. The amplification was observed only at 75, and 37.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ N-trichloromethylthio-4-cyclohexane-1,2-dicarboximide. Negligible amplification was obtained at 42.2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ N-trichloromethylthio-phthalimide and visible amplification was possible only at 21.1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ N-trichloromethylthio-phthalimide. These phthalimides are strong Taq polymerase inhibitors. depending on the concentration, the presence of both fungicides can make the laborious work of monitoring process of spoilage microorganisms in wine more difficult. These fungicides also showed to be strong inhibitors of the yeast cell metabolism at all concentrations here used.

Introduction

The off-flavour metabolites produced by nutritionally fastidious yeasts are economically disastrous to the wine producer since they render the wine unpalatable, decreasing its quality, and resulting in a lower sale price. These microorganisms are difficult to detect by traditional culture media since those techniques involve complex enrichment. Selective and/or differential media able to recover and detect *Dekkera* and *Brettanomyces* (DBDM) have been developed (Rodrigues et al., 2001). This medium only inhibits the growth of some species. Renouf and Lonvaud-Funel (2007) have developed a specific enrichment medium (EBB) for *Dekkera* and *Brettanomyces* detection but again several other genera and species could be detected. Harris et al. (2008) have demonstrated that both the growth and substrate utilisation rates of *Dekkera bruxellensis* differ depending on strain and the acid precursor present. Low specific growth rate, media unspecificity and the presence of inhibitors are some of the problems found to detect *Dekkera* and *Brettanomyces*. The polymerase chain reaction (PCR) is a well-established molecular technique that uses tiny amounts of nucleic acid to be amplified, it does not depend on culture media for cell growth, it can give highly species-specific and reproducible results with null cross-reactivity, and so it can overcome some of the difficulties found to commonly limit the appearance of yeast colonies. This essentially enzymatic reaction can be employed to detect microorganisms in food, beverages, and in other environments. Biomolecular technique has its peculiar advantages but it can also have huge limitations. As with other diagnostic tests, PCR tests run the risk of providing false negative results. It has been well established that the Taq polymerase is susceptible to natural inhibitors. de Franchis et al. (1988) have observed that some samples of genomic DNA extracted from human blood fail to be amplified and neither boiling process nor the use of Sephadex G50 column alone could remove the inhibitors. Eckhart et al. (2000) have showed that preparations derived from melanocytes contain a RT-PCR inhibitor that blocks PCR and that the inhibitory effect is the result of a direct and reversible polymerase–melanin interaction. Myoglobin (Bélec et al., 1998), haemoglobin, lactoferrin (Al-Soud and Rådström, 2001), plasma, serum IgG (Kermekchiev et al., 2009), heparin (Ghadessy et al., 2001), bile acids and their salts (Al-Soud et al., 2005) and dUTP (Hogrefe et al., 2002) were demonstrated to be potent DNA polymerase inhibitors. The activity of Taq DNA polymerase can also be significantly inhibited by monovalent salt concentrations (Innis et al., 1988; Burckhardt, 1994).

Not only human body fluids have negative effect upon Taq DNA polymerase, it has been shown that a wide range of other natural environments, such as skeletal material (Cattaneo et al., 1995), tea (Tichopad et al., 2005), wine (da Silva et al., 2009a) and soil (Hummel et al., 1992; Sutlović et al., 2005; Kermekchiev et al., 2009) possess some components with a strong inhibitor action on Taq DNA polymerase, causing false negative results. In all cases, additional procedures involving physical or enzymatic strategies to remove the inhibitors are absolutely necessary. All these procedures can result in significant loss of DNA, specially when the quantity of DNA is limited. Cattaneo et al. (1995) have showed that extractions using phenol/chloroform was appropriate to amplify only 7 out of 11 samples of fresh bone in forensic cases and failed to amplify DNA of 3-month-old and 9-month-old bones due to the presence of inhibiting compounds. As external chemical compounds can be involved in Taq DNA polymerase inhibition (Meng et al., 2007) and phthalimides are widely employed in Brazilian vineyards to control fungal threats, the main purpose of this work was to detect the action of both N-trichloromethylthio-4-cyclohexane-1,2-dicarboximide and N-trichloromethylthiophthalimide upon the enzyme Taq DNA polymerase and upon the metabolic activity of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.

Materials and Methods

Microorganism

The *Saccharomyces cerevisiae* Embrapa 1vvt/97 strain was used. The yeast was maintained in G7 (da Silva and de Almeida, 2006) and must agar (da Silva, 1996). The abbreviations used for names of genera followed the notation defined by Lodder (1974); van Rij (1984) and used by de Jonge et al. (1986), Török et al. (1993), Xufre et al. (2000) and Strauss et al. (2005).

DNA Preparation

Cells of *Saccharomyces cerevisiae* were spread on must agar plates and incubated for 24 to 48 hours at 25 °C to grow a lawn. The cells were scraped off the plate and transferred to microtubes containing 500 µL of lysis buffer (NaCl 0.15M (Vetec, BR), Tris-HCl 50 mM (Invitrogen Life Technologies, USA), EDTA 10 mM (Sigma-Aldrich CO., USA), SDS 2.0 % (w/v) (Labsynth, BR); pH 8,0). The mixture was incubated for 1 hour at 60°C in a water-bath. An equal volume (500 µL) of buffer-saturated phenol (Sigma Chemical CO., USA) : chloroform (Reagen, BR) (1:1) was added to the DNA solution. The mixture was vigorously mixed by vortexing, and centrifuged to phase separation in a Sorval centrifuge

(Sorval, USA) at 10,000 x g for 15 minutes. The upper aqueous layer was carefully transferred to a clean tube, avoiding the phenol interface and equal volume of chloroform was added. The mixture was vigorously mixed by vortexing and centrifuged at 10,000 x g for 15 min. The chloroform extraction was repeated once. The upper aqueous layer was transferred to a clean centrifuge tube and an equal volume of cold isopropanol (Chimie Test, BR) was added to the DNA sample. The mixture was vigorously mixed by vortexing, the tube was allowed to settle in an ice water-bath for 30 minutes and then centrifuged at 10,000 x g for 20 min. In order to recover the precipitated DNA, the samples were centrifuged and the supernatant was discarded. The pellets were washed with ice-cold 70% ethanol, centrifuged at 10,000 x g for 15 min. The resulting DNA pellet was air dried and dissolved in 100 μL of TE (Tris-HCl 10 mM pH 7.6, EDTA 1 mM pH 8.0). The DNA sample was stored at $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$.

PCR procedure

Primers YeastF and YeastR (submitted to Regional Patent Office) targeting the conserved region of 18S rDNA were used to amplify a 375-bp segment. PCR amplification was performed in a volume of 25 μL . One microlitre of DNA was added to the PCR master mixture, which consisted of 2.5 μL buffer to a final concentration of perform 1x Taq DNA polymerase (Invitrogen Corporation, USA), 0.3 μL of 5.0U/ μL Taq DNA polymerase Platinum (Invitrogen Corporation, USA), 2.5 μL of a 1 mM solution of each dNTP (Invitrogen Corporation, USA), 1 μL of 20 pMol of each primer (Integrated DNA Technologies Inc., USA), 1.25 μL of 50 mMol of MgCl_2 and 15.45 μL of N-trichloromethylthio-4-cyclohexane-1,2-dicarboximide ($\text{C}_9\text{H}_8\text{Cl}_3\text{NO}_2\text{S}$) (NTCMT CDC), also known as N-((trichloromethyl)-thio)-tetrahydrophthalimide (Ash and Ash, 2004), solutions (1200-recommended dose, 600, 300, 150, 75, 37.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and 10^{-1} times of the first five concentrations) or N-trichloromethylthio-phthalimide ($\text{C}_9\text{H}_4\text{Cl}_3\text{NO}_2\text{S}$) (NTCMTP) (675-recommended dose, 337.5, 168.8, 84.4, 42.2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and 10^{-1} times of the first five concentrations). Amplification consisted of an initial denaturation at 94°C for 5 min, followed by 30 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 68°C for 45 s, extension at 72°C for 30 s, with a final extension at 72°C for 5 min. A PTC-100 Peltier thermal cycler (Bio-Rad Life Sciences, USA) was used.

Electrophoresis

Aliquots of 5 μL of PCR-amplified products and the 100 bp DNA Ladder (100 to 1500 bp) (Invitrogen Life Technologies, USA) were loaded onto electrophoresis gels with 1.0% (w/v) agarose (Sigma Chemical, USA). The run was performed with 1 X Tris-borate- EDTA (TBE) buffer, containing 0.1 M Tris-base (Invitrogen Life Technologies, USA), pH 8.3, 0.09 mM boric acid (Merck, Germany), 1 mM EDTA (Sigma-Aldrich CO., USA), at 90 V/cm for 45 min. The gels were stained with ethidium bromide (Merck, Germany). The stained gels were photographed using UV transilluminator Eagle Eye II Video Imaging System (Stratagene, California, USA).

Fermentation

The effect of different concentrations of NTCMT CDC (1200, 600, 300, 150, 75, 37.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and NTCMTP (675, 337.5, 168.75, 84.4, 42.2, 21.1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) upon yeast metabolism was measured by CO_2 evolution according to Giudici and Zambonelli (1992), Longo et al. (1992) and da Silva et al. (2009b).

Cell growth

The growth of *Saccharomyces* was evaluated by optical density (OD) readings at 600 nm in a 1 cm-path quartz cuvette using a spectrophotometer UV/VIS Lambda Bio (Perkin-Elmer). The cells were inoculated in Lorena grape must without and with 37.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ NTCMT CDC and 21.1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ NTCMTP. Each treatment was apportioned into three 150-mL replicates in 500-mL flasks. The cultures were incubated at $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ in an orbital shaker (New Brunswick, Edison, USA) at 150 rpm during 96 hours.

Cell morphology and viability

The morphology of the cells after 4 days of fermentation was observed with an optical Universal microscope Zeiss (Carl-Zeiss, Oberkochen-Germany) equipped with phase contrast. The cell viability was determined with propidium iodide (PI) dye that binds only to double stranded nucleic acids. This fluorescent nucleic acid dye stains the nucleus light to dark red in colour. The fluorescent red colour provides excellent contrast to green or blue fluorochromes. It was used a fluorescence microscope integrated to the NucleoCounter (Gibertini - Milan - Italy). According to manufacturer, the NucleoCounter is equipped with light emitting diodes as excitation light source, excitation and emission filters, optical lens system to focus the red light on charged coupled device (CCD) camera and software for image processing. The evaluation of lysed yeast cells was performed diluting 1 mL sample in 100 mL of phosphate buffer (PBS), having in 1 L of reagent quality water: 8.0 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g

Na_2HPO_4 and 0.24 g KH_2PO_4 . All components of PBS were prepared in 500 mL, the pH was adjusted to 7.4 with HCl and then the final volume was filled up to 1 L with deionised water. The mixture was stirred to disrupt the clusters. The yeast cells were transferred to the buffer solution to give a range of concentration from approximately $10^5 \text{ cell.mL}^{-1}$ to $10^6 \text{ cell.mL}^{-1}$.

Analytical procedure

The concentration of sugar was estimated by the phenol/sulphuric acid method as described by Dubois et al. (1956). The ethanol evaluation was done by distillation essentially as described by Ribéreau-Gayon et al. (1982). In short, the samples were steam distilled with electronic distiller (Gibertini-Italy) followed by measurement of density with Anton Paar DMA45 Calculating Digital Density Meter SP2 (Graz, Austria) equipped with a Haake D3/L (Germany) water bath. Percentage by volume at 20 °C of ethyl alcohol corresponding to apparent specific gravity was obtained according to the AOAC (Horwitz, 1980).

Results and Discussion

Effect of phthalimides on PCR

Figure 1 depicts the effect of different concentrations of NTCMTP and NTCMTCDC upon the amplification reaction with 6.0 U Taq DNA polymerase. The highest concentration that allows DNA amplification was $42.2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ and $75 \mu\text{g.mL}^{-1}$ for NTCMTP and NTCMTCDC, respectively. The inhibition of PCR can be due to agents that bind not only to single-stranded or double-stranded DNA preventing amplification but can also interfere with Taq DNA polymerase, blocking or reducing the enzyme activity. The results from previous report have also showed that NTCMTCDC and NTCMTP, both belonging to the dicarboximide family, are potent inhibitors of yeast metabolism (da Silva et al., 2007). Strong inhibitions were observed at 675 (recommended dose), 337.5, 168.75 and $84,375 \mu\text{g.mL}^{-1}$ NTCMTP and at 1200 (recommended dose), 600, 300 and $150 \mu\text{g.mL}^{-1}$ NTCMTCDC. The amplification of the 375 bp segment started at values below $84 \mu\text{g.mL}^{-1}$ NTCMTP. The PCR reaction became effective at values below $150 \mu\text{g.mL}^{-1}$ NTCMTCDC. Jin et al. (2008) also observed that, in a 25 μL reaction mixture containing 1.5 units of Taq DNA polymerase, the enzyme was completely inhibited by compounds isolated from the marine red alga *Symphyclocladia latiuscula*. To show that this fungicide can bind Taq DNA polymerase and but not the substrate (primers), only the concentration of the enzyme was increased to 6.0 units and all other components in the 25 μL reaction mixture were maintained constant. The results illustrated in Figure 2 show that in a 25 μL reaction mixture containing 1.5 units of Taq DNA polymerase, the enzyme was completely inhibited by NTCMTCDC at the concentrations of 120 and $60 \mu\text{g.mL}^{-1}$, whereas with 6.0 units of Taq DNA polymerase, significant inhibition was only observed at the concentration of $120 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figure 2).

DNA polymerase is an enzyme with distinct activities. This multifaceted enzyme has polymerase and exonuclease activities (Freeman-Wittig and Lewis, 1986; Freeman-Wittig et al., 1989; Kim et al., 1995; Eom et al., 1996). According to Freeman-Wittig and Lewis (1986) and Freeman-Wittig et al. (1989), NTCMTCDC affects the polymerising step and can influence the activities of both exonucleases, inhibiting the 3'-5' exonuclease and polymerase activities, and enhancing the 5'-3' exonuclease activity. The results here obtained suggest that the fungicide is irreversibly bound to the enzyme and not to the substrate (primers) and that, at concentration of $60 \mu\text{g.mL}^{-1}$ NTCMTCDC or lower, the fungicide is at limiting concentrations when 6.0 units of Taq DNA polymerase are used. This is also in accordance with a previous study (Dillwith and Lewis, 1982b), in which it was observed that the RNA polymerase activity of *Escherichia coli* was irreversibly altered by NTCMTCDC. Dillwith and Lewis (1982a) showed that NTCMTCDC and DNA compete for the same site on the polymerase. Luo and Lewis (1992) have demonstrate that NTCMTCDC binds to the β subunit of RNA polymerase, which contains the nucleoside triphosphate-(NTP)-binding site and, as a consequence blocks this binding site. A similar behaviour seems to hold for the competition between DNA and NTCMTP. The NTCMTP inhibited the amplification reaction at concentration of $67.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ only with 1.5 units of Taq DNA polymerase in the 25 μL reaction mixture (Fig. 3). In the presence of inhibitors, the enzyme is shown to catalyse this reaction in both an inhibitor-dose-dependent and enzyme concentration-dependent manner (Figures 1, 2 and 3). It seems that these compounds, in fact, affect the enzyme and do not bind to the substrate. Several factors affect the rate at which enzymatic reactions proceed. Among these factors are the enzyme concentration, and the presence of activators and inhibitors.

Since the central properties of both compounds are related to the reaction with thiol-containing groups (Bernard and Gordon, 2001), the reaction of these compounds with Taq polymerase suggests the presence of such a group, as cysteine or glutathione. The reaction of thiol groups is highly dependent pH. Values of pH below 4 do not promote the reaction with cysteine (Liu and Fishbein, 1967). The inhibitory effect can be related to the presence of amino acid with thiol group. Albeit there is no cysteine residues in the Taq

polymerase sequence showed by Lawyer et al. (1989), the deposited sequence on NCBI (National Centre for Biotechnology Information) database presents three residues of cysteine (.570 tgrlcccdpn 580..) (NCBI, 2008). It was observed that the residues 515-928 of the segment of *Escherichia coli* Pol I do not have 3' -5' exonuclease but polymerase activity (Freemont et al., 1986; Lawyer et al., 1989). The amino acid sequence showed by NCBI being true for the Taq polymerase used in this work, the thiol-contained compounds would be located in between 574 and 578. These two chemical inhibitors to react with thiol, the inhibitor molecules should split, forming free imide and the thiol is oxidized to disulphide. The trichloromethylthio (SCCI3) formed goes directly to thiol sites or undergoes dechlorination, producing thiophosgene (SCCI2). Both SCCI3 (Freeman-Wittig et al., 1986) and SCCI2 have been accounted for the inhibitory action of NTCMTP and NTCMTDC. The amino acid sequence of DNA polymerase gene from *Thermus aquaticus* presented by Lawyer et al. (1989) shows three residues of serine (.570 tgrlsssdpn 580..) replacing the cysteine residues showed on NCBI database sequence. The replacement of an active-site cysteine residues by serine of a protein required for disulphide bond formation caused destabilisation of the folded conformation (Zapun et al., 1994). Residues of cysteine are commonly found in zinc finger motifs, which play important role in DNA-binding proteins. Garcia et al. (2004) have demonstrated that the substitution of the putative metal-coordinating cysteines with alanine abolishes β -subunit binding and *in vivo* function. Considering the fact that the reaction of NTCMTP, NTCMTDC and trichloromethyl sulphenyl chloride (CCI-3SCl) with cysteine is inhibited in pH values below 4.0 and stimulated above 6.0 (Liu and Fishbein, 1967), is reasonable to expect that the pH of the PCR reaction buffer (above 6.0) also contributes to an increase in inhibition reaction levels.

The inhibitors generally interfere at one or more of the essential points in the analytical process, as cell lysis, degradation or capture of the nucleic acid and polymerase activity (Wilson, 1997) or even chelating magnesium ion (Arruda et al., 2007), contributing to the failure of any given PCR reaction. Mg^{+2} ions are important cofactor for Taq Polymerase and so the sequestration of these ions affects the amplification process (Wilson, 1997). It was observed that thiophosgene can react with salts to give bifunctional chelating activity (Loussouarn et al., 1998). It was already called attention to the fact that thiophosgene is one of the components formed during the NTCMTP and NTCMTDC split process. This compound is used to the synthesis of several compounds including chelating and enzymatic inhibitor agents. The 2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl isothiocyanate obtained by the action of thiophosgene on 2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosylamine binds to the active site of the human and boar N-acetyl- β -D-hexosaminidase, provoking irreversible inhibition of the enzyme activity (Shulman et al., 1977). The inhibitors can be markedly more potent for a specific DNA polymerase than for another (Wolfgang et al., 2009). Agents with characteristics of PCR-inhibitors have been observed in several natural environments. Water-soluble eumelanins extracted together with DNA from natural black hairs act as an inhibitor of Taq DNA polymerase in the polymerase chain reaction (Yoshii et al., 1993). Small amount of intraocular vitreous fluid and aqueous fluid can completely inhibit DNA amplification. The inhibitors were resistant to boiling for 15 min and their actions were not related to primer specificity, nor ions chelation or DNase activity (Wiedbrauk et al., 1995). Wang et al. (2006) have shown that the silicon materials decreased considerably the amplification efficiency and that the adsorption of Taq polymerase was the primary cause of the inhibition phenomena. It has been shown that the PCR inhibition process can also be simultaneously related to both Taq polymerase and cDNA template (Yang et al., 2008). Wan et al. (2009) observed PCR inhibition provoked by the interaction between Taq polymerase and gold nanoparticles and that the inhibition was both concentration and size dependent. Relevant limitations of this method for analytical purposes include specially the possibility of both false-positive results related to contamination and false-negative reactions provoked by Taq polymerase inhibitors (Coutlée et al., 1991). Some components of blood, as whole-blood, plasma, haemoglobin, lactoferrin, serum IgG, and soil are potent PCR inhibitors. The reaction is strongly inhibited by 0.1-1% blood (Kermekchiev et al., 2009). Humic acid, fulvic acids and free radicals are the inhibitor compounds associated with soil environments. These compounds can act during the DNA extraction, hydrolyzing 20-30 bp of DNA fragments (Arruda et al., 2007). Besides the huge number of different inhibitors, there is still great difference of sensitivity among distinct DNA polymerases to these repressor compounds. Depending on the Taq polymerase, amount as low as 11ng of humic acid and 9.4 ng of fulvic acid can be potent inhibitors (Matheson et al., 2010). This sensitivity is likely to be related to the amino acid sequence. Helianti et al. (2008) have showed that xylanases of Indonesian *Bacillus licheniformis* differ in length and amino acid sequence composition from those of *Bacillus halodurans* and *Bacillus firmus*. Xylanase of *Bacillus licheniformis* does not have cysteine in the peptide chain.

Effect phthalimides on cell metabolism

The results illustrated in Figures 4 and 5 stress the fact that all concentrations at which both NTCMTDC and NTCMTP were not inhibitory to Taq DNA polymerase, strongly inhibited CO₂ evolution, suggesting

that the inhibitory action on *Sacch. cerevisiae* anaerobic metabolism is clearly attributed to these compounds. These results are in accordance with those found by da Silva et al. (2007). In fact, the ethanol production and the product yield ($Y_{p=s}$) were severely affected by both added compounds (Figures 6 and 7). Drastic inhibition took place even when the cells were inoculated at the lowest levels of NTCMTP and NTCMTCDC, $21.1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and $37.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively. These results suggest different interpretations. The effect of these two chemical compounds on yeast seems not to be only due to the activity inhibition of Taq DNA or RNA polymerases but also due to a severe inhibition that reaches the glycolytic pathway or only in one point involving pyruvic acid, acetaldehyde and ethanol with respective CO_2 evolution. In that case, the glycolytic CO_2 evolution would be more sensitive to these compounds than would be the aerobic respiration. This differential behaviour has been attributed to several organic compounds such as ethanol on *Sacch. cerevisiae* (Katz and Diamond, 1974). The presence of some chemical organic compounds, such as benzoate, induces the alcoholic fermentation and causes a decrease in the specific oxygen uptake rate (Verduyn et al., 1992). If the ethanol production is tightly coupled with the growth of yeast cells, indicating yeast must be produced as a co-product (Bai et al., 2008), the media permissive for yeast cell growth should also be free of both chemical compounds NTCMTCDC and NTCMTP. In fact, the yeast growth, measured by optical density, was strongly inhibited in the presence of these chemical compounds. The cells were more severely affected by NTCMTCDC (Figure 8). The inhibition process of these chemicals showed to reach both aerobic and anaerobic cell metabolism. In that case, the action of these compounds should be linked to a point somewhere in the glycolytic pathway at which the inhibition affects both the alcoholic fermentation and aerobic metabolism. Siegel (1971) has observed that NTCMTP and its decomposition product thiophosgene, in fact, caused changes in absorbance profiles of the glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase and that these changes were associated with the inhibition of dehydrogenase activity, suggesting an effect on tertiary configuration and/or denaturation of the protein. The glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase is a crucial glycolytic enzyme that mediates the transfer of an inorganic phosphate to a glyceraldehydes 3-phosphate molecule, the production of a NADH^+H^+ molecule and the formation of a molecule of 1,3-diphosphoglyceric acid. Thiophosgene is a well known highly reactive compound that can react with cellular groups to form several different products. Besides this reactive property, the thiophosgene behaves as an activator in the synthesis of neoglycoprotein (Aizawa and Tavassoli, 1988; Molema et al., 1991). The pyranose derivatives of various monosaccharides bind to a large protein of the medium, forming the neoglycoprotein and so preventing the diffusion of sugar into the yeast cells. This property of the thiophosgene may, at least in part, explain the severe inhibition of the yeast cell activities. Both trichloromethylthio (SCC13) and thiophosgene (SCC12) can react with several important cellular molecules. The glutathione (g-glutamyl-cysteinyl-glycine) (GSH) is one of these molecules. It is a key-component that participates in the cellular detoxification process (Tommasini et al., 1996; Bi et al., 2007) and mediates a great diversity of other complex cellular activities (Meister, 1988; Suh et al., 1999; Vergauwen et al., 2003a,b, 2010). GSH depletion is associated more with augmented oxidation of water soluble proteins than with the lipid peroxidation of cell membranes (Sedlak et al., 2009) and induces apoptosis in *Sacch. cerevisiae* (Madeo et al., 1999). GSH plays an important role not only in the growth of nitrogen-fixing bacteria but also in their symbiotic processes (Harrison et al., 2005). The growth and fermentation inhibition observed in *Sacch. cerevisiae* provoked by NTCMTCDC and NTCMTP can be related with the decrease of intracellular GSH levels. NTCMTCDC and NTCMTP, reacting directly with GSH. Siegel (1970a,b) or inhibiting the enzymes of glutathione metabolism, can decrease the life span of yeast cells and have enormous lethal effect on *Sacch. cerevisiae*. Microscopical analysis has shown several cells completely lysed after four days of growth in the medium with $37.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ NTCMTCDC and $21.1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ NTCMTP. This period of time corresponds to the maceration period for red wine fermentation. A portion of the dead cells presented budding. The fact that both budding and non budding yeast cells are being destroyed suggests that these compounds kill the yeast cells irrespective of any particular cell cycle stage. The strongest effect on yeast death was observed with NTCMTCDC, probably due to its higher concentration. No excess lysis was found in the medium without addition of these two chemical compounds. The lysis process of yeast cells was in fact confirmed by fluorescence microscopy in a 24-hour old culture (Figure 9). The strong lysis process detected in must treated with both chemical compounds suggests that the must, although being a rich complex medium that contains all necessary nutrients required for yeast metabolism, does not offer conditions to neutralise the deleterious effect of these compounds. Rousk et al. (2009) showed that the basal respiration of fungi was not affected by NTCMTCDC but the glucose-activated respiration was inhibited by about 40% with this compound. These facts show that the components of the medium not only do not protect the yeast cells against chemical products but also seem to intensify their inhibitory actions. This behaviour is very similar to the very well known penicillins mechanism of action. It has been known for a long time that these antibiotics inhibit susceptible bacteria more effectively when the environment is most favourable for growth (Pratt

and Dufrenoy, 1948). Todeschini et al. (2010) also verified that *Sacch. cerevisiae* was much less affected by tetraconazole in poor medium than in rich medium (must). In contrast, some fungicides do not affect the ethanol production and their presence can even stimulate the alcoholic fermentation (Cabras et al., 1999; da Silva et al., 2005, 2009b). NTCMTDC and NTCMTP have proved to be more potent inhibitor compounds for both anaerobic and aerobic metabolism of *Sacch. cerevisiae* than for Taq DNA polymerase activity. Differences among strains related to these inhibitors may exist. This assertion being true, this yeast is probably one of those sensitive strains. The NTCMTDC and NTCMTP containing must probably should not be transformed in wine by this specific microorganism or the fermentation does not reach completion.

References

- Aizawa, S. and Tavassoli, M. (1988). Molecular basis of the recognition of intravenously transplanted hemopoietic cells by bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(9):3180–3183.
- Al-Soud, W. A., Ouis, I.-S., Li, D.-Q., Ljungh, S., and Wadström, T. (2005). Characterization of the PCR inhibitory effect of bile to optimize real-time PCR detection of *Helicobacter* species. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 44(2):177–182.
- Al-Soud, W. A. and Rådström, P. (2001). Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. *J Clin Microbiol*, 39(2):485–493.
- Arruda, D. G., Hirata, M. H., and de Oliveira Barretto, O. C. (2007). Pitfalls in DNA extraction from ancient bones found in brazilian shellmounds. *Rev Museu Arqueol e Etnol*, 17:461–467.
- Ash, M. and Ash, I. (2004). *Handbook of Preservatives*. Synapse Information Resources, Endicott, NY.
- Bai, F. W., Anderson, W. A., and Moo-Young, M. (2008). Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnol Adv*, 26(1):89–105.
- Bernard, B. K. and Gordon, E. B. (2001). An evaluation of the common mechanism approach to the food quality protection act: Captan and four related fungicides, a practical example. *Int J of Toxicol*, 19(1):43–61.
- Bi, W. X., Kong, F., Hu, X. Y., and Cui, X. (2007). Role of glutathione in detoxification of copper and cadmium by yeast cells having different abilities to express cup1 protein. *Toxicol Mech Methods*, 17(6):371–378.
- Burckhardt, J. (1994). Amplification of DNA from whole blood. *PCR Methods Appl*, 3(4):239–243.
- Bélec, L., Authier, J., Eliezer-Vanerot, M. C., Piédouillet, C., Mohamed, A. S., and Gherardi, R. K. (1998). Myoglobin as a polymerase chain reaction (PCR) inhibitor: a limitation for PCR from skeletal muscle tissue avoided by the use of *Thermus thermophilus* polymerase. *Muscle Nerve*, 21(8):1064–1067.
- Cabras, P., Angioni, A., Garau, V. L., Pirisi, F. M., Farris, G. A., Madau, G., and Emonti, G. (1999). Pesticides in fermentative processes of wine. *J Agric Food Chem*, 47(9):3854–3857.
- Cattaneo, C., Smillie, D. M., Gelsthorpe, K., Piccinini, A., Gelsthorpe, A. R., and Sokol, R. J. (1995). A simple method for extracting DNA from old skeletal material. *Forensic Sci Int*, 74(3):167–174.
- Coutlée, F., Viscidi, R. P., Saint-Antoine, P., Kessous, A., and Yolken, R. H. (1991). The polymerase chain reaction: a new tool for the understanding and diagnosis of HIV-1 infection at the molecular level. *Mol Cell Probes*, 5(4):241–259.
- da Silva, G. A. (1996). The occurrence of killer, sensitive, and neutral yeasts in Brazilian Riesling Italic grape must and the effect of neutral strains on killing behaviour. *Appl Microbiol Biotechnol*, 46(2):112–121.
- da Silva, G. A., Bernardi, T. L., Menegotto, M., Schaker, P. D. C., Berlesi, M. S., and Valente, P. (2009a). Inibição da reação em cadeia da polimerase por compostos presentes no vinho. In TOMASSO, M., editor, XII Congresso Latinoamericano de Viticultura y Enología, page 229, Uruguay. Asociación de Enólogos del Uruguay, MAURICIO TOMASSO.

- da Silva, G. A. and de Almeida, E. A. (2006). Production of yellow-green fluorescent pigment by *Pseudomonas fluorescens*. *Braz Arch Biol and Technol*, 49(3):411–419.
- da Silva, G. A., Gava, R., Sônego, O. R., and da Ressurreição Garrido, L. (2007). Fungicidas empregados na viticultura e sua ação sobre atividade de leveduras autóctones e selecionadas. VI SINAFERM e XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos. 17
- da Silva, G. A., Gava, R., Sônego, O. R., and da R. Garrido, L. (2005). Leveduras e fungicidas: inibição e estímulo do processo fermentativo. In Guerra, C. C. and de Souza Sebben, S., editors, *Anais do X Congresso Latino-Americano de Viticultura e Enologia/XI Congresso Brasileiro de Viticultura e Enologia/II Seminário Franco-Brasileiro de Viticultura e Enologia*, page 346, Bento Gonçalves-RS. Embrapa Uva e Vinho, Embrapa Uva e Vinho.
- da Silva, G. A., Menegotto, M., Schaker, P. D. C., and Bernardi, T. L. (2009). Ação do Cabrio[®]Top sobre o crescimento e a atividade fermentativa da linhagem *Saccharomyces cerevisiae* Embrapa 1vvt/97. In TOMASSO, M., editor, *XII Congreso Latinoamericano de Viticultura y Enología*, page 221, Uruguay. Asociación de Enólogos del Uruguay, MAURICIO TOMASSO.
- de Franchis, R., Cross, N. C., Foulkes, N. S., and Cox, T. M. (1988). A potent inhibitor of Taq polymerase copurifies with human genomic DNA. *Nucleic Acids Res*, 16(21):10355.
- de Jonge, P., de Jongh, F. C., Meijers, R., Steensma, H. Y., and Scheffers, W. A. (1986). Orthogonal-field-alternation gel electrophoresis banding patterns of DNA from yeasts. *Yeast*, 2(3):193–204.
- Dillwith, J. W. and Lewis, R. A. (1982a). Inhibition of DNA polymerase by Captan. *Biochim Biophys Acta*, 696(3):245–252.
- Dillwith, J. W. and Lewis, R. A. (1982b). Mechanism of inhibition of *Escherichia coli* RNA polymerase by Captan. *Biochem J*, 201(1):145–151.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P., and Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem*, 28(3):350–356.
- Eckhart, L., Bach, J., Ban, J., and Tschachler, E. (2000). Melanin binds reversibly to thermostable DNA polymerase and inhibits its activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 271(3):726–730.
- Eom, S. H., Wang, J., and Steitz, T. A. (1996). Structure of Taq polymerase with DNA at the polymerase active site. *Nature*, 382(6588):278–281.
- Freeman-Wittig, M. J. and Lewis, R. A. (1986). Alteration of the exonuclease activities of DNA polymerase I by captan. *Biochim Biophys Acta*, 867(3):107–113.
- Freeman-Wittig, M. J., Vinocour, M., and Lewis, R. A. (1986). Differential effects of Captan on DNA polymerase and ribonuclease H activities of avian myeloblastosis virus reverse transcriptase. *Biochem*, 25(10):3050–3055.
- Freeman-Wittig, M. J., Welch, W., and Lewis, R. A. (1989). Binding of captan to DNA polymerase I from *Escherichia coli* and the concomitant effect on 5-3' exonuclease activity. *Biochem*, 28(7):2843–2849.
- Freemont, P. S., Ollis, D. L., Steitz, T. A., and Joyce, C. M. (1986). A domain of the Klenow fragment of *Escherichia coli* DNA polymerase I has polymerase but no exonuclease activity. *Proteins*, 1(1):66–73.
- Garcia, J. S., Ciufo, L. F., Yang, X., Kearsey, S. E., and MacNeill, S. A. (2004). The c-terminal zinc finger of the catalytic subunit of DNA polymerase is responsible for direct interaction with the β subunit. *Nucleic Acids Res*, 32(10):3005–3016.
- Ghadessy, F. J., Ong, J. L., and Holliger, P. (2001). Directed evolution of polymerase function by compartmentalized self-replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(8):4552–4557.

- Giudici, P. and Zambonelli, C. (1992). Biometric and genetic study on acetic acid production for breeding of wine yeast. *Am. J. Enol. Vitic.*, 43(4):370–374.
- Harris, V., Ford, C. M., Jiranek, V., and Grbin, P. R. (2008). *Dekkera* and *Brettanomyces* growth and utilisation of hydroxycinnamic acids in synthetic media. *Appl Microbiol Biotechnol*, 78(6):997–1006.
- Harrison, J., Jamet, A., Muglia, C. I., de Sype, G. V., Aguilar, O. M., Puppo, A., and Frendo, P. (2005). Glutathione plays a fundamental role in growth and symbiotic capacity of *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol*, 187(1):168–174.
- Helianti, I., Nurhayati, N., and Wahyuntari, B. (2008). Cloning, sequencing, and expression of a β -1,4-endoxylanase gene from Indonesian *Bacillus licheniformis* strain 15 in *Escherichia coli*. *World J Microbiol Biotechnol*, 24:1273–1279.
- Hogrefe, H. H., Hansen, C. J., Scott, B. R., and Nielson, K. B. (2002). Archaeal dutpase enhances PCR amplifications with archaeal DNA polymerases by preventing dutp incorporation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(2):596–601.
- Horwitz, W., editor (1980). *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC 20044, thirteenth edition.
- Hummel, S., Nordsiek, G., and Herrmann, B. (1992). Improved efficiency in amplification of ancient DNA and its sequence analysis. *Naturwissenschaften*, 79(8):359–360.
- Innis, M. A., Myambo, K. B., Gelfand, D. H., and Brow, M. A. (1988). Dna sequencing with thermus aquaticus DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction amplified DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(24):9436–9440.
- Jin, H. J., Oh, M. Y., Jin, D. H., and Hong, Y. K. (2008). Identification of a taq DNA polymerase inhibitor from the red seaweed *Symphycocladia latiuscula*. *J Environ Biol*, 29(4):475–478.
- Katz, Y. and Diamond, J. M. (1974). Thermodynamic constants for nonelectrolyte partition between dimyristoyl lecithin and water. *J Membr Biol*, 17(2):101–120.
- Kermekchiev, M. B., Kirilova, L. I., Vail, E. E., and Barnes, W. M. (2009). Mutants of taq DNA polymerase resistant to PCR inhibitors allow DNA amplification from whole blood and crude soil samples. *Nucleic Acids Res*, 37(5):e40.
- Kim, Y., Eom, S. H., Wang, J., Lee, D. S., Suh, S.W., and Steitz, T. A. (1995). Crystal structure of thermus aquaticus DNA polymerase. *Nature*, 376(6541):612–616.
- Lawyer, F. C., Stoffel, S., Saiki, R. K., Myambo, K., Drummond, R., and Gelfand, D. H. (1989). Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the DNA polymerase gene from thermus aquaticus. *J Biol Chem*, 264(11):6427–6437.
- Liu, M. K. and Fishbein, L. (1967). Reactions of captan and folpet with thiols. *Experientia*, 23(2):81–82.
- Lodder, J., editor (1974). *The yeasts a taxonomic study*. North-Holland, third edition.
- Longo, E., Cansado, J., Siero, C., Calo, P., Velazquez, J. B., and Villa, T. G. (1992). Influence of the curing killer phenotype in *Saccharomyces cerevisiae* wine in *Saccharomyces cerevisiae* wine strains on the fermentative behaviour. *World J Microbiol Biotechnol*, 8:147–150.
- Loussouarn, A., Duflos, M., Benoist, E., Chatal, J.-F., Le Baut, G., and Gestin, J.-F. (1998). Synthesis of new bifunctional chelating agents: (1r*,2r*,4s*)-4-isothiocyanatocyclohexane-1,2-diaminen,n[n[prime or minute],n[prime or minute]-tetrakis(methanephosphonic acid (4-icmp) and (1r*,2r*,4s*)-4-isothiocyanatocyclohexane-1,2-diamine-n,n,n[prime or minute],n[prime or minute]-tetrakis(ethanephosphonic acid (4-icep)). *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 2:237–242.

- Luo, G. and Lewis, R. A. (1992). Inhibition of RNA polymerase by captan at both DNA and substrate binding sites. *Biochem Pharmacol*, 44(11):2251–2258.
- Madeo, F., Fröhlich, E., Ligr, M., Grey, M., Sigrist, S. J., Wolf, D. H., and Fröhlich, K. U. (1999). Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeast. *J Cell Biol*, 145(4):757–767.
- Matheson, C. D., Gurney, C., Esau, N., and Lehto, R. (2010). Assessing per inhibition from humic substances. *The Open Enzyme Inhibition Journal*, 3:38–45.
- Meister, A. (1988). Glutathione metabolism and its selective modification. *J Biol Chem*, 263(33):17205–17208.
- Meng, X., Li, B., Chen, Z., Yao, L., Zhao, D., Yang, X., He, M., and Yu, Q. (2007). Inhibition of a thermophilic deoxyribonucleic acid polymerase by fullerene derivatives. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 22(3):293–296.
- Molema, G., Jansen, R. W., Visser, J., Herdewijn, P., Moolenaar, F., and Meijer, D. K. (1991). Neoglycoproteins as carriers for antiviral drugs: synthesis and analysis of protein-drug conjugates. *J Med Chem*, 34(3):1137–1141.
- NCBI (2008). Chain a, structure of taq DNA polymerase. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/1TAQ_A. Cited 24 september 2008.
- Pratt, R. and Dufrenoy, J. (1948). Cytochemical interpretation of the mechanism of penicillin action. *Bacteriol Rev*, 12(1):79–103.
- Renouf, V. and Lonvaud-Funel, A. (2007). Development of an enrichment medium to detect *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis*, a spoilage wine yeast, on the surface of grape berries. *Microbiol Res*, 162(2):154–167.
- Ribéreau-Gayon, J., Peynaud, E., Sudraud, P., and Ribéreau-Gayon, P. (1982). *Traité d'Enologie. Sciences et techniques du vin. Analyse et contrôle des vins, volume 1*. Dunod, Paris.
- Rodrigues, N., Gonçalves, G., da Silva, S. P., Malfeito-Ferreira, M., and Loureiro, V. (2001). Development and use of a new medium to detect yeasts of the genera *Dekkera/Brettanomyces*. *J Appl Microbiol*, 90(4):588–599.
- Rousk, J., Demoling, L. A., and Bååth, E. (2009). Contrasting short-term antibiotic effects on respiration and bacterial growth compromises the validity of the selective respiratory inhibition technique to distinguish fungi and bacteria. *Microb Ecol*, 58(1):75–85.
- Sedlak, T. W., Saleh, M., Higginson, D. S., Paul, B. D., Juluri, K. R., and Snyder, S. H. (2009). Bilirubin and glutathione have complementary antioxidant and cytoprotective roles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(13):5171–5176.
- Shulman, M. L., Lakhtina, O. E., and Khorlin, A. Y. (1977). Specific irreversible inhibition of human and boar *n*-acetyl-beta-dhexosaminidase by 2-acetamido-2-deoxy-beta-d-glucopyranosyl isothiocyanate. *Biochem Biophys Res Commun*, 74(2):455–459.
- Siegel, M. R. (1970a). Reactions of certain trichloromethyl sulfonyl fungicides with low molecular weight thiols. *in vitro* studies with glutathione. *J Agric Food Chem*, 18(5):819–822.
- Siegel, M. R. (1970b). Reactions of certain trichloromethyl sulfonyl fungicides with low molecular weight thiols. *in vivo* studies with cells of *Saccharomyces pastorianus*. *J Agric Food Chem*, 18(5):823–826.
- Siegel, M. R. (1971). Reactions of the fungicide folpet (*n*-(trichloromethylthio)phthalimide) with a thiol protein. *Pesticide Biochem Physiol*, 1(2):225–233.
- Strauss, C., Kock, J., van Wyk, P., Lodolo, E., Pohl, C., , and Botes, P. (2005). Bioactive oxylipins in *saccharomyces cerevisiae*. *J. Inst. Brew.*, 111(3):304–308.

- Suh, J. K., Poulsen, L. L., Ziegler, D. M., and Robertus, J. D. (1999). Yeast flavin-containing monooxygenase generates oxidizing equivalents that control protein folding in the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(6):2687–2691.
- Sutlović, D., Gojanović, M. D., Andelinović, S., Gugić, D., and Primorac, D. (2005). Taq polymerase reverses inhibition of quantitative real time polymerase chain reaction by humic acid. *Croat Med J*, 46(4):556–562.
- Tichopad, A., Polster, J., Pecan, L., and Pfaffl, M. W. (2005). Model of inhibition of thermus aquaticus polymerase and moloney murine leukemia virus reverse transcriptase by tea polyphenols (+)-catechin and (-)-epigallocatechin-3-gallate. *J Ethnopharmacol*, 99(2):221–227.
- Todeschini, A. P., Bernardi, T. L., Schaker, P. D. C., and da Silva, G. A. (2010). Ação dos princípios ativos tebuconazol e tetraconazol sobre a atividade metabólica da linhagem *Saccharomyces cerevisiae* EMBRAPA 1vvt/97. In Girardi, C. L., Revers, L. F., Antonioli, L. R., dos Santos, H. P., Botton, M., and Machado, C. A. E., editors, *Apresentação no VIII Encontro de Iniciação Científica e IV Encontro de Pós-Graduandos Embrapa Uva e Vinho*, page 26. Embrapa Uva e Vinho.
- Tommasini, R., Evers, R., Vogt, E., Mornet, C., Zaman, G. J., Schinkel, A. H., Borst, P., and Martinoia, E. (1996). The human multidrug resistance-associated protein functionally complements the yeast cadmium resistance factor 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(13):6743–6748.
- Török, T., Rockhold, D., and Jr., A. K. (1993). Use of electrophoretic karyotyping and DNA-DNA hybridization in yeast identification. *Int J Food Microbiol*, 19(1):63 – 80.
- van Rij, N. J. W. K., editor (1984). *The yeasts a taxonomic study*. Elsevier - Amsterdam, P.O. Box 211, Amsterdam, The Netherlands, third edition.
- Verduyn, C., Postma, E., Scheffers, W. A., and Dijken, J. P. V. (1992). Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: a continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation. *Yeast*, 8(7):501–517.
- Vergauwen, B., Elegheert, J., Dansercoer, A., Devreese, B., and Savvides, S. N. (2010). Glutathione import in *haemophilus influenzae* rd is primed by the periplasmic heme-binding protein hbpa. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(30):13270–13275.
- Vergauwen, B., Pauwels, F., and Beeumen, J. J. V. (2003a). Glutathione and catalase provide overlapping defenses for protection against respiration-generated hydrogen peroxide in *haemophilus influenzae*. *J Bacteriol*, 185(18):5555–5562.
- Vergauwen, B., Pauwels, F., Vaneechoutte, M., and Beeumen, J. J. V. (2003b). Exogenous glutathione completes the defense against oxidative stress in *haemophilus influenzae*. *J Bacteriol*, 185(5):1572–1581.
- Wan, W., Yeow, J. T. W., and Dyke, M. I. V. (2009). Size-dependent PCR inhibitory effect induced by gold nanoparticles. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, 2009:2771–2774.
- Wang, W., Wang, H.-B., Li, Z.-X., and Guo, Z.-Y. (2006). Silicon inhibition effects on the polymerase chain reaction: a real-time detection approach. *J Biomed Mater Res A*, 77(1):28–34.
- Wiedbrauk, D. L., Werner, J. C., and Drevon, A. M. (1995). Inhibition of PCR by aqueous and vitreous fluids. *J Clin Microbiol*, 33(10):2643–2646.
- Wilson, I. G. (1997). Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl Environ Microbiol*, 63(10):3741–3751.
- Wolfgang, G. H. I., Shibata, R., Wang, J., Ray, A. S., Wu, S., Doerrfler, E., Reiser, H., Lee, W. A., Birkus, G., Christensen, N. D., Andrei, G., and Snoeck, R. (2009). Gs-9191 is a novel topical prodrug of the nucleotide analog 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)guanine with antiproliferative activity and possible utility in the treatment of human papillomavirus lesions. *Antimicrob Agents Chemother*, 53(7):2777–2784.

Xufre, A., Simões, F., Gírio, F., and Clemente, A. (2000). Use of RAPD analysis for differentiation among six enological *Saccharomyces cerevisiae* spp. strains. *Food Technol. Biotechnol.*, 38:53–58.

Yang, X., Meng, X., Li, B., Chen, Z., Zhao, D., Tan, X., and Yu, Q. (2008). Inhibition of in vitro amplification of targeted DNA fragment and activity of exonuclease I by a fullerene-oligonucleotide conjugate. *Biologicals*, 36(4):223–226.

Yoshii, T., Tamura, K., Taniguchi, T., Akiyama, K., and Ishiyama, I. (1993). [water-soluble eumelanin as a PCR-inhibitor and a simple method for its removal]. *Nihon Hoigaku Zasshi*, 47(4):323–329.

Zapun, A., Cooper, L., and Creighton, T. E. (1994). Replacement of the active-site cysteine residues of DsbA, a protein required for disulfide bond formation in vivo. *Biochem*, 33(7):1907–1914.

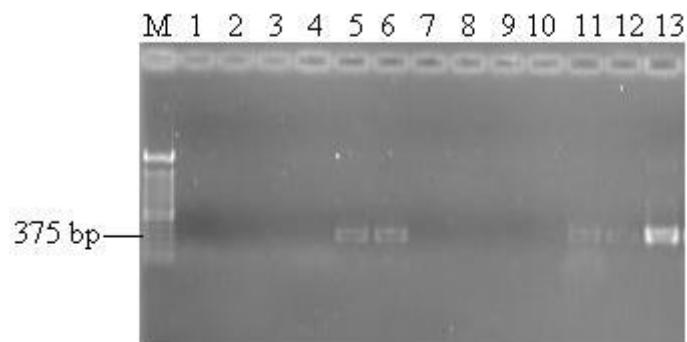


Figure 1: Amplification of a 375 bp specific DNA fragment of the 18S region of *Saccharomyces cerevisiae* with different N-trichloromethylthio-phthalimide (NTCMTP) and N-trichloromethylthio-4-cyclohexane-1,2-dicarboximide (NTCMTCDC) concentrations and with 6.0 U Taq DNA polymerase. NTCMTP: M-100 bp DNA Ladder; 1- 675 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (recommended dose); 2- 337.5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; 3- 168.75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; 4- 84,375 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; 5- 42.2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; 6- 21.1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. NTCMTCDC: 7- 1200 (recommended dose) $\mu\text{g.mL}^{-1}$; 8- 600 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; 9- 300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; 10- 150 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; 11- 75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; 12- 37.5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; 13 and 14- positive control

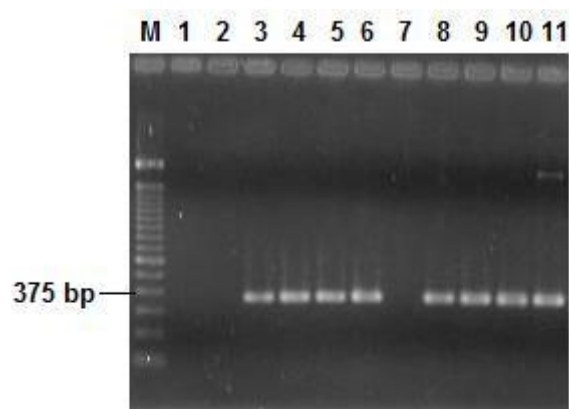


Figure 2: Amplification of a 375 bp specific DNA fragment of the 18S region of *Saccharomyces cerevisiae* by two different Taq DNA polymerase units and with distinct N-trichloromethylthio-4-cyclohexane-1,2-dicarboximide (NTCMTCDC) concentrations. 1.5 U Taq DNA polymerase: M- 100 bp DNA Ladder; 1-120 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; 2- 60 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; 3- 30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; 4- 15 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; 5 -7.5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; 6- positive control. 6.0 U Taq DNA polymerase: 7- 120 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; 8- 60 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; 9- 30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; 10- 15 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; 11- 7.5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$

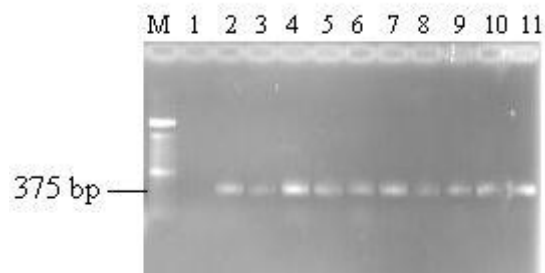


Figure 3: Amplification of a 375 bp specific DNA fragment of the 18S region of *Saccharomyces cerevisiae* by two different Taq DNA polymerase units and with different N-trichloromethylthio-phthalimide (NTCMTP) concentrations. 1.5 U Taq DNA polymerase: M- 100 bp DNA Ladder; 1- 67.5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; 2- 33.75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; 3- 16.875 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; 4- 8.438 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; 5 -4.219 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. 6.0 U Taq DNA polymerase: 6- 67.5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; 7- 33.75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; 8- 16.875 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; 9- 8.438 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; 10- 4.219 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; 11 - positive control

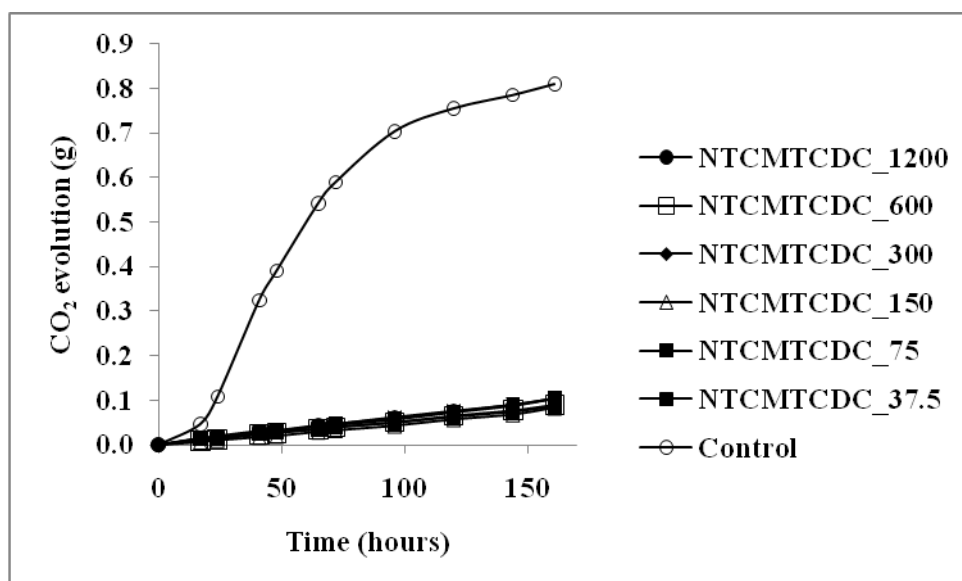


Figure 4: Metabolic activity of *Sacch. cerevisiae* in different concentrations of N-trichloromethylthio-4-cyclohexane-1,2-dicarboximide (NTCMTCDC): 1200 (recommended dose), 600, 300, 150, 75 and 37.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

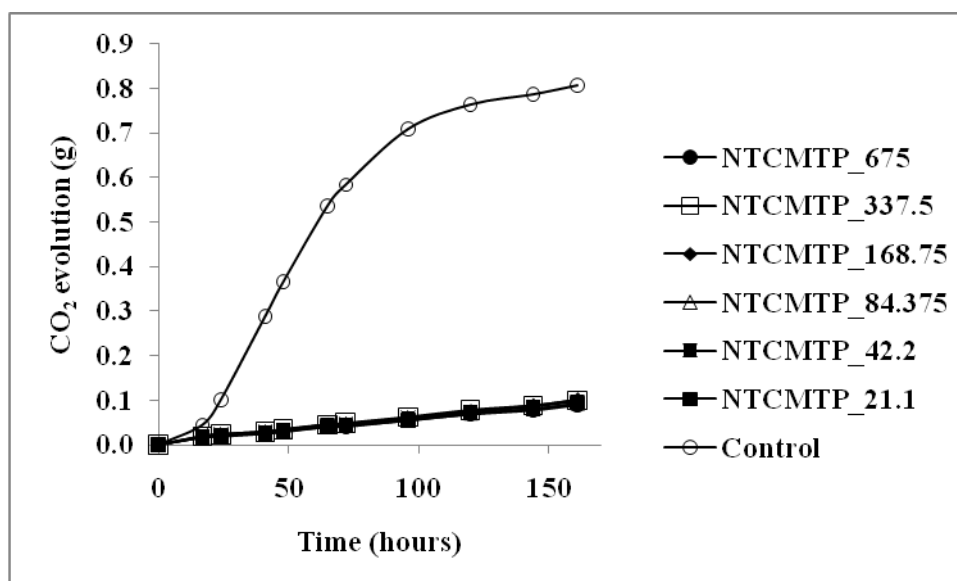


Figure 5: Metabolic activity of *Sacch. cerevisiae* in different concentrations of N-trichloromethylthiophthalimide (NTCMTP): 675 (recommended dose), 337.5, 168.75, 84.375, 42.2 and 21.1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

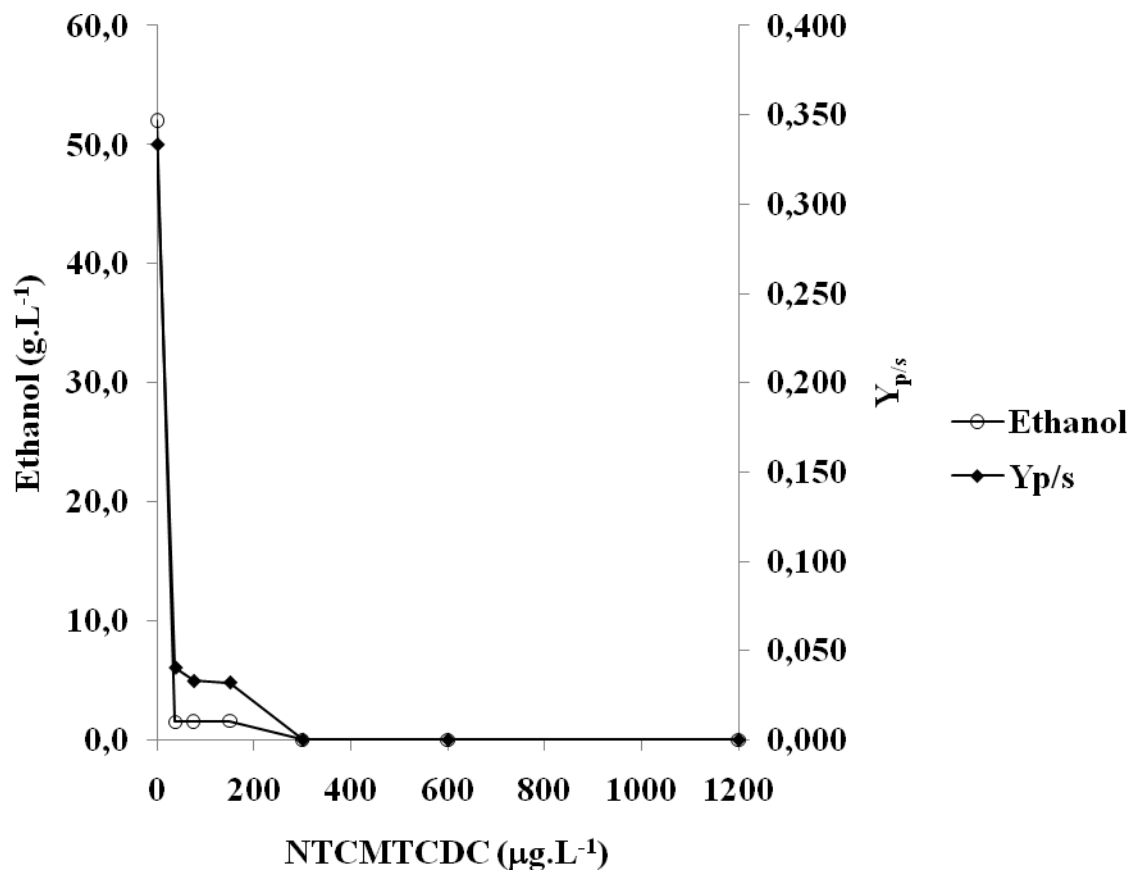


Figure 6: Ethanol production and product yield ($Y_{p/s}$) referred to product formed by *Sacch. cerevisiae* in different concentration of N-trichloromethylthio-4-cyclohexane-1,2-dicarboximide (NTCMTCDC). 1200 (recommended dose), 600, 300, 150, 75 and 37.5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

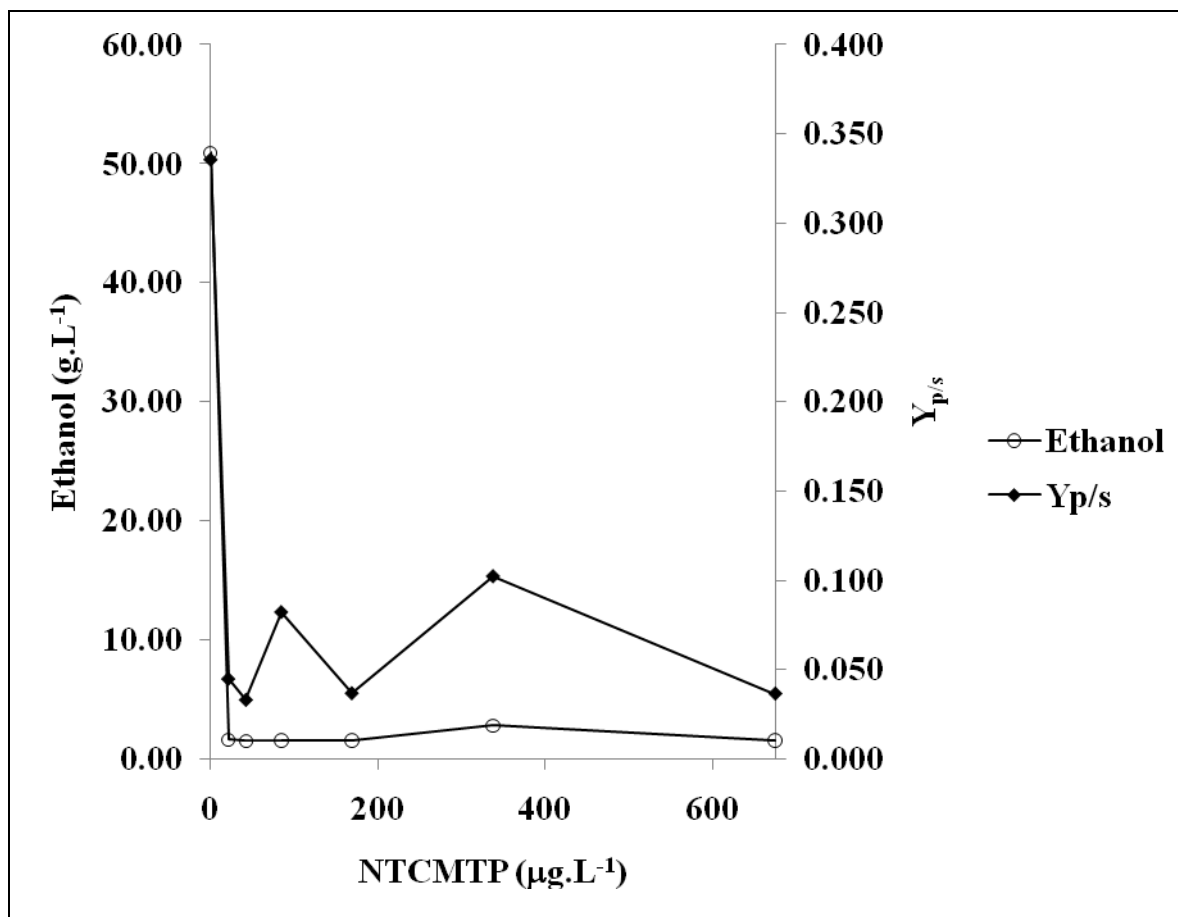


Figure 7: Ethanol production and product yield ($Y_{p/s}$) referred to product formed by *Sacch. cerevisiae* in different concentration of N-trichloromethylthio-phthalimide (NTCMTP). 675 (recommended dose), 337.5, 168.75, 84.375, 42.2 and 21.1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

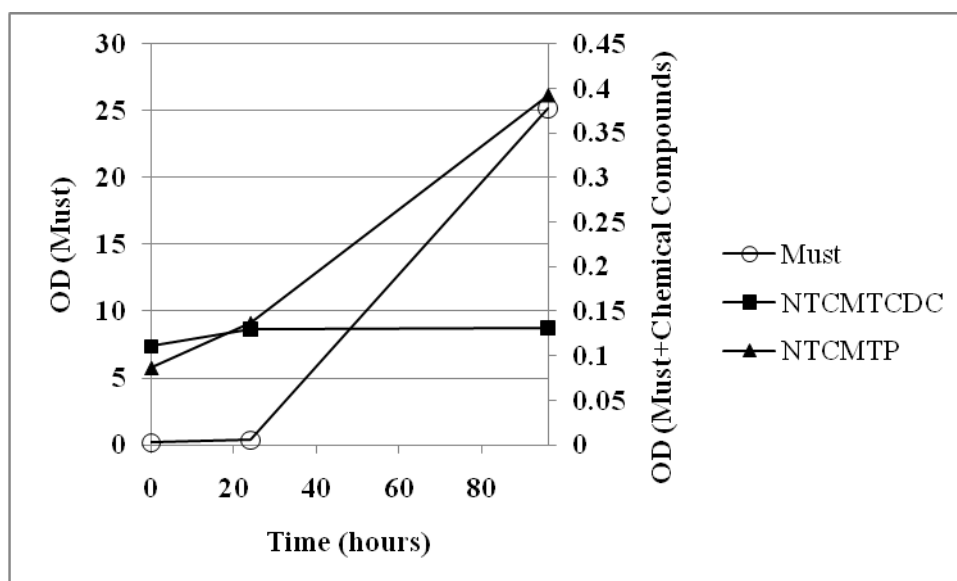


Figure 8: Inhibition growth of *Sacch. cerevisiae* during 96-hour period in absence and presence of $37.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ N-trichloromethylthio-4-cyclohexane-1,2-dicarboximide (NTCMTCDC) and $21.1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ N-trichloromethylthio-phthalimide (NTCMTP).

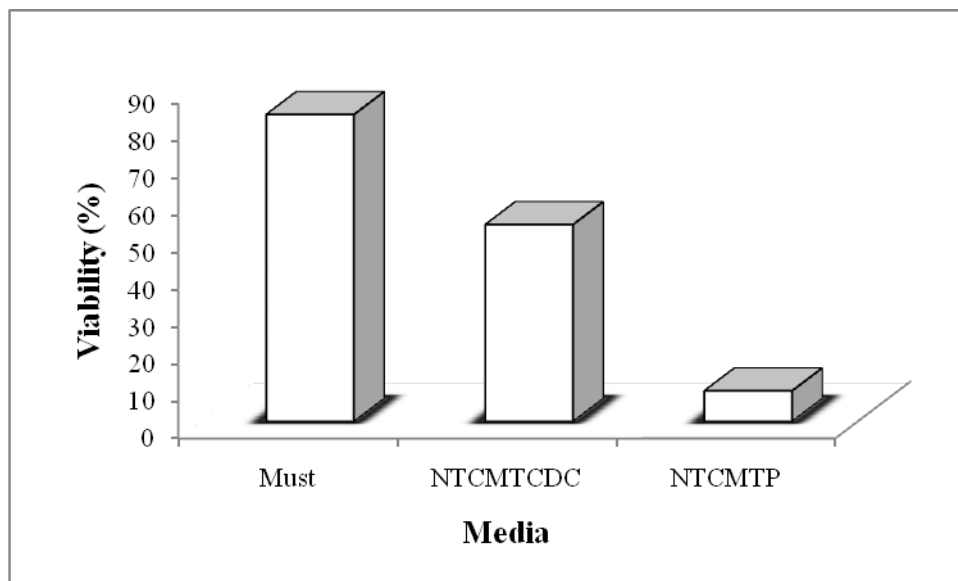


Figure 9: Viability of 24-hour old culture of *Sacch. cerevisiae* in presence and absence of $37.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ N-trichloromethylthio-4-cyclohexane-1,2-dicarboximide (NTCMTCDC) and $21.1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ Ntrichloromethylthio-phthalimide (NTCMTP).

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Após o desenvolvimento do presente trabalho, algumas considerações podem ser realizadas.

O desenvolvimento de oligonucleotídeos universais para leveduras possui grande aplicabilidade para detectar a eficiência de diferentes processos de extração de DNA, bem como verificar a presença de DNA amplificável nas mais diferentes amostras. Também são importantes por acusar a presença de substâncias inibidoras da PCR, as concentrações em que estas substâncias inibem.

A realização da PCR com oligonucleotídeos específicos para *D. bruxellensis* constitui excelente ferramenta para diagnóstico rápido da presença destas leveduras, principalmente em vinhos. Desta forma, eliminando a dificuldade e demora da identificação por meio de testes taxonômicos tradicionais. Essa agilidade conseguida com a técnica molecular permite a tomada de medidas corretivas em tempo hábil de evitar perdas econômicas. Além disso, a técnica pode ser empregada a outros alimentos e bebidas como cidra e cerveja que também podem ser afetadas por estas leveduras.

A utilização de diferentes métodos de extração de DNA é útil quando um elevado número de amostras ou linhagens precisa ser analisado. Um determinado procedimento de extração, no entanto, poderá não se mostrar adequado em todos os casos. Diferentes amostras ou linhagens podem

requerer diferentes procedimentos em função da presença de substâncias ou da idade celular.

A extração direta de DNA de vinho nem sempre é tarefa fácil devido à presença de compostos com capacidade de interferir, principalmente, na atividade enzimática, o que reflete na inibição da PCR. Compostos como tanino, ácido gálico e catequina, quando avaliados isoladamente, mostram elevado poder inibidor da PCR. Concentrações bem inferiores às aquelas encontradas em vinho exercem efeito.

O desenvolvimento de protocolos de extração direta de DNA do vinho só é conseguido quando procedimentos que eliminem ou diminuam a concentração destes compostos inibidores são empregados. A lavagem cuidadosa do precipitado obtido da centrifugação de uma alíquota de vinho podem ser uma aliada na obtenção de DNA amplificável.

Os tratamentos realizados nas uvas destinadas à elaboração de vinho também podem deixar resíduos que interferem tanto no metabolismo das leveduras utilizadas para a fermentação quanto na PCR.

Embora a utilização de PCR com DNA molde extraído diretamente da amostra promova a rapidez do diagnóstico, o uso de meio de cultivo é importante para obtenção de linhagens para estudos de variabilidade, por exemplo. Meios que promovam a seletividade ou diferenciação, dando indício de determinada linhagem pertencem ao gênero que se pretende estudar facilitam os trabalhos de identificação.

9. REFERÊNCIAS

AGNOLUCCI, M.; VIGENTINI, I.; CAPURSO, G.; MERICO, A.; TIRELLI, A.; COMPAGNO, C.; FOSCHINO, R.; NUTI, M. Genetic diversity and physiological traits of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from Tuscan Sangiovese wines. **International Journal of Food Microbiology**, 130 (3), 238-244, 2009.

AIZAWA, S.; TAVASSOLI, M. Molecular basis of the recognition of intravenously transplanted hemopoietic cells by bone marrow. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 85 (9): 3180–3183. 1988.

AL-SOUD, W.A.; OUIS, I.S.; LI, D.Q.; LJUNGH, S.; WADSTRÖM, T. Characterization of the PCR inhibitory effect of bile to optimize real-time PCR detection of *Helicobacter* species. **FEMS Immunol Med Microbiol**, 44(2):177–182. 2005.

AL-SOUD, W. A.; RÅDSTRÖM, P. Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. **J Clin Microbiol**, 39 (2), 485–493. 2001

ANDRIGHETTO C, MARCAZZAN G, LOMBARDI A (2004) Use of RAPD-PCR and TTGE for the evaluation of biodiversity of whey cultures for grana padano cheese. **Lett Appl Microbiol**, 38 (5):400–405.

ANDRIGHETTO C, PSOMAS E, TZANETAKIS N, SUZZI G, LOMBARDI A (2000) Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) PCR for the identification of yeasts isolated from dairy products. *Lett Appl Microbiol*, 30(1):5–9.

ARAÚJO WL, de ANGELIS DA, AZEVEDO JL (2004) Direct RAPD evaluation of bacteria without conventional DNA extraction. *Braz Arch Biol Technol*, 47:375–380.

ARRUDA, D.G.; HIRATA, M.H.; BARRETTO, O.C.O. Pitfalls in DNA extraction from ancient bones found in Brazilian shellmounds. **Revista do Museu de Arqueologia e Etnologia**, 17:461–467. 2007.

ASH, M.; ASH, I. Handbook of Preservatives. Synapse Information Resources, Endicott, NY. Bai, F. W., Anderson, W. A., and Moo-Young, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnol Adv**, 26(1):89–105. 2004. 2008.

BAI, Y.; KOSOY, M.Y.; BOONMAR, S.; SAWATWONG, P.; SANGMANEEDET, S.; PERUSKI, L. F. Enrichment culture and molecular identification of diverse *Bartonella* species in stray dogs. **Vet Microbiol**, 146(3-4), 314–319. 2010.

BARBIN, P.; CHEVAL, J.L.; GILIS, J.F.; STREHAIANO, P.; TAILLANDIER, P. Diversity in spoilage yeast *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* isolated from

French red wine. Assessment during fermentation of synthetic wine medium. **Journal of Institute of Brewing**, 114 (1), 69-75. 2008.

BÉLEC, L.; AUTHIER, J.; ELIEZER-VANEROT, M.C.; PIÉDOUILLET, C.; MOHAMED, A.S.; GHERARDI, R.K. Myoglobin as a polymerase chain reaction (PCR) inhibitor: a limitation for PCR from skeletal muscle tissue avoided by the use of thermos thermophilus polymerase. **Muscle Nerve**, 21(8):1064–1067. 1998.

BERNARD, B.K.; GORDON, E.B. An evaluation of the common mechanism approach to the food quality protection act: Captan and four related fungicides, a practical example. **International Journal of Toxicology**, 19(1):43–61. 2001.

BERNARDI, T.L; PEREIRA, G.V.M.; CARDOSO, P.G.; DIAS, E.S.; SCHWAN, R. *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with the production of cachaça: identification and characterization by traditional and molecular methods (PCR, PFGE and mtDNA-RFLP). **World Journal Microbiology and Biotechnology**, 2008.

BI, W.X.; KONG, F.; HU, X.Y.; CUI, X. Role of glutathione in detoxification of copper and cadmium by yeast cells having different abilities to express cup1 protein. **Toxicol Mech Methods**, 17(6):371–378. 2007.

BORMAN AM, LINTON CJ, MILES SJ, CAMPBELI CK, JOHNSON EM (2006) Ultrarapid preparation of total genomic DNA from isolates of yeast and mould

using Whatman FTA filter paper technology - a reusable DNA archiving system. *Med Mycol*, 44 (5):389–398.

BORMAN AM, LINTON CJ, MILES SJ, JOHNSON EM (2008) Molecular identification of pathogenic fungi. *J Antimicrob Chemother*, 61 Suppl 1:i7–12.

BRASIL. Lei nº 7.678, de 08 de novembro de 1988.

BUJALANCE, C.; JIMÉNEZ-VALERA, M.; MORENO, E.; RUIZ-BRAVO, A. A selective differential medium for *Lactobacillus plantarum*. **J Microbiol Methods**, 66 (3), 572–575. 2006.

BURCKHARDT, J. Amplification of DNA from whole blood. **PCR Methods Appl**, 3(4):239–243. 1994.

CABRAS, P.; ANGIONI, A.; GARAU, V.L.; PIRISI, F.M.; FARRIS, G.A.; MADAU, G.; EMONTI, G. Pesticides in fermentative processes of wine. **J Agric Food Chem**, 47(9):3854–3857. 1999.

CATTANEO, C.; SMILLIE, D.M.; GELSTHORPE, K.; PICCININI, A.; GELSTHORPE, A.R.; SOKOL, R.J. A simple method for extracting DNA from old skeletal material. **Forensic Sci Int**, 74(3):167–174. 1995.

CHATONNET, P.; DUBOURDIEU, D.; BOIDRON, J.N. The influence of *Brettanomyces/Dekkera* sp. yeasts and lactic acid bacteria on the ethylphenol

content of red wines. **American Journal of Viticulture and Enology**, 46 (4), 463-468, 1995.

CHATONNET, P.; DUBOURDIEU, D.; BOIDRON, J.N.; LAVIGNE, V. Synthesis of volatile phenols by *Saccharomyces cerevisiae* in wines. **Journal Science of Food and Agriculture**, 62, 191-202. 1993.

CHENG HR, JIANG N (2006) Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts. *Biotechnol Lett*, 28 (1):55–59.

CIANI, M.; FERRARO, L. Role of oxygen on acetic acid production by *Brettanomyces/Dekkera* in winemaking. **Journal Science Food Agriculture**, 75, 489-495, 1997.

COCOLIN, L.; RANTSIOU, K.; IACUMIN, L.; ZIRONI, R.; COMI, G. Molecular detection and identification of *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* and *Brettanomyces/Dekkera anomalous* in spoiled wines. **Applied and Environmental Microbiology**, 70 (3), 1347-1355, 2004.

CONNELL, L.; STENDER, H.; EDWARDS, C.G. Rapid detection and identification of *Brettanomyces* from winery air samples based on peptide nucleic acid analysis. **Am. J. Enol. Vitic.**, 53 (4), 322–324. 2002.

CONTRERAS, A.; SALINAS, F.; GANGA, A.; MARTÍNEZ, C. Polymerase chain reaction confirmatory method for microbiological detection of *Brettanomyces*

bruxellensis in wines. **Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology**, 16, 308-319. 2008.

COSTA, A.; BARATA, A.; MALFEITO-FERREIRA, M.; LOUREIRO, V. Evaluation of the inhibitory effect of dimethyl dicarbonate (DMDC) against wine microorganisms. **Food Microbiology**, v. 25, 422-427, 2008.

COUtlÉE, F.; VISCIDI, R.P.; SAINT-ANTOINE, P.; KESSOUS, A.; YOLKEN, R.H. The polymerase chain reaction: a new tool for the understanding and diagnosis of HIV-1 infection at the molecular level. **Mol Cell Probes**, 5(4):241–259. 1991.

COUTO, J.A.; BARBOSA, A.; HOGG, T. A simple cultural method for the presumptive detection of the yeasts *Brettanomyces/Dekkera* in wines. **Letters in Applied Microbiology**, 41, 505-510, 2005.

COUTO, J.A.; NEVES, F.; CAMPOS, F.; HOGG, T. Thermal inactivation of the wine spoilage yeasts *Dekkera/Brettanomyces*. **International Journal Food Microbiology**, 104, 337-344. 2005.

da SILVA, G. A. The occurrence of killer, sensitive, and neutral yeasts in Brazilian Riesling Italic grape must and the effect of neutral strains on killing behaviour. **Appl Microbiol Biotechnol**, 46(2):112–121. 1996.

da SILVA GA, de ALMEIDA EA (2006) Production of yellow-green fluorescent pigment by *Pseudomonas fluorescens*. *Braz Arch Biol Technol*, 49 (3):411–419.

DA SILVA, G.A. *Dekkera e Brettanomyces*: leveduras não competitivas que deterioram vinhos – características, problemas e identificação. Embrapa Uva e Vinho, **Documento 41**, v.1, p. 1-62. 2005.

da SILVA, G.A.; BERNARDI, T.L.; MENEGOTTO, M.; SCHAKER, P.D.C.; BERLESI, M.S.; VALENTE, P. Inibição da reação em cadeia da polimerase por compostos presentes no vinho. In: XII Congreso Latinoamericano de Viticultura y Enología, page 229. 2009

da SILVA, G.A.; de ALMEIDA, E.A. Production of yellow-green fluorescent pigment by *Pseudomonas fluorescens*. **Brazilian Archives Biology and Technology**, 49(3):411–419. 2006.

da SILVA, G.A.; GAVA, R.; SÔNEGO, O.R.; GARRIDO, L.R. Fungicidas empregados na viticultura e sua ação sobre atividade de leveduras autóctones e selecionadas. VI SINAFERM e XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos. 17. 2007.

da SILVA, G.A.; GAVA, R.; SÔNEGO, O.R.; GARRIDO, L.R. Leveduras e fungicidas: inibição e estímulo do processo fermentativo X Congresso Latino-Americano de Viticultura e Enologia/XI Congresso Brasileiro de Viticultura e

Enologia/II Seminário Franco-Brasileiro de Viticultura e Enologia/, page 346, Bento Gonçalves-RS. Embrapa Uva e Vinho, Embrapa Uva e Vinho. 2005.

da SILVA, G.A.; MENEGOTTO, M.; SCHAKER, P.D.C.; BERNARDI, T.L. Ação do Cabrio[®]Top sobre o crescimento e a atividade fermentativa da linhagem *Saccharomyces cerevisiae* Embrapa 1vvt/97. In: XII Congreso Latinoamericano de Viticultura y Enología, page 221. 2009.

DATO, M.C.F.; PIZAURO JÚNIOR, J.M.; MUTTON, M.J.R. Analysis of secondary compounds produced by *Saccharomyces cerevisiae* and wild yeast strains during the production of “cachaça”. **Brazilian Journal of Microbiology**, 36, 70-74. 2005.

DAVALIEVA, K.; EFREMOV, G.D. Influence of salts and PCR inhibitors on the amplification capacity of three thermostable DNA polymerases. **Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering**, 29 (1), 57–62. 2010.

de BAERE T, CLAEYS G, SWINNE D, VERSCHRAEGEN G, MUYLAERT A, MASSONET C, VANEECHOUTTE M (2002) Identification of cultured isolates of clinically important yeast species using fluorescent fragment length analysis of the amplified internally transcribed rRNA spacer 2 region (ITS2). *BMC Microbiol*, 2:21.

de FRANCHIS, R.; CROSS, N.C.; FOULKES, N.S.; COX, T. M. A potent inhibitor of Taq polymerase copurifies with human genomic DNA. **Nucleic Acids Res**, 16 (21):10355. 1988.

de JONGE, P.; de JONGH, F.C.; MEIJERS, R.; STEENSMA, H.Y.; SCHEFFERS, W.A. Orthogonal-field-alternation gel electrophoresis banding patterns of DNA from yeasts. **Yeast**, 2(3):193–204. 1986.

DEAK T, CHEn J, BEUCHAT LR (2000) Molecular characterization of *Yarrowia lipolytica* and *Candida zeylanoides* isolated from poultry. *Appl Environ Microbiol*, 66 (10):4340–4344.

DELAHERCHE, A.; CLAISSE, O.; LONVAUD-FUNEL, A. Detection and quantification of *Brettanomyces bruxellensis* and 'ropy' *Pediococcus damnosus* strains in wine by real-time polymerase chain reaction. **Journal of Applied Microbiology**, 97, 910-915. 2004.

DEMEKE, T.; JENKINS, G.R. Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. **Anal Bioanal Chem**, 396 (6), 1977–1990. 2010.

DILLWITH, J.W.; LEWIS, R.A. Inhibition of DNA polymerase by Captan. **Biochim Biophys Acta**, 696(3):245–252. 1982a.

DILLWITH, J.W.; LEWIS, R.A. Mechanism of inhibition of *Escherichia coli* RNA polymerase by Captan. **Biochem J**, 201(1):145–151. 1982b.

di MARO, E.; ERCOLINI, D.; COPPOLA, S. Yeast dynamics during spontaneous wine fermentation of the Catalanesca grape. **International Journal of Food Microbiology**, 117, 201-210, 2007.

DIAS, L.; PEREIRA-DA-SILVA, S.; TAVARES, M.; MALFEITO-FERREIRA, M.; LOUREIRO, V. Factors affecting the production of 4-ethylphenol by the yeast *Dekkera bruxellensis* in enological conditions. **Food Microbiology**, 20, 377-384. 2003.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, 28(3):350–356. 1956.

du TOIT, W.J.; PRETORIUS, I.S.; LONVAUD-FUNEL, A. The effect of sulphur dioxide and oxygen on the viability and culturability of a strain of *Acetobacter pasteurianus* and a strain of *Brettanomyces bruxellensis* isolated from wine. **Journal of Applied Microbiology**, 98, 862-871, 2005.

DUGELAY, I.; GUNATA, Z.; SAPIS, J.C.; BAUMES, R.; BAYONOVE, C. Role of cinnamoyl esterase activities from enzyme preparations on the formation of volatile phenols during winemaking. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 41, 2092-2096, 1993.

DUMONT F, MARECHAL PA, Gervais P (2006) Involvement of two specific causes of cell mortality in freezethaw cycles with freezing to -196 degrees C. *Appl Environ Microbiol*, 72 (2):1330–1335.

ECKHART, L.; BACH, J.; BAN, J.; TSCHACHLER, E. Melanin binds reversibly to thermostable DNA polymerase and inhibits its activity. **Biochem Biophys Res Commun**, 271(3):726–730. 2000.

EOM, S.H.; WANG, J.; STEITZ, T.A. Structure of Taq polymerase with DNA at the polymerase active site. **Nature**, 382(6588):278–281. 1996.

FERNANDES, E.K.; KEYSER, C.A.; RANGEL, D.E.; FOSTER, R.N.; ROBERTS, D.W. CTC medium: A novel dodine-free selective médium for isolating entomopathogenic fungi, especially *Metarhizium acridum*, from soil. **Biological Control**, 54, 197–205. 2010.

FREEMAN-WITTIG, M.J.; LEWIS, R.A. Alteration of the exonuclease activities of DNA polymerase I by captan. **Biochim Biophys Acta**, 867(3):107–113. 1986.

FREEMAN-WITTIG, M.J.; VINOCOUR, M.; LEWIS, R.A. Differential effects of Captan on DNA polymerase and ribonuclease H activities of avian myeloblastosis virus reverse transcriptase. **Biochemistry**, 25(10):3050–3055. 1986.

FREEMAN-WITTIG, M.J.; WELCH, W.; LEWIS, R.A. Binding of captan to DNA polymerase I from *Escherichia coli* and the concomitant effect on 5-3' exonuclease activity. **Biochemistry**, 28(7):2843–2849. 1989.

FREEMONT, P.S.; OLLIS, D.L.; STEITZ, T.A.; JOYCE, C.M. A domain of the Klenow fragment of *Escherichia coli* DNA polymerase I has polymerase but no exonuclease activity. **Proteins**, 1(1):66–73. 1986.

FRESCHI CR, CARVALHO LFOS, de OLIVEIRA CJB (2005) Comparison of DNA-extraction methods and selective enrichment broths on the detection of *Salmonella typhimurium* in swine feces by polymerase chain reaction (PCR). *Braz J Microbiol*, 36:363–367.

FUGELSANG, K.C.; EDWARDS, C.G. **Wine Microbiology: Pratical Aplicacions and Procedures**. 2ed. 393p. 2006.

GALÁN A, VESES V, MURGUI A, CASANOVA M, MARTÍNEZ JP (2006) Rapid PCR-based test for identifying *Candida albicans* by using primers derived from the pH-regulated KER1 gene. *FEMS Yeast Res*, 6 (7):1094–1100.

GARCIA-BRAVO, M.; AGUADO, J.M.; MORALES, J.M.; NORIEGA, A.R. Efficacy of a selective and differential medium for isolating *Corynebacterium urealyticum* from urine specimens. **Clin Microbiol Infect**, 3 (5), 555–558. 1997.

GARCIA, J.S.; CIUFO, L.F.; YANG, X.; KEARSEY, S.E.; MACNEILL, S.A. The c-terminal zinc finger of the catalytic subunit of DNA polymerase is responsible for direct interaction with the β subunit. **Nucleic Acids Research**, 32(10):3005–3016. 2004.

GEORGE, W. L.; SUTTER, V.L.; CITRON, D.; FINEGOLD, S.M. Selective and differential medium for isolation of clostridium difficile. **J Clin Microbiol**, 9 (2), 214–219. 1979.

GERBAUX, V.; VINCENT, B.; BERTRAND, A. Influence of maceration temperature and enzymes on the content of volatile phenols in Pinot Noir wines. **American Journal of Enology and Viticulture**, 53, 131-137, 2002.

GHADESSY, F.J.; ONG, J.L.; HOLLIGER, P. Directed evolution of polymerase function by compartmentalized self-replication. **Proc Natl Acad Sci USA**, 98(8):4552–4557. 2001.

GINZINGER, D.G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. **Experimental Hematology**, 30, 503-512. 2002

GIUDICI, P.; ZAMBONELLI, C. Biometric and genetic study on acetic acid production for breeding of wine yeast. **Am. J. Enol. Vitic.**, 43(4):370–374. 1992.

GUILLEN, A.C.; ÁVILA, L.D.; CELSO, P.G.; AYUB, M.A.Z. Presença de *Brettanomyces/Dekkera* em vinhos finos tintos. In: XIX Salão de Iniciação Científica. **Anais**. Porto Alegre: UFRGS, 2007, 126.

HARJU S, FEDOSYUK H, PETERSON KR (2004) Rapid isolation of yeast genomic DNA: Bust n' Grab. *BMC Biotechnol*, 4:8.

HARRIS, V.; FORD, C.M.; JIRANEK, V.; GRBIN, P.R. *Dekkera* and *Brettanomyces* growth and utilization of hydroxycinnamic acids in synthetic media. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 78, 997-1006, 2008.

HARRIS, V.; FORD, C.M.; JIRANEK, V.; GRBIN, P.R. Survey of enzyme activity responsible for phenolic off-flavour production by *Dekkera* and *Brettanomyces* yeast. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 81, 1117-1127, 2009.

HARRISON, J.; JAMET, A.; MUGLIA, C.I.; de SYPE, G.V.; AGUILAR, O.M.; PUPPO, A.; FRENO, P. Glutathione plays a fundamental role in growth and symbiotic capacity of *Sinorhizobium meliloti*. **J Bacteriol**, 187(1):168–174. 2005.

HARTEMINK, R.; KOK, B.; WEENKB, G.; ROMBOUTS, F. Raffinose-*Bifidobacterium* (RB) agar, a new selective medium for bifidobacteria. **Journal of Microbiological Methods**, 27, 33–43. 1996.

HELIANTI, I.; NURHAYATI, N.; WAHYUNTARI, B. Cloning, sequencing, and expression of a β -1,4-endoxylanase gene from Indonesian *Bacillus licheniformis* strain 15 in *Escherichia coli*. **World J Microbiol Biotechnol**, 24:1273–1279. 2008.

HIERRO, N.; GONZÁLEZ, A.; MAS, A.; GUILLAMÓN, J.M. New PCR-based methods for yeast identification. **Journal of Applied Microbiology**, 97, 792-801, 2004.

HIRANO M, SHTILBANS A, MAYEUX R, DAVIDSON MM, di MAURO S, KNOWLES JA, SCHON EA (1997) Apparent mtDNA heteroplasmy in Alzheimer's disease patients and in normals due to PCR amplification of nucleus embedded mtDNA pseudogenes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94 (26):14894–14899.

HOGREFE, H.H.; HANSEN, C.J.; SCOTT, B.R.; NIELSON, K.B. Archaeal dutpase enhances PCR amplifications with archaeal DNA polymerases by preventing dutp incorporation. **Proc Natl Acad Sci USA**, 99(2):596–601. 2002.

HORWITZ, W. (editor). *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC 20044, thirteenth edition. 1980.

HUGGETT, J.F.; NOVAK, T.; GARSON, J.A.; GREEN, C.; MORRIS-JONES, S.D.; MILLER, R.F.; ZUMLA, A. Differential susceptibility of PCR reactions to

inhibitors: an important and unrecognised phenomenon. **BMC Res Notes**, 1:70. 2008

HUMMEL, S.; NORDSIEK, G.; HERRMANN, B. Improved efficiency in amplification of ancient dna and its sequence analysis. **Naturwissenschaften**, 79(8):359–360. 1992.

IBEAS, J.I.; LOZANO, I.; PERDIGONES, F.; JIMENEZ, J. Detection of *Dekkera-Brettanomyces* in sherry by a nested PCR method. **Applied and Environmental Microbiology**, 62 (3), 998-1003, 1996.

INNIS MA, GELFAND DH (1990) Optimization of PCRs. In: Innis MA (ed) PCR protocols. A guide to methods and applications. Academic Press, Inc. Harcourt Brace Jovanovich, Academic Press, Limited, 24-28 Oval Road, London NW1 7DX.

JARA, C.; MATEO, E.; GUILLAMÓN, J.M.; TORIJA, M.J.; MAS, A. Analysis of several methods for the extraction of high quality DNA from acetic acid bacteria in wine and vinegar for characterization by PCR-based methods. **Int J Food Microbiol**, 128 (2):336–341. 2008.

JAWAD, A.; HAWKEY, P.M.; HERITAGE, J.; SNELLING, A.M. Description of leeds *Acinetobacter* medium, a new selective and differential medium for isolation of clinically important *Acinetobacter* spp., and comparison with Herellea agar and Holton's agar. **J Clin Microbiol**, 32 (10), 2353–2358. 1994.

JIANG, J.; ALDERISIO, K.A.; SINGH, A.; XIAO, L. Development of procedures for direct extraction of *Cryptosporidium* DNA from water concentrates and for relief of PCR inhibitors. **Appl Environ Microbiol**, 71 (3),1135–1141. 2005.

JIN J, LEE YK, WICKES BL (2004) Simple chemical extraction method for DNA isolation from *Aspergillus fumigatus* and other *Aspergillus* species. *J Clin Microbiol*, 42(9):4293–4296.

JIN, H.J.; OH, M.Y.; JIN, D.H.; HONG, Y.K. Identification of a taq DNA polymerase inhibitor from the red seaweed *Symphyclocladia latiuscula*. **J Environ Biol**, 29(4):475–478. 2008.

KATZ, Y.; DIAMOND, J.M. Thermodynamic constants for nonelectrolyte partition between dimyristoyl lecithin and water. **J Membr Biol**, 17(2):101–120. 1974.

KE C, KELLEHER AM, MATHEWSON A, SHEEHAN M (2004) Design and fabrication of a silicon microreactor for DNA amplification. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, 3:1964–1967.

KE C, KELLEHER AM, SHEEHAN M, MATHEWSON A (2007) Single step cell lysis/PCR detection of *Escherichia coli* in an independently controllable silicon microreactor. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 120:538–544. doi:10.1016/j.snb.2006.03.019

KENTERS, N.; HENDERSON, G.; JEYANATHAN, J.; KITTELMANN, S.; JANSSEN, P.H. Isolation of previously uncultured rumen bacteria by dilution to extinction using a new liquid culture medium. **J Microbiol Methods**, 84 (1), 52–60. 2011.

KERMEKCHIEV, M.B.; KIRILOVA, L.I.; VAIL, E.E.; BARNES, W.M. Mutants of taq DNA polymerase resistant to PCR inhibitors allow DNA amplification from whole blood and crude soil samples. **Nucleic Acids Res**, 37(5):e40. 2009.

KIM, Y.; EOM, S.H.; WANG, J.; LEE, D.S.; SUH, S.W.; STEITZ, T.A. Crystal structure of thermus aquaticus DNA polymerase. **Nature**, 376(6541):612–616. 1995.

KIM, C.H.; KHAN, M.; MORIN, D.E.; HURLEY, W.L.; TRIPATHY, D.N.; KEHRLI, M.; OLUOCH, A.O.; KAKOMA, I. Optimization of the PCR for detection of *Staphylococcus aureus* nuc gene in bovine milk. **J Dairy Sci**, 84 (1), 74–83. 2001.

KONTANIS, E. J. AND REED, F. A. Evaluation of real-time PCR amplification efficiencies to detect PCR inhibitors. **J Forensic Sci**, 51 (4), 795–804. 2006.

LAPOLLI, J.N.; MELLO, L.M.R.; TRARBACH, C.; BRENNER, G.; TEIXEIRA, A.N.; SANTIAGO, R.W.; COMIN, J.C. A competitividade da Vitivinicultura Brasileira: análise sensorial e programa de ação com destaque para o Rio

Grande do Sul. Porto Alegre, RS: BANRISUL/EMBRAPA-CNPUV/SEBRAE/RS, 1995. 200p.

LARENA, I.; SALAZAR, O.; GONZÁLEZ, V.; JULIÁN, M.C.; RUBIO, V. Design of a primer for ribosomal DNA internal transcribed spacer with enhanced specificity for ascomycetes. **Journal of Biotechnology**, 75, 187-194. 1999.

LAWYER, F.C.; STOFFEL, S.; SAIKI, R.K.; MYAMBO, K.; DRUMMOND, R.; GELFAND, D.H. Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the DNA polymerase gene from *thermus aquaticus*. **J Biol Chem**, 264(11):6427–6437. 1989.

LIBERAL, A.T.S.; BASÍLIO, A.C.M.; RESENDE, A.M.; BRASILEIRO, B.T.V.; SILVA FILHO, E.A.; MORAIS, J.O.F.; SIMÕES, D.A.; MORAIS JÚNIOR, M.A. Identification of *Dekkera bruxellensis* as a major contaminant yeast in continuous fuel ethanol fermentation. **Journal of Applied Microbiology**, 102, 538-547. 2007.

LIBERAL, A.T.S.; SILVA FILHO, E.A.; MORAIS, J.O.F.; SIMÕES, D.A.; MORAIS JÚNIOR, M.A. Contaminant yeast detection in industrial ethanol fermentation must by rDNA-PCR. **Letters in Applied Microbiology**, 40, 19-23. 2005.

LIGUORI G, LUCARIELLO A, COLELLA G, LUCA AD, MARINELLI P (2007) Rapid identification of *Candida* species in oral rinse solutions by PCR. *J Clin Pathol*, 60 (9):1035–1039.

LIU, M.K.; FISHBEIN, L. Reactions of captan and folpet with thiols. **Experientia**, 23(2):81–82. 1967.

LODDER, J. (editor) *The yeasts a taxonomic study*. North-Holland, third edition. 1974.

LONGO, E.; CANSADO, J.; SIERO, C.; CALO, P.; VELAZQUEZ, J.B.; VILLA, T.G. Influence of the curing killer phenotype in *Saccharomyces cerevisiae* wine in *Saccharomyces cerevisiae* wine strains on the fermentative behaviour. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 8:147–150. 1992.

LOUSSOUARN, A.; DUFLOS, M.; BENOIST, E.; CHATAL, J.F.; le BAUT, G.; GESTIN, J.F. Synthesis of new bifunctional chelating agents: (1r*,2r*,4s*)-4-isothiocyanatocyclohexane-1,2-diaminen,n,n[prime or minute],n[prime or minute]-tetrakisethanephosphonic acid (4-icmp) and (1r*,2r*,4s*)-4-isothiocyanatocyclohexane-1,2-diamine-n,n,n[prime or minute],n[prime or minute]-tetrakisethanephosphonic acid (4-icep). **J. Chem. Soc.**, Perkin Trans. 1, 2:237–242. 1998.

LUO, G.; LEWIS, R.A. Inhibition of RNA polymerase by captan at both DNA and substrate binding sites. **Biochem Pharmacol**, 44(11):2251–2258. 1992.

MADEO, F.; FRÖHLICH, E.; LIGR, M.; GREY, M.; SIGRIST, S.J.; WOLF, D.H.; FRÖHLICH, K.U. Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeast. **J Cell Biol**, 145(4):757–767. 1999.

MANEU V, MARTÍNEZ JP, GOZALBO D (2000) Identification of *Candida albicans* clinical isolates by PCR amplification of an *efb1* gene fragment containing an intron-interrupted open reading frame. *Med Mycol*, 38 (2):123–126.

MARCUSSI, V.M.; MARCUSSI, L.M.; BARBOSA-TESSMANN, L.P.; LONARDONI, M.V.C.; SILVEIRA, T.G.V. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: New primers for identification using polymerase chain reaction. **Experimental Parasitology**, 120, 300-305. 2008

MARTIN, K.J.; RYGIIEWICZ, P.T. Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. **BMC Microbiology**, 5:28. 2005.

MARTORELL, P.; BARATA, A.; MALFEITO-FERREIRA, M.; FERNÁNDEZ-ESPINAR, M.T.; LOUREIRO, V.; QUEROL, A. Molecular typing of the yeast species *Dekkera bruxellensis* and *Pichia guilliermondii* recovered from wine related sources. **Int J Food Microbiol**, 106 (1), 79–84. 2006.

MASSAD, G; OLIVER, J.D. New selective and differential medium for *Vibrio cholerae* and *Vibrio vulnificus*. **Appl Environ Microbiol**, 53 (9), 2262–2264. 1987.

MATHESON, C.D.; GURNEY, C.; ESAU, N.; LEHTO, R. Assessing pcr inhibition from humic substances. *The Open Enzyme Inhibition Journal*, 3:38–45. Meister, A. (1988). Glutathione metabolism and its selective modification. **J Biol Chem**, 263(33):17205–17208. 2010.

MAYORAL, M.B.; MARTÍN, R.; SANZ, A.; HERNÁNDEZ, P.E.; GONZÁLEZ, I.; GARCÍA, T. Detection of *Kluyveromyces marxianus* and other spoilage yeasts in yoghurt using a PCR-culture technique. **International Journal of Food Microbiology**, 105, 27-34. 2005

MEDICI DD, CROCI L, DELIBATO E, PASQUALE SD, FILETICI E, TOTI L (2003) Evaluation of DNA extraction methods for use in combination with SYBR green I real-time PCR to detect *Salmonella enterica* serotype enteritidis in poultry. *Appl Environ Microbiol*, 69 (6):3456–3461.

MENG, X.; LI, B.; CHEN, Z.; YAO, L.; ZHAO, D.; YANG, X.; HE, M.; YU, Q. Inhibition of a thermophilic deoxyribonucleic acid polymerase by fullerene derivatives. **J Enzyme Inhib Med Chem**, 22(3):293–296. 2007.

MELO SCO, PUNGARTNIK C, CASCARDO JCM, BRENDEL M (2006) Rapid and efficient protocol for DNA extraction and molecular identification of the basidiomycete *Crinipellis perniciosa*. **Genet Mol Res**, 5 (4):851–855.

MILLET, V.; LONVAUD-FUNEL, A. The viable but non culturable state of wine micro-organisms during storage. **Letters in Applied Microbiology**, 30, 136-141. 2000.

MIOT-SERTIER, C.; LONVAUD-FUNEL, A. Development of a molecular method for the typing of *Brettanomyces bruxellensis* (*Dekkera bruxellensis*) at the strain level. **J Appl Microbiol**, 102 (2), 555–562. 2007.

MITRAKUL, C.M.; HENICK-KLING, T.; EGLI, C.M. Discrimination of *Brettanomyces/Dekkera* yeast isolates from wine by using various DNA fingerprinting methods. **Food Microbiology**, 16, 3-14. 1999.

MOLEMA, G.; JANSEN, R.W.; VISSER, J.; HERDEWIJN, P., MOOLENAAR, F., MEIJER, D. K. Neoglycoproteins as carriers for antiviral drugs: synthesis and analysis of protein-drug conjugates. **J Med Chem**, 34(3):1137–1141. 1991.

MOUSSA M, DUMONT F, PERRIER-CORNET JM, GERVAIS P (2008) Cell inactivation and membrane damage after long-term treatments at sub-zero temperature in the supercooled and frozen states. **Biotechnol Bioeng**, 101 (6):1245–1255.

MÜLLER FM, WERNER KE, KASAI M, FRANCESCONI A, CHANOCK SJ, WALSH TJ (1998) Rapid extraction of genomic DNA from medically important yeasts and filamentous fungi by high-speed cell disruption. *J Clin Microbiol*, 36 (6):1625–1629.

NAKAMURA, S.; HARAGUCHI, K.; MITANI, N.; OHTSUBO, K. Novel preparation method of template DNAs from wine for pcr to differentiate grape (*Vitis vinifera* L.) cultivar. **J Agric Food Chem**, 55 (25), 10388–10395. 2007.

NCBI (2008). Chain a, structure of taq DNA polymerase. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/1TAQ_A. Cited 24 september 2008.

OELOFSE, A.; PRETORIUS, I.; DU TOIT, M. Significance of *Brettanomyces* and *Dekkera* during winemaking: a synptic review. **South African Journal of Enology and Viticulture**, 29 (2), 128–144. 2008.

OHTSUBO, K.; SUZUKI, K.; HARAGUCHI, K.; NAKAMURA, S. Novel method for preparation of the template DNA and selection of primers to differentiate the material rice cultivars of rice wine by PCR. **J Biochem Biophys Methods**, 70 (6), 1020–1028. 2008

PAL, A.; MARSHALL, D.L.. Comparison of culture media for enrichment and isolation of *Salmonella* spp. from frozen channel catfish and vietnamese basa filets. **Food Microbiol**, 26(3), 317–319. 2009.

PARK JI, GRANT CM, ATTFIELD PV, DAWES IW (1997) The freeze-thaw stress response of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is growth phase specific and is controlled by nutritional state via the ras-cyclic amp signal transduction pathway. *Appl Environ Microbiol*, 63 (10):3818–3824.

PATERSON AH, BRUBAKER CL, WENDEL JF (1993) A rapid method for extraction of cotton (*Gossypium* spp.) genomic DNA suitable for RFLP or PCR analysis. *Plant Molecular Biology Reporter*, 11 (2):122–127.

PEIXOTO, A.R.; MARIANO, R.L.R; VIANA, I.O. Meio semi-seletivo para isolamento de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Ciência Rural**, Santa Maria, 36 (4), 1317–1320. 2006.

PHISTER, T. G.; MILLS, D. A. Real-time PCR assay for detection and enumeration of *Dekkera bruxellensis* in wine. **Applied and Environmental Microbiology**, 69 (12), 7430–7434. 2003.

PRATT, R.; DUFRENOY, J. Cytochemical interpretation of the mechanism of penicillin action. **Bacteriol Rev**, 12(1):79–103. 1948.

PRUVOST M, GEIGL EM (2004) Real-time quantitative PCR to assess the authenticity of ancient DNA amplification. *Journal of Archaeological Science*, 31:1191–1197.

PSIFIDI, A.; DOVAS, C.I.; BANOS, G. A comparison of six methods for genomic DNA extraction suitable for PCR-based genotyping applications using ovine milk samples. **Mol Cell Probes**, 24 (2), 93–98. 2010.

RAWSTHORNE, H.; PHISTER, T.G. A real-time PCR assay for the enumeration and detection of *Zygosaccharomyces bailii* from wine and fruit juices. **International Journal of Food Microbiology**, 112, 1-7. 2006.

RENOUF, V.; FALCOU, M.; MIOT-SERTIER, C.; PERELLO, M.C.; REVEL, G. de.; LONVAUD-FUNEL, A. Interactions between *Brettanomyces bruxellensis* and other yeast species during the initial stages of winemaking. **Journal of Applied Microbiology**, 100, 1208-1219, 2006.

RENOUF, V.; LONVAUD-FUNEL, A. Development of an enrichment medium to detect *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis*, a spoilage wine yeast, on the surface of grape berries. **Microbial Research**, 162, 154-167, 2007.

RENOUF, V.; STREHAIANO, P.; LONVAUD-FUNEL, A. Effectiveness of dimethyldicarbonate to prevent *Brettanomyces bruxellensis* growth in wine. **Food Control**, 19, 208-216, 2008.

RIBÉREAU-GAYON, J.; PEYNAUD, E.; SUDRAUD, P.; RIBÉREAU-GAYON, P. *Traité d'Enologie. Sciences et techniques du vin. Analyse et contrôle des vins*, volume 1. Dunod, Paris. 1982.

RODRIGUES, N.; GONÇALVES, G.; DA SILVA, S.P.; MALFEITO-FERREIRA, M.; LOUREIRO, V. Development and use of a new medium to detect yeasts of the genera *Dekkera/Brettanomyces*. **Journal of Applied Microbiology**, 90 (4), 588–599. 2001.

ROMANO, A.; PERELLO, M.C.; LONVAUD-FUNEL, A.; SICARD, G.; REVEL, G. Sensory and analytical re-avaluation of “Brett character”. **Food Chemistry**, 114 (1), 15-19. 2009.

ROSZAK, D.B.; COLWELL, R.R. Survival strategies of bacteria in the natural environment. **Microbiological Reviews**, 51 (3), 365-379. 1987.

ROUSK, J.; DEMOLING, L.A.; BÅÅTH, E. Contrasting short-term antibiotic effects on respiration and bacterial growth compromises the validity of the selective respiratory inhibition technique to distinguish fungi and bacteria. **Microb Ecol**, 58(1):75–85. 2009.

SAKAI, T.; OISHI, K.; ASAHARA, T.; TAKADA, T.; YUKI, N.; MATSUMOTO, K.; NOMOTO, K.; KUSHIRO, A. M-rtlv agar, a novel selective medium to distinguish *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus paracasei* from *Lactobacillus rhamnosus*. **Int J Food Microbiol**, 139 (3), 154–160. 2010.

SALONEN, A.; NIKKILÄ, J.; JALANKA-TUOVINEN, J.; IMMONEN, O.; RAJILIĆ-STOJANOVIĆ, M.; KEKKONEN, R.A.; PALVA, A.; DE VOS, W.M. Comparative analysis of fecal DNA extraction methods with phylogenetic

microarray: effective recovery of bacterial and archaeal DNA using mechanical cell lysis. **J Microbiol Methods**, 81 (2), 127–134. 2010.

SANDVEN, P.; LASSEN, J. Importance of selective media for recovery of yeasts from clinical specimens. **J Clin Microbiol**, 37 (11), 3731–3732. 1999.

SANZ, A.; MARTÍN, R.; MAYORAL, M.B.; HERNÁNDEZ, P.E.; GONZÁLEZ, I.; LACARRA, T.G. Development of a PCR-culture technique for rapid detection of yeast species in vacuum packed ham. **Meat Science**, 71, 230-237. 2005.

SARAVIA, M.E.; NELSON-FILHO, P.; ITO, I.Y.; DA SILVA, L.A.B.; DA SILVA, R.A.B.; EMILSON, C.G. Morphological differentiation between *S. mutans* and *S. sobrinus* on modified sb-20 culture medium. **Microbiol Res**, 166 (1), 63–67. 2011.

SAVAZZINI, F.; MARTINELLI, L. DNA analysis in wines: Development of methods for enhanced extraction and real-time polymerase chain reaction quantification. **Analytica Chimica Acta**, 563, 274–282. 2006.

SEDLAK, T.W.; SALEH, M.; HIGGINSON, D.S.; PAUL, B.D.; JULURI, K.R.; SNYDER, S.H. Bilirubin and glutathione have complementary antioxidant and cytoprotective roles. **Proc Natl Acad Sci USA**, 106(13):5171–5176. 2009.

SEI, K.; ASANO, K.I.; TATEISHI, N.; MORI, K.; IKE, M.; FUJITA, M. Design of PCR and gene probes for the general detection of bacterial populations capable

of degrading aromatic compounds via catechol cleavage pathways. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 88 (5), 542-550. 1999.

SHAMES, B.; FOX, J.G.; DEWHIRST, F.; YAN, L.; SHEN, Z.; TAYLOR, N.S. Identification of widespread helicobacter hepaticus infection in feces in commercial mouse colonies by culture and PCR assay. **J Clin Microbiol**, 33 (11), 2968–2972. 1995.

SHARMA S, SZELE Z, SCHILLING R, MUNCH JC, SCHLOTTER M (2006) Influence of freeze-thaw stress on the structure and function of microbial communities and denitrifying populations in soil. *Appl Environ Microbiol*, 72 (3):2148–2154.

SHEN, F.T.; YOUNG, C.C. Rapid detection and identification of the metabolically diverse genus *Gordonia* by 16S rRNA-gene-targeted genus-specific primers. **FEMS Microbiology Letters**, 250, 221-227. 2005.

SHULMAN, M.L.; LAKHTINA, O.E.; KHORLIN, A.Y. Specific irreversible inhibition of human and boar n-acetyl-beta-dhexosaminidase by 2-acetamido-2-deoxy-beta-d-glucopyranosyl isothiocyanate. **Biochem Biophys Res Commun**, 74(2):455–459. 1977.

SIEGEL, M.R. Reactions of certain trichloromethyl sulfenyl fungicides with low molecular weight thiols. in vitro studies with glutathione. **J Agric Food Chem**, 18(5):819–822. 1970a.

SIEGEL, M.R. Reactions of certain trichloromethyl sulfenyl fungicides with low molecular weight thiols. *in vivo* studies with cells of *Saccharomyces pastorianus*. **J Agric Food Chem**, 18(5):823–826. 1970b.

SIEGEL, M.R. Reactions of the fungicide folpet (n-(trichloromethylthio)phthalimide) with a thiol protein. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 1(2):225–233. 1971.

SMITH, C.J.; OSBORN, A.M. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. **FEMS Microbiology and Ecology**, 67, 6-20. 2009.

SMITH, D.S.; MAXWELL, P.W.; BOER, S.H.D. Comparison of several methods for the extraction of DNA from potatoes and potato-derived products. **J Agric Food Chem**, 53 (26), 9848–9859. 2005.

STENDER, H.; KURTZMAN, C.; HYLDIG-NIELSEN, J.J.; SORENSEN, D.; BROOMER, A.; OLIVEIRA, K.; PERRY-O'KEEFE, H.; SAGE, A.; YOUNG, B.; COULL, J. Identification of *Dekkera bruxellensis* (*Brettanomyces*) from wine by fluorescence *in situ* hybridization using peptide nucleic acid probes. **Applied and Environmental Microbiology**, 67 (2), 938-941. 2001.

STRAUSS, C.; KOCK, J.; VAN WYK, P.; LODOLO, E.; POHL, C.; BOTES, P. Bioactive oxylipins in *saccharomyces cerevisiae*. **J. Inst. Brew.**, 111(3):304–308. 2005.

STURM, J.; GROSSMANN, M.; SCHNELL, S. Influence of grape treatment on the wine yeast populations isolated from spontaneous fermentations. **J Appl Microbiol**, 101 (6), 1241–1248. 2006.

SUÁREZ, R.; SUÁREZ-LEPE, J.A.; MORATA, A.; CALDERÓN, F. The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera*: a review. **Food Chemistry**, 102, 10-21, 2007.

SUH, J.K.; POULSEN, L.L.; ZIEGLER, D.M.; ROBERTUS, J.D. Yeast flavin-containing monooxygenase generates oxidizing equivalents that control protein folding in the endoplasmic reticulum. **Proc Natl Acad Sci USA**, 96(6):2687–2691. 1999.

SUTLOVIĆ, D.; GOJANOVIĆ, M.D.; ANDELINOVIĆ, S.; GUGIĆ, D.; PRIMORAC, D. Taq polymerase reverses inhibition of quantitative real time polymerase chain reaction by humic acid. **Croat Med J**, 46(4):556–562. 2005.

TESSONIÈRE, H.; VIDAL, S.; BARNAVON, L.; ALEXANDRE, H.; REMIZE, F.; Design and performance testing of a real-time PCR assay for sensitive and reliable direct quantification of *Brettanomyces* in wine. **International Journal of Food Microbiology**, 129 (3), 237-243. 2009.

TICHOPAD, A.; POLSTER, J.; PECEN, L.; PFAFFL, M.W. Model of inhibition of thermus aquaticus polymerase and moloney murine leukemia virus reverse transcriptase by tea polyphenols (+)-catechin and (-)-epigallocatechin-3-gallate. **J Ethnopharmacol**, 99(2):221–227. 2005.

TODESCHINI, A.P.; BERNARDI, T.L.; SCHAKER, P.D.C., da SILVA, G. A. Ação dos princípios ativos tebuconazol e tetraconazol sobre a atividade metabólica da linhagem *Saccharomyces cerevisiae* EMBRAPA 1vvt/97. In VIII Encontro de Iniciação Científica e IV Encontro de Pós-Graduandos Embrapa Uva e Vinho, page 26. Embrapa Uva e Vinho. 2010.

TOMMASINI, R.; EVERS, R.; VOGT, E.; MORNET, C.; ZAMAN, G.J.; SCHINKEL, A.H.; BORST, P.; MARTINOIA, E. The human multidrug resistance-associated protein functionally complements the yeast cadmium resistance factor 1. **Proc Natl Acad Sci USA**, 93(13):6743–6748. 1996.

TORNAI-LEHOCZKI, J.; PÉTER, G.; DLAUCHY, D. Chromagar candida medium as a practical tool for the differentiation and presumptive identification of yeast species isolated from salads. **Int J Food Microbiol**, 86, 189–200. 2003.

TÖRÖK, T.; ROCKHOLD, D.; JR., A.K. Use of electrophoretic karyotyping and DNA-DNA hybridization in yeast identification. **International Journal of Food Microbiology**, 19(1):63 – 80. 1993.

URSO, R.; RANTSIOU, K.; DOLCI, P.; ROLLE, L.; COMI, G.; COCOLIN, L. Yeast biodiversity and dynamics during sweet wine production as determined by molecular methods. **FEMS Yeast Res**, 8 (7):1053–1062. 2008.

VAN DAMME, I.; HABIB, I.; DE ZUTTER, L. *Yersinia enterocolitica* in slaughter pig tonsils: enumeration and detection by enrichment versus direct plating culture. **Food Microbiol**, 27 (1), 158–161. 2010.

van RIJ, N. J. W. K., (editor). *The yeasts a taxonomic study*. Elsevier - Amsterdam, P.O. Box 211, Amsterdam, The Netherlands, third edition. 1984.

VERDUYN, C.; POSTMA, E.; SCHEFFERS, W.A.; DIJKEN, J.P.V. Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: a continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation. **Yeast**, 8(7):501–517. 1992.

VERGAUWEN, B.; ELEGHEERT, J.; DANSERCOER, A.; DEVREESE, B.; SAVVIDES, S.N. Glutathione import in *Haemophilus influenzae* is primed by the periplasmic heme-binding protein hbpa. **Proc Natl Acad Sci USA**, 107(30):13270–13275. 2010.

VERGAUWEN, B.; PAUWELS, F.; BEEUMEN, J.J.V. Glutathione and catalase provide overlapping defenses for protection against respiration-generated hydrogen peroxide in *Haemophilus influenzae*. **J Bacteriol**, 185(18):5555–5562. 2003a.

VERGAUWEN, B.; PAUWELS, F.; VANEECHOUTTE, M.; BEEUMEN, J.J.V. Exogenous glutathione completes the defense against oxidative stress in haemophilus influenzae. **J Bacteriol**, 185(5):1572–1581. 2003b.

WAN,W., YEOW, J. T.W., DYKE, M. I. V. (2009). Size-dependent pcr inhibitory effect induced by gold nanoparticles. **Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc**, 2009:2771–2774.

WANG, W.; WANG, H.B.; LI, Z.X.; GUO, Z.Y. Silicon inhibition effects on the polymerase chain reaction: a real-time detection approach. **J Biomed Mater Res A**, 77(1):28–34. 2006.

WIEDBRAUK, D.L.; WERNER, J.C.; DREVON, A.M. Inhibition of PCR by aqueous and vitreous fluids. **J Clin Microbiol**, 33(10):2643–2646. 1995.

WILSON, I. G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. **Appl Environ Microbiol**, 63 (10), 3741–3751. 1997.

WOLFGANG, G.H.I.; SHIBATA, R.; WANG, J.; RAY, A.S.; WU, S.; DOERRFLER, E.; REISER, H.; LEE, W.A.; BIRKUS, G.; CHRISTENSEN, N.D.; ANDREI, G.; SNOECK, R. Gs-9191 is a novel topical prodrug of the nucleotide analog 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)guanine with antiproliferative activity and possible utility in the treatment of human papillomavirus lesions. **Antimicrob Agents Chemother**, 53(7):2777–2784. 2009.

XUFRE, A.; SIMÕES, F.; GÍRIO, F.; CLEMENTE, A. Use of RAPD analysis for differentiation among six enological *Saccharomyces cerevisiae* spp. strains.

Food Technol. Biotechnol., 38:53–58. 2000.

YANG, X.; MENG, X.; LI, B.; CHEN, Z.; ZHAO, D.; TAN, X.; YU, Q. Inhibition of in vitro amplification of targeted DNA fragment and activity of exonuclease i by a fullerene-oligonucleotide conjugate. **Biologicals**, 36(4):223–226. 2008.

YOSHII, T.; TAMURA, K.; TANIGUCHI, T.; AKIYAMA, K.; ISHIYAMA, I. Water-soluble eumelanin as a PCR-inhibitor and a simple method for its removal.

Nihon Hoigaku Zasshi, 47(4):323–329. 1993.

ZAPUN, A.; COOPER, L.; CREIGHTON, T.E. Replacement of the active-site cysteine residues of dsba, a protein required for disulfide bond formation in vivo.

Biochemistry, 33(7):1907–1914. 1994.

ZENG, Q.Y.; WESTERMARK, S.O.; RASMUSON-LESTANDER, A.; WANG, X.R. Detection and quantification of *Wallemia sebi* in aerosols by real-time PCR, conventional PCR, and cultivation. **Applied and Environmental Microbiology**, 70 (12), 7295-7302. 2004.

10 VITA

10.1 DADOS PESSOAIS:

Nome: Taís Letícia Bernardi

Nascimento: 20/11/1982, Catuípe/RS

Filiação: Erní José Bernardi e Nilsa Maria Somavilla Bernardi

E-mail: tislesticia@yahoo.com.br

10.2 FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

2007 - 2011 Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
Título: Detecção e análise da variabilidade genética de leveduras do gênero *Dekkera/Brettanomyces* em vinhos produzidos no Rio Grande do Sul
Orientador: Patrícia Valente; Coorientador: Gildo Almeida da Silva
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

2005 - 2007 Mestrado em Microbiologia Agrícola.
Universidade Federal de Lavras, UFLA, Lavras, Brasil
Título: Técnicas moleculares para a caracterização de *Saccharomyces cerevisiae* associadas à produção de cachaça, Ano de obtenção: 2007
Orientador: Rosane Freitas Schwan
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

2001 - 2005 Graduação em Bacharelado Em Química de Alimentos.
Universidade Federal de Pelotas, UFPEL, Pelotas, Brasil
Título: Processo de refino de óleo de arroz
Orientador: Rui Carlos Zambiasi

1998 - 2000 Ensino Médio (2o grau).
Escola Estadual de Ensino Médio Catuípe, EEEMC, Brasil

1990 - 1997 Ensino Fundamental (1o grau).
Escola Estadual de 1º Grau Barão do Rio Branco, EEBRB, Brasil

10.3 FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

2008 - 2008 Curso de curta duração em Fabricação de Cachaça.
Serviço Nacional de Aprendizagem Rural (RS), SENAR/RS, Brasil

- 2008 - 2008** Metodologia da Formação Profissional Rural.
Serviço Nacional de Aprendizagem Rural (RS), SENAR-RS, Brasil
- 2003 - 2003** Curso de curta duração em Inglês Basic 2.
Centro de Estudos Especiais Em Língua Inglesa, CEELI, Brasil
- 2003 - 2003** Curso de curta duração em Cultivo de Cogumelos Comestíveis.
Universidade Federal de Pelotas, UFPEL, Pelotas, Brasil
- 2003 - 2003** Curso de curta duração em 1º Curso Sobre Tecnologia de Embutidos.
Universidade Federal de Pelotas, UFPEL, Pelotas, Brasil
- 2003 - 2003** Curso de curta duração em Inglês Basic 1.
Centro de Estudos Especiais Em Língua Inglesa, CEELI, Brasil
- 2002 - 2002** Curso de curta duração em Curso Reologia.
Universidade Federal de Pelotas, UFPEL, Pelotas, Brasil
- 2000 - 2000** Curso de curta duração em Windows 98 Word 97 Excel 97.
Escola Estadual de Ensino Médio Catuípe, EEEMC, Brasil
- 2000 - 2000** Curso de curta duração em Orientação Para o Crédito Brasil Empreendedor.
Serviço de Apoio Às Micro e Pequenas Empresas do Rio Grande do Sul, SEBRAE/RS, Brasil
- 1999 - 1999** Curso de curta duração em Operador de Caixa Emissor de Cupom Fiscal.
Senac Departamento Regional no Rio Grande do Sul, SENAC, Brasil
- 1998 - 1998** Curso de curta duração em Windows 95 Word 7 0 Excel 7 0.
Info Center Informática, ICINFORMÁTICA, Brasil

10.4 Produção bibliográfica

10.4.1 Artigos completos publicados em periódicos

SILVA, G.A. da; BERNARDI, T.L.; VALENTE, P. PCR amplification of a 375 bp specific DNA fragmento f the 18S region of *Dekkera* and *Saccharomyces* extracted without chemical reagents and without DNA purification. Submetido à Brazilian Archives of Biology and Technology.

BERNARDI, Taís Letícia; SILVA, Gildo Almeida da; VALENTE, Patrícia. Considerações sobre a presença dos gêneros *Brettanomyces* e *Dekkera* em vinhos. Revista Brasileira de Viticultura e Enologia, v. 3 (3), 2011.

BERNARDI, Taís Letícia, Melo Pereira, Gilberto Vinícius, Cardoso, Patricia Gomes, Dias, Eustáquio Souza, Schwan, R. F.

Saccharomyces cerevisiae strains associated with the production of cachaça: identification and characterization by traditional and molecular methods (PCR, PFGE and mtDNA-RFLP). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. , v.24, p.2705 - 2712, 2008.

BERNARDI, Taís Letícia, RODRIGUES, Rosane da Silva, MACHADO, Mírian Ribeiro Galvão, TAVARES, Ana Clara Klug, FORLIN, Flavio João. Determinação de cobre em cachaça através de polarografia de pulso diferencial (PPD) e espectroscopia de absorção atômica (EAA). *Revista Tecnológica*. , v.08, 2004.

10.4.2 Trabalhos publicados em anais de eventos (completo)

Menegotto, M.; Schaker, P.; Bernardi, T.L.; Silva, G.A. da. Influência do meio de cultura na atividade metabólica de *Saccharomyces cerevisiae* na presença de Cabrio Top. In: III Simpósio de Microbiologia Aplicada, Porto Alegre/RS, 2009.

Bernardi, T.L.; Führ, J.; Pignol, M.H.;Rodrigues,R.S.; Silva, L.H. Avaliação sensorial preliminar de tofú condimentado. In: XIII Congresso de Iniciação Científica e VI Encontro da Pós-Graduação, Pelotas/RS, 2004.

Araújo,P.F.; Bernardi, T.L.; Rodrigues, R.S.; Bernardi, E.; Nascimento, J.S. Caracterização físico-química de *Pleurotus ostreatus*. In: XIII Congresso de Iniciação Científica e VI Encontro da Pós-Graduação, Pelotas/RS, 2004.

Bernardi, T.L.; Führ, J.; Zambiasi, R.C. Estabilidade de óleos vegetais em condições aceleradas de oxidação na presença de luz. In: XIII Congresso de Iniciação Científica e VI Encontro da Pós-Graduação, Pelotas/RS, 2004.

Führ, J.; Bernardi, T.L.; Zambiasi, R.C. Estabilidade oxidativa de óleos comerciais. In: XIII Congresso de Iniciação Científica e VI Encontro da Pós-Graduação, Pelotas/RS, 2004.

Bernardi, T.L.; Führ, J.; Zambiasi, R. Análises físico-químicas em charque. In: 2º Simpósio em Ciência de Alimentos, Florianópolis/SC, 2003.

10.4.3 Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

Bernardi, T.L.; Schaker, P.D.C.; Todeschini, A.P.; Valente, P.; Silva, G.A. da. Ação do ácido gálico e da catequina na inibição da Reação em Cadeia da Polimerase para amplificação direta de DNA de leveduras contidas em vinho. In: 8º Encontro de Iniciação Científica e 4º Encontro de Pós-Graduandos da Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves/RS, 2010.

Schaker, P.D.C.; Bernardi, T.L.; Todeschini, A.P.; Silva, G.A. da. Comportamento assimilativo da xilose e dextrose por parte de linhagens de micro-organismos selecionados. In: 8º Encontro de Iniciação Científica e 4º Encontro de Pós-Graduandos da Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves/RS, 2010.

Bernardi, T.L.; Schaker, P.D.C.; Todeschini, A.P.; Valente, P.; Silva, G.A. da. Uso da enzima Tth Polimerase. In: 8º Encontro de Iniciação Científica e 4º Encontro de Pós-Graduandos da Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves/RS, 2010.

Schaker, P.D.C.; Bernardi, T.L.; Menegotto, M.; Silva, G.A. da. Capacidade de fermentação e assimilação da xilose por parte de linhagens de micro-

organismos isolados do solo. In: 8º Encontro de Iniciação Científica e 4º Encontro de Pós-Graduandos da Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves/RS, 2010.

Todeschini, A.P.; Bernardi, T.L.; Schaker, P.D.C.; Silva, G.A. da. Ação dos princípios ativos tebuconazol e tetraconazol sobre a atividade metabólica da linhagem *Saccharomyces cerevisiae* Embrapa 1vvt/97. In: 8º Encontro de Iniciação Científica e 4º Encontro de Pós-Graduandos da Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves/RS, 2010.

Silva, G.A. da.; Bernardi, T.L.; Schaker, P.; Todeschini, A.P. Inibição da detecção de fator killer em meios complexos contendo derivados de diferentes cultivares de uva. In: XXI Congresso Brasileiro de Fruticultura, Natal/RN, 2010.

Silva, G.A. da.; Schaker, P.; Menegotto, M.; Bernardi, T.L.; Avaliação do sistema comercial CandFast para identificação de leveduras isoladas do mosto de uvas brancas e tintas. In: Congresso Brasileiro de Recursos Genéticos, Salvador/BA, 2010.

Silva, G.A. da.; Bernardi, T.L.; Schaker, P.D.C.; Mello, L.M.R. de; Valente, P. Captan and Folpan inhibition of amplification of a 375 bp DNA fragment specific for the 18S region of *Saccharomyces*. In: World Federation for Culture Collections, Costão do Santinho/SC, 2010.

Menegotto, M.; SCHAKER, P.; BERNARDI, T.L.; Silva, G.A. da. Ação do Cabrio Top no crescimento celular em condições aeróbicas. In: 7º Encontro de Iniciação Científica e 3º Encontro de Pós-Graduandos da Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves/RS, 2009.

Schaker, P.; Menegotto, M; Bernardi, T.L.; Silva, G.A. da. Efeito da aeração no processo de fermentação de xilose. In: 7º Encontro de Iniciação Científica e 3º Encontro de Pós-Graduandos da Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves/RS, 2009.

Schaker, P.; Bernardi, T.L., Menegotto, M, Silva G A da. Influência do uso de culturas mistas no processo de fermentação de xilose. In: 7º Encontro de Iniciação Científica e 3º Encontro de Pós-Graduandos da Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves/RS, 2009.

Bernardi, T.L.; Schaker, P.; Menegotto, M.; Valente, P.; Silva, G.A. da. Inibição da Reação em Cadeia da Polimerase por taninos do vinho. In: 7º Encontro de Iniciação Científica e 3º Encontro de Pós-Graduandos da Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves/RS, 2009.

Silva, G.A. da; Menegotto, M.; SCHAKER, P.; BERNARDI, T.L. Ação do Cabrio Top sobre o crescimento e a atividade fermentativa da linhagem *Saccharomyces cerevisiae* Embrapa 1vvt/97. In: XII Congresso Latinoamericano de Viticultura y Enología, Montevideo/UY, 2009.

Silva, G.A. da; Bernardi, T.L.; Menegotto, M.; Schaker, P.; Berlesi M.S.; Silva, P.V. da. Inibição da Reação em Cadeia da Polimerase por compostos presentes no vinho. In: XII Congresso Latinoamericano de Viticultura y Enología, Montevideo/UY, 2009.

Silva, G.A. da; Schaker, P.; Menegotto, M.; Bernardi, T.L. Leveduras autóctones isoladas de uvas tintas com capacidade de utilizar xilose como fonte de

carbono. In: XII Congreso Latinoamericano de Viticultura y Enología, Montevideo/UY, 2009.

Schwan, R.F.; Pereira, G.V.M.; Bernardi, T.L.; Cardoso, P.G.; Dias, E.S. Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with production of cachaça. In: VII Brazilian Meeting on Chemistry of Food and Beverages, Lorena/SP, 2008.

Bernardi, T.L.; Berlesi, M.S.; Lipreri A.; Silva, G.A. da; Vainstein, M.H., Valente, P. Detecção de leveduras *Brettanomyces/Dekkera* utilizando PCR com primer específico. In: I Encontro Gaúcho de Micologia, Porto Alegre/RS, 2008.

Pereira, G.V.M.; Bernardi, T.L.; Ramos, C.L.; Cardoso, P.G.; Schwan, R.F. Análise de restrição do DNA mitocondrial (RFLP-mtDNA) de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de alambiques de produção de cachaça. In: 24º Congresso Brasileiro de Microbiologia, Brasília/DF, 2007.

Londero, L.G.; Bernardi, T.L.; Poli, J.S.; Poletto, C.M.; Valente, P. Desenvolvimento de meio de cultura para isolamento de leveduras pertencentes aos gêneros *Dekkera* e *Brettanomyces*. In: XIX Salão de Iniciação Científica, Porto Alegre/RS, 2007.

Pereira, G.V.M.; Ramos, C.L.; Bernardi, T.L.; Cardoso, P.G.; Schwan, R.F. Diversidade genética de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* por PFGE em diferentes alambiques de produção de cachaça. In: II Encontro Nacional de Pós-Graduação e IV Fórum de Coordenadores dos Programas de Microbiologia da Área de Ciências Agrárias I, Lavras/MG, 2007.

Bernardi, T.L.; Poletto, C.M.; Poli, J.S.; Londero, L.G.; Valente, P. Desenvolvimento de meio de cultivo diferencial para o isolamento de leveduras *Dekkera/Brettanomyces* em vinhos. In: 5º Congresso Brasileiro de Micologia, Recife/PE, 2007.

Bernardi, T.L.; Landell, M.; Poletto, C.M.; Poli, J.S.; Valente, P. Inibição de *Dekkera/Brettanomyces* por leveduras "killer" isoladas de produtos lácteos. In: 5º Congresso Brasileiro de Micologia, Recife/PE, 2007.

Pereira, G.V.M.; Ramos, C.L.; Bernardi, T.L.; Cardoso, P.G.; Schwan, R. F. Técnicas moleculares para a caracterização de *Saccharomyces cerevisiae* associadas à produção de cachaça. In: II Simpósio em Microbiologia Aplicada, Rio Claro/SP, 2007.

Bernardi, T.L.; Pereira, G.V.M.; Cardoso, P.G.; Schwan, R.F. Identificação de leveduras do gênero *Saccharomyces* por PCR. In: I Encontro Nacional de Pós-Graduação e III Fórum de Coordenadores dos Programas de Microbiologia da Área de Ciências Agrárias I, Piracicaba/SP, 2006.

Araújo, P.F.; Silveira, M.F.; Bernardi, T.L.; Rodrigues, R.S.; Forlin, F.J. Avaliação preliminar de destilado de laranja. In: 1º Congresso de Ciências Farmacêuticas de Cascavel/PR e 1º Simpósio em Ciência e Tecnologia de Alimentos do MERCOSUL, Cascavel/PR, 2004.

Silveira, M.F.; Araújo, P.F.; Bernardi, T.L.; Rodrigues, R.S.; Bernardi, E.; Nascimento, J.S. Determinação do tempo de inativação enzimática em *Pleurotus ostreatus*. In: 1º Congresso de Ciências Farmacêuticas de Cascavel/PR e 1º Simpósio em Ciência e Tecnologia de Alimentos do

MERCOSUL, Cascavel/PR, 2004.

Bastos, C.P.; Führ, J.; Bernardi, T.L.; Antes, S.; Pignol, M.H.; Vendruscolo, C.T.; Soares, G.J.D.; Kuhn, C.R. Elaboração de salame tipo milano com baixo teor de gorduras insaturadas. In: XIII Congresso de Iniciação Científica e VI Encontro da Pós-Graduação, Pelotas/RS, 2004.

Führ, J.; Bernardi, T.L.; Rodrigues, R.S.; Machado, M.R.G. Aceitabilidade da soja açucarada. In: XII Congresso de Iniciação Científica, Pelotas/RS, 2003.

Barbosa, E.G.; Bernardi, T.L.; Führ, J.; Rodrigues, R.S.; Machado, M.R.G.; Bernardi, E.; Nascimento, J.S. Aceitabilidade de cogumelo comestível. In: XII Congresso de Iniciação Científica, Pelotas/RS, 2003.

Bernardi, T.L.; Führ, J.; Rodrigues, R.S.; Machado, M.R.G. Aceitação de amostras de soja torrada com e sem adição de sal. In: XII Congresso de Iniciação Científica, Pelotas/RS, 2003.

Führ, J.; Bernardi, T.L.; Buchweitz, P.R.; Rodrigues, R.S.; Machado, M.R.G. Aceitabilidade de laranja Kinkan saturada com açúcares. In: XII Congresso de Iniciação Científica e 5º Encontro de Pós-graduação, Pelotas/RS, 2003.

Bernardi, T.L.; Führ, J.; Machado, M.R.G.; Rodrigues, R.S. Efeito de diferentes sanitizantes na desinfecção de alface. In: XII Congresso de Iniciação Científica, Pelotas/RS, 2003.

Rodrigues, R.S.; Bernardi, T.L.; Führ, J.; Machado, M.R.G. Polarografia de pulso diferencial na determinação de cobre em aguardente de cana. In: XII Congresso de Iniciação Científica, Pelotas/RS, 2003.

Bernardi, T.L.; Führ, J.; Rodrigues, R.S.; Machado, M.R.G. Análises físico-químicas em aguardentes adoçadas: resultados preliminares. In: XII Congresso de Iniciação Científica e 5º Encontro de Pós-Graduação, Pelotas/RS, 2003.

Bernardi, T.L.; Machado, M.R.G.; Rodrigues, R.S. Comparação dos parâmetros físico-químicos de aguardentes de cana produzidas industrial e artesanalmente: resultados preliminares. In: II Mostra de Produção Universitária, Rio Grande/RS, 2003.

Bernardi, T.L.; Führ, J.; OLIVEIRA, L.C.; Machado, M.R.G.; Bernardi, E.; Menezes, A.D. Contagem e identificação de bolores em doce em massa de goiaba comercializados na cidade de Pelotas-RS. In: 5º Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, Campinas/SP, 2003.

Bernardi, T.L.; Machado, M.R.G.; Determinação de coliformes fecais em amostras de catchup. In: 5º Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, Campinas/SP, 2003.

Bernardi, T.L.; Oliveira, L.C.; Machado, M.R.G.; Bastos, C.P.; Führ, J.; Pinheiro, L.A.; Silveira, M.F.; Antes, S. Qualidade microbiológica de alface orgânica e convencional. In: 5º Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, Campinas/SP, 2003.

Bernardi, T.L.; Machado, M.R.G.; Rodrigues, R.S.; Tavares, A.C.K. Teor de cobre em aguardentes de cana (*Saccharum officinarum*, L): vida-de-prateleira. In: 5º Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, Campinas/RS, 2003.

Führ, J.; Bernardi, T.L.; Nachtigall, A.M.; Carvalho, D.S.; Bubolz, M.H.M.; Zambiasi, R.C. Aceitabilidade de chope aromatizado de morango e menta. In: X Seminário de Iniciação Científica da UNIJUI, Ijuí/RS, 2002.

Bernardi, T.L.; Carvalho, D.S.; Nachtigall, A.M.; Bubolz, M.H.M.; Führ, J.; Zambiasi, R.C. Chope artesanal: aceitação. In: X Seminário de Iniciação Científica da UNIJUI, Ijuí/RS, 2002.

Santos, J.L.; Dias, V.C.; Bernardi, T.L.; Machado, M.R.G. Determinação de estanho em compotas de pêssego em embalagem metálica convencional e estanhada. In: 11º Congresso de Iniciação Científica e 4º Encontro de Pós-Graduação, Pelotas/RS, 2002.

10.4.4 Artigos em Jornais de Notícias:

TAVARES, Ana Clara Klug; BERNARDI, Taís Letícia. Arroz parboilizado. *Jornal Folha Catuípe*. Catuípe/RS, 2004.

BERNARDI, Taís Letícia; FORLIN, Flavio João. Cachaça: produção, consumo e perigos. *Jornal Folha Catuípe*. Catuípe/RS, 2004.

BERNARDI, Taís Letícia; MACHADO, Mírian Ribeiro Galvão. Lecitina de Soja. *Jornal Folha Catuípe*. Catuípe/RS, 2004.

BERNARDI, Taís Letícia; BERNARDI, Eduardo. Micotoxinas em soja. *Jornal Folha Catuípe*. Catuípe/RS, 2004.

10.5 PARTICIPAÇÃO EM BANCA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO

Bernardi, Taís Letícia; da Silva, Gildo Almeida; Maciel, Fábio Luis. Banca de Patricia Dayane Carvalho Schaker. Avaliação de micro-organismos quanto à capacidade de assimilação e fermentação de xilose. Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, Bento Gonçalves/RS, 2010.

Bernardi, Taís Letícia; da Silva, Gildo Almeida; Maciel, Fábio Luís. Banca de Morgana Menegotto. Isolamento e seleção de leveduras para vinificação obtidas de uvas da Região do Vale do São Francisco. Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, Bento Gonçalves/RS, 2010.

Machado, Mírian Ribeiro Galvão; Bernardi, Taís Letícia; Rodrigues, Rosane da Silva. Banca de Fabiane Zwirter Cavalheiro. Produção de ciclodextrana glicosiltransferase por micro-organismos. Bacharelado em Química de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas/RS, 2008.

Gularte, Márcia Arocha; Rodrigues, Rosane da Silva; Bernardi, Taís Letícia. Banca de Eliane Bevilacqua Forsin. Avaliação da qualidade em vinícola. Bacharelado em Química de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas/RS, 2007.