



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA ECONOMIA
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº PI 1103674-5

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: PI 1103674-5

(22) Data do Depósito: 16/06/2011

(43) Data da Publicação Nacional: 05/02/2013

(51) Classificação Internacional: C12N 15/11; C12Q 1/68.

(54) Título: MÉTODO, KIT E USO DE PAR DE OLIGONUCLEOTÍDEOS PARA DETECÇÃO DE CONTAMINAÇÃO DE AMOSTRAS POR MICRORGANISMOS

(73) Titular: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL. CGC/CPF: 92969856000198. Endereço: Av. Paulo Gama, 110, 6º Andar, Farroupilha, Porto Alegre, RS, BRASIL(BR), 90040-060; EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. CGC/CPF: 00348003000110. Endereço: PqEB Parque Estação Biológica- Edifício Sede- Final W/3 Norte -Plano Piloto, Brasília, DF, BRASIL(BR), 70770-901

(72) Inventor: GILDO ALMEIDA DA SILVA; TAÍS LETÍCIA BERNARDI; PATRÍCIA VALENTE DA SILVA.

Código de Controle: 663781226C5631F6 7CFC82514C4E8D86

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 16/06/2011, observadas as condições legais

Expedida em: 19/05/2020

Assinado digitalmente por:

Liane Elizabeth Caldeira Lage

Diretora de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

MÉTODO, KIT E USO DE PAR DE OLIGONUCLEOTÍDEOS PARA DETECÇÃO DE CONTAMINAÇÃO DE AMOSTRAS POR MICRORGANISMOS

CAMPO DA INVENÇÃO

[1] A presente invenção se refere ao campo da Biotecnologia e da Biologia Molecular e descreve método, kit e uso de oligonucleotídeos para detecção de contaminação de amostras por leveduras. Preferencialmente a presente invenção está relacionada com a detecção de *Dekkera bruxellensis* e *Brettanomyces bruxellensis* em bebidas. A presente invenção se situa no campo industrial.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[2] O Estado do Rio Grande do Sul é o principal produtor de vinhos, sendo responsável por aproximadamente 90% da produção nacional. Durante o processo produtivo, o vinho pode ser contaminado com leveduras pertencentes ao gênero *Brettanomyces/Dekkera*, as quais produzem compostos fenólicos voláteis responsáveis por conferir sabores e odores indesejáveis ao produto final, ocasionando perdas econômicas. Estas leveduras têm como uma de suas principais características seu lento crescimento em meio de cultivo.

[3] Atualmente existem descritos alguns primers para detecção de microorganismos, mas a maioria não possui especificidade (JP11169181, WO2005031004) dificultando a identificação de microorganismos específicos como é o caso de *Dekkera bruxellensis* e *Brettanomyces bruxellensis*. Até o momento, existem poucos pares de oligonucleotídeos disponíveis para a detecção de leveduras, especialmente *Dekkera bruxellensis* e *Brettanomyces bruxellensis*. É possível encontrar poucos pares de oligonucleotídeos patenteados e também poucos artigos científicos que relatam a construção e o uso de oligonucleotídeos específicos para estas espécies para utilização por meio da técnica da PCR e suas variáveis.

[4] Phister & Mills (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) desenharam um par de oligonucleotídeos específico para *Dekkera bruxellensis*. Este par de oligonucleotídeos foi utilizado em reação em cadeia da polimerase em tempo real (QPCR), o qual amplificou um segmento de 79 pb do gene 26S do DNA ribossômico. Outro par de oligonucleotídeos específico para a espécie foi desenvolvido por Delaherche et al. (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, v. 97, 910-915. 2004), o qual amplificou um segmento do gene *rad4* por meio da reação em cadeia da polimerase em tempo real. Este mesmo gene, também foi utilizado por Tessonière et al. (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, v. 129, 237-243. 2009) para amplificação de um fragmento de 108 pb por meio da QPCR. Cocolin et al. (COCOLIN, L.; RANTSIUO, K.; IACUMIN, L.; ZIRONI, R.; COMI, G. Molecular detection and identification of *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* and *Brettanomyces/Dekkera anomala* in spoiled wines. Applied and Environmental Microbiology, v.70, n.3, 1347-1355.2004) otimizaram um protocolo de detecção e identificação por meio da técnica da PCR com enzima de restrição. Inicialmente, os autores construíram um par de oligonucleotídeos específico para as espécies *Br. bruxellensis* e *Br. anomala* baseando-se na região D1/D2 da subunidade 26S do rDNA. Após a utilização destes em PCR, o produto de amplificação foi submetido à análise de restrição com a enzima *DdeI*, a qual permite a diferenciação entre as espécies.

[5] O documento WO 2007132589 descreve um grupo de primers utilizados para detectar *D.anomala*, *D.bruxellensis*, *D.custersiana* ou *B.naardenensis*, para controlar a qualidade de bebidas alcólicas ou refrigerante. No entanto, a polimerase usada neste documento é a Bst DNA Polimerase de *Bacillus stearothermophilus*, pouco empregada e com dificuldade de disponibilização no mercado. A tecnologia do documento WO

2007132589 também utiliza uma tecnologia de amplificação de DNA por LAMP (Loop Mediated-Isothermal Amplification) que não é muito comum. A tecnologia por LAMP emprega 5 primers no lugar de apenas 2 como na presente tecnologia e ainda necessita de um kit de amplificação específico para o LAMP.

[6] O documento WO 2008/006985 descreve um kit para detecção de contaminação por leveduras *Brettanomyces* em qualquer estágio da produção de vinho pela integração de um teste imuno-enzimático com a captura de um anticorpo capaz de reconhecer *Brettanomyces*. A presente invenção difere desse documento por utilizar oligonucleotídeos específicos para o reconhecimento de *Dekkera bruxellensis* e *Brettanomyces bruxellensis*, sem utilizar testes imuno-enzimáticos com captura de anticorpos, como citado no referido documento.

[7] O documento US 2004/0166492 descreve novos oligonucleotídeos capazes de se ligar à região do espaçador transcrito interno de *Dekkera bruxellensis*, entre outros, sendo útil para a identificação de microorganismos relacionados à fermentação. A presente invenção difere desse documento por utilizar oligonucleotídeos específicos para o reconhecimento da região 18S rDNA de *Dekkera bruxellensis* e *Brettanomyces bruxellensis*, sem se ligar à região do espaçador transcrito interno de *Dekkera*, como citado no referido documento.

[8] O documento FR 2908786 descreve um kit para detecção de contaminação de leveduras *Brettanomyces* em vinhedos pelo teste de PCR em tempo real com seqüências de primers específicas para o reconhecimento de *Brettanomyces*. O documento WO 2007/132589 também descreve um conjunto de cerca de 20 primers para detecção de leveduras *Dekkera* ou *Brettanomyces*. O WO 2007/021027 descreve oligonucleotídeos, arranjos contendo esses oligos, aparato, método e kit de detecção de microorganismos, incluindo *Dekkera*. A presente invenção difere destes documentos por utilizar oligonucleotídeos específicos para o reconhecimento da região 18S rDNA de *Dekkera bruxellensis* e *Brettanomyces bruxellensis*, os quais são diferentes daqueles citados no referido documento.

[9] O documento US 20080268430 descreve métodos e kits relacionados a detecção, identificação e quantificação de leveduras em vinho, cerveja e sucos. Esse método utiliza amostras de DNA dessas bebidas, as quais entram em contato com sondas

homólogas ao gene actina ou ATPase, permitindo a detecção e quantificação dessa levedura. A presente invenção difere desse documento pelos oligonucleotídeos aqui utilizados (sondas) não compreenderem homólogos de actina ou ATPase e pelas mesmas serem capazes de reconhecer a região 18S rDNA de *Dekkera bruxellensis* e *Brettanomyces bruxellensis*, fato não citado no referido documento.

[10] O par de oligonucleotídeos do presente invento, construído para amplificar um fragmento de 690 pb da região 18S do DNA ribossômico de *Dekkera bruxellensis* e *Brettanomyces bruxellensis* apresenta como vantagens sobre os demais a utilização de novos pares de oligonucleotídeos, os quais podem ser utilizados em PCR comum, a qual é uma técnica de menor custo em relação à QPCR, e não necessita do passo adicional de uso de enzima de restrição, diminuindo o tempo para detecção da levedura. Além disso, o produto de amplificação obtido é maior que os descritos, permitindo o uso de géis de agarose com menor concentração na eletroforese, representando economia, uma vez que produtos menores exigem o uso de géis de agarose mais concentrados.

[11] Do que se depreende da literatura pesquisada, não foram encontrados documentos antecipando ou sugerindo os ensinamentos da presente invenção, de forma que a solução aqui proposta possui novidade e atividade inventiva frente ao estado da técnica.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[12] Em um aspecto, a presente invenção descreve oligonucleotídeos, seu uso para detecção de *Dekkera bruxellensis* e *Brettanomyces bruxellensis*, método e kit compreendendo tais oligonucleotídeos, para serem oligonucleoutilizados para detecção da contaminação por estas leveduras.

[13] De acordo com a primeira concretização da invenção é provido um método de detecção de contaminação por leveduras compreendendo as etapas de:

- a. realizar a reação de amplificação de ácido nucléico contido em uma amostra através da utilização do par de oligonucleotídeos SEQ ID NO 1 e SEQ ID NO 2; e
- b. detectar a presença ou ausência de um produto de amplificação, onde a geração de um produto de amplificação indica a presença do microorganismo.

[14] Uma segunda concretização da presente invenção diz respeito a um kit de identificação de microorganismos em uma amostra caracterizado por compreender aparato para realização da reação de amplificação e reagentes de amplificação compreendendo os oligonucleotídeos SEQ ID NO 1 e SEQ ID NO 2.

[15] Uma terceira concretização da invenção diz respeito ao uso do par de oligonucleotídeos da presente invenção caracterizado por ser na identificação de microorganismos em amostras.

[16] Estes e outros objetos da invenção serão imediatamente valorizados pelos versados na arte e pelas empresas com interesses no segmento, e serão descritos em detalhes suficientes para sua reprodução na descrição a seguir.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[17] Figura 1 – 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.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[18] As leveduras do gênero *Dekkera* e *Brettanomyces* são espécies de leveduras que estão presentes em vários tipos de bebidas, como bebidas alcoólicas e refrigerantes. Assim, a presença ou ausência dessas espécies de levedura pode ser utilizada como um indicador do controle de qualidade de vários tipos de bebidas. Assim, o grupo de oligonucleotídeos de acordo com a presente invenção é útil para o controle de qualidade de vários tipos de bebidas (por exemplo, bebidas alcoólicas e refrigerantes, e, particularmente, vinho e cerveja) e do exame de amostras ambientais.

[19] A presente invenção está relacionada particularmente ao desenvolvimento de um grupo de oligonucleotídeos para identificação taxonômica de leveduras. A presente invenção também está relacionada com o uso no método de identificação de leveduras em bebidas. Mais especificamente a presente invenção está relacionada com a identificação de leveduras do gênero *Dekkera* e *Brettanomyces*.

[20] A presente invenção compreende o uso de oligonucleotídeos capazes de reconhecer a região 18S rDNA das espécies *Dekkera bruxellensis* e *Brettanomyces bruxellensis* como sondas para a detecção de contaminação por estas leveduras.

[21] A presente invenção também está relacionada com uma metodologia para identificação taxonômica de *Dekkera bruxellensis* e *Brettanomyces bruxellensis* por meio da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase utilizando um par de oligonucleotídeos específico baseado na região 18S do DNA ribossômico. A inovação consiste no desenvolvimento de oligonucleotídeos baseados em uma região do DNA ribossômico ainda não utilizada para a detecção desta levedura, tendo como consequência o desenvolvimento de um método de detecção confiável e viável de ser utilizado na rotina industrial.

[22] A vantagem é que permite, com alto grau de confiabilidade, a detecção de leveduras *Dekkera bruxellensis* e *Brettanomyces bruxellensis*, que são contaminantes de bebidas, entre elas o vinho, e que causam perdas econômicas ao setor vinícola ao se desenvolverem no produto final e produzirem quantidade de compostos fenólicos acima do limiar de percepção (LP). Permite a detecção rápida da contaminação por esta levedura, possibilitando ações que reduzam as perdas econômicas.

[23] Na descrição que segue, um número de termos é utilizado extensivamente. As seguintes definições são providas para facilitar o entendimento da invenção.

[24] Os termos “*Dekkera*” e “*Brettanomyces*” serão utilizados de forma intermitente na presente invenção, definindo o gênero que forma esporo (*Dekkera*) e a forma anamorfa (*Brettanomyces*).

[25] O "gênero *Dekkera*" é uma designação da geração sexual do "gênero *Brettanomyces*." Em taxonomia, é possível que um único tipo de levedura tenha diferentes designações para sua geração sexual e asexual, e então as duas designações são consistentes uma com a outra. Portanto, podemos dizer que os *primers* da presente invenção podem ser utilizados para detectar tanto espécies *Dekkera bruxellensis* quanto espécies *Brettanomyces bruxellensis*.

[26] “Sense” significa que a seqüência de polinucleotídeo está na mesma orientação 5’-3’ da seqüência de interesse.

[27] “Antisense” significa que a seqüência de polinucleotídeo está na orientação contrária com relação a orientação 5’-3’ da seqüência de interesse.

[28] O termo “polinucleotídeo (s)” como usado aqui, significa um polímero de filamento único ou duplo de bases de deoxiribonucleotídeo ou ribonucleotídeo e inclui moléculas correspondentes de RNA e DNA, incluindo moléculas de HnRNA e mRNA, de filamentos tanto “sense” como “antisense”.

[29] Os polinucleotídeos descritos na presente invenção são preferencialmente cerca de 80% puros, mais preferencialmente pelo menos cerca de 90% puros, e mais preferencialmente pelo menos cerca de 99% puro.

[30] O termo “sonda” utilizado na presente invenção refere-se a um oligonucleotídeo, polinucleotídeo ou ácido nucléico, sendo RNA ou DNA, se ocorrendo naturalmente como em uma digestão de enzima de restrição purificada ou produzida sinteticamente, que seja capaz de se anelar com ou especificamente hibridizando com um ácido nucléico contendo seqüências complementares à sonda. Uma sonda pode ser ainda de cadeia simples ou cadeia dupla. O comprimento exato da sonda dependerá de muitos fatores, incluindo temperatura, origem da sonda e uso do método. Por exemplo,

dependendo da complexidade da seqüência alvo, a sonda de oligonucleotídeo tipicamente contém 15-25 ou mais nucleotídeos, embora ela possa conter menos nucleotídeos. As sondas aqui são selecionadas para serem complementares para diferenciar cadeias de uma seqüência de um ácido nucléico particular. Isto significa que a sonda pode ser suficientemente complementar para ser capaz de “hibridizar especificamente” ou anelar com suas respectivas cadeias-alvo sob uma série de condições pré-determinadas. Conseqüentemente, a seqüência da sonda não necessita refletir exatamente a seqüência complementar do alvo. Por exemplo, um fragmento de nucleotídeo não complementar pode ser ligado ao final 5’ ou 3’ da sonda, com o restante da seqüência da sonda sendo complementar à cadeia alvo. Alternativamente, bases não complementares ou seqüências longas podem estar intercaladas dentro da sonda se esta tiver complementaridade suficiente com a seqüência do ácido nucléico alvo para anelar especificamente com ele.

[31] O termo “primer” como utilizado aqui se refere a um oligonucleotídeo, sendo RNA ou DNA, cadeia simples ou cadeia dupla, derivado de um sistema biológico, gerado através de digestão com enzimas de restrição, ou produzido sinteticamente que, quando colocado em um ambiente próprio, é capaz de agir funcionalmente como um iniciador de uma síntese de ácido nucléico dependente de molde. Quando apresentado com um molde de ácido nucléico apropriado, trifosfatos nucleosídeos adequados precursores de ácidos nucléicos, uma enzima polimerase, cofatores adequados e condições tais como temperatura e pH adequados, o *primer* pode ser estendido em seu terminal 3’ pela adição de nucleotídeos pela ação de uma polimerase ou com atividade similar para produzir uma primeira extensão do produto. O ‘primer’ pode variar em comprimento dependendo de condições particulares e requerimentos para aplicação. Por exemplo, em aplicações de diagnósticos, o ‘primer’ oligonucleotídeo possui tipicamente de 15-25 ou mais nucleotídeos em comprimento. O ‘primer’ deve ter complementaridade suficiente com o molde desejado para iniciar a síntese da extensão do produto desejado. Isso não significa que a seqüência do ‘primer’ deva representar um complemento exato do molde desejado. Por exemplo, uma seqüência de nucleotídeo não complementar pode ser ligada ao final 5’ de um ‘primer’ complementar.

Alternativamente, bases não complementares podem estar intercaladas dentro da seqüência de oligonucleotídeo do ‘primer’, desde que o ‘primer’ tenha complementaridade suficiente com a seqüência da cadeia molde desejada para prover funcionalmente um complexo molde-primer para a síntese da extensão do produto.

[32] O termo “hibridizando especificamente” diz respeito à associação entre duas moléculas de ácidos nucléicos de cadeia simples que possuam seqüências suficientemente complementares para permitir tal hibridização sob condições pré-determinadas geralmente descritas no estado da técnica (apostila: Tecnologia de DNA recombinante. Universidade de São Paulo, Capítulo 1, 2003)

[33] Em particular, o termo se refere à hibridização de um oligonucleotídeo com uma seqüência substancialmente complementar contendo uma molécula de DNA ou RNA de cadeia simples da presente invenção. Condições apropriadas necessárias para realização da hibridização específica entre moléculas de ácidos nucléicos de cadeia simples de complementaridade variada estão bem descritas no estado da técnica (apostila: Tecnologia de DNA recombinante. Universidade de São Paulo, Capítulo 4, 2003). Uma fórmula comum para se calcular as condições de estringência requeridas para se ter uma hibridização entre moléculas de ácido nucléico segue abaixo (Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed. (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press):

$$T_m = 81,5^{\circ}\text{C} + 16,6 \text{ Log } [\text{Na}^+] + 0,41 (\% \text{G+C}) - 0,63 (\% \text{ formamida}) - 600/\text{pb no duplex (sonda)}$$

[34] Como ilustração da fórmula acima, usando $[\text{Na}^+] = [0,368]$ e 50% de formamida, com conteúdo de GC de 42% e um tamanho de sonda médio de 200 bases, a T_m será de 57°C.

[35] Sondas ou *primers* são descritos como correspondendo ao polinucleotídeo da presente invenção identificado como SEQ ID NO1 ou SEQ ID NO2 ou uma variante do mesmo, se a sonda de oligonucleotídeo ou *primer*, ou seu complemento, estiver contido

dentro da seqüência especificada como SEQ ID NO1 ou SEQ ID NO2, ou uma variante desta.

[36] O termo “oligonucleotídeo” refere-se a um segmento relativamente curto de uma seqüência de polinucleotídeo, geralmente compreendendo entre 6 a 60 nucleotídeos. Esses oligonucleotídeos podem ser usados como sondas ou iniciadores (“primers”), onde as sondas podem ser usadas para uso em testes de hibridização e iniciadores para uso na amplificação de DNA por reação de cadeia polimerase. O termo “oligonucleotídeo” é referido aqui como ‘primers’ e ‘sondas’ da presente invenção, e é definido como uma molécula de ácido nucléico compreendendo de dois ou mais ribo ou deoxiribonucleotídeos, preferencialmente mais do que três. O tamanho exato dos oligonucleotídeos dependerá de vários fatores e na aplicação particular e uso dos oligonucleotídeos. Oligonucleotídeos preferidos compreendem 15-50 pares de base consecutivas complementares à SEQ ID NO 1 ou SEQ ID NO2. As sondas podem ser facilmente selecionadas usando procedimentos bem descritos no estado da técnica (Sambrook et al “Molecular Cloning, a laboratory manual”, CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989), levando em consideração estringências de hibridização DNA-DNA, recombinação e temperaturas de fusão, e potencial para formação de laços e outros fatores, que são conhecidos no estado da técnica.

[37] A definição dos termos “complemento”, “complemento reverso” e “seqüência reversa”, como usados aqui, é ilustrada pelo seguinte exemplo. Para a seqüência 5’AGTGAAGT3’, o complemento é 3’TCACTTCA5’, o complemento reverso é 3’ACTTCACT5’ e a seqüência reversa é 5’TGAAGTGA3’.

[38] Como usado aqui, o termo “variante” ou “substancialmente similar” compreende seqüências de aminoácidos ou nucleotídeos diferentes de seqüências especificamente identificadas, em que um ou mais nucleotídeos ou resíduos de aminoácidos é deletado, substituído ou adicionado. As variantes podem ser variantes alélicas, de ocorrência natural, ou variantes de ocorrência não natural. As seqüências variantes ou substancialmente similares dizem respeito a fragmentos de ácidos nucléicos que podem ser caracterizados pela porcentagem de similaridade de suas seqüências de nucleotídeos

com as seqüências de nucleotídeo descritas aqui (SEQ ID NO 1 ou SEQ ID NO2), como determinada por algoritmos comuns empregados no estado da técnica. Os fragmentos de ácidos nucléicos preferidos são aqueles cujas seqüências de nucleotídeos têm pelo menos cerca de 40 ou 45% de identidade de seqüência, preferencialmente cerca de 50% ou 55% de identidade de seqüência, mais preferencialmente cerca de 60% ou 65% de identidade de seqüência, mais preferencialmente cerca de 70% ou 75% de identidade de seqüência, mais preferencialmente cerca de 80% ou 85% de identidade de seqüência, mais preferencialmente ainda com cerca de 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de seqüência quando comparada com a seqüência de referência. A identidade percentual é determinada por alinhamento de duas seqüências a serem comparadas, determinando o número de resíduos idênticos na porção alinhada, dividindo este número pelo número total de resíduos na seqüência pesquisada e multiplicando o resultado por 100. Esse alinhamento pode ser feito através de softwares existentes na internet, um deles é o BLASTN, que está disponível na página do National Center for Biotechnology Information/NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov).

[39] Aqui, o termo "mutação" significa que os nucleotídeos podem ser os mesmos ou diferentes, podem ser selecionados a partir de uma substituição, uma exclusão, uma inserção e uma adição. Essa mutação pode ser preferencialmente selecionada de "uma substituição de uma base", onde uma certa base é substituída por outra base, "uma base de exclusão", onde uma certa base é excluída, "uma base de inserção", onde uma certa base está inserida, e "uma base de adição", em que uma certa base é adicionada. O número de mutações pode ser 1-6 bases, 1, 2, 3 ou 4, bases, 1 ou 2 bases ou uma base.

[40] Um polinucleotídeo que constitui o grupo de *primers* da presente invenção pode ser preparado pela síntese química de um ácido nucléico de acordo com um método comum, como um método de fosfato triéster (Hunkapiller, M. et al. Nature, 310, 105, 1984). Caso contrário, o DNA total de uma cepa como meta de detecção pode ser obtido, e um fragmento de DNA contendo uma seqüência de nucleotídeos de interesse pode ser então obtido, conforme o caso, pelo método de PCR ou similar, com base nas seqüências de nucleotídeos divulgada na presente especificação. Mais especificamente a presente invenção diz respeito ao método de detecção de leveduras do gênero *Dekkera* e *Brettanomyces* através da técnica de PCR (Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J.

Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, and H. A. Erlich. "Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase." *Science* 239 (1988): 487-491; United States Patent 5,656,493 Mullis, et al. August 12, 1997: System for automated performance of the polymerase chain reaction).

[41] De acordo com a presente invenção, é previsto um método de detectar leveduras das espécies *Dekkera bruxellensis* e *Brettanomyces bruxellensis* compreendendo as seguintes etapas:

- a. realizar a reação de amplificação de ácido nucléico contido em uma amostra através da utilização do par de *primers* SEQ ID NO 1 ou SEQ ID NO 2; e
- b. detectar a presença ou ausência de um produto de amplificação, onde a geração de um produto de amplificação indica a presença de microrganismo.

[42] O grupo de *primers* da presente invenção pode ser provido na forma de um kit. Então, de acordo com a presente invenção, é provido um kit para detecção de levedura, preferencialmente *Dekkera bruxellensis* e *Brettanomyces bruxellensis*, que compreende um par de *primers* descrito nas seqüências de SEQ ID NO 1 e SEQ ID NO 2 e uma combinação dos mesmos.

[43] O kit de acordo com a presente invenção pode compreender reagentes e aparatos, que são necessários para a implementação da reação de amplificação de ácido nucléico pelo método da presente invenção. Os reagentes do kit da presente invenção podem ser enzimas (Taq DNA polimerase, Tth DNA polimerase), solução tampão específicas para enzimas, oligonucleotídeos da presente invenção, desoxirribonucleotídeos trifosfatos, cofator cloreto de magnésio. Os aparatos do kit da presente invenção podem ser, mas não estão limitados a tubo de reação feitos de polipropileno. A reação de amplificação pode ocorrer em aparelhos específicos tais como termocicladores.

[44] Assim, o conjunto de *primers* e o kit de acordo com a presente invenção podem ser usados no controle de qualidade de bebidas alcoólicas (por exemplo, vinho, cerveja, cerveja com baixo teor de malte, vinho de fruta) e / ou de refrigerantes (por exemplo, bebidas espumantes não alcoólicas tais como a soda de limão e água gaseificada), a análise de uma amostra do ambiente (por exemplo, a água das matérias-primas).

[45] *Dekkera anomala*, *Dekkera bruxellensis* e *Dekkera custersiana*, podem causar a deterioração no processo de produção de cerveja e cerveja com baixo teor de malte ou nos produtos finais dos mesmos. Por isso, os *primers* da presente invenção e combinação dos mesmos podem ser utilizados em métodos de detecção e quantificação. Este último por meio de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-PCR) usando qualquer um desses *primers* (SEQ ID NO 1 e SEQ ID NO 2), e um kit compreendendo esses grupos de *primers*.

[46] A reação de amplificação de ácido nucléico pelo método da presente invenção pode ser realizada através de métodos de amplificação utilizando reagentes comerciais já existentes no estado da técnica (cloreto de magnésio, Taq DNA polimerase e dNTP nas concentrações adequadas – Invitrogen, Promega). A reação de amplificação de ácido nucléico pode ser realizada, por exemplo, através do DNA da amostra de mistura, uma solução de *primer*, e reagentes de amplificação (por exemplo, um kit de amplificação de DNA Loopamp fabricado pela Eiken Chemical Co., Ltd.), em conformidade com as instruções incluídas com o kit, e em seguida, mantendo a mistura obtida em uma determinada temperatura (60.degree. C. a 65.degree. C.), de modo a reagir por um determinado período de tempo (em geral, uma hora).

[47] A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é um método muito sensível de análise e por isso é realizado com muito cuidado para evitar contaminações que possam inviabilizar ou tornar errôneo o resultado. Em primeiro lugar, deve-se extrair o material genético da célula ou outro material a ser estudado (exemplo: bebidas) sem danificá-lo. Normalmente o material extraído é o DNA (ADN), mas pode-se trabalhar com o RNA (ARN) em uma RT-PCR que é um desdobramento da PCR e possui outras aplicações.

[48] Depois de extraído o DNA, a este é adicionada uma mistura (também conhecida como pré-mix) que contém os dNTPs (desoxirribonucleotídeos trifosfatos), que são as bases nitrogenadas ligadas com um três fosfato, os *primers* também chamados de oligonucleotídeos (ou iniciadores) e a enzima DNA polimerase em uma solução tampão. Toda esta mistura é colocada no termociclador, o qual faz ciclos de temperatura pré-estabelecidos com tempos exatos específicos para cada reação (fragmento a ser amplificado).

[49] Na primeira etapa do ciclo a temperatura é elevada de 94 a 96 °C por pouco tempo para que haja a separação da dupla cadeia de DNA (Desnaturação). Na segunda etapa, a temperatura é reduzida entre 50 a 60 °C dependendo da quantidade de C e G encontrada no *primer*; para que os *primers* se anelem (pareiem) com a fita molde de DNA (anelamento). Na última etapa do ciclo a temperatura é elevada a 72 °C para que a enzima possa funcionar sintetizando a nova molécula (extensão), em seguida um novo ciclo é iniciado. Normalmente são realizados de 25 a 40 ciclos para cada reação na qual a taxa de replicação é exponencial 2 ciclos.

[50] O resultado é analisado por meio de uma eletroforese em gel de agarose ou de poliacrilamida e depois é interpretado com a ajuda de um profissional competente. Este último, no entanto, tem como características o valor mais elevado e a toxicidade antes da polimerização.

[51] A reação de amplificação do ácido nucléico pelo método da presente invenção pode ser realizada através das seguintes etapas:

[52] Em um primeiro momento é obtida uma amostra de DNA para que se ocorra a reação de amplificação;

[53] Em seguida a amostra é colocada em contato com uma reação de amplificação contendo 0,1mM de cada dNTP (desoxirribonucleotídeos trifosfatos), 1,5 U de uma enzima para polimerizar a cadeia de DNA (Taq DNA polimerase, Tth DNA polimerase), 0,8 pmol de cada oligonucleotídeo, 2,5 mM de cloreto de magnésio e uma solução tampão 1 x específica para atuação da enzima em questão;

[54] Na primeira etapa da reação (desnaturação) ocorre a separação das fitas do DNA de interesse através da elevação da temperatura entre 94 a 96°C, preferencialmente 95 °C;

[55] Na segunda etapa a temperatura é reduzida para 50 a 61°C, preferencialmente 60 °C, dependendo da quantidade de C e G encontrada no oligonucleotídeo, para que os *primers* se anelem (pareiem) com a fita molde de DNA (anelamento);

[56] O oligonucleotídeo é anelado à região 18S do DNAr e a síntese do DNA é estendida pela ação de uma enzima (preferencialmente Taq DNA polimerase, Tth DNA polimerase) a uma temperatura entre 70 a 74°C, preferencialmente 72 °C;

[57] Uma cadeia dupla é formada pela cadeia de DNA sintetizada do oligonucleotídeo da presente invenção e a amostra de DNA;

[58] O ciclo de amplificação pode se repetir de 25 a 40 vezes.

[59] A amostra de DNA pode ser obtida por meio de extração com protocolo padrão que utiliza fenol/clorofórmio, extração por fervura a 90°C por 2 minutos e extração por congelamento/descongelamento. A utilização direta de amostra de bebida vai depender do tipo de bebida.

[60] É possível que os especialistas na área realizem a reação de amplificação de ácido nucléico pelo método da presente invenção, fazendo pequenas modificações no processo acima descrito. Os oligonucleotídeos definidos de acordo com a presente invenção também podem ser usados em tal método modificado.

[61] Se a amplificação de ácidos nucleicos é observada, isso significa que um gene-alvo está presente, indicando que a cepa como meta de detecção do conjunto de *primers* é positiva (+). Ao contrário, se amplificação de tais ácidos nucléicos não for observada, isso significa que um gene-alvo está ausente, indicando que a cepa como meta de detecção do conjunto de *primers* é negativa (-).

[62] Exemplos de uma amostra utilizada como um alvo de detecção do conjunto de oligonucleotídeos e kit de acordo com a presente invenção incluem: bebidas alcoólicas, como vinho, cerveja, cerveja de baixo índice de malte, refrigerantes, como cidra, refrigerante de limão e água gaseificada, amostras ambientais, tais como a água coletada para uso como matéria-prima e produtos semi-acabados coletados a partir do processo de produção de bebidas alcoólicas, refrigerantes, etc.

[63] Quando estes produtos são utilizados como amostras para o método da presente invenção, operações como a concentração, separação e cultura de células existentes na amostra, a separação de um ácido nucléico das células, e a concentração do ácido nucleico podem ser realizadas como pré-tratamentos. Métodos de concentração e separação de células existentes na amostra incluem filtragem e centrifugação, e esses métodos podem ser selecionados, conforme o caso. Além disso, as células concentradas e isoladas da amostra podem ser ainda mais cultivadas, de modo a aumentar o número de células. Para a cultura, ágar sólido ou um líquido, que é adequado para a proliferação da levedura alvo, pode ser usado. Além disso, a fim de selecionar a cepa de levedura

alvo, um agente como cicloheximida pode ser adicionado. A fim de liberar um ácido nucleico de células existentes em uma amostra de bebida ou uma amostra ambiental ou de culturas de células, um método que utiliza um kit comercialmente disponível ou de um método de tratamento de células com uma solução alcalina e então aquecer as células a 100°C para liberar o ácido nucléico pode ser selecionado, por exemplo. Além disso, se for necessário purificar um ácido nucléico, o ácido nucléico pode ser purificado por um tratamento fenol/clorofórmio, precipitação de etanol, centrifugação, etc, e o ácido nucléico purificado pode ser finalmente re-dissolvido em tampão TE ou semelhantes, de modo que possa ser usado como modelo em testes de DNA (European Brewery Convention: Analytica-Microbiológica-EBC, 2.sup.nd ed 2005, Fachverlag Hans Carl, Nuernberg, Rolf et al.: diagnósticos clínicos e PCR-. pesquisa, Springer-Verlag, Berlin, 1992; Yasuji Oshima et al: Tanpaku Koso Kakusan (proteínas, ácidos nucléicos, enzimas), Vol. 35, 2523-2541, 1990).

[64] A detecção da levedura da espécie *Dekkera bruxellensis* e da levedura da espécie *Brettanomyces bruxellensis* usando o conjunto de *primer* e kit de acordo com a presente invenção pode ser feita da seguinte forma, por exemplo.

[65] Primeiro, a levedura da espécie *Dekkera bruxellensis* e da levedura da espécie *Brettanomyces bruxellensis* que são consideradas de existir em uma amostra são cultivadas em um meio adequado. Em seguida, o DNA é separado de uma colônia formada em meio ágar, e o método da presente invenção usando os *primers* definidos de acordo com a presente invenção são aplicados para o DNA, de modo a amplificar as regiões do 18S DNAr da levedura da espécie *Dekkera bruxellensis* e da levedura da espécie *Brettanomyces bruxellensis*. O produto de amplificação do gene obtido indica a presença de uma cepa como um alvo do conjunto de *primers*.

EXEMPLOS

[66] Os exemplos aqui mostrados têm o intuito somente de exemplificar uma das inúmeras maneiras de se realizar a invenção, contudo sem limitar, o escopo da mesma.

EXEMPLO 1 - EXTRAÇÃO DE DNA

[67] 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, 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). Uma alçada de células foi transferida para tubo contendo 500 µL 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 µL 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 µL de TE (Tris-HCl 10mM pH 7,6, EDTA 1mM pH 8,0). O DNA foi estocado a -18°C para usos futuros.

EXEMPLO 2 – DETECÇÃO DE LEVEDURAS UTILIZANDO OS OLIGOSNUCLEOTÍDEOS DA PRESENTE INVENÇÃO

[68] As condições para a Reação em Cadeia da Polimerase para o par de oligonucleotídeos específico para *Dekkera bruxellensis* e *Brettanomyces bruxellensis* foram padronizadas. Diferentes temperaturas de pareamento (de 50 a 61°C) e diferentes concentrações de cloreto de magnésio (de 1,5 a 3,0 mM) foram testadas. A reação ideal foi preparada para um volume final de 25µL contendo 1,5 U de Taq DNA polimerase, tampão da enzima 1x, 2,5mM de cloreto de magnésio, 0,8pmol de cada oligonucleotídeo e 1,0µL de DNA extraído (500 ng.mL⁻¹) de linhagens tipo de todas as espécies avaliadas (*Dekkera bruxellensis* e *Brettanomyces bruxellensis*, outras espécies de *Dekkera/Brettanomyces*, *Saccharomyces cerevisiae* e espécies de *Hanseniaspora*). A condição de amplificação ideal é desnaturação a 94°C/5 minutos, seguida de 25 ciclos de desnaturação a 94°C/30 segundos, pareamento a 60°C/45 segundos e extensão a 72°C/30 segundos, e uma extensão final de 72°C/5 minutos. A Figura 1 mostra a validação dos *primers* da presente invenção através do produto de amplificação de um segmento específico de 690 pb (SEQ ID NO 4) da região 18S do rDNA de *D. bruxellensis* (SEQ ID NO 3) na amostra testada.

[69] Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outras variantes, abrangidos no escopo das reivindicações anexas.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para detecção de leveduras *Dekkera bruxellensis* e *Brettanomyces bruxellensis* em uma amostra caracterizado por compreender os passos:
 - a. realizar a reação de amplificação de ácido nucléico contido em uma amostra através da utilização do par de oligonucleotídeos SEQ ID NO1 e SEQ ID NO2 ; e
 - b. detectar a presença ou ausência de um produto de amplificação, onde a geração de um produto de amplificação indica a presença das leveduras.
2. Método de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo fato de a amostra ser selecionada do grupo de bebidas alcoólicas, refrigerantes, amostras ambientais.
3. Método de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo fato de os oligonucleotídeos hibridizarem com a região 18S DNAr de qualquer uma das espécies *Dekkera bruxellensis* e *Brettanomyces bruxellensis*.
4. Método de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo fato de a detecção da presença ou ausência do produto de amplificação se dar por meio de visualização em gel de agarose ou gel de acrilamida.
5. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4 caracterizado pelo fato de a reação da amplificação compreender as seguintes etapas:
 - a. Obter uma amostra de DNA para que se ocorra a reação de amplificação;
 - b. Colocar a amostra em contato com uma reação de amplificação contendo dNTPs (desoxirribonucleotídeos trifosfatos), uma enzima para polimerizar a cadeia de DNA, um par de oligonucleotídeos consistindo de SEQ ID NO 1 e SEQ ID NO 2 e uma solução tampão específica para atuação da enzima em questão;
 - c. Elevar a temperatura entre 93 a 95°C, preferencialmente 94 °C de 4 a 6 min, preferencialmente 5 minutos;
 - d. Fazer de 25-30 ciclos de desnaturação a uma temperatura entre 93°C a 95°C, preferencialmente 94°C em um tempo de 20 segundos a 1 min, preferencialmente 30 segundos;

- e. Posteriormente a temperatura é reduzida para 65 a 70°C, preferencialmente 68 °C;
 - f. O oligonucleotídeo é então anelado à região 18S do DNAr e a síntese do DNA é estendida pela ação de uma enzima (preferencialmente Taq DNA polimerase, Tth DNA polimerase) a uma temperatura entre 70 a 74°C, preferencialmente 72 °C entre 20 segundos e 1 minutos, preferencialmente 30 segundos;
 - g. Uma etapa posterior envolve uma extensão final de 72°C a 5 minutos.
6. Método de acordo com a reivindicação 5 caracterizado pelo fato de a temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos depender da quantidade de C e G encontrada no oligonucleotídeo.
 7. Kit de identificação de leveduras *Dekkera bruxellensis* e *Brettanomyces bruxellensis* em uma amostra caracterizado por compreender aparato para realização da reação de amplificação e reagentes de amplificação compreendendo os oligonucleotídeos SEQ ID NO 1 e SEQ ID NO 2.
 8. Kit de acordo com a reivindicação 7 caracterizado pelo fato de os reagentes serem enzimas, tampões, desoxirribonucleotídeos trifosfatos e oligonucleotídeos de acordo com a reivindicação 1.
 9. Uso do par de oligonucleotídeos SEQ ID NO 1 e SEQ ID NO 2 caracterizado por ser na identificação de leveduras *Dekkera bruxellensis* e *Brettanomyces bruxellensis* em amostras.
 10. Uso de acordo com a reivindicação 9 caracterizado pelo fato de a amostra ser selecionada do grupo de bebidas alcoólicas, refrigerantes, amostras ambientais.

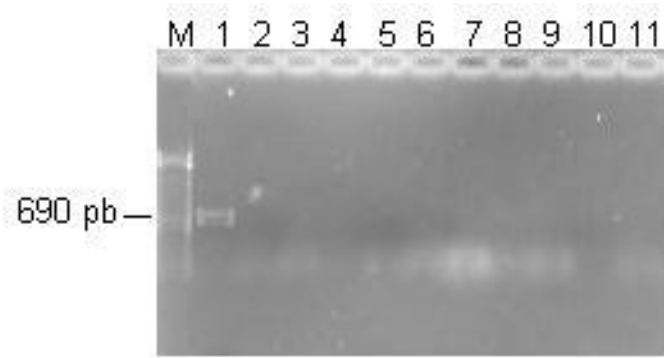


FIGURA 1