

RESUMO EXPANDIDO
XXVI Congresso de Iniciação Científica

DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS CONTAMINANTES DE CERVEJA EM AMOSTRAS COMERCIAIS

Milena Coutinho Natucci¹

Yara Natércia Lima Faustino de Maria²

David Aciole Barbosa³

Fabiano Bezerra Menegidio⁴

Regina Costa de Oliveira⁵

Luiz R. Nunes⁶

Daniela Leite Jabes⁷

1. Discente do curso de Biomedicina; e-mail: micnatucci@gmail.com
2. Discente no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia na Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: yaralima07@gmail.com
3. Doutor em Biotecnologia pela Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: aciole.d@gmail.com
4. Docente e Pesquisador na Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: fabianomenegidio@umc.br;
5. Docente na Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: reginaco@umc.br
6. Docente na Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: nunes1212@gmail.com
7. Docente e Pesquisadora na Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: danielajabes@umc.br

Área de Conhecimento: Genética Molecular; Microbiologia.

Palavras-Chave: Cerveja; qPCR; BSMs; *Brettanomyces bruxellensis*; *Zymomonas mobilis*

Como citar:

Natucci MC, de Maria YNLF, Barbosa DA, Menegidio FB, de Oliveira RC, Nunes LR, et al. Detecção e quantificação de microrganismos contaminantes de cerveja em amostras comerciais. Revista Científica UMC [Internet]. 27 de outubro de 2023;8(2):e080200074.

Disponível em: <https://revista.umc.br/index.php/revistaumc/article/view/1931>

Fluxo de revisão: o presente resumo expandido foi revisado por pares pela comissão do evento.

Recebido em: 11/09/2023

Aprovado em: 26/10/2023

ID publicação: e080200074

DOI:

Licença CC BY 4.0 DEED

INTRODUÇÃO

A indústria cervejeira brasileira é responsável pela produção anual de cerca de 140 milhões de litros da bebida e ocupa a terceira posição no ranking de maiores produtores do mundo. Entretanto, a produção poderia ser maior se não fossem as perdas ocasionadas pelos microrganismos contaminantes de cerveja, conhecidos como BSMs (*Beer Spoilage Microorganisms*), que podem causar sabores e aromas indesejáveis, além de outras alterações não desejáveis no produto (Morado, 2017; Venturini Filho, 2022). Embora não haja dados precisos sobre o prejuízo causado por BSMs para a indústria cervejeira no Brasil, sabe-se que esses deteriorantes são responsáveis por perdas envolvendo vários milhões de dólares ao ano (March *et al.*, 2005; *et al.*; Esmaeili *et al.*, 2015). Tradicionalmente, as contaminações por BSMs são monitoradas por meio de técnicas de cultura laboratorial. Entretanto, essas estratégias apresentam baixa sensibilidade e especificidade e podem ser muito demoradas (Dragone *et al.*, 2007; Esmaeili *et al.*, 2015; Rodhouse e Carbonero, 2019). No presente estudo, mostramos o desenvolvimento de uma técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) capaz de detectar a contaminação da cerveja por dois importantes BSMs, a saber, a levedura *Brettanomyces bruxellensis* e a bactéria gram-negativa *Zymomonas mobilis*.

OBJETIVO

Detectar a presença de dois microrganismos deteriorantes de cerveja (BSMs) - *Brettanomyces bruxellensis* e *Zymomonas mobilis* - em cervejas comerciais do tipo Lager, através da técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR).

METODOLOGIA

O DNA total foi extraído de culturas axênicas desses dois microrganismos (com o auxílio do Qiagen DNeasy Blood e Tissue) e utilizado em qPCR utilizando o sistema 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) com primers específicos, desenhados contra sequências alvo específicas das regiões ITS (para *B. bruxellensis*) e 16S rRNA (para *Z. mobilis*). A quantificação absoluta foi obtida utilizando uma curva padrão, construída através da amplificação de quantidades conhecidas de DNA alvo (variando de 10 ng - 1 fg). As amostras de cerveja foram analisadas em reações duplicadas contendo 10 µL de cerveja descarbonatada por 1 h, 0,25 µL de cada primer (estoques a 10 mM) e 4 µL de EvaGreen Dye® (Biotium). A

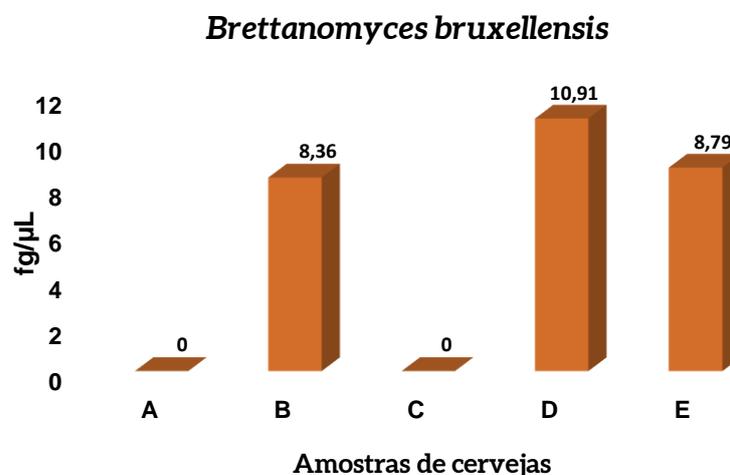
quantificação foi realizada comparando os valores de Ct (threshold cycle) das amostras de cerveja com as curvas padrão, realizadas com DNA de *B. bruxellensis* ou *Z. mobilis*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para que fosse avaliar a presença de *B. bruxellensis* e *Z. mobilis* nas cinco amostras de cerveja comerciais (denominadas de A até E), o DNA genômico de ambos os microrganismos foi utilizado para a geração das curvas-padrão, que foram realizadas com as amostras em duplicata (coeficiente de determinação $R^2 = 0,9894$ e $0,9759$, respectivamente)

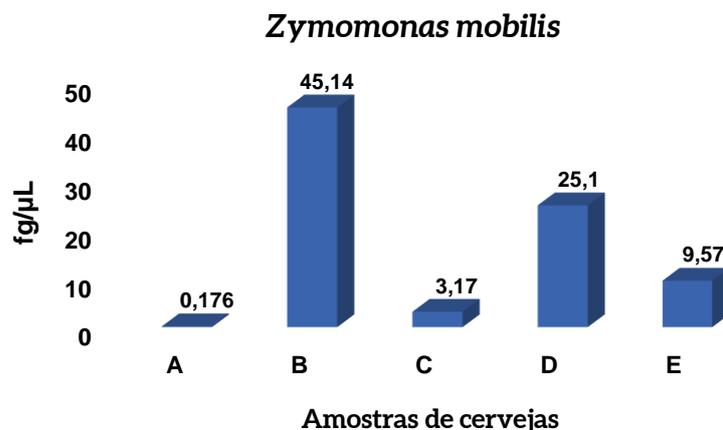
Foi possível identificar DNA de *B. bruxellensis* em 3 amostras estudadas (B, D e E), conforme apresentado no Gráfico 1. A maior quantidade de DNA foi identificada na amostra D (10,91 fg/ μ L) e, para as amostras B e E, foram encontrados 8,36 e 8,79 fg/ μ L, respectivamente. Nas amostras A e E não foram encontrados indícios de DNA nas condições testadas.

Gráfico 1 - Valores de quantificação de DNA de *Brettanomyces bruxellensis* em cinco amostras de cervejas comerciais brasileiras.



Para nossa surpresa, identificamos a presença de *Z. mobilis* em todas as amostras utilizadas. Nas amostras B e D, as concentrações foram maiores, detectando 45,14 fg/ μ L e 25,1 fg/ μ L, respectivamente. As amostras A e C apresentaram, respectivamente, 3,17 e 9,57 fg/ μ L, já a amostra A apresentou somente 176 ag/ μ L de DNA de *Z. mobilis* (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Valores de quantificação de DNA de *Zymomonas mobilis* em cinco amostras de cervejas comerciais brasileiras.



Contaminações por BSMs podem ocorrer nas diversas etapas do processo de fabricação da bebida. Nesse trabalho, identificamos a presença de DNA dos deteriorantes *B. bruxellensis* e *Z. mobilis* através do uso da técnica molecular de qPCR no produto final (cerveja em lata, pronta para o consumo). Entretanto, existe a possibilidade do DNA detectado ser de origem extracelular, oriundo de células lisadas após a pasteurização industrial, processo utilizado com a finalidade de realizar um controle microbiológico e, assim, eliminar microrganismos contaminantes.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nossos resultados sugerem a contaminação por *B. bruxellensis* e *Z. mobilis* na maioria das amostras de cervejas comerciais avaliadas. Sabe-se que a contaminação por BSMs é um evento comum na produção de cerveja. Porém, é possível que os resultados positivos aqui observados sejam devidos ao DNA livre presente na cerveja, que pode ser derivado de células mortas/estouradas, após a bebida ser submetida à pasteurização. Atualmente, estamos desenvolvendo uma estratégia para eliminar DNA residual e células mortas de amostras de cerveja, o que será de suma importância para empregar métodos de detecção baseados em PCR em cervejarias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DRAGONE, G. MUSSATTO, S.I., NOGUEIRA A.D.; ALMEIDA E SILVA, J.B. Revisão:

Produção de Cerveja: Microrganismos Deteriorantes e Métodos de Detecção. Braz. J. Food Technol. 10(4), 240-251, 2007.

ESMAEILI, S.; MOGHARRABI, M.; SAFI, F.; SOHRABVANDI, S.; MORTAZAVIAN, A.M.;

BAGHERIPOOR-FALLAH, N. The common spoilage microorganisms of beer: occurrence, defects and determination: a review. *Carpathian Journal of Food Science and Technology*, 7(4), 68-73, 2015.

MARCH, C. et al. Rapid detection and counting of viable beer-spoilage lactic acid bacteria using a monoclonal chemiluminescence enzyme immunoassay and a CCD camera. *Journal of Immunological Methods*, v. 303, n. 1-2, p. 92-104, ago. 2005.

MORADO, R. *Larousse da Cerveja: A história e as curiosidades de uma das bebidas mais populares do mundo*. 1. ed. São Paulo: Alaúde, 2017.

RODHOUSE, L.; CARBONERO, F. Overview of craft brewing specificities and potentially associated microbiota. *Critical reviews in food science and nutrition*, 59(3), 462-473, 2019.

VENTURINI FILHO, W. G. *INDÚSTRIA DE BEBIDAS: Inovação, Gestão e Produção*. v.3, 2. ed. São Paulo: Edgard Blucher, 2022.