

Detecção molecular de *Levilactobacillus brevis* em cerveja por amplificação de DNA

Molecular detection of the beer contaminant *Levilactobacillus brevis* through DNA amplification

Maria Vitória Cavalheiro Berlofa¹, Yara Natércia Lima Faustino de Maria¹, Milena Coutinho Natucci², David Aciole Barbosa¹, René Aduan Júnior¹, Fabiano Bezerra Menegidio¹, Luiz Roberto Nunes³ e Daniela Leite Jabes^{1,2}

1. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGB), Núcleo Integrado de Biotecnologia (NIB), Universidade de Mogi das Cruzes (UMC) – Mogi das Cruzes, SP, Brasil; 2. Curso de Graduação em Biomedicina, NIB, UMC, Mogi das Cruzes – Mogi das Cruzes, SP, Brasil. 3. Centro de Ciências Naturais e Humanas (CCNH), Universidade Federal do ABC (UFABC) – Santo André, SP, Brasil.

Berlofa, M. V. C.*

mariavitoriacavalheiro@gmail.com
<https://orcid.org/0009-0001-9949-0606>

Maria, Y. N. L. F. de

yaralima07@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0001-5249-1882>

Natucci, M. C.

micnatucci@gmail.com
<https://orcid.org/0009-0001-3045-6493>

Barbosa, D. A.

aciole.d@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0003-3875-2307>

Aduan Jr., R.

reneaduanjunior@hotmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-5816-2630>

Menegidio, F. B.

fabianomenegidio@umc.br
<https://orcid.org/0000-0002-4705-8352>

Nunes, L. R.

nunes1212@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0001-9619-269X>

Jabes, D. L.

danielajabes@umc.br
<https://orcid.org/0000-0001-7297-0784>

* Autora correspondente: Endereço:

João Baptista Monteiro, 107, Vila Melchizedec, Mogi das Cruzes, SP, Brasil – 08738-340.

Resumo: O setor cervejeiro brasileiro é um dos maiores empregadores do país e um pilar econômico significativo, responsável pela produção de bilhões de litros de cerveja anualmente. No entanto, enfrenta desafios relacionados à contaminação por BSMs (*Beer Spoilage Microorganisms*; ou microrganismos deteriorantes de cerveja), como *Levilactobacillus brevis*, que comprometem a qualidade do produto e geram prejuízos econômicos. Este trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência de primers para a detecção específica de *L. brevis* a partir da aplicação das técnicas de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) e *Loop-Mediated Isothermal Amplification* (LAMP). Cepas de *Levilactobacillus brevis* foram cultivadas em laboratório, além de outras bactérias ácido-lácticas dos gêneros *Lentilactobacillus* e *Lactiplantibacillus*, bem como bactérias heterólogas e fungos para os testes de especificidade. O DNA genômico de todos os microrganismos foi extraído e utilizado na composição de pools de DNA, utilizado nas análises de especificidade por PCR e LAMP. Para os testes de sensibilidade, o DNAG de *L. brevis* foi submetido a diluições seriadas e empregado nas técnicas de PCR, qPCR e LAMP. Os resultados da PCR demonstraram que os primers desenvolvidos apresentaram eficiência, porém razoável inespecificidade para *Lentilactobacillus buchneri*, outro contaminante de cerveja. O LAMP apresentou uma alternativa promissora à PCR, com alta especificidade e sensibilidade, amplificando até 100 fg/μL de DNAG. Este estudo reforça o potencial das metodologias moleculares, com destaque para o LAMP, e evidencia a necessidade de aperfeiçoamento contínuo dessas técnicas, a fim de assegurar soluções mais rápidas, precisas e eficazes para o controle de qualidade na indústria cervejeira.

Palavras-chave: Cerveja, Diagnóstico, DNA, Indústria Cervejeira, *Levilactobacillus brevis*.

Abstract: The Brazilian brewing sector stands out as one of the country's largest employers and a significant economic pillar, responsible for the production of billions of liters of beer annually. However, it faces challenges related to contamination by beer spoilage microorganisms (BSMs), such as *Levilactobacillus brevis*, which compromise product quality and cause economic losses. This study aimed to evaluate the efficiency of primers for the specific detection of *L. brevis* using the techniques of Polymerase Chain Reaction (PCR) and Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP). Laboratory cultures were established for *Levilactobacillus brevis*, the target microorganism of this study, as well as other lactic acid bacteria from the genera *Lentilactobacillus* and *Lactiplantibacillus*, along with heterologous bacteria and fungi for specificity tests. Genomic DNA (gDNA) was extracted from all microorganisms and used to create DNA pools, which were employed in specificity analyses via PCR and LAMP. For sensitivity tests, *L. brevis* gDNA was subjected to serial dilutions and tested using PCR, qPCR, and LAMP. PCR results showed that the developed primers were efficient but exhibited a certain degree of cross-reactivity with *Lentilactobacillus buchneri*, another common beer contaminant. LAMP emerged as a promising alternative to PCR, demonstrating high specificity and sensitivity, detecting as little as 100 fg/μL of gDNA. This study highlights the potential of molecular methodologies, particularly LAMP, and underscores the need for continuous improvement of these techniques to ensure faster, more accurate, and effective quality control solutions for the brewing industry.

Keywords: Beer, Diagnosis, DNA, Brewing Industry, *Levilactobacillus brevis*.

INTRODUÇÃO

O setor cervejeiro brasileiro é um dos mais tradicionais do país e abrange uma cadeia produtiva que se estende desde o agronegócio até pequenos varejos. Destaca-se como um dos pilares da economia nacional, emprega mais de 2,7 milhões de pessoas e se posiciona entre os maiores empregadores do Brasil, sendo um significativo impulsionador do desenvolvimento econômico (Bressan et al., 2020; Anuário da Cerveja de 2024 - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, 2024; CervBrasil, 2024).

A produção de cerveja envolve a maltagem dos grãos para converter amidos em açúcares fermentáveis, seguida pela moagem e mistura com água para formar o mosto, que é fervido com lúpulo para conferir aroma, amargor e efeito antibacteriano. Após o resfriamento, o mosto é fermentado por leveduras *Saccharomyces*, convertendo carboidratos em álcool. O processo final inclui floculação, centrifugação, filtração e maturação (15 a 30 dias). Antes do envase, a cerveja é pasteurizada para eliminar microrganismos e estabilizar o produto, diferindo do chope, que não passa por essa etapa (Stewart; Priest, 2006; Rodhouse; Carbonero, 2019; Thongon et al., 2023).

BSMs (Beer Spoilage Microorganisms)

A fabricação de cerveja enfrenta desafios relacionados à qualidade e segurança do produto final, especialmente devido à contaminação por *Beer Spoilage Microorganisms* (BSMs). Embora a cerveja possua propriedades microbicidas, como baixo pH, baixa concentração de oxigênio, alta concentração de dióxido de carbono e adição de lúpulo, algumas bactérias e leveduras conseguem crescer e comprometer sua qualidade. A contaminação pode ocorrer a partir das matérias-primas, do ambiente de produção ou pela adição de ingredientes aromatizantes, representando um problema crítico que pode afetar a aceitação do produto pelos consumidores e gerar desperdícios significativos (Sakamoto; Konings, 2003; Garofalo et al., 2015; Rodhouse; Carbonero, 2019).

Os BSMs incluem bactérias produtoras de ácido lático dos gêneros *Lactobacillus* e *Pediococcus* (Jevons; Quain, 2022), bactérias Gram-negativas aeróbicas como *Acetobacter* (Kubizniaková et al., 2021) e anaeróbicas como *Zymomonas* e *Megasphaera* (Dragone et al., 2007). Também estão presentes leveduras aeróbicas, como as dos gêneros *Brettanomyces* (Powell; Kerruish, 2017) e *Saccharomyces diastaticus* (Briggs et al., 2004), além de fungos miceliais como os gêneros *Alternaria*, *Fusarium* (Esmaili et al., 2015) e *Aspergillus* (Vaughan et al., 2005). Esses microrganismos deteriorantes podem comprometer a bebida, causando turbidez, acidez e/ou cheiro desagradável devido à presença de compostos gerados pelo metabolismo dos próprios BSMs (Xu et al., 2020).

O lúpulo na cerveja possui efeito antibacteriano devido aos ionóforos de prótons e iso- α -ácidos, que inibem bactérias gram-positivas, incluindo as ácido-lácticas (Suzuki et al., 2005). No entanto, algumas espécies do gênero *Lactobacillus* apresentam resistência a esses compostos e são responsáveis por cerca de 70% dos casos de deterioração da cerveja (Hayashi et al., 2001; Suzuki et al., 2005; Bergsveinson et al., 2015). *Levilactobacillus brevis* é o principal contaminante da indústria cervejeira, sendo sua resistência associada ao gene *horA*, que atua como bomba de efluxo, removendo compostos antibacterianos do lúpulo. Outros genes, como *horC* e *hitA*, também auxiliam na resistência, promovendo a expulsão de iso- α -ácidos e o equilíbrio iônico celular. A disseminação desses genes por plasmídeos dificulta o controle microbiológico, exigindo estratégias eficazes para prevenir a contaminação por *L. brevis* (Suzuki et al., 2004; Asano et al., 2019; Feyereisen et al., 2020).

Técnicas de detecção

Atualmente, a detecção de BSMs na indústria é feita principalmente por análises de crescimento em cultivo com meios seletivos, um processo que leva cerca de sete dias para fornecer resultados. Esse tempo pode permitir que a cerveja deteriorada seja distribuída antes das análises, gerando custos financeiros com recolhimento dos produtos e risco de danos à credibilidade da marca (Sakamoto; Konings, 2003; Condina et al., 2019).

A *Polymerase Chain Reaction* (PCR) é uma técnica molecular eficaz para detectar *BSMs*, oferecendo resultados rápidos e precisos em comparação com métodos de cultivo. Estudos indicam que pode identificar *Lactobacillus brevis* e até 12 espécies por PCR multiplex, incluindo genes de resistência como *horA* e *horC* (Garofalo et al., 2015; Asano et al., 2019; Condina et al., 2019). Como alternativa, a técnica *Loop-mediated Isothermal Amplification* (LAMP) se destaca por sua sensibilidade e rapidez, operando em temperatura constante e dispensando o uso de termocicladores, ao contrário da PCR. Sua alta especificidade e facilidade de aplicação tornam o LAMP uma opção promissora para o controle microbiológico na indústria cervejeira, oferecendo

uma abordagem mais acessível e eficiente para a detecção de contaminantes (Augustine et al., 2020; Soroka et al., 2021).

Desenvolvida em 1998, a técnica LAMP é rápida e sensível para a detecção de microrganismos, operando em temperatura constante sem necessidade de equipamentos sofisticados. Utiliza múltiplos *primers* para amplificar até oito regiões (Figura 1) do DNA-alvo, garantindo alta especificidade e eficiência superior à PCR (Notomi et al., 2000; Srividya et al., 2019; Chaouch, 2021; Augustine et al., 2020; Soroka et al., 2021). O design dos *primers* inclui pares internos, externos e de *loop*, formando uma estrutura semelhante a um “haltere”, que melhora a amplificação e reduz o tempo da reação em 50% (Augustine et al., 2020; Chaouch, 2021; Soroka et al., 2021).

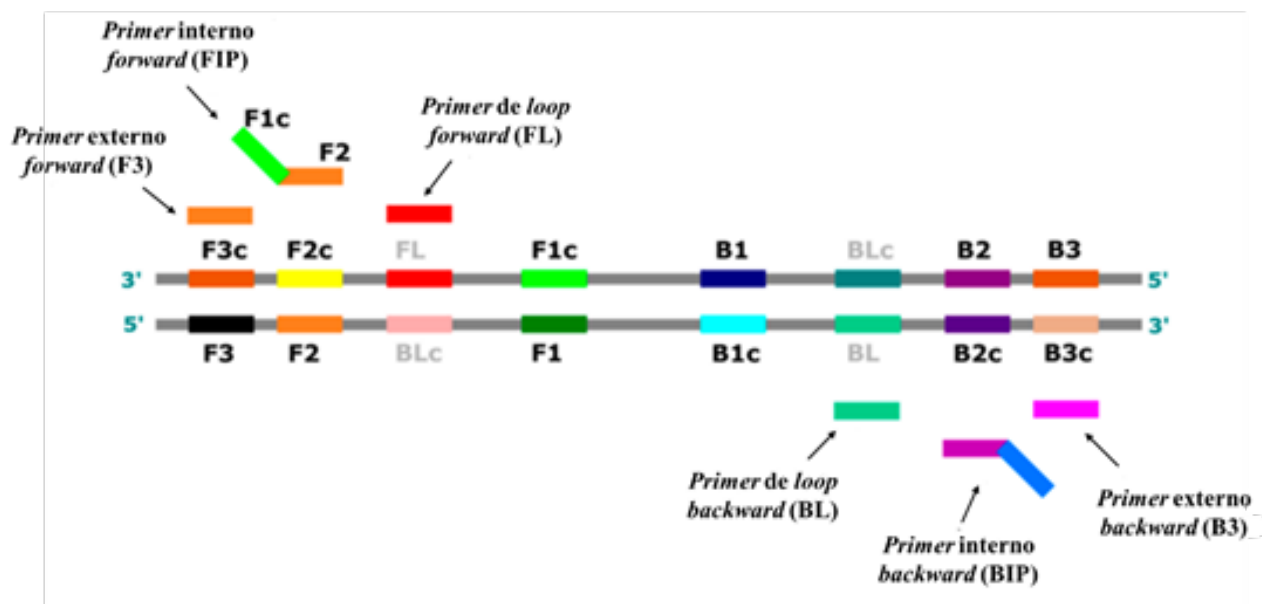


Figura 1 - *Primers* utilizados na reação de LAMP. O *primer interno forward* (FIP) possui uma região F2, que é complementar à sequência F2c do molde, e uma região livre F1c, complementar à F1 da nova fita formada. O *primer interno backward* (BIP) contém a região B2, complementar à B2c do molde, e a região livre B1c, complementar à B1 da nova fita formada. O *primer externo forward* (F3) possui uma região F3, complementar à F3c do molde, enquanto o *primer externo backward* (B3) apresenta uma região B3, complementar à B3c do molde. O *primer de loop forward* (FL) é complementar à alça de fita simples formada entre as regiões F2 e F1, e o *primer de loop backward* (BL) é complementar à alça de fita simples formada entre as regiões B2 e B1 (adaptado de Soroka et al., 2021).

A técnica LAMP dispensa a desnaturação do DNA, pois a polimerase *Bst*, derivada de *Bacillus stearothermophilus*, permite a amplificação em temperatura constante (60-65°C), eliminando a necessidade de termociclador. O processo envolve produção do material inicial, amplificação cíclica e alongação com reciclagem, gerando DNA de fita dupla (Notomi et al., 2000; Srividya et al., 2019; Augustine et al.,

2020; Soroka et al., 2021). A detecção pode ser feita por colorimetria, fluorescência, turbidimetria ou eletroforese, com destaque para o vermelho fenol (*phenol red*), que muda de rosa para amarelo em reações positivas, facilitando a interpretação dos resultados (Srividya et al., 2019; Augustine et al., 2020; Chaouch, 2021; Soroka et al., 2021).

O LAMP e o qPCR são técnicas comparáveis em sensibilidade e especificidade, mas o LAMP se destaca por ser mais rápido, simples e acessível, dispensando termocicladores sofisticados (Hanifehpour et al., 2024). O RT-LAMP (sigla em inglês para Transcrição Reversa Seguida por Amplificação Isotérmica Mediada por *Loop*) demonstrou 93-94% de precisão na detecção do SARS-CoV-2, com menor necessidade de infraestrutura (Pourakbari et al., 2023), e em alguns casos, como na identificação de *Aeromonas hydrophila*, superou o qPCR em sensibilidade (Gao et al., 2023).

Além disso, é uma alternativa viável para fitopatologia e diagnóstico de COVID-19, especialmente em locais com infraestrutura limitada (Ikeda et al., 2023; Dahmani et al., 2023). A escolha entre LAMP e qPCR depende da aplicação e dos recursos disponíveis, a Tabela 1 compara os custos e tempos de execução das técnicas.

Preço por reação		
Reagentes	LAMP	qPCR
<i>Primers</i>	R\$ 1,07	R\$ 0,03
Mix de amplificação	R\$ 18,89	R\$ 20,14
Placa ou tubo	R\$ 0,69	R\$ 0,76
Custo total da reação	R\$ 20,65	R\$ 20,93
Equipamentos e tempo de reação		
Aparelho de qPCR ou bloco térmico	R\$3.055,61	R\$ 250.969,26
Insumos	-	R\$ 6.144,00
Tempo de reação	30 min - 1h	2h - 3h

Tabela 1: Comparação dos preços e tempo das reações de LAMP e qPCR. Os valores foram obtidos por meio de cotações realizadas junto às empresas *New England Biolabs*, *Sigma-Aldrich*, Loja *Netlab* e *Thermo Fisher Scientific*. Foram considerados os seguintes materiais e reagentes: LAMP *Master Mix* (*New England Biolabs*), tubos de 0,2 mL (*Sigma-Aldrich*), banho seco digital e bloco para banho seco (Loja *Netlab*), além de *SYBR Green*, placa para qPCR, serviço de calibração, *primers* e *QuantStudio 5* com *laptop* e *software* (*Thermo Fisher Scientific*). As cotações foram realizadas em janeiro de 2025.

O LAMP tem custo por reação semelhante ao qPCR (R\$ 20,65 vs. R\$ 20,93), mas é mais econômico devido ao menor tempo de resposta (30-60 min vs. 2-3 h) e à dispensa de termociclador. Embora os *primers* do LAMP sejam mais caros, o investimento em equipamentos é significativamente menor, tornando-o uma opção acessível (Dahmani et al., 2023). Assim, o LAMP se destaca pela rapidez e acessibilidade,

sendo viável para laboratórios com recursos limitados e setores que demandam diagnósticos ágeis, como a indústria cervejeira (Hanifehpour et al., 2024; Pourakbari et al., 2023; Gao et al., 2023; Ikeda et al., 2023).

Diante desse contexto, este estudo teve como objetivo principal avaliar a especificidade e a sensibilidade de um conjunto de *primers* desenvolvido *in silico* para a detecção de *Levilactobacillus brevis*, utilizando as técnicas de PCR e LAMP. Para tanto, foram cultivadas cepas de *L. brevis*, microrganismo-alvo do estudo, além de diferentes microrganismos heterólogos, que serviram como modelos para os testes de especificidade. Após a extração do DNAg de todas as amostras, o material foi utilizado em reações de PCR e LAMP para verificar a capacidade dos *primers* em detectar *L. brevis* com alta sensibilidade e sem ampliações cruzadas. Dessa forma, buscou-se validar a precisão do método proposto, visando sua aplicação prática no controle microbiológico da indústria cervejeira.

MATERIAL E MÉTODOS

Cultivo dos microrganismos

Levilactobacillus brevis e outras bactérias ácido-lácticas como *Lactobacillus buchneri*, *Lentilactobacillus buchneri*, *L. plantarum* e *Lactiplantibacillus plantarum*, foram cultivadas em meio MRS com pH 6,5 ± 0,2. Para meio sólido, foi adicionado 1,5% de ágar. Após o preparo, os microrganismos foram inoculados com alça de platina e incubados a 35°C por até 72 horas.

A tabela 2 apresenta os meios de cultivo utilizados para cada um dos microrganismos heterólogos utilizados para o teste de especificidade.

	Microrganismo Heterólogo	Meio de Cultivo	Parâmetros de Crescimento
Bactérias	<i>Bacillus thuringiensis</i>		30°C – 24 h
	<i>Klebsiella aerogenes</i>		28°C – 48 h
	<i>Kocuria kristinae</i>	Nutriente Ágar	28°C – 48 h
	<i>Pseudomonas sp.</i>		28°C – 48 h
	<i>Staphylococcus aureus</i>		28°C – 48 h
	<i>Escherichia coli</i>	Super Optimal	37°C – 24 h
	<i>Lactococcus lactis</i>	Broth	35°C – 72 h
	<i>Zymomonas mobilis</i>	RM	30°C – 48 h
	<i>Pediococcus sp.</i>		35°C – 48 h
	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	De Man, Rogosa e Sharpe	35°C – 48 h
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>		30°C – 48 h
	<i>Alternaria sp.</i>		28°C – 7 dias
	<i>Aspergillus sp.</i>	Mannitol Agar	28°C – 7 dias
	<i>Fusarium verticillioides</i>		28°C – 7 dias
	<i>Trichoderma sp.</i>		28°C – 7 dias
Fungos	<i>Candida albicans</i>		35°C – 24 h
	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>		37°C – 7 dias
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		30°C – 24 h
	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>		30°C – 24 h
	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>		30°C – 48 h
	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Yeast Peptone Dextrose	30°C – 24 h
	EC1118 (<i>S. cerevisiae</i>)		30°C – 24 h
	S288 (<i>S. cerevisiae</i>)		30°C – 24 h
	Wild Catarina (<i>S. cerevisiae</i>)		30°C – 24 h
	SA (<i>S. cerevisiae</i>)		30°C – 24 h
	Sali Fermentada (<i>S. cerevisiae</i>)		30°C – 24 h
	W303(<i>S. cerevisiae</i>)		30°C – 24 h

Tabela 2 - Condições de cultivo dos microrganismos heterólogos.

Extração de DNA genômico

A extração de DNAg foi realizada a partir de 3 mL de cultura crescida *overnight*, seguindo protocolos específicos da QIAGEN para bactérias e leveduras, com o kit *DNeasy Blood & Tissue*. A quantificação foi feita por fluorescência no *Quantus (Promega)*, e a integridade do DNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1%.

Reações de PCR

A PCR foi realizada em 25 µL, contendo tampão, dNTPs, MgCl₂, primers específicos, *Taq* DNA polimerase e DNA genômico de *L. brevis*. A amplificação seguiu 30 ciclos de desnaturação (95°C), anelamento (58°C) e extensão (72°C), com validação por eletroforese em gel de agarose 2%.

Os primers, desenhados por bioinformática, garantiram especificidade, evitando amplificações cruzadas. Controles positivos utilizaram primers para 16S rRNA (bactérias) e ITS (fungos), enquanto os negativos substituíram o DNA por água Milli-Q.

Testes de especificidade e sensibilidade

A especificidade dos *primers* foi avaliada utilizando dois *pools* de DNA genômico (DNAg), um contendo bactérias e outro leveduras, ambos preparados com microrganismos heterólogos a *L. brevis*.

Para os testes de sensibilidade, o DNAg de *L. brevis* foi diluído em série (1:10) para obter concentrações de 10 ng a 1 fg, e PCR convencional e em tempo real foram realizados para determinar o limite de detecção. A amplificação da qPCR foi monitorada por fluorescência com *SYBRGreen*.

Reações de LAMP

A sensibilidade do LAMP foi avaliada com diluições seriadas do DNAg de *Levilactobacillus brevis* (10 ng a 10 fg), utilizando 1 µL por reação. A amplificação ocorreu com WarmStart® Colorimetric LAMP 2X Master Mix e primers específicos, incubados a 65°C por 1 hora, com detecção pela mudança de cor do phenol red. Controles negativos utilizaram água Milli-Q. A especificidade foi testada com *pools* de DNAg ajustados para 10 ng/µL, aplicando 7 µL de cada pool, equivalente a 4,375 ng por microrganismo, permitindo avaliar a seletividade dos primers para *L. brevis*.

RESULTADOS

Cultivo e extração de DNAG

A extração de DNAG foi realizada com o kit *DNeasy Blood & Tissue* (QIAGEN), seguindo protocolos específicos para bactérias e fungos. A quantificação por fluorescência no sistema *Quantus* (Promega) revelou um rendimento de 2,4 µg para *L. brevis*, com bandas íntegras e sem *smear* (Figura 2), indicando alta qualidade do DNA para PCR e LAMP.

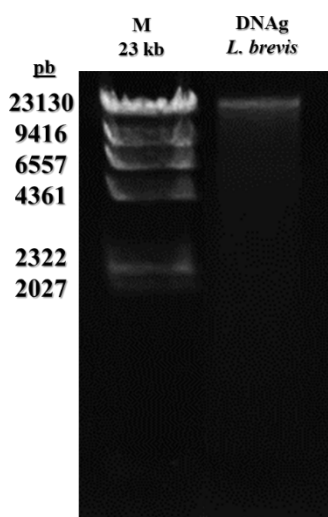


Figura 2 – Eletroforese em gel de agarose da extração de DNAG de *L. brevis*. O perfil da amostra de *Levilactobacillus brevis* mostra uma banda íntegra e sem *smear*, indicando uma extração eficiente e adequada para amplificação. (M) Marcador 23.000 pb (Promega); DNAG de *L. brevis*.

Os DNAG extraídos dos demais microrganismos apresentaram concentrações adequadas para amplificação, conforme detalhado na Tabela 3. Valores acima de 1 µg foram considerados satisfatórios, garantindo a confiabilidade e reprodutibilidade das análises.

	Microorganismo Heterólogo	Rendimento	
Bactérias	<i>Bacillus thuringiensis</i>	2,2 µg	
	<i>Citrobacter freundii</i>	12,7 µg	
	<i>Klebsiella aerogenes</i>	18 µg	
	<i>Kocuria kristinae</i>	1,9 µg	
	<i>Pseudomonas sp.</i>	1,5 µg	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	3 µg	
	<i>Escherichia coli</i>	5,8 µg	
	<i>Lactococcus lactis</i>	16,3 µg	
	<i>Zymomonas mobilis</i>	4,9 µg	
	<i>Lentilactobacillus buchneri</i>	2,1 µg	
	<i>Lactobacillus buchneri</i>	2,8 µg	
	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	3,6 µg	
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	4,2 µg	
	<i>Pediococcus sp.</i>	1,8 µg	
	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	3,3 µg	
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	4,9 µg	
	Fungos	<i>Alternaria sp.</i>	7,8 µg
		<i>Aspergillus sp.</i>	6,3 µg
<i>Fusarium verticillioides</i>		3,7 µg	
<i>Trichoderma sp.</i>		3 µg	
<i>Candida albicans</i>		2,2 µg	
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>		1,9 µg	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		1,9 µg	
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>		5,1 µg	
<i>Brettanomyces bruxellensis</i>		4,5 µg	
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>		8,1 µg	
EC1118 (<i>S. cerevisiae</i>)		4,5 µg	
S288 (<i>S. cerevisiae</i>)		3 µg	
Wild Catarina (<i>S. cerevisiae</i>)	1,9 µg		
SA (<i>S. cerevisiae</i>)	2,2 µg		
Sali Fermentada (<i>S. cerevisiae</i>)	3,6 µg		
W303(<i>S. cerevisiae</i>)	2,4 µg		

Tabela 3 - Rendimento das extrações de DNAG dos microrganismos heterólogos utilizadas no estudo. Todas as extrações apresentaram rendimentos satisfatórios, com quantidades adequadas de DNAG para a realização dos experimentos subsequentes, garantindo a confiabilidade e a precisão das análises realizadas.

Reações de PCR

O set de *primers* testado nesse trabalho, desenvolvido para ensaios de LAMP, foi sintetizado pela *Thermo Fisher Scientific* e inclui seis *primers*: internos (FIP, BIP), externos (F3, B3) e de *loop* (LF, LB). Para PCR convencional, foram utilizados apenas os *primers* externos F3 e B3, designados como *forward* e *reverse*. A eficiência do set de *primers* para *L. brevis* foi avaliada por PCR, com controles positivo e negativo. O controle positivo (16S rRNA) confirmou a integridade do DNAG, enquanto o set de *primers* gerou amplificação bem-sucedida, resultando em uma banda de aproximadamente 250 pb (Figura 3).

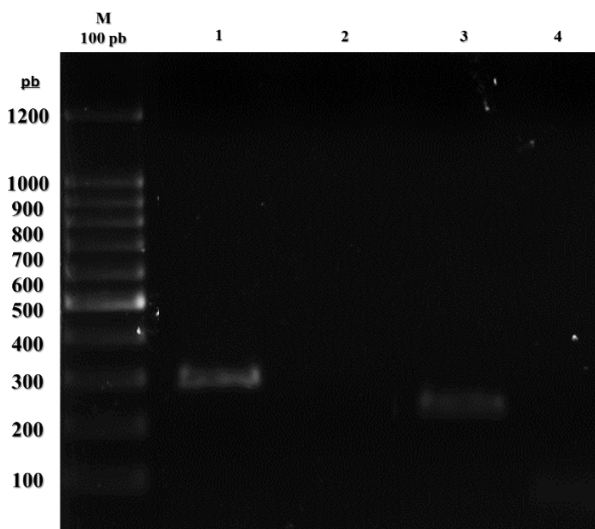


Figura 3 - Eletroforese em gel de agarose para avaliação da amplificação com o set de *primers* desenhado para detecção de *L. brevis*. O controle positivo amplificou, bem como o set de *primers* com uma banda visível de aproximadamente 250 pares de bases (pb). (M 100 bp) Marcador 100 pb (Sinapse); (1) Controle positivo *L. brevis*; (2) Controle negativo 16S; (3) Teste *primer* gerado com *L. brevis*; (4) Controle negativo set de *primers*.

A especificidade do set de *primers* foi avaliada por PCR utilizando *pools* de DNA de bactérias e fungos, com controles positivos e negativos. Cada reação continha 100 ng de DNA, sendo 6,25 ng por espécie. O controle positivo com *L. brevis* foi incluído para simular as mesmas condições dos *pools*. Os controles positivos amplificaram corretamente, e o set de *primers* não amplificou o *pool* de fungos, confirmando sua especificidade para bactérias. No entanto, gerou uma banda fraca no *pool* bacteriano, sugerindo possível amplificação inespecífica.

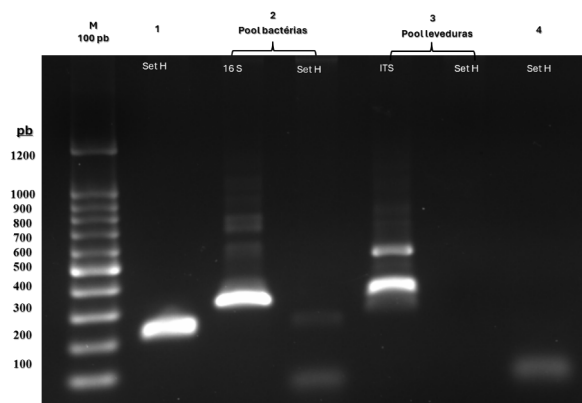


Figura 4 - Avaliação de especificidade do set de *primers* em PCR. O pool de fungos não apresentou amplificação, no entanto, o pool bacteriano gerou uma banda fraca, sugerindo possível amplificação inespecífica. (M 100 bp) Marcador 100 pb (Sinapse); (1) Controle positivo set de *primers*; (2) Controle positivo pool de bactérias 16S e teste set de *primers*; (3) Controle positivo pool de leveduras ITS e teste set de *primers*; (4) controle negativo set de *primers*.

Tendo em vista o aparecimento de uma banda fraca no *pool* de bactérias heterólogas, um novo teste com microrganismos próximos taxonomicamente a *L. brevis*, conforme a literatura, foi realizado. Neste caso, foram testados separadamente o DNAG de *L. buchneri* (obtido da FAT e Levteck) e *L. plantarum* (obtido da FAT e Levteck). Nesse experimento houve amplificação fraca apenas para *L. buchneri*, sugerindo detecção inespecífica. Isso indica que o set de *primers* pode identificar tanto *L. brevis* quanto *L. buchneri*, ambos contaminantes cervejeiros. Para maior especificidade, recomenda-se otimizar a PCR, combinar o set testado com *primers* adicionais ou usá-lo para triagem inicial seguida de PCR específica.

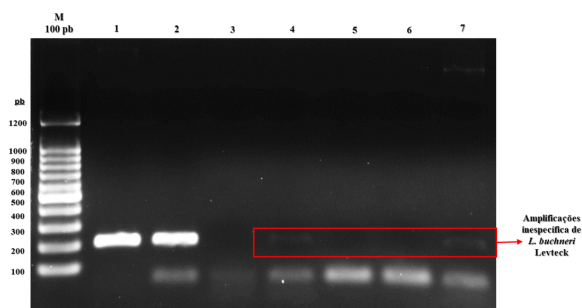


Figura 5 - Teste de especificidade do set de *primers* para *Lactobacillus*. Apenas *L. buchneri*, isolado da empresa Levteck, apresentou uma banda fraca, semelhante ao resultado observado no *pool* de bactérias. (M 100 bp) Marcador 100 pb (Sinapse); (1) Controle positivo set de *primers* 10 ng; (2) Controle positivo set de *primers* 6,25 ng; (3) *L. buchneri* CCT teste set de *primers*; (4) *L. buchneri* Levteck teste set de *primers*; (5) *L. plantarum* CCT teste set de *primers*; (6) *L. plantarum* teste set de *primers* Levteck; (7) *pool* de bactérias com set de *primers*.

A sensibilidade do set de primers foi avaliada por PCR com diluições de DNAg de *L. brevis* (10 ng/μL a 1 fg/μL). Conforme ilustrado na Figura 6, os controles negativos não amplificaram, e a menor concentração detectável foi 10 pg/μL. As bandas no gel ficaram menos nítidas em concentrações mais baixas, indicando a redução da sensibilidade dos primers.

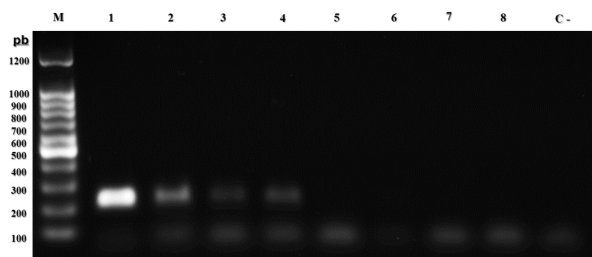


Figura 6 - Teste de sensibilidade do set de primers para amplificação de *L. brevis*. A concentração mínima detectável foi de 10 pg/μL, e as bandas tornaram-se progressivamente menos nítidas à medida que a concentração de DNAg diminuía. (M) Marcador 100 pb (Sinapse); (1) 10 ng/μL; (2) 1 ng/μL; (3) 100 pg/μL; (4) 10 pg/μL; (5) 1 pg/μL; (6) 100 fg/μL; (7) 10 fg/μL; (8) 1 fg/μL; (C-) Controle negativo.

A PCR quantitativa foi realizada com diluições de *L. brevis* (10 ng/μL a 100 atg/μL). A amplificação ocorreu de 10 ng/μL a 10 fg/μL, sem detecção em concentrações menores, demonstrando maior sensibilidade que o PCR convencional, pois a fluorescência em tempo real permitiu identificar a amplificação nas fases iniciais. O $R^2 = 0,99$ confirmou a alta precisão do experimento (Gráfico 1).

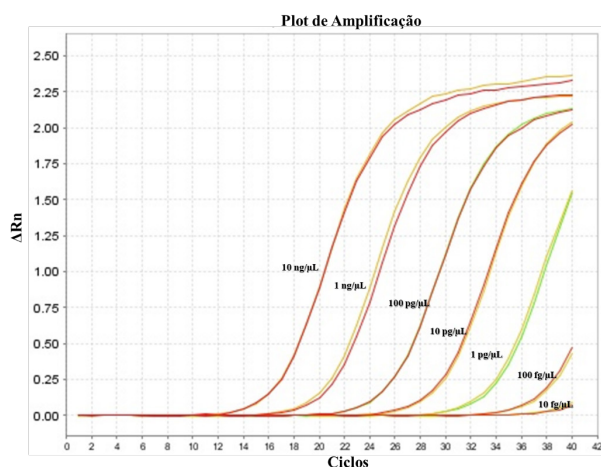


Gráfico 1 - Teste de PCR quantitativo de *L. brevis* com diferentes concentrações de DNAg. O gráfico mostra que a amplificação foi detectada nas concentrações de 10 ng/μL a 10 fg/μL, evidenciando maior sensibilidade do PCR quantitativo em comparação à PCR convencional.

Reações de LAMP

A reação de LAMP com DNAg foi realizada usando o *WarmStart® Colorimetric LAMP 2X Master Mix*, que utiliza o corante *phenol red*. Foram testadas concentrações de 10 ng/μL, 100 pg/μL, 100 fg/μL e 10 fg/μL, além de controle negativo. O teste de sensibilidade, mostrado na Figura 8, demonstrou amplificação eficaz nas concentrações de 10 ng/μL, 100 pg/μL e 100 fg/μL, mas não detectou amplificação em 10 fg/μL, indicando que o limite de sensibilidade é em torno de 100 fg/μL, destacando a eficácia do LAMP na detecção de baixas concentrações de DNA de *L. brevis*.

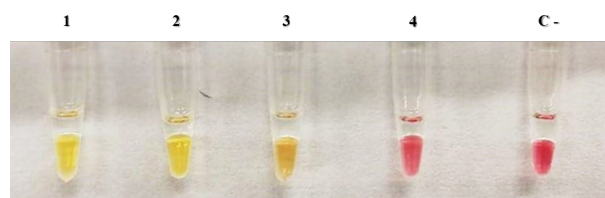


Figura 8 - Análise do teste de LAMP com DNAg de *L. brevis*. A amplificação bem-sucedida até nas amostras de 10 ng/μL, 100 pg/μL e 100 fg/μL, com exceção da concentração de 10 fg/μL. (1) 10 ng/μL; (2) 100 pg/μL; (3) 100 fg/μL; (4) 10 fg/μL; (C-) Controle negativo.

A especificidade da reação de LAMP foi avaliada utilizando *pools* de DNA de leveduras e bactérias heterólogas a 10 ng/μL, além de um controle positivo com DNA de *Levilactobacillus brevis*. Apenas o controle positivo apresentou amplificação, enquanto os outros *pools* não geraram sinais. O volume da reação foi de 25 μL, com até 7 μL de amostra, totalizando aproximadamente 4,375 ng de DNA por microrganismo.

O teste de sensibilidade (Figura 9) indicou que a detecção é possível até 100 fg/μL, sendo a quantidade de DNA suficiente para o ensaio. A reação foi monitorada em intervalos de 10 minutos, com amplificação observada no controle positivo em 20 minutos, confirmando a eficácia e a especificidade do método para a detecção rápida.

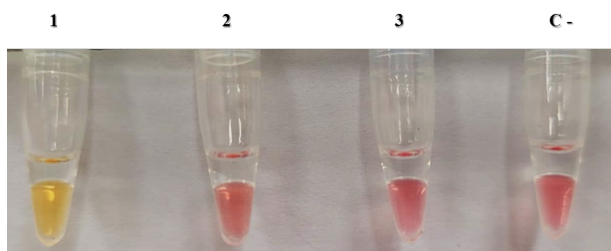


Figura 9 - Análise do teste de especificidade da reação de LAMP para *L. brevis*. Os pools de bactérias e fungos não apresentaram amplificação, assim como o controle negativo. (1) Controle positivo set de primers 10 ng; (2) Teste pool de bactérias; (3) Teste pool de leveduras; (4) controle negativo set de primers.

DISCUSSÃO

A busca por técnicas alternativas para detectar *BSMs*, como *Levilactobacillus brevis*, atende à demanda do setor cervejeiro por soluções rápidas e precisas, já que a contaminação afeta a qualidade e aumenta os custos. Métodos tradicionais, como a microbiologia de cultivo, têm limitações quanto ao tempo de resposta, enquanto técnicas moleculares, como PCR e LAMP, são mais rápidas e sensíveis.

Neste estudo, os *primers* específicos para *L. brevis* amplificaram de forma eficiente em ambas as técnicas, mas a PCR apresentou uma amplificação mínima para *Lactobacillus buchneri*, um contaminante geneticamente próximo (Zheng et al., 2020), sugerindo que ajustes nos *primers* seriam necessários para melhorar a especificidade da detecção exclusiva de *L. brevis*.

Os testes mostraram que a PCR qualitativa detecta até 10 pg/ μ L de DNA, enquanto a PCR quantitativa (em tempo real) alcança maior sensibilidade, detectando até 10 fg/ μ L. No entanto, seu alto custo e a necessidade de equipamentos especializados limitam seu uso em cervejarias menores. Já o LAMP, que não requer termociclador e fornece resultados em até uma hora, apresentou alta sensibilidade para *L. brevis* (100 fg/ μ L), destacando-se como uma alternativa eficiente e acessível para a detecção rápida de contaminantes (Chaouch, 2021; Soroka et al., 2021).

Comparações com outros estudos reforçam a eficácia do LAMP na detecção de *Lactobacillus*. A técnica demonstrou alta sensibilidade, alcançando até 0,1 cópias/ μ L, embora nesse caso tenha sido utilizado SYBR Green em vez da abordagem colorimétrica empregada no presente estudo. Apesar dessa

diferença, o desempenho do LAMP foi igualmente eficaz, permitindo amplificação em concentrações muito baixas (Anyaduba et al., 2022; Kim et al., 2024).

Estudos anteriores reforçam a eficácia da mistura utilizada neste trabalho, o *WarmStart® Colorimetric LAMP 2X Master Mix*, demonstrando excelente desempenho. Jomoui et al. (2022) relataram 100% de sensibilidade e especificidade variando entre 98,2% e 99,7% na detecção de diferentes bactérias. Em outro estudo, Illidge et al. (2024) relataram que o LAMP foi capaz de detectar *Lactobacillus crispatus* a partir de 10 fg de DNA, demonstrando uma sensibilidade ligeiramente superior à obtida no presente estudo, em que *L. brevis* foi detectado até o limite de 100 fg. Ainda assim, os resultados aqui apresentados situam-se na mesma ordem de magnitude, confirmando o alto potencial do LAMP para detectar microrganismos em concentrações muito baixas.

Além disso, a versatilidade do LAMP foi evidenciada na detecção do SARS-CoV-2 utilizando *WarmStart® Colorimetric Master Mix* com SYTO-9® em um termociclador de qPCR. Embora esse protocolo difere do presente estudo, que utilizou apenas detecção visual direta, ambos aplicaram a mesma temperatura de 65°C por 20 minutos, demonstrando a estabilidade da metodologia aplicada no teste de especificidade (Zhang et al., 2020).

A técnica colorimétrica também tem sido empregada com sucesso na detecção de *Bovine alphaherpesvirus 1* e *Mycobacterium bovis* em saúde animal (Peltzer et al., 2021; Sierra et al., 2023). Além disso, foi aplicada para identificar *Fusobacterium nucleatum* com o uso do corante *phenol red*, destacando sua eficiência, sem necessidade de equipamentos sofisticados (Zuraik et al., 2024). Esse fator é especialmente relevante para ambientes com recursos limitados, como cervejarias.

Ampliando ainda mais seu escopo, o LAMP é amplamente utilizado para detecção de microrganismos em diferentes contextos, atendendo aos critérios ASSURED (sigla em inglês para Acessível, Sensível, Específico, Fácil de usar, Rápido, Robusto, Sem equipamento e Entregável aos usuários finais) da OMS (Organização Mundial da Saúde) pela sua sensibilidade, especificidade e acessibilidade (Kosack et al., 2017). Durante a pandemia, o RT-LAMP mostrou alta eficácia na detecção do SARS-CoV-2, especialmente nas fases

iniciais da infecção (Huang et al., 2020; Dong et al., 2021) sendo útil em locais com infraestrutura limitada (Pu et al., 2022; Mannier; Yoon, 2022; Choi et al., 2023).

Além disso, a técnica foi adaptada para detectar vírus como Ebola, Zika, dengue (Oloniniyi et al., 2017; Estrela et al., 2019), adenovírus (Yuan et al., 2019), influenza A (Poon et al., 2005) e herpesvírus (Wang et al., 2015). O TB-LAMP (*Tuberculosis - Loop-mediated Isothermal Amplification*), recomendado pela OMS, mostrou eficácia no diagnóstico rápido da tuberculose (Dayal et al., 2021; Fan et al., 2022), enquanto o mLAMP (LAMP *multiplex*) permite diferenciar *M. tuberculosis* de *Mycobacterium* não tuberculoso (Kim et al., 2021).

O LAMP também tem sido testado no diagnóstico de doenças respiratórias, como pneumonia causada por diversos patógenos (Vergara et al., 2020), e em patógenos alimentares, como *E. coli* e *Salmonella* (Zhuang et al., 2014; Priya et al., 2018). Sua eficácia também é demonstrada no diagnóstico de parasitas, como *Plasmodium* (Selvarajah et al., 2020), e infecções fúngicas, como *Candida albicans* e *Aspergillus fumigatus* (Nakayama et al., 2017; Li et al., 2023).

Diante do exposto, os dados da literatura corroboram com os achados do presente estudo, destacando a robustez, simplicidade e adaptabilidade do LAMP como uma ferramenta promissora para a detecção rápida e precisa de microrganismos em contextos variados, incluindo a indústria cervejeira.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo confirmam que os *primers* desenvolvidos *in silico* para *Levilactobacillus brevis* foram eficientes nas técnicas de PCR e LAMP, validando o objetivo proposto de avaliar sua especificidade e sensibilidade. A PCR convencional demonstrou capacidade de detecção até 10 pg/μL, enquanto a PCR em tempo real ampliou a sensibilidade para 10 fg/μL. No entanto, foi observada uma amplificação cruzada com *Lactobacillus buchneri*, sugerindo limitação na especificidade em contextos com espécies geneticamente próximas.

Por outro lado, o LAMP mostrou-se altamente promissor, com sensibilidade de até 100 fg/μL e alta especificidade nos testes com diferentes microrganismos, destacando-se como uma alternativa viável à PCR para aplicações em ambientes com recursos limitados. Assim, os dados apresentados reforçam o potencial das metodologias moleculares, em especial o LAMP, como ferramentas eficazes para o controle microbiológico na indústria cervejeira. A continuidade de pesquisas focadas em aprimorar a especificidade dos *primers* pode ampliar ainda mais a aplicabilidade desses métodos em contextos industriais o que oferece um potencial inovador para o controle de qualidade. Além disso, seu uso em cervejarias ainda é pouco explorado, podendo otimizar processos e reduzir perdas. A integração dessa tecnologia ao setor abre novas oportunidades em biotecnologia industrial.

REFERÊNCIAS

- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). (2024). Anuário da cerveja de 2024. Recuperado de <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/anuario-da-cerveja>.
- Anyaduba, T. D., Otoo, J. A., & Schlappi, T. S. (2022). Picoliter droplet generation and dense bead-in-droplet encapsulation via microfluidic devices fabricated via 3D printed molds. *Micromachines*, 13(11), 1946. <https://doi.org/10.3390/mi13111946>.
- Asano, S., Shimokawa, M., & Suzuki, K. (2019). PCR analysis methods for detection and identification of beer-spoilage lactic acid bacteria. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1887, pp. 95-107). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8907-2_9.
- Associação Brasileira da Indústria da Cerveja (CERVBRASIL). (2018). Recuperado de http://www.cervbrasil.org.br/novo_site/.
- Augustine, R., Hasan, A., Das, S., Ahmed, R., Mori, Y., Notomi, T., Kevadiya, B. D., & Thakor, A. S. (2020). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A rapid, sensitive, specific, and cost-effective point-of-care test for coronaviruses in the context of COVID-19 pandemic. *Biology*, 9, 182. <https://doi.org/10.3390/biology9080182>.
- Bergsveinson, J., Baecker, N., Pittet, V., & Ziola, B. (2015). Role of plasmids in *Lactobacillus brevis* BSO 464 hop tolerance and beer spoilage. *Journals ASM*. <https://doi.org/10.1128/AEM.02870-14>.
- Bressan, P., Geremias, R., & Souza, E. L. (2020). Resíduo da indústria cervejeira como precursor de carvão ativado comparado a outros resíduos agroindustriais: uma revisão. *Evidência/Inovação*, 20(2). <https://doi.org/10.18593/eba.25575>.

- Briggs, D. E., Boulton, C. A., Brookes, P. A., & Stevens, R. (2004). *Brewing: Science and practice* (pp. 606-649). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780203024195>.
- Chaouch, M. (2021). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): An effective molecular point-of-care technique for the rapid diagnosis of coronavirus SARS-CoV-2. *Reviews in Medical Virology*, 31(6), e2215. <https://doi.org/10.1002/rmv.2215>.
- Choi, G., Moehling, T. J., & Meagher, R. J. (2023). Advances in RT-LAMP for COVID-19 testing and diagnosis. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 23, 9-28. <https://doi.org/10.1080/14737159.2023.2169071>.
- Condina, M. R., Dilmetz, B. A., Bazaz, S. R., Meneses, J., Ebrahimi Warkiani, M., & Hoffmann, P. (2019). Rapid separation and identification of beer spoilage bacteria by inertial microfluidics and MALDI-TOF mass spectrometry. *Lab on a Chip*, 19(11), 1961-1970. <https://doi.org/10.1039/c9lc00152b>.
- Dahmani, C. A., Khaldi, F., Derouiche, W., Benyagoub, N., Zenati, L. G. A., Hamidi, W., & Bencheikh, N. (2023). Comparison between RT-qPCR and LAMP methods for a rapid COVID-19 diagnosis in an Algerian sample. In L. Anfossi (Ed.), *Rapid Antigen Testing*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.1001116>.
- Dayal, R., Yadav, A., Agarwal, D., Kumar, M., Kamal, R., Singh, D., Bhatnagar, S. (2021). Comparison of the diagnostic yield of tuberculosis loop-mediated isothermal amplification assay with cartridge-based nucleic acid amplification test, acid-fast bacilli smear microscopy, and mycobacterial growth indicator tube culture in children with pulmonary tuberculosis. *J. Pediatric Infect. Dis. Soc.*, 10(2), 83-87. <https://doi.org/10.1093/jpids/piaa019>.
- Dong, Y., Wu, X., Li, S., Lu, R., Li, Y., Wan, Z., Qin, J., Yu, G., Jin, X., & Zhang, C. (2021). Comparative evaluation of 19 reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assays for detection of SARS-CoV-2. *Scientific Reports*, 11, 2936. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80352-8>.
- Dragone, G., Mussatto, S. I., Nogueira, A. D., & Almeida e Silva, J. B. (2007). Revisão: Produção de cerveja: Microrganismos deteriorantes e métodos de detecção. *Braz. J. Food Technol.*, 10(4), 240-251. <https://hdl.handle.net/1822/16769>.
- Esmaeili, S., Mogharrabi, M., Safi, F., Sohravandi, S., Mortazavian, A. M., & Bagheripoor-Fallah, N. (2015). The common spoilage microorganisms of beer: Occurrence, defects, and determination: A review. *Carpathian Journal of Food Science and Technology*, 7(4), 68-73.
- Estrela, P. F. N., Mendes, G. de M., Oliveira, K. G., Bailão, A. M., Soares, C. M. de A., Assunção, N. A., Duarte, G. R. M. (2019). Ten-minute direct detection of Zika virus in serum samples by RT-LAMP. *Journal of Virological Methods*, 271, 113675. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2019.113675>
- Fan, L., Guan, B., Cheng, M., Liu, C., Tian, Y., Li, R., Chen, Y. (2022). A comprehensive evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in children using bronchoalveolar lavage fluid. *Infect. Drug Resist.*, 15, 975-987. <https://doi.org/10.2147/IDR.S354660>.
- Feyereisen, M., Mahony, J., O'Sullivan, T., Boer, V., & Van Sinderen, D. (2020). A plasmid-encoded putative glycosyltransferase is involved in hop tolerance and beer spoilage in *Lactobacillus brevis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(3), e02268-19. <https://doi.org/10.1128/AEM.02268-19>.
- Gao, Z., Yang, C., Zhang, X., Hu, B., Zhang, H., Zhang, Z., Kuang, W., Zheng, Q., Cao, J. (2023). Establishment of a rapid LAMP assay for *Aeromonas hydrophila* and comparison with the application of qPCR. *Metabolites*, 13(7), 841. <https://doi.org/10.3390/metabo13070841>.
- Garofalo, C., Osimani, A., Milanovic, V., Taccari, M., Aquilanti, L., & Clementi, F. (2015). The occurrence of beer spoilage lactic acid bacteria in craft beer production. *Journal of Food Science, Food Microbiology & Safety*. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13112>.
- Hanifehpour, H., Ashrafi, F., Siasi, E., & Fallahi, S. (2024). Evaluation and comparison of one-step real-time PCR and one-step RT-LAMP methods for detection of SARS-CoV-2. *BMC Infectious Diseases*, 24(1), 679. <https://doi.org/10.1186/s12879-024-09574-9>.
- Hayashi, N., Ito, M., Horiike, S., & Taguchi, H. (2001). Molecular cloning of a putative divalent-cation transporter gene as a new genetic marker for the identification of *Lactobacillus brevis* strains capable of growing in beer. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55(5), 596-603. <https://doi.org/10.1007/s002530100600>.
- Huang, W. E., Lim, B., Hsu, C. C., Xiong, D., Wu, W., Yuejiang, Y., Jia, H., Wang, Y., Zeng, Y., Ji, M., Chang, H., Zhang, X., Wang, H., Cui, Z. (2020). RT-LAMP for rapid diagnosis of coronavirus SARS-CoV-2. *Microbial Biotechnology*, 13(4), 950-961. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13586>.
- Ikeda, K., Uchihashi, K., Okuda, I., Xiang, Z., Nakayashiki, H. (2023). Specific detection of *Pyricularia oryzae* pathotype *Triticum* using qPCR and LAMP methods. *Journal of General Plant Pathology*. <https://doi.org/10.1007/s10327-023-01162-0>.
- Illidge, S., Kort, R., Hertzberger, R., & Dutch Crispatus Citizen Science Collective. (2024). 'From women for women': A citizen science approach engaging women in the isolation and application of the vaginal health-associated bacterium *Lactobacillus crispatus*. *PLoS One*, 19(11), e0308526. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0308526>.
- Jevons, A. L., & Quain, D. (2022). Identification of spoilage microflora in draught beer using culture-dependent methods. *Journal of Applied Microbiology*, 133(6), 3728-3740. <https://doi.org/10.1111/jam.15810>.
- Jomoui, W., Srivorakun, H., Chansai, S., & Fuchareon, S. (2022). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) colorimetric phenol red assay for rapid identification of α -thalassemia: Application to population screening and prenatal diagnosis. *PLoS One*, 17(4), e0267832. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0267832>.

- Kim, M., Shin, S. W., Shin, J., Kim, E., Yang, S., Gwak, Y., Lee, S., Kim, H. (2024). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for rapid on-site detection of *Lactocaseibacillus casei*, *Lactocaseibacillus paracasei*, and *Lactocaseibacillus rhamnosus* in probiotic products. *Food Bioscience*, 57, 103562. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2024.103562>.
- Kosack, C. S., Page, A.-L., & Klatser, P. R. (2017). A guide to aid the selection of diagnostic tests. *Bulletin of the World Health Organization*, 95(9), 639–645. <https://doi.org/10.2471/BLT.16.187468>.
- Kubizniaková, P., Kyselová, L., Brožová, M., Hanzalíková, K., & Matoulková, D. (2021). The role of acetic acid bacteria in brewing and their detection in operation. *Kvasny Prumysl*, 67, 511–522. <https://doi.org/10.18832/kp2021.67.511>.
- Li, M., Jin, X., Jiang, Q., Wei, H., Deng, A., Mao, Z., Wang, Y., Zeng, Z., Wu, Y., Liu, S., Kim, J., Wang, X., Liu, Y., Liu, J., Lv, W., Huang, L., Liao, Q., Huang, G., Zhang, L. (2023). Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): Potential Point-of-Care Testing for Vulvovaginal Candidiasis. *Journal of Fungi (Basel)*, 9(12), 1159. <https://doi.org/10.3390/jof9121159>.
- Mannier, C., & Yoon, J.-Y. (2022). Progression of LAMP as a result of the COVID-19 pandemic: Is PCR finally rivaled? *Biosensors (Basel)*, 12(7), 492. <https://doi.org/10.3390/bios12070492>.
- Nakayama, T., Yamazaki, T., Yo, A., Tone, K., Alshahni, M. M., Fujisaki, R., Makimura, K. (2017). Detection of fungi from an indoor environment using Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) method. *Bio*, 22(2), 97–104. <https://doi.org/10.4265/bio.22.97>.
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., & Hase, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 28(12), E63. <https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63>.
- Oloniniyi, O. K., Kurosaki, Y., Miyamoto, H., Takada, A., & Yasuda, J. (2017). Rapid detection of all known ebolavirus species by reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *Journal of Virological Methods*, 246, 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.03.011>.
- Peltzer, D., Tobler, K., Fraefel, C., Maley, M., & Bachofen, C. (2021). Rapid and simple colorimetric loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the detection of Bovine alphaherpesvirus 1. *Journal of Virological Methods*, 289, 114041. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2020.114041>.
- Poon, L. L. M., Leung, C. S. W., Chan, K. H., Lee, J. H. C., Yuen, K. Y., Guan, Y., & Peiris, J. S. M. (2005). Detection of Human Influenza A Viruses by Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(1), 427–430. <https://doi.org/10.1128/jcm.43.1.427-430.2005>.
- Pourakbari, R., Gholami, M., Shakerimoghaddam, A., Motavalli Khiavi, F., Mohammadimehr, M., & Shakouri Khomartash, M. (2024). Comparison of RT-LAMP and RT-qPCR assays for detecting SARS-CoV-2 in the extracted RNA and direct swab samples. *Journal of Virological Methods*, 324, 114871. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2023.114871>.
- Powell, C. D., & Kerruish, D. W. M. (2017). Beer spoiling yeasts: genomics, detection, and control. In N. A. Bokulich & C. W. Bamforth (Eds.), *Brewing microbiology – current research, omics, and microbial ecology* (pp. 289–327). Caister Academic Press. <https://doi.org/10.21775/9781910190616.11>.
- Priya, G. B., Agrawal, R. K., Milton, A. A. P., Mishra, M., Mendiratta, S. K., Agarwal, R. K., Luke, A., Singh, B. R., Kumar, D. (2018). Development and evaluation of isothermal amplification assay for the rapid and sensitive detection of *Clostridium perfringens* from chevon. *Anaerobe*, 54, 178–187. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.09.005>.
- Pu, R., Liu, S., Ren, X., Shi, D., Ba, Y., Huo, Y., Zhang, W., Ma, L., Liu, Y., Yang, Y., & Cheng, N. (2022). The screening value of RT-LAMP and RT-PCR in the diagnosis of COVID-19: systematic review and meta-analysis. *Journal of Virological Methods*, 300, 114392. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2021.114392>.
- Rodhouse, L., & Carbonero, F. (2017). Overview of craft brewing specificities and potentially associated microbiota. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(3), 462–473. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1378616>.
- Sakamoto, K., & Konings, W. N. (2003). Beer spoilage bacteria and hop resistance. *International Journal of Food Microbiology*, 89(2–3), 105–124. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(03\)00153-3](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(03)00153-3).
- Selvarajah, D., Naing, C., Htet Htet, N., & Mak, J. W. (2020). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) test for diagnosis of uncomplicated malaria in endemic areas: a meta-analysis of diagnostic test accuracy. *Malaria Journal*, 19(211), 19. <https://doi.org/10.1186/s12936-020-03307-2>.
- Sierra, A., Camelo, D., Lota, C., Arenas, N. E., & Soto, C. (2023). Specific identification of *Mycobacterium bovis* by Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) targeting the Region of Difference 12 (RD12) of the M. tuberculosis complex. *MethodsX*, 10, 102223. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2023.102223>.
- Soroka, M., Wasowicz, B., & Rymaszewska, A. (2021). Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): The Better Sibling of PCR? *Cells*, 10(8), 1931. <https://doi.org/10.3390/cells10081931>.
- Srividya, A., Maiti, B., Chakraborty, A., & Chakraborty, G. (2019). Loop Mediated Isothermal Amplification: A Promising Tool for Screening Genetic Mutations. *Molecular Diagnosis & Therapy*, 23(6), 723–733. <https://doi.org/10.1007/s40291-019-00422-0>.
- Stewart, G. G., & Priest, F. G. (2006). *Handbook of Brewing* (2nd ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420015171>.
- Suzuki, K., Iijima, K., Ozaki, K., & Yamashita, H. (2005). Isolation of a hop-sensitive variant of *Lactobacillus lindneri* and identification of genetic markers for beer spoilage ability of lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9), 5089–5097. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.5089-5097.2005>.
- Suzuki, K., Koyanagi, M., & Yamashita, H. (2004). Genetic characterization of non-spoilage variant isolated from beer-spoilage *Lactobacillus brevis* ABBC45. *Journal of Applied Microbiology*, 96(5), 946–953. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02244.x>.

- Thongon, R., Netramai, S., Kijchavengkul, T., Yaijam, G., & Debhakam, R. (2023). Mathematical modeling and optimization of pasteurization for the internal pressure and physical quality of canned beer. *Heliyon*, 9(11), e21493. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e21493>.
- Vaughan, A., O'Sullivan, T., & Sinderen, D. (2005). Enhancing the microbiological stability of malt and beer – A review. *Journal of the Institute of Brewing*, 111(4), 338–350. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2005.tb00221.x>.
- Vergara, A., Boutal, H., Ceccato, A., López, M., Cruells, A., Bueno-Freire, L., Moreno-Morales, J., Puig de la Bellacasa, J., Castro, P., Torres, A., Marco, F., Calsals-Pascual, C., & Vila, J. (2020). Assessment of a Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay for the Rapid Detection of Pathogenic Bacteria from Respiratory Samples in Patients with Hospital-Acquired Pneumonia. *Microorganisms*, 8(1), 103. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8010103>.
- Wang, Y., Wang, Y., Lan, R., Xu, H., Ma, A., Li, D., Dai, H., Yuan, X., Xu, J., & Ye, C. (2015). Multiple Endonuclease Restriction Real-Time Loop-Mediated Isothermal Amplification: A Novel Analytically Rapid, Sensitive, Multiplex Loop-Mediated Isothermal Amplification Detection Technique. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 17(4), 392–401. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2015.03.002>.
- Xu, Z., Luo, Y., Mao, Y., Peng, R., Chen, J., Soteyome, T., Bai, C., Chen, L., Liang, Y., Su, J., Wang, K., Liu, J., & Kjellerup, B. V. (2020). Spoilage Lactic Acid Bacteria in the Brewing Industry. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(7), 955–961. <https://doi.org/10.4014/jmb.1908.08069>.
- Yuan, X. Y., Wang, Y. L., Meng, K., Lan, R., Xu, H., Ma, A., Li, D., Dai, H., Yuan, X., Xu, J., & Ye, C. (2019). LAMP real-time turbidity detection for fowl adenovirus. *BMC Veterinary Research*, 15, 256. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-2015-5>.
- Zhang, Y., Ren, G., Buss, J., Barry, A. J., Patton, G. C., & Tanner, N. A. (2020). Enhancing colorimetric loop-mediated isothermal amplification speed and sensitivity with guanidine chloride. *Biotechniques*, 69(3), 178–185. <https://doi.org/10.2144/btn-2020-0078>.
- Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M. A. P., Harris, H. M. B., Mattarelli, P., O'Toole, P. W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G. E., Ganzle, M. G., Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>.
- Zhuang, L., Gong, J., Li, Q., Zhu, C., Yu, Y., Dou, X., Liu, X., Xu, B., & Wang, C. (2014). Detection of *Salmonella* spp. by a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method targeting *bcfD* gene. *Letters in Applied Microbiology*, 59(6), 658–664. <https://doi.org/10.1111/lam.12328>.
- ZuraiK, A. A., Daboul, Y., Awama, M. A., Yazigi, H., Kayasseh, M. A., Georges, M. (2024). Rapid detection of *FadA* in *Fusobacterium nucleatum* using the quantitative LAMP colorimetric phenol red method in stool samples from colorectal cancer patients. *Scientific Reports*, 14(1), 13739. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-62846-x>.