República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) **BR 10 2013 018581-7 A2**

BR102013018581A2

(22) Data de Depósito: 19/07/2013

(43) Data da Publicação: 11/08/2015
(RPI 2327)

(54) Título: COMPOSIÇÕES PARA DETECTAR MICROORGANISMOS DE DETERIORAÇÃO DO PRODUTO ALIMENTÍCIO

(51) Int.Cl.: C12N15/11; C12Q1/68; C12R1/225

(30) Prioridade Unionista: 23/07/2012 US 13/555.399

(73) Titular(es): PALL CORPORATION

(72) Inventor(es): CAIFU CHEN

(57) Resumo: COMPOSIÇÕES PARA DETECTAR MICROORGANISMOS DE DETERIORAÇÃO DO PRODUTO ALIMENTÍCIO. A presente invenção proporciona ácidos nucleicos, coleções de ácidos nucíeicos, kits de teste, e métodos para a leitura e detecção especifica de microorganismos em um produto alimentício. O ácido nucleico consiste de uma sequência de nucleotideo delecionado a partir do grupo que consiste de SEQ ID NOs: 1-46.

"COMPOSIÇÕES PARA DETECTAR MICROORGANISMOS DE DETERIORAÇÃO DO PRODUTO ALIMENTÍCIO"

Aqui incorporada por referência em sua totalidade está uma listagem de sequência de amino ácido/nucleotídeo capaz de ser lida por computador submetida conjuntamente aqui e identificada como a seguir: um 8,781 Byte ASCII (Texto) nome depositado "710675SequenceListing", datada de 20 de Julho de 2012.

Antecedentes da Invenção

Microorganismos (por exemplo, bactéria) pode causar a deterioração de produtos alimentícios (por exemplo, cerveja) durante ou após a fabricação. Alguns microorganismos podem fazer com que o produto alimentício deteriore e qualquer um ou mais dos diversos efeitos indesejáveis tais como, por exemplo, odor desagradável, sabor desagradável, e tornar o produto alimentício inseguro para consumo. Falha em detectar com rapidez e precisão a presença de microorganismos de deterioração de produto alimentício pode aumentar o risco de deterioração do alimento. Obstáculos para a rápida e precisa detecção dos microorganismos que ocasionam a deterioração de produtos alimentícios podem incluir, por exemplo, a longa duração dos métodos microbiológicos tradicionais usados para detectar os microorganismos. Os referidos métodos tradicionais podem levar em média de 7-14 dias para completar. Outro obstáculo para a detecção precisa pode incluir, por exemplo, a similaridade das sequências genômicas de alguns microorganismos de deterioração de produto alimentício em comparação àquela dos microorganismos de não deterioração de produto alimentício.

Assim sendo, há uma necessidade de composições e métodos aprimorados para detectar os microorganismos que ocasionam a deterioração de produtos alimentícios.

Breve Sumário da Invenção

Uma modalidade da presente invenção proporciona um ácido nucleico que consiste de uma sequência de nucleotídeo selecionada a partir do grupo que consiste de SEQ ID NOs: 1-45.

Outra modalidade da presente invenção proporciona uma coleção de ácidos nucleicos que compreende dois ou mais ácidos nucleicos, em que os dois ou mais ácidos nucleicos cada um consiste de uma sequência de nucleotídeo selecionada a partir do grupo que consiste de SEQ ID NOs: 1-45.

Outra modalidade da presente invenção proporciona um kit de teste que compreende uma coleção de ácidos nucleicos, em que a coleção é selecionada a partir do grupo que consiste de (a) SEQ ID NOs: 1-3; (b) SEQ ID NOs: 4-6; (c) SEQ ID NOs: 7-9; (d) SEQ ID NOs: 10-12; (e) SEQ ID NOs: 13-15; (f) SEQ ID NOs: 16-18; (g) SEQ ID NOs: 19-21; (h) SEQ ID NOs: 22, 24, e 27; (i) SEQ ID NOs: 22, 25, e 27; (j) SEQ ID NOs: 23, 26, e 27; (k) SEQ ID NOs: 28-30; (l) SEQ ID NOs: 31-33; (m) SEQ ID NOs: 34-36; (n) SEQ ID NOs: 37-

39; (o) SEQ ID NOs: 40-42; e (p) SEQ ID NOs: 43-45.

Ainda outra modalidade da presente invenção proporciona um método de detectar a presença de um ou mais microorganismos em um produto alimentício, o método compreendendo: (a) obter pelo menos uma amostra de teste que compreende ácido nucleico de microorganismos isolados a partir de produto alimentício; (b) colocar em contato o ácido nucleico da presente invenção, coleção de ácidos nucleicos, ou suporte incluindo pelo menos um ácido nucleico da presente invenção com a pelo menos uma amostra de teste sob condições permitindo que um complexo se forme entre o ácido nucleico da presente invenção e o ácido nucleico do microorganismo; (c) detectar o complexo; e, opcionalmente, (d) comparar uma quantidade de complexo na pelo menos uma amostra de teste com uma quantidade de complexo a partir de uma amostra negativa que é desprovida de ácido nucleico de microorganismo, em que uma maior quantidade de complexo a partir da pelo menos uma amostra de teste é indicativa da presença de um ou mais microorganismos.

Descrição detalhada da presente invenção

Uma modalidade da presente invenção proporciona um ácido nucleico que consiste de uma sequência de nucleotídeo selecionada a partir do grupo que consiste de SEQ ID NOs: 1-45. Em uma modalidade, o ácido nucleico é isolado ou purificado. Os ácidos nucleicos da presente invenção proporcionam primers diretos, primers reversos, e sondas que podem, de modo vantajoso, especificamente hibridizar com um ácido nucleico de microorganismo para detecção da presença de um ou mais microorganismos em um produto alimentício. Em algumas modalidades, os primers e sondas especificamente hibridizam com o ácido nucleico de um gênero específico de microorganismos. Em uma modalidade especialmente preferida, os primers e sondas especificamente hibridizam com o ácido nucleico de uma espécie específica de microorganismos.

Os ácidos nucleicos da presente invenção podem ser usados para detectar a presença de um ou mais microorganismos que ocasionam a deterioração do produto alimentício em uma amostra de produto alimentício. Em uma modalidade da presente invenção, os ácidos nucleicos da presente invenção podem especificamente detectar um ou mais microorganismos de um ou mais gênero selecionado a partir do grupo que consiste de *Pediococcus, Lactobacillus, Pectinatus, e Megasphaera.* Exemplos de espécies de microorganismos especificamente detectáveis pelos ácidos nucleicos da presente invenção são determinados na Tabela 1.

TABELA 1

Kit de Teste No.	Espécie	Componente	Sequência	SEQ ID NOs:
1	*Lactobacillus collinoides L. paracollinoides*	primer direto	ACGAACGCATCCCGTTAAA	1
		primer reverso	GGACCAGTTCGCCACTCATCC	2
		sonda	CAAGTGCTTGCACGGATTTTAACATTG	3

2	Controle de inibição	primer direto	CTTGCAAATCGTTCTTTGGG	4
		primer reverso	TAGCGGTACGACTGTCTTGG	5
		sonda	TCAAACCCTAACCTCAGCTCCAGC	6
3	*L. backii*	primer direto	TCCAAGTCGAACGCACAGATA	7
		primer reverso	GGGAAATGTTATCCCCCACTTTT	8
		sonda	AGTGGCGGACGGGTGAGTAACACG	9
4	*L. brevis*	primer direto	AACGAGCTTCCGTTGAATGAC	10
		primer reverso	CGGCCTGCTTCTGGGCAGA	11
		sonda	TGCTTGCACTGATTTCAACAATGAAGC	12
5	*Pectinatus (P. cerevisiiphilus, P. frisingensis, P. haikarae & P. portalensis)*	primer direto	TCAAGTTCTGTTGCAGGGGA	13
		primer reverso	ACCGGACAACGCTTGCCG	14
		sonda	TGAATGACGGTACCCTGTTAGAAAGCC	15
6	*L. lindneri*	primer direto	CGTCGAACGAGGTCTCCTAAC	16
		primer reverso	GCCTTCCAGGTGTTATCCCCTT	17
		sonda	AGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGT	18
7	*Megasphaera (M. cerevisiae, M. elsdenii)*	primer direto	CGCGTGACGGTACCGTAAG	19
		primer reverso	GGAGCCCCGCACTTTTAAGAC	20
		sonda	TACCGTAAGAGAAAGCCACGGCTAA	21
8	*Pediococcus (P. damnosus, P. inopinatus, P. claussenii)*	primer direto *damnosus e inopinatus*	CGTAGAGATGCTTGCATCGAA	22
		primer direto *claussenii*	GGCTTGCACGGATAGATGATT	23
		primer reverso *damnosus*	CCAACCATGCGGTTCATTTTA	24
		primer reverso *inopinatus*	CCAAACCATGCGGTTTACTTTA	25
		primer reverso *claussenii*	CCAACCATGCGGTTTTCTTTA	26
		sonda	AGTGGCGAACGGGTGAGTAACACG	27
9	*L. casei*	primer direto	TGGCTTGCACTGAGATTCGA	28
		primer reverso	CCACCATGCGGTTCTTGGAT	29
		sonda	AGTGGCGGACGGGTGAGTAACACG	30
10	*L. coryniformis*	primer direto	CAACGCACTGACGTCGACC	31
		primer reverso	AGCCAAAGGCCGTCTTTTACATT	32
		sonda	AGTGGCGGACGGGTGAGTAACACG	33
11	*L. parabuchneri (L. frigidus)*	primer direto	CCTGTTGAGTGCTTGCATTTAACTG	34
		primer reverso	GGCCAAGTGTTATCCCCTACTTCAA	35
		sonda	AGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGT	36
12	*L. perolens*	primer direto	CCAGGTGCTTGCATCACCA	37
		primer reverso	TTTCCAAATGTTATCCCCTGCTG	38
		sonda	AGTGGCGGACGGGTGAGTAACACG	39
13	*L. plantarum*	primer direto	TGAAGTCGAACGAACTCTGGTA	40
		primer reverso	GCCCGAAGCCATCTTTCAAACTC	41
		sonda	AGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGT	42
14	*L. rossiae*	primer direto	ACACGGTGCTTGCACCAGA	43
		primer reverso	GGCAAATGTTATCCCCCACTTTA	44
		sonda	AGTGGCGAACGGGTGAGTAACACG	45

Os ácidos nucleicos da presente invenção podem especificamente detectar qualquer tipo de ácido nucleico de microorganismo. Em uma modalidade da presente invenção, o ácido nucleico do microorganismo é DNA. Em ainda outra modalidade, o ácido nucleico

da presente invenção é um ácido nucleico que consiste de uma sequência de nucleotídeo que é complementar a qualquer de SEQ ID NOs: 1-45. O ácido nucleico que é complementar a qualquer de SEQ ID NOs: 1-45 pode detectar RNA de microorganismo.

Em uma modalidade, o ácido nucleico da presente invenção adicionalmente compreende uma marcação detectável. A marcação pode ser qualquer marcação adequada para detectar hibridização, por exemplo, um complexo, do ácido nucleico da presente invenção com ácido nucleico de microorganismo. Exemplos de marcações detectáveis podem incluir qualquer um ou mais de marcações radioativas, marcações não radioativas, marcações fluorescentes, e marcações quimioluminescentes.

Outra modalidade da presente invenção proporciona uma coleção de ácidos nucleicos que compreende dois ou mais ácidos nucleicos, em que os dois ou mais ácidos nucleicos cada um dos quais consiste de uma sequência de nucleotídeo selecionada a partir do grupo que consiste de SEQ ID NOs: 1-45. Em uma modalidade da presente invenção, a coleção pode compreender ou adicionalmente compreende uma sequência de nucleotídeo complementar a uma sequência de nucleotídeo selecionada a partir do grupo que consiste de SEQ ID NOs: 1-45. A coleção pode compreender qualquer número adequado de ácidos nucleicos da presente invenção. Por exemplo, a coleção pode compreender a partir de cerca de 2 a cerca de 45 ou mais ácidos nucleicos, a partir de cerca de 10 ou menos a cerca de 40 ou mais ácidos nucleicos, ou a partir de cerca de 20 ou menos a cerca de 30 ou mais ácidos nucleicos. Em relação a isso, a coleção pode compreender 2 ou mais, 3 ou mais, 4 ou mais, 5 ou mais, 6 ou mais, 7 ou mais, 8 ou mais, 9 ou mais, 10 ou mais, 11 ou mais, 12 ou mais, 13 ou mais, 14 ou mais, 15 ou mais, 16 ou mais, 17 ou mais, 18 ou mais, 19 ou mais, 20 ou mais, 21 ou mais, 22 ou mais, 23 ou mais, 24 ou mais, 25 ou mais, 26 ou mais, 27 ou mais, 28 ou mais, 29 ou mais, 30 ou mais, 31 ou mais, 32 ou mais, 33 ou mais, 34 ou mais, 35 ou mais, 36 ou mais, 37 ou mais, 38 ou mais, 39 ou mais, 40 ou mais, 41 ou mais, 42 ou mais, 43 ou mais, 44 ou mais, ou 45 ou mais ácidos nucleicos. Embora os dois ou mais ácidos nucleicos da coleção possam ser idênticos um ao outro, em uma modalidade preferida, os dois ou mais ácidos nucleicos são diferentes um a partir do outro. Assim sendo, os dois ou mais diferentes ácidos nucleicos podem, de modo vantajoso, hibridizar com dois ou mais diferente microorganismo ácidos nucleicos e, portanto, detectar a presença de dois ou mais diferente microorganismos em um produto alimentício.

Uma modalidade da presente invenção proporciona um kit de teste que compreende uma coleção de ácidos nucleicos para a detecção específica de um ou mais espécie de um ou mais microorganismos. A coleção de ácidos nucleicos do kit de teste pode incluir pelo menos um primer e uma sonda, preferivelmente pelo menos um primer direto, pelo menos um primer reverso, e pelo menos uma sonda. Em uma modalidade, o kit de teste é selecionado a partir do grupo que consiste de kit de teste números 1-14 da Tabela 1. Preferi-

velmente, a coleção de ácidos nucleicos do kit de teste é selecionada a partir do grupo que consiste de (a) SEQ ID NOs: 1-3; (b) SEQ ID NOs: 4-6; (c) SEQ ID NOs: 7-9; (d) SEQ ID NOs: 10-12; (e) SEQ ID NOs: 13-15; (f) SEQ ID NOs: 16-18; (g) SEQ ID NOs: 19-21; (h) SEQ ID NOs: 22, 24, e 27; (i) SEQ ID NOs: 22, 25, e 27; (j) SEQ ID NOs: 23, 26, e 27; (k) SEQ ID NOs: 28-30; (l) SEQ ID NOs: 31-33; (m) SEQ ID NOs: 34-36; (n) SEQ ID NOs: 37-39; (o) SEQ ID NOs: 40-42; e (p) SEQ ID NOs: 43-45. Em uma modalidade, o kit de teste pode incluir sequências que são complementares a qualquer uma ou mais das SEQ ID NOs: 1-45.

Por "sequência de nucleotídeo" ou "ácido nucleico" como usado aqui inclui "polinucleotídeo", "oligonucleotídeo", e "molécula de ácido nucleico", e em geral quer dizer um polímero de DNA ou RNA, que pode ser de fita única ou de dupla fita, sintetizado ou obtido (por exemplo, isolado e/ou purificado) a partir de fontes naturais, que podem conter nucleotídeos naturais, não naturais ou alterados, e que podem conter uma ligação de internucleotídeo natural, não natural ou alterada, tais como uma ligação fosforoamidato ou uma ligação fosforotioato, em vez do fosfodiéster encontrado entre os nucleotídeos de um oligonucleotídeo não modificado. É em geral preferido que o ácido nucleico da presente invenção não compreenda quaisquer inserções, deleções, inversões, e/ou substituições. Entretanto, pode ser adequado em alguns casos, como discutido aqui, para o ácido nucleico compreender uma ou mais inserções, deleções, inversões, e/ou substituições.

Os ácidos nucleicos da presente invenção podem ser construídos com base na síntese química e/ou reações de ligação enzimática usando procedimentos conhecidos na técnica. Vide, por exemplo, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY 2001; e Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates e John Wiley & Sons, NY, 1994. Por exemplo, um ácido nucleico pode ser quimicamente sintetizado usando nucleotídeos de ocorrência natural ou nucleotídeos diversamente modificados projetados para aumentar a estabilidade biológica das moléculas ou para aumentar a estabilidade física do duplex formado com a hibridização (por exemplo, derivados de fosforotioato e nucleotídeos substituídos com acridina). Exemplos de nucleotídeos modificados que podem ser usados para gerar os ácidos nucleicos incluem, mas não são limitados a, 5-fluorouracila, 5-bromouracila, 5-chlorouracila, 5-iodouracila, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroximetil) uracila, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracila, dihidrouracila, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N^6-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N^6-substituted adenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracila, 5-metoxiaminometil-2-tiouracila, beta-D-mannosilqueosina, 5'-metoxicarboximetiluracila, 5-metoxiuracila, 2-metiltio-N^6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wibutoxosina, pseudouracila, queosina,

2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracila, 2-tiouracila, 4-tiouracila, 5-metiluracila, éster metílico de ácido uracil-5-oxiacético, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil) uracila, e 2,6-diaminopurina. Alternativamente, um ou mais dos ácidos nucleicos da presente invenção podem ser adquiridos a partir de empresas, tais como Macromolecular Resources (Fort Collins, CO) e Synthegen (Houston, TX).

Uma modalidade da presente invenção proporciona um suporte que compreende o ácido nucleico da presente invenção, coleção de ácidos nucleicos, ou coleção de ácidos nucleicos do kit de teste imobilizada no suporte. Outra modalidade da presente invenção proporciona um suporte que compreende a amostra a ser testada imobilizada no suporte, e o ácido nucleico da presente invenção é aplicada ao suporte. O suporte pode ser qualquer suporte adequado para imobilizar os ácidos nucleicos da presente invenção. Exemplos de suportes são descritos em Pedido de Patente US No. 6,821,771, que está aqui incorporado por referência em sua totalidade. Outros exemplos de suportes incluem placas GENEDISC oferecidas pela Pall Corporation, Port Washington, NY, USA.

O suporte pode adicionalmente compreender uma marcação detectável. A marcação pode ser qualquer marcação adequada para detectar um complexo do ácido nucleico da presente invenção com ácido nucleico de microorganismo. Exemplos de marcações detectáveis podem incluir qualquer uma ou mais das marcações radioativas, marcações não radioativas, marcações fluorescentes, e marcações quimioluminescentes.

Ainda outra modalidade da presente invenção proporciona um método de detectar a presença de um ou mais microorganismos em um produto alimentício, o método compreendendo: (a) obter pelo menos uma amostra de teste que compreende ácido nucleico de microorganismos isolados a partir de produto alimentício; (b) colocar em contato o ácido nucleico da presente invenção, coleção de ácidos nucleicos, coleção de ácidos nucleicos do kit de teste, ou suporte incluindo pelo menos um ácido nucleico com a pelo menos uma amostra de teste sob condições permitindo que um complexo se forme entre o ácido nucleico da presente invenção e o ácido nucleico do microorganismo; (c) detectar o complexo; e (d) comparar uma quantidade de complexo na pelo menos uma amostra de teste com uma quantidade de complexo a partir da amostra negativa que é desprovida de ácido nucleico de microorganismo, em que uma maior quantidade de complexo a partir da pelo menos uma amostra de teste é indicativa da presença de um ou mais microorganismos.

O método pode compreender obter a amostra do produto alimentício a ser testada e cultivar os microorganismos na amostra em qualquer maneira adequada. Por exemplo, quando o produto alimentício é cerveja, a amostra pode ser qualquer um ou mais de cerveja clara, cerveja não filtrada, cerveja processada, cerveja fermentada, ou outra cerveja túrbida.

O método pode compreender cultivar os microorganismos em qualquer meio de cultura adequado como é conhecido na técnica. O meio de cultura pode ser selecionado de-

pendendo da natureza do produto alimentício e do microorganismo a ser testado. Exemplos de meio de cultura podem incluir caldo de enriquecimento tais como, por exemplo, caldo de enriquecimento MRS oferecido pela AES CHEMUNEX, Inc., Cranbury, NJ, USA; e caldo de enriquecimento NBB-C oferecido pela VWR International, West Chester, PA, USA.

Os microorganismos podem ser cultivados a qualquer temperatura adequada e por qualquer duração adequada como é conhecido na técnica. A temperatura e a duração do cultivo podem ser selecionados dependendo da natureza do produto alimentício e do microorganismo a ser testado. Por exemplo, os microorganismos podem ser cultivados a uma temperatura de cerca de 20° C a cerca de 40° C, preferivelmente a partir de cerca de 22° C a cerca de 28° C. Os microorganismos podem ser cultivados for cerca de 1 dia a cerca de 14 dias, preferivelmente a partir de cerca de 2 dias a cerca de 7 dias.

O método pode compreender extrair o ácido nucleico a partir dos microorganismos de qualquer maneira adequada como é conhecido na técnica. O ácido nucleico pode ser RNA e/ou DNA. O protocolo para extrair o ácido nucleico pode ser selecionado dependendo da natureza do produto alimentício, do microorganismo, e do ácido nucleico a ser testado como é conhecido na técnica. Preferivelmente, o ácido nucleico é extraído de qualquer maneira que lise bactéria Gram positiva e Gram negativa e que recupere uma quantidade capaz de ser testada de DNA sem usar inibidores de reação de cadeia de polimerase (PCR). A extração de ácido nucleico pode ser realizada usando qualquer um de uma variedade de kits de extração de ácido nucleico comercialmente oferecidos de acordo com as instruções do fabricante. Exemplos de kits de extração de DNA podem incluir, por exemplo, o kit PEFOOD (oferecido pela Pall Corporation, Port Washington, NY, USA).

O método compreende colocar em contato o ácido nucleico da presente invenção, coleção de ácidos nucleicos, coleção de ácidos nucleicos do kit de teste, ou suporte com a pelo menos uma amostra de teste sob condições permitindo que um complexo se forme entre o ácido nucleico da presente invenção e o ácido nucleico do microorganismo. Em relação a isso, o método compreende colocar em contato a amostra de extraído ácido nucleico com o ácido nucleico da presente invenção sob condições que permitam que o ácido nucleico da presente invenção especificamente hibridize com o ácido nucleico de microorganismo como é conhecido na técnica. O método pode compreender amplificar o ácido nucleico da presente invenção e o ácido nucleico do microorganismo usando qualquer tipo adequado de PCR como é conhecido na técnica.

O método compreende detectar o complexo. O complexo pode ser detectado usando, por exemplo, uma marcação radioativa ou um corante como é conhecido na técnica. Em uma modalidade preferida, o método compreende medir a luz emitida a partir de um corante fluorescente usando, por exemplo, a laser. Detectar o complexo pode adicionalmente compreender medir a quantidade de complexo formado.

Em uma modalidade, o método opcionalmente compreende comparar uma quantidade de complexo na pelo menos uma amostra de teste com uma quantidade de complexo a partir da amostra negativa que é desprovida de ácido nucleico de microorganismo, em que uma maior quantidade de complexo a partir da pelo menos uma amostra de teste é indicativa da presença de um ou mais microorganismos. Em relação a isso, a amostra é negativa para o microorganismo de deterioração de produto alimentício se a quantidade de complexo detectado na amostra for não mais do que a quantidade de complexo que é detectado na amostra negativa que é conhecida por ser desprovida do ácido nucleico do microorganismo. A amostra é positiva para o microorganismo de deterioração de produto alimentício se a quantidade de complexo detectado na amostra for mais do que a quantidade de complexo que é detectado na amostra negativa que é conhecida por ser desprovida do ácido nucleico do microorganismo.

O método pode, de modo vantajoso, compreender testar quanto a presença de microorganismos em mais do que uma amostra diferente de produto alimentício simultaneamente. Em relação a isso, a pelo menos uma amostra de teste pode ser dois ou mais diferente amostras testada sequencialmente ou simultaneamente, i.e., 3 ou mais, 4 ou mais, 5 ou mais, 6 ou mais, 7 ou mais, 8 ou mais, 9 ou mais, 10 ou mais, 11 ou mais, 12 ou mais, 13 ou mais, 14 ou mais, 15 ou mais, 16 ou mais, 17 ou mais, 18 ou mais, 19 ou mais, 20 ou mais amostras sequencialmente ou simultaneamente.

O método pode compreender detectar a presença de qualquer um ou mais microorganismos que ocasionem a deterioração de produto alimentício. Em uma modalidade da presente invenção, o método compreende detectar a presença de um ou mais microorganismos de um ou mais gêneros selecionados a partir do grupo que consiste de *Pediococcus, Lactobacillus, Pectinatus, e Megasphaera.* Em uma modalidade preferida, o método compreende detectar a presença de uma ou mais espécie de microorganismos selecionada a partir do grupo que consiste de *Pediococcus damnosus, Pediococcus inopinatus, Pediococcus claussenii, Lactobacillus backii, Lactobacillus brevis, Lactobacillus casei, Lactobacillus coryniformis, Lactobacillus collinoides, Lactobacillus lindneri, Lactobacillus rossiae, Lactobacillus parabuchneri, Lactobacillus paracollinoides, Lactobacillus perolens, Lactobacillus plantarum, Pectinatus cerevisiiphillus, Pectinatus frisingensis, Pectinatus haikarae, Pectinatus portalensis, Megasphaera cerevisiae, e Megasphaera elsdenii.*

O método pode compreender detectar microorganismos em qualquer produto alimentício. O produto alimentício pode ser, por exemplo, qualquer um ou mais de laticínios; gorduras, óleos, e emulsões de gordura; gelos comestíveis (incluindo, por exemplo, sorvete e picolé); frutas e vegetais (incluindo, por exemplo, cogumelos e fungos, raízes e túberos, pulsos e legumes, e aloe vera); algas marinhas; nozes e sementes; produtos de confeitaria; cereais e produtos de cereal; produtos assados (por exemplo, pão); carne e produtos de

carne (incluindo, por exemplo, frango e caça); peixes e produtos de peixe (incluindo moluscos, crustáceos, e equinodermas); ovos e produtos de ovos; adoçantes, incluindo, por exemplo, mel; sais, temperos, sopas, molhos, saladas, produtos de proteína; produtos alimentícios pretendidos para usos nutricionais particulares; e bebidas (por exemplo, cerveja e vinho). Em uma modalidade preferida, o produto alimentício é cerveja.

O termo "isolado" como usado aqui significa ter sido removido a partir de seu ambiente natural. O termo "purificado" como usado aqui quer dizer ter sido aumentado em pureza, em que "pureza" é um termo relativo, e não deve ser necessariamente concebido como de absoluta pureza. Por exemplo, a pureza pode ser pelo menos cerca de 50%, pode ser maior do que 60%, 70% ou 80%, 90% ou pode ser 100%.

Os exemplos a seguir ilustram de modo adicional a presente invenção mas, evidentemente, não devem ser concebidos como de modo a limitar de modo algum o âmbito da mesma.

EXEMPLO 1

O presente exemplo demonstra a detecção quantitativa de *L. casei* usando os ácidos nucleicos da presente invenção.

DNA genômico é isolado a partir da cepa de *L. casei* (American Type Culture Colection (ATCC) referência E-011808) usando um Kit de Extração de DNA (oferecido pela Pall Corporation, Port Washington, NY, USA). O DNA bacteriano é diluído com 10 mM de Tris-pH 8.3 a uma concentração de 83 pg/µL. Tampão Tris-pH 8.3 (10 mM) é usado como um controle sem alvo (NTC).

Um kit de teste de *L. casei* (incluindo um primer direto (SEQ ID NO: 28), um primer reverso (SEQ ID NO: 29), e uma sonda (SEQ ID NO: 30)) é usado para testar DNA a partir de *L. casei* at 0 (NTC), 10, 1,000 ou 100,000 cópias por cavidade de PCR. A sonda é marcada com corante fluorescente 6-FAM a 5' e resfriador BHQ1a 3' ou corante fluorescente ROX a 5' e resfriador BHQ2 a 3'.

Uma placa GENEDISC (oferecida pela Pall Corporation, Port Washington, NY, USA) é preparada de acordo com as instruções do fabricante.

Um kit de mistura quantitativa (q) PCR ("Master Mix") (incluído no kit de detecção GENEDISC, oferecido pela Pall Corporation, Port Washington, NY, USA) é preparado incluindo SEQ ID NOs: 28-30. O código de barras localizado na placa GENEDISC e o código de barras no cartão de identificação contido no saco Master Mix são lidos usando o leitor de código de barras adaptado ao aparelho de ciclagem GENEDISC (oferecido pela Pall Corporation, Port Washington, NY, USA). Os nomes das amostras são informados de acordo com as instruções do fabricante para o aparelho de ciclagem GENEDISC. Seis microtubos de 1,5 mL correspondendo a cada um dos setores da placa GENEDISC são marcados. O Master Mix é centrifugado por 2 segundos, e então ligeiramente centrifugado por 2 segundos. Mas-

ter Mix (37 µL) é adicionado a cada microtubo. Os microtubos são fechados. As amostras de DNA são centrifugadas em uma centrífuga de bancada por 15 segundos.

A amostra de DNA (37 µL) é transferida para o microtubo correspondente contendo o Master Mix usando uma pipeta. O tubo é fechado para evitar contaminação cruzada. Os tubos são gentilmente misturados por 2 segundos e então centrifugados por 2 segundos usando uma mini centrífuga. As referidas etapas são repetidas para cada uma das outras 5 amostras. 72 µL a partir de cada microtubo é adicionado ao setor apropriado da placa GENEDISC.

As placas GENEDISC são carregadas. A tampa de preenchimento é disposta em cima da placa GENEDISC, a tampa é gentilmente pressionada para garantir que não haja vazamento e o vácuo é iniciado. Quando o aparelho de ciclagem GENEDISC indicar que vácuo está 90% completo, a placa GENEDISC é tocada para remover quaisquer bolhas residuais. A tampa é removida após o vácuo ser liberado. Óleo mineral (4 gotas) são carregadas em cada setor de placa GENEDISC. A tampa de preenchimento é disposta na placa GENEDISC e o vácuo é iniciado. A tampa é removida no final do ciclo de vácuo e é limpa ao esfregar com 70% de etanol. As cavidades são examinadas para garantir que não hajam cavidades parcialmente não preenchidas ou preenchidas de modo não uniforme presentes que posam fazer com que o kit de teste seja abortado.

A tampa de preenchimento é substituída no local designado. A placa GENEDISC é cuidadosamente inserida no aparelho de ciclagem GENEDISC e a tampa do aparelho de ciclagem GENEDISC é fechada. O PCR é acionado usando a condição de ciclagem térmica. A condição de ciclagem térmica inclui quatro temperaturas 113 °C, 107 °C, 57 °C, e 63°C. O tempo de ciclagem é 70 segundos por ciclo por 45 ciclos. No final do PCR, a placa GENEDISC é removida e descartada.

os dados são analisados. O teste de *L. casei* (SEQ ID NOs: 28-30) quantitativamente detecta DNA alvo de *L. casei* a 10, 1,000 e 100,000 cópias por cavidade de PCR. Não há sinal na ausência do alvo ou com o controle "sem matriz" (NTC). NTC mede sinais não específicos na ausência de moléculas alvo. O controle de inibição proporciona um sinal de PCR positivo e mede o grau de inibição de PCR na presença de amostra ou de contaminante(s) na amostra.

EXEMPLO 2

O presente exemplo demonstra a especificidade dos ácidos nucleicos da presente invenção.

DNA genômico é isolado a partir de 13 bactérias de deterioração de cerveja (Tabela 2) e diluído como descritos no Exemplo 1. Tampão Tris-pH 8.3 (10 mM) é usado como um controle sem alvo (NTC). Todas as cepas bacterianas são obtidas da American Type Culture Colection (ATCC).

TABELA 2

Referência da cepa	Bactéria	Lote de DNA
E-64028	*L. brevis*	0011111LBRE-DH
E-79105	*Pectinatus cerevisiiphilus*	0010212LPEC-DH
E-052900	*L. backii*	0011111LBAC-DH
E-991161	*L. lindneri*	0011111LLIN-DH
E-91459T	*Pediococcus damnosus*	0011111PEDD-DH
E-79111T	*Megasphaera cerevisiae*	0011011MEGC-DH
E-95503T	*L. frigidus*	0011111LFRI-DH
DSM 15814	*L. rossiae*	0011111LRO-DH
E-011808	*L. casei*	0011111LCAS-DH
E-991162	*L. collinoides*	0011111LCOL-DH
E-991163	*L. coryniformis*	0011111LCOR-DH
E-89345	*L. perolens*	0011111LPER-DH
E-71034	*L. plantarum*	0011111LPLA-DH

Um kit de teste de *L. casei* (incluindo um primer direto (SEQ ID NO: 28), um primer reverso (SEQ ID NO: 29), e uma sonda (SEQ ID NO: 30)) é usado para amostras de teste de DNA a partir de cada uma das 13 diferentes bactérias da Tabela 2 de acordo com os procedimentos do Exemplo 1. Todas as sondas são marcadas com corante fluorescente 6-FAM a 5' e resfriador BHQ1a 3' ou corante fluorescente ROX a 5' e resfriador BHQ2 a 3'.

O teste de *L. casei* (SEQ ID NOs: 28-30) quantitativamente detecta DNA alvo de *L. casei* a 10, 1,000 e 100,000 cópias por cavidade de PCR. Entetanto, não há sinal positivo na presença de 100,000 cópias de cada uma das outras 12 bactérias da Tabela 2. Assim sendo, o teste de *L. casei* assay (SEQ ID NOs: 28-30) é altamente específico para *L. casei.*

Todas as referências, incluindo publicações, pedidos de patente, e patentes, citadas aqui se encontram aqui incorporados por referência na mesma extensão de se cada referência fosse individualmente e especificamente indicada como sendo incorporada por referência e onde determinado em sua totalidade aqui.

O uso dos termos "o", "a", "os", "as" e "um" e "uma" e "pelo menos um" e referências similares no contexto da descrição da presente invenção (especialmente no contexto das reivindicações a seguir) devem ser construídos de modo a cobrir não só o singular mas também o plural, a não ser que de outro modo indicado aqui ou claramente contradito pelo contexto. O uso do termo "pelo menos um" seguido por uma lista de um ou mais itens (por exemplo, "pelo menos um de A e B") deve ser construído para significar um item selecionado a partir dos itens relacionados (A ou B) ou qualquer combinação de dois ou mais dos itens relacionados (A e B), a não ser que de outro modo indicado aqui ou claramente contradito pelo contexto. Os termos "que compreende", "tendo", "incluindo", e "contendo" devem ser construídos como termos abertos (isto é, significando "incluindo, mas não limitado a",) a não ser que de outro modo observado. Recitação de faixas de valores aqui são meramente pretendidas para servir como um método abreviado de se referir individualmente a cada valor separado que se insira dentro da faixa, a não ser que de outro modo indicado aqui, e cada valor separado é incorporado na especificação como se fosse individualmente recitado

aqui. Todos os métodos descritos aqui podem ser realizados em qualquer ordem adequada a não ser que de outro modo indicado aqui ou de outro modo claramente contradito pelo contexto. O uso de qualquer e todos os exemplos, ou exemplos de linguagem (por exemplo, "tais como") proporcionados aqui, são pretendidos para meramente melhor ilustrar a presente invenção e não implicam em limitação do abito da presente invenção a não ser que de outro modo reivindicado. Nenhuma linguagem na especificação deve ser construída como indicando qualquer elemento não reivindicado como essencial par a prática da presente invenção.

Modalidades preferidas da presente invenção são descritas aqui, incluindo o melhor modo conhecido dos inventores para realizar a presente invenção. Variações das referidas modalidades preferidas podem se tornar aparentes para aqueles versados na técnica com a leitura da descrição anterior. Os inventores esperam que aqueles versados na técnica empreguem as referidas variações conforme apropriado, e os inventores pretendem para a presente invenção que ela seja praticada de outro modo além do especificamente descrito aqui. Assim sendo, a presente invenção inclui todas as modificações e equivalentes do sujeito recitado nas reivindicações anexas aqui como permitido pela lei aplicável. Ademais, qualquer combinação dos elementos acima descritos em todas as variações possíveis dos mesmos são englobados pela presente invenção a não ser que de outro modo indicado aqui ou de outro modo claramente contradito pelo contexto.

REIVINDICAÇÕES

1. Ácido nucleico, **CARACTERIZADO** pelo fato de que consiste de uma sequência de nucleotídeo selecionada a partir do grupo que consiste de SEQ ID NOs: 1-45.

2. Coleção de ácidos nucleicos, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende dois ou mais ácidos nucleicos, em que os dois ou mais ácidos nucleicos cada um dos quais consiste de uma sequência de nucleotídeo selecionada a partir do grupo que consiste de SEQ ID NOs: 1-45.

3. Coleção, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADA** pelo fato de que os dois ou mais ácidos nucleicos incluem dois ou mais diferentes ácidos nucleicos.

4. Kit de teste, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende uma coleção de ácidos nucleicos, em que a coleção é selecionada a partir do grupo que consiste de

(a) SEQ ID NOs: 1-3;

(b) SEQ ID NOs: 4-6;

(c) SEQ ID NOs: 7-9;

(d) SEQ ID NOs: 10-12;

(e) SEQ ID NOs: 13-15;

(f) SEQ ID NOs: 16-18;

(g) SEQ ID NOs: 19-21;

(h) SEQ ID NOs: 22, 24, e 27;

(i) SEQ ID NOs: 22, 25, e 27;

(j) SEQ ID NOs: 23, 26, e 27;

(k) SEQ ID NOs: 28-30;

(l) SEQ ID NOs: 31-33;

(m) SEQ ID NOs: 34-36;

(n) SEQ ID NOs: 37-39;

(o) SEQ ID NOs: 40-42; e

(p) SEQ ID NOs: 43-45.

5. Suporte, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende o ácido nucleico de acordo com reivindicação 1, a coleção de ácidos nucleicos de acordo com qualquer uma das reivindicações 2-3, ou a coleção de ácidos nucleicos do kit de teste da reivindicação 4 imobilizada no suporte.

6. Suporte, de acordo com reivindicação 5, **CARACTERIZADO** pelo fato de que adicionalmente compreende uma marcação detectável.

7. Método de detectar a presença de um ou mais microorganismos em um produto alimentício, o método **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:

(a) obter pelo menos uma amostra de teste que compreende ácido nucleico de microorganismos isolados a partir de produto alimentício;

(b) colocar em contato o ácido nucleico de acordo com a reivindicação 1, a coleção de ácidos nucleicos de acordo com qualquer uma das reivindicações 2-3, a coleção de ácidos nucleicos do kit de teste de acordo com a reivindicação 4, ou o suporte incluindo o ácido nucleico de acordo com a reivindicação 5 ou 6 com a pelo menos uma amostra de teste sob condições permitindo que um complexo se forme entre o ácido nucleico e o ácido nucleico do microorganismo;

(c) detectar o complexo; e, opcionalmente,

(d) comparar uma quantidade de complexo na pelo menos uma amostra de teste com uma quantidade de complexo a partir da amostra negativa que é desprovida de ácido nucleico de microorganismo, em que uma maior quantidade de complexo a partir da pelo menos uma amostra de teste é indicativa da presença de um ou mais microorganismos.

8. Método, de acordo com reivindicação 7, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende detectar a presença de um ou mais microorganismos que ocasionem A deterioração de produto alimentício.

9. Método, de acordo com reivindicação 7 ou 8, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende detectar a presença de um ou mais microorganismos de um ou mais gêneros selecionados a partir do grupo que consiste de *Pediococcus, Lactobacillus, Pectinatus, e Megasphaera.*

10. Método, de acordo com qualquer um de reivindicações 7-9, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende detectar a presença de um ou mais microorganismos selecionados a partir do grupo que consiste de *Pediococcus damnosus, Pediococcus inopinatus, Pediococcus claussenii, Lactobacillus backii, Lactobacillus brevis, Lactobacillus casei, Lactobacillus coryniformis, Lactobacillus collinoides, Lactobacillus lindneri, Lactobacillus rossiae, Lactobacillus parabuchneri, Lactobacillus paracollinoides, Lactobacillus perolens, Lactobacillus plantarum, Pectinatus cerevisiiphillus, Pectinatus frisingensis, Pectinatus haikarae, Pectinatus portalensis, Megasphaera cerevisiae, e Megasphaera elsdenii.*

11. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 7-10, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o produto alimentício é uma bebida.

12. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 7-11, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o produto alimentício é cerveja.

RESUMO

"COMPOSIÇÕES PARA DETECTAR MICROORGANISMOS DE DETERIORAÇÃO DO PRODUTO ALIMENTÍCIO"

A presente invenção proporciona ácidos nucleicos, coleções de ácidos nucleicos, kits de teste, e métodos para a leitura e detecção específica de microorganismos em um produto alimentício. O ácido nucleico consiste de uma sequência de nucleotídeo selecionada a partir do grupo que consiste de SEQ ID NOs: 1-45.