



DESENVOLVIMENTO DE UM BIOMARCADOR PARA CERTIFICAÇÃO DAS VARIEDADES DOS QUEIJOS MINAS ARTESANAIS

Autores: Saulo Nascimento Melo; André Luis da Costa Paiva

Palavras-chave: BACTERIA – CERTIFICAÇÃO – METAGENÔMICA - ALIMENTOS

Campus: Bambuí

Área do Conhecimento (CNPq): MICROBIOLOGIA APLICADA

RESUMO

O Instituto Mineiro de Agropecuária – IMA, através do Programa Queijo Minas Artesanal, classifica os Queijos Minas Artesanais em sete microrregiões produtoras de queijos: Araxá, Campos das Vertentes, Canastra, Cerrado, Serra do Salitre, Serro e Triângulo Mineiro. Neste programa os produtores para terem seus produtos certificados, eles devem ser cadastrados e seguir normas de higiene na construção das instalações, montagem das queijarias e manipulação. Esta certificação agrega valor aos produtos, promovendo sua comercialização no comércio local mas sobretudo em mercados fora do estado de Minas Gerais. Entretanto, o critério mais claro para se classificar um Queijo Minas Artesanal como de uma dada variedade é o geográfico (município de produção) apresenta uma relação bastante indireta com o produto em si. Neste contexto, o presente projeto se propõe a desenvolver uma ferramenta mais objetiva e científica de certificação de um produto como representante de uma das variedades de Queijo Minas Artesanal baseando-se em um dos fatores essenciais na determinação das características do queijo - a microbiota exclusiva e característica de cada variedade - utilizando uma das técnicas mais modernas e de alta sensibilidade que é identificação de grupos bacterianos utilizando análise metagenômica. Ao final da execução do projeto, espera-se que o produto desenvolvido seja utilizado como uma eficiente ferramenta de certificação dos Queijos Minas Artesanais.

INTRODUÇÃO

A fabricação artesanal de queijos no estado de Minas Gerais resulta de uma tradição secular, que surgiu como forma de aproveitamento da produção leiteira em pequenas propriedades rurais. A produção do Queijo Minas Artesanal tem como principal característica a utilização do leite cru, que ao contrário da produção convencional de queijos cuja matéria-prima é o leite pasteurizado, utiliza a microbiota presente no leite como parte do processo de produção (NOBREGA, 2007).

A utilização de parte do soro residual do processo de produção - conhecido como “pingo” - como fermento endógeno, insere no processo de produção uma microbiota diversificada, representativa da região na qual o produto é fabricado, que direcionam a fermentação e maturação do queijo conferindo as características sensoriais peculiares a cada um dos tipos de queijos artesanais (MARINO et al, 2003). Apesar do antigo conhecimento prático da importância da utilização do fermento endógeno no processo de produção de Queijos Minas Artesanais, pouco se sabe a respeito da sua composição, além de que ele é formado por uma complexa associação microbiana de comunidades de bactérias do ácido láctico (BAL) e comunidades de leveduras (PARENTE et al., 1997).



A produção de queijos em Minas Gerais é de aproximadamente 215 mil toneladas por ano, sendo aproximadamente um terço desta produção correspondente ao Queijo Minas Artesanal, produzido em mais 500 municípios mineiros. Embora o volume de produção seja significativo, a produção caracteriza-se por ser em pequena escala, fabricado diretamente nas propriedades rurais, gerando renda para cerca de 30 mil famílias de pequenos produtores rurais (EMATER, 2004).

Em 2002, o governo do estado de Minas Gerais promulgou uma lei que estabelece que os Queijos Minas Artesanais como patrimônio do Estado e, com o intuito de proteger os processos tradicionais de produção mas se preocupando com as normas sanitárias foi criado pelo Instituto Mineiro de Agropecuária – IMA o *Programa Queijo Minas Artesanal* que classifica os Queijos Minas Artesanais em sete tipos: Araxá, Campos das Vertentes, Canastra, Cerrado, Serra do Salitre, Serro e Triângulo Mineiro. Neste programa os produtores para terem seus produtos certificados, eles devem ser cadastrados e seguir normas de higiene na construção das instalações, montagem das queijarias e manipulação. Esta certificação agrega valor aos produtos, promovendo sua comercialização no comércio local mas sobretudo em mercados fora do estado de Minas Gerais (IMA, 2015).

A inclusão dos municípios produtores em cada uma das sete variedades, se dá por meio de portarias publicadas pelo IMA que definem quais são as cidades produtoras de cada variedade de queijo, cujos critérios de inclusão, em grande maioria de natureza geográfica e portanto política, uma vez que ao analisar as portarias que definem as normas de credenciamento de novos produtores, nota-se que a obtenção da certificação, em linhas gerais, se baseia em três aspectos: (1) no atendimento às condições sanitárias mínimas de matéria-prima, produção e acondicionamento; (2) algumas características sensoriais (aparência e sabor); e principalmente (3) em qual município o produto é produzido. Dentre estes três aspectos, o primeiro se aplica a todo, não sendo por si só um critério diferencial. O segundo envolve critérios diferenciais pouco objetivos o que abre margem para subjetividade (IMA, 2002a; IMA, 2002b; IMA, 2002c; IMA, 2006).

Assim, o critério mais claro para se classificar um Queijo Minas Artesanal como de uma dada variedade é o geográfico (município de produção) apresenta uma relação bastante indireta com o produto em si. Como exemplo claro desta situação, pode-se citar os produtores do município de Pratinha que cujo produto é classificado como Queijo Artesanal da microrregião de Araxá pelo IMA e comercializado na região como Queijo Artesanal do tipo Canastra por distar apenas 40 quilômetros do município de Medeiros, importante município produtor do tipo Canastra (IMA, 2003; IMA, 2004). Dessa forma, a ausência de critérios claros e diretamente relacionados ao produto em si, prejudica produtores e principalmente a comunidade em geral que acaba pagando mais caro por consumir um queijo com a certificação de classificação como Queijo Minas Artesanal de uma dada variedade.

Até a década de 1980 a classificação e identificação de bactérias, se baseavam em comparações fenotípicas, incluindo características morfológicas, fisiológicas, metabólicas e químicas das células. Entretanto, com o surgimento e principalmente a consolidação das técnicas de sequenciamento de DNA a partir dos anos 2000, associado à utilização do sequenciamento do gene de RNA ribossômico 16S (rRNA) como marcador molecular de caracterização de grupos bacterianos de bactérias, a classificação e a identificação de grupos de Bacteria e Archea se tornou mais acessível e tem fornecido informações consideráveis sobre a composição e o papel desempenhado pelas comunidades de bactérias que participam tanto do processo de produção de alimentos quanto aquelas que são consideradas



contaminantes de alimentos e causam danos à saúde, sem a necessidade de isolamento e cultivo (RAPPÉ & GIOVANNONI, 2003; TRINGE & HUGENHOLTZ, 2008; ERCOLINI, 2013).

A reconhecida utilidade da caracterização do rRNA 16S nos estudos de caracterização de comunidades bacterianas vem do tamanho adequado para ser estudado e por possuir regiões filogeneticamente informativas em sua sequência que permitem a atribuição de uma amostra a uma dada espécie bacteriana apenas pelas diferenças específicas que esta região apresenta (MADIGAN et al., 2004). Entretanto, até o início dos anos 2000, a grande maioria dos trabalhos deste tipo apresentavam como limitação a necessidade de cultivo e construção de bibliotecas para isolamento das diferentes sequências de DNA presentes na comunidade para posterior sequenciamento (PONTES et al., 2007).

A partir de 1996 e principalmente no final dos anos 2000 com a popularização dos métodos de sequenciamento de nova geração, o sequenciamento de rRNA 16S obtidas de amostras tornou-se independente de cultivo e ampliou o número de sequências geradas em até 1000 vezes com o mesmo custo e num tempo cerca de 100 vezes menor, desencadeando um “boom” na em sua aplicação (XU, 2011). Esta facilidade em obter sequências de DNA, fez florescer a “Era da Metagenômica” no qual se tornou possível a obtenção de milhares de sequências de DNA, quaisquer bactéria presente numa amostra de qualquer material: água, solo, alimentos, efluentes. As análises de metagenômica vêm permitindo os cientistas, nos últimos anos, desvendar a vasta diversidade de microrganismos cultiváveis e não cultiváveis (incluindo os mais raros), descobrir genes biotecnologicamente interessantes e novas vias metabólicas (CHISTOSERDOVA, 2010).

Dessa forma, a caracterização de comunidades bacterianas na indústria de alimento passou de uma tarefa extremamente árdua na década de 80 para uma tarefa relativamente simples na década atual (ERCOLINI, 2013). Ainda considerando o contexto do projeto, a aplicação da metagenômica na determinação dos grupos bacterianos que compõem a microbiota associada à produção de cada uma das variedades de Queijo Minas Artesanal, permitiria traçar um perfil da microbiota de cada variedade. Este perfil pode ser utilizado como um critério objetivo e científico de certificação de um produto como representante de uma das variedades de Queijo Minas Artesanal baseando-se em um dos fatores essenciais na determinação das características do queijo - a microbiota exclusiva e característica de cada variedade.

METODOLOGIA

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E AMOSTRAGEM

Em linhas gerais o delineamento experimental do projeto está estruturado em 4 etapas: (1) Obtenção de amostras de queijos das sete variedades; (2) caracterização dos grupos bacterianos presentes nas amostras coletadas por meio de análises de metagenômica; (3) estabelecimento de perfil de grupos bacterianos característicos de cada uma das sete variedades de Queijo Minas Artesanal e construção um painel biomarcador para as variedades Queijo Minas Artesanal a ser utilizado como parâmetro de certificação.

A amostragem constituirá de aquisição de amostras (peças) de Queijos Minas Artesanais de pelo menos três diferentes produtores certificados pelo IMA, para cada uma das sete variedades. As amostras serão adquiridas diretamente com o produtor ou em pontos comerciais para aqueles produtos que apresentem algum tipo de identificação de origem.



IDENTIFICAÇÃO DOS GRUPOS BACTERIANOS PRESENTES NAS AMOSTRAS

A identificação dos grupos bacterianos será realizada por meio de análises de metagenômica que, em linhas gerais, consiste na extração do DNA total da amostra seguido da amplificação e sequenciamento de trechos específicos do DNA bacteriano (região V1 do gene ribossomal 16S). A sequência de DNA destes trechos são peculiares a cada espécie bacteriana permitindo assim a sua identificação por meio de comparação com bancos de dados de sequências do mesmo trecho do DNA de bactérias de todo o mundo.

A extração do DNA de cada amostra (peça de queijo) será a partir de dois fragmentos de 1 cm³ da amostra: um deles coletados na porção mediana e o outro na porção da extremidade. O DNA será extraído utilizando um kit comercial específico para material ambiental (solo, água e alimentos).

As sequências de DNA serão geradas por um dos métodos dos coletivamente chamados de Sequenciamento de Nova Geração que gera milhares de sequências de DNA do trecho amplificado num único experimento. Neste projeto utilizaremos a plataforma desenvolvida pela empresa Illumina® que adota o sequenciamento por síntese, ou seja, utiliza DNA polimerase e nucleotídeos marcados com diferentes fluoróforos. Os fragmentos de DNA ligados a adaptadores fixos são desnaturados em DNA fita simples, inseridos e fixados à flowcell, lâmina de vidro onde ocorre o sequenciamento. Em seguida, é feita a amplificação dos fragmentos de DNA ligados à flowcell através de uma estrutura em forma de “ponte” para formar clusters que contém fragmentos de DNA clonados. Os nucleotídeos com corantes fluorescentes diferentes incorporados e o sinal gerado é captado e interpretado pelo sequenciador (LIU et al, 2012).

As sequências geradas são posteriormente avaliadas quanto a sua qualidade utilizando ferramentas de bioinformática PRINSEQ, MOTHUR e UCHIME que, em linhas gerais, identifica e elimina sequências de baixa qualidade e artefatos do processo do sequenciamento. As sequências de DNA resultantes (denominadas tecnicamente de OTUs) serão comparadas com dois bancos de dados que armazenam sequências de OTUs de bactérias já caracterizadas em estudos prévios: o GenBank e o Greengenes. Como critério de atribuição de uma sequência gerada à uma dada espécie dos bancos de dados, será utilizada um grau de similaridade um mínimo de 97%, segundo recomendado por DRANCOURT et al. (2000). Por fim, curvas de rarefação serão calculadas para estimar de o número de sequências utilizadas na análise são estatisticamente suficiente para representar a comunidade bacteriana amostrada.

Como resultado das análises de metagenômica, obtem-se uma lista de gêneros e espécies bacterianas presentes em cada uma das amostras coletadas. Estes dados serão utilizados na etapa posterior de caracterização dos grupos bacterianos típicos de cada variedade de Queijo Minas Artesanal.

DESENVOLVIMENTO DO BIOMARCADOR

Após a identificação dos grupos bacterianos presentes em todas as amostras analisadas para cada variedade de Queijo Minas Artesanal, será realizada uma compilação de todos os grupos presentes em cada variedade de forma a identificar quais são os grupos característicos de cada variedade (grupos biomarcadores).

Após a identificação dos grupos biomarcadores, será construído um painel, agrupando todas as informações sobre os grupos biomarcadores, de forma que a certificação de qualquer amostra de Queijo Minas Artesanal a uma dada variedade, será realizada pela presença destes grupos biomarcadores.

Até o presente momento, foram realizadas pesquisas bibliográficas sobre o tema do trabalho por parte do aluno bolsista e levantamento dos materiais a serem adquiridos por parte do professor coordenador do projeto. A execução está programada para se iniciar tão logo os recursos de custeio e capital estiverem disponíveis.

CONCLUSÕES

Não há dados gerados para estabelecimento de conclusões.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

CHISTOSERDOVA, Ludmila. Recent progress and new challenges in metagenomics for biotechnology. **Biotechnology letters**, v. 32, n. 10, p. 1351-1359, 2010.

DRANCOURT, Michel et al. 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. **Journal of clinical microbiology**, v. 38, n. 10, p. 3623-3630, 2000.

EMPRESA, DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA E. EXTENSÃO. RURAL-EMATER. Queijos tradicionais de Minas com mais qualidade. **Revista da EMATER**, v. 22, n. 80, p. 8-9, 2004.

ERCOLINI, Danilo. High-throughput sequencing and metagenomics: moving forward in the culture-independent analysis of food microbial ecology. **Applied and environmental microbiology**, v. 79, n. 10, p. 3148-3155, 2013.

INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. 2002a. Portaria nº 517, de 14 de junho de 2002. Estabelece normas de defesa sanitária para rebanhos fornecedores de leite para produção de queijo minas artesanal. Disponível em: <http://www.ima.mg.gov.br/component/docman/doc_details/209-portaria-517>. Acesso em: 14 out. 2015.

INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. 2002b. Portaria nº 518, de 14 de junho de 2002. Dispõe sobre requisitos básicos das instalações, materiais e equipamentos para a fabricação do queijo minas artesanal. Disponível em: <http://www.ima.mg.gov.br/component/docman/doc_details/210-portaria-518>. Acesso em: 14 out. 2015.

INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. 2002c. Portaria nº 523, de 3 de julho de 2002. Dispõe sobre as condições higiênico-sanitárias e boas práticas na manipulação e fabricação do queijo minas artesanal. Disponível em: <http://www.ima.mg.gov.br/component/docman/doc_details/212-portaria-523>. Acesso em: 14 out. 2015.

INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. 2003. Portaria nº 594, de 10 de junho de 2003. Identifica a microrregião de Araxá. Disponível em: <http://www.ima.mg.gov.br/component/docman/doc_details/244-portaria-594>. Acesso em: 14 out. 2015.

INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. 2004. Portaria nº 694, de 17 de novembro de 2004. Identifica a microrregião da Canastra. Disponível em: <http://www.ima.mg.gov.br/component/docman/doc_details/276-portaria-694>. Acesso em: 14 out. 2015.

INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. 2006. Portaria 818. Baixa o regulamento técnico de produção do queijo minas artesanal e dá outras providências. Disponível em: <http://www.ima.mg.gov.br/component/docman/doc_details/338-portaria-818>. Acesso em: 14 out. 2015.

INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. 2014a. Requerimento registro queijaria QMA. Disponível em: <http://www.ima.mg.gov.br/material-curso-cfo-cfoc/doc_details/1628-requerimento-registro-queijaria-qma>. Acesso em: 14 out. 2015.



INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. 2015. **Queijo Minas Artesanal**. Disponível em: <
<http://www.ima.mg.gov.br/certificacao/queijo-minas-artesanal-link>>. Acesso em: 14 out. 2015.

LIU, Lin et al. Comparison of next-generation sequencing systems. **BioMed Research International**, v. 2012, 2012.

MADIGAN, Michael T. et al. **Microbiologia de Brock**. Artmed, 2004.

MARINO, Marilena; MAIFRENI, Michela; RONDININI, Gabriella. Microbiological characterization of artisanal Montasio cheese: analysis of its indigenous lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 229, n. 1, p. 133-140, 2003.

NÓBREGA, J. E. **Caracterização do fermento endógeno utilizado na fabricação do queijo Canastra no município de Medeiros, Minas Gerais, com ênfase em leveduras**. Viçosa: UFV. 2007. 82p. Dissertação de mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa.

PARENTE, Eugenio et al. Characterization of natural starter cultures used in the manufacture of Pasta Filata cheese in Basilicata (Southern Italy). **International Dairy Journal**, v. 7, n. 12, p. 775-783, 1997.

PONTES, Daniela Santos et al. Molecular approaches: advantages and artifacts in assessing bacterial diversity. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 34, n. 7, p. 463-473, 2007.

RAPPÉ, Michael S.; GIOVANNONI, Stephen J. The uncultured microbial majority. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 369-394, 2003.

TRINGE, Susannah G.; HUGENHOLTZ, Philip. A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene. **Current opinion in microbiology**, v. 11, n. 5, p. 442-446, 2008.

XU, Jianping. Microbial ecology in the age of metagenomics. **Handbook of Molecular Microbial Ecology I: Metagenomics and Complementary Approaches**, p. 111-122, 2011.

Participação em Congressos, publicações e/ou pedidos de proteção intelectual:

Ainda não foram gerados dados a serem publicados ou apresentados.