



RELATÓRIO FINAL

Caracterização da diversidade microbiana componente do fermento endógeno utilizado na produção do Queijos Minas Artesanais por meio de análise metagenômica

Ana Flávia Silveira Santos⁽¹⁾, Gabriel Henrique Oliveira Silva⁽¹⁾, Gustavo Augusto Lacorte⁽²⁾

⁽¹⁾Estudante do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas - Instituto Federal de Minas Gerais (IFMG) - Campus Bambuí.

⁽²⁾ Professor orientador - IFMG - Campus Bambuí

RESUMO

A produção do Queijo Minas Artesanal (QMA) representa um relevante segmento da cadeia produtiva do leite no Estado de Minas Gerais, sobretudo para a agroindústria familiar. Atualmente são reconhecidas 10 regiões produtoras de QMA em que utiliza a adição do fermento endógeno conhecido popularmente como “pingo”. A microbiota do pingo inclui uma grande diversidade de grupos bacterianos e fúngicos que através do seu metabolismo podem conferir propriedades sensoriais desejáveis aos queijos. Neste projeto assumimos como premissa básica que como os pingos são compostos por microrganismos nativos de cada ambiente de produção, sua composição microbiana apresenta assinaturas regionais, mas também sobre variações sazonais associadas a fatores climáticos marcados pelas estações seca e úmida típicas do Estado de Minas Gerais. Neste contexto, o objetivo geral deste projeto é realizar uma caracterização da composição microbiológica dos pingos utilizados nas regiões produtoras de QMA, em amostragens realizadas de forma pareada nas estações seca e úmida na tentativa de se identificar potenciais assinaturas microbiológicas regionais e também possíveis padrões de variação sazonal. Identificamos microrganismos comuns (dominantes) que já foram relatados na literatura como relacionados ao processo de produção do queijo. Por outro lado, também observamos grupos específicos relacionados a cada variedade de queijo Minas artesanal, destacando a importância de comunidades microbianas indígenas representativas para a determinação de atributos sensoriais típicos de cada variedade de queijo Minas artesanal.

Palavras-chave: Sazonalidade; QMA; Alimentos; DNA; Metataxonomia



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 lático (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 atualmente em 10 tipos, de acordo com a região produtora: Araxá, Campos das Vertentes, Canastra, Cerrado, Diamantina, Entre Serras da Piedade, Serra do Salitre, Serras da Ibitipoca, 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).

Atualmente existem trabalhos científicos abordando o papel dos fermentos endógenos na produção de queijos artesanais que apontam para a relação entre o uso destes fermentos e a determinação de características sensoriais dos produtos finais. Porém a maioria destes trabalhos foram realizados em regiões de clima temperado, cuja aplicabilidade de suas conclusões para queijos artesanais produzidos em ambientes tropicais é limitada. As informações disponíveis sobre a composição da microbiota dos fermentos endógenos utilizados na produção dos Queijos Minas Artesanais são escassas, fragmentada e enviesada para um pequeno número de regiões produtoras.

As regiões produtoras de QMA apresentam diferenças nas suas condições edafoclimáticas que influenciam tanto na composição do leite cru utilizado quanto nas condições de produção dos queijos. Baseando-se nestas evidências, assume-se como premissa básica que como os pingos são compostos por microrganismos nativos de cada ambiente de produção, sua composição microbiana apresenta assinaturas regionais, mas também sobre variações sazonais associadas a fatores climáticos marcados pelas estações seca e úmida típicas do Estado de Minas Gerais. Esta é uma lacuna de conhecimento crucial para o aprimoramento da cadeia produtiva de queijos artesanais a ser explorada.

Determinar a variação sazonal da diversidade microbiológica do fermento endógenos (pingos) utilizado na produção dos Queijos Minas Artesanais (QMAs) em suas regiões é importante para



gerar o conhecimento necessário para definir recomendações e protocolos que aperfeiçoem a utilização do pingo em diferentes períodos do ano. Os resultados gerados podem contribuir para aumentar a segurança da cadeia de produção dos QMAs, uma vez que conhecendo melhor o comportamento sazonal da microbiota bem como as assinaturas microbiológicas de cada região produtora, é possível definir com maior assertividade os procedimentos para favorecer a manutenção de microrganismos desejáveis bem como traçar estratégias para inibir o crescimento de microrganismos indesejáveis a serem identificados ao longo da execução do projeto.

OBJETIVOS

O objetivo geral deste projeto foi realizar uma caracterização da composição microbiológica dos pingos utilizados nas 10 regiões produtoras de QMA, em amostragens realizadas de forma pareada nas estações seca e úmida na tentativa de se identificar potenciais assinaturas microbiológicas regionais e também possíveis padrões de variação sazonal.

METODOLOGIA

Neste projeto foram utilizadas amostras de fermento endógeno coletados para execução do projeto financiado pelo Edital Universal da FAPEMIG de 2022, aprovado pelo pesquisador coordenador desta proposta. O projeto original tem como objetivo realizar uma caracterização físico-química e quantificação de bactérias do ácido láctico, leveduras e microrganismos patogênicos presentes nos fermentos em amostras de todas as regiões produtoras de QMA nas estações seca e úmida.

Como forma de aproveitar o banco de amostras a serem coletadas com financiamento da FAPEMIG, este projeto utilizou o mesmo delineamento amostral do projeto original, mas se propondo a realizar as análises metataxonômicas utilizando sequenciamento de alta produtividade de marcadores moleculares de identificação taxonômica de fungos e bactérias presentes nas amostras. O desenho experimental envolveu o acesso a amostras de empreendimentos representantes das regiões produtoras de QMA.

O DNA total de cada amostra de pingo foi extraído a partir da ressuspensão em água ultrapura (200 µl) do corpo de fundo de uma fração de 50 ml de pingo mantido sob centrifugação por 20 minutos a 4000 rpm. Foi utilizado o kit de extração de DNA Milk Bacterial DNA Isolation Kit (Norgen Bioteck Corp., Thorold, Canada) seguindo as instruções do fabricante. A



caracterização da composição das comunidades procarióticas típicas de cada amostra foi realizada através do sequenciamento da região hipervariável V4 do gene ribossomal rDNA 16S e para caracterização das comunidades fúngicas será utilizada a região do espaçador ITS2, seguindo as recomendações propostas pela iniciativa Earth Microbiome Project (GILBERT et al., 2014). Os amplicons produzidos em triplicata foram combinados e purificados utilizando o sistema de esferas magnéticas Sera-Mag (Cytiva, Merck Group). As bibliotecas de amplicons geradas para cada amostra foram reunidas após processo de normalização. Os pools de amostras foram submetidos ao sequenciamento utilizando a plataforma Illumina MiSeq no esquema de “pontas pareadas” (paired-end) equitativo (2 x 250) para o marcador do gene 16S e no esquema de “ponta única” (single-end) (1 x 500) para o marcador ITS.

Todo o tratamento dos dados gerados no sequenciamento foi realizado utilizando a plataforma bioinformática de análise de dados de microbiomas gerados por sequenciamento de nova geração QIIME2™ (BOLYEN et al., 2019). O módulo DEMUX foi utilizado para separar as sequências brutas de cada amostra sequenciada (considerada aqui como biblioteca de leituras de sequenciamento) através do trecho identificador chamado de barcode. O módulo DEMUX foi também utilizado para gerar relatórios interativos de qualidades das leituras para embasamento dos pontos de corte das leituras. O módulo DENOISE foi utilizado para remover os iniciadores das leituras, cortar os trechos de baixa qualidade, identificar e remover sequências quimeras, unir as leituras diretas e reversas e identificar as diferentes leituras, chamadas de ASVs (amplicon sequencing variants), utilizando o método de DADA2. Cada uma das diferentes ASVs foram assumidas nas análises posteriores com a unidade taxonômica básica e terão a sua taxonomia estimada utilizando o classificador Naïve Bayes Classifier.

Para as análises dos dados foi utilizada a plataforma QIIME2™ (BOLYEN et al., 2019) para gerar vetores de alfa-diversidade bem como matrizes de beta-diversidade, utilizando um ponto de corte o ponto de inflexão da curva de rarefação gerada para as ASVs. As análises comparativas entre os grupos foram realizadas através de análise multivariada de coordenadas principais (PCoA) com a proposta de identificar padrões gerais de similaridade entre amostras dos grupos de teste. As análises de composição de grupos bacterianos (beta-diversidade) basearam-se no cálculo de matrizes de dissimilaridade utilizando-se três diferentes métricas: Bray-curtis, Unifrac não-ponderada e Unifrac ponderada. Testes de agrupamento serão realizados através de PERMANOVA (Permutational Multivariate Analysis of Variance)

assumindo o nível de significância de 5%, utilizando plataforma QIIME2™ (BOLYEN et al., 2019). As análises de alfa-diversidade serão realizadas baseando-se em quatro métricas: riqueza de ASVs pelo estimador Chao-1, índice de diversidade de Shannon, índice de diversidade filogenética de Faith e índice de equitabilidade de Pielou. Testes de Wilcoxon pareados serão realizados para verificar diferenças significativas entre comunidades bacterianas dos grupos de teste. As abundâncias relativas dos filos bacterianos com frequências superiores a 1% forma apresentadas em gráficos de barras. Teste Exato de Fisher será utilizado para verificar diferenças significativas na frequência dos filos dominantes entre os grupos comparativos, utilizando o software R (versão 3.3.2).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste trabalho nós detectamos a presença de alguns filotipos difundidos entre as variedades, pertencentes a gêneros bem conhecidos relacionados à microbiota do queijo, como os gêneros LAB *Lactococcus* e *Streptococcus*, bem como os fungos *Diutinia* (*Candida*), *Kodamaea* e *Debaryomyces*, que devem realizar vias metabólicas importantes durante a fabricação artesanal do queijo Minas (Figura 1).

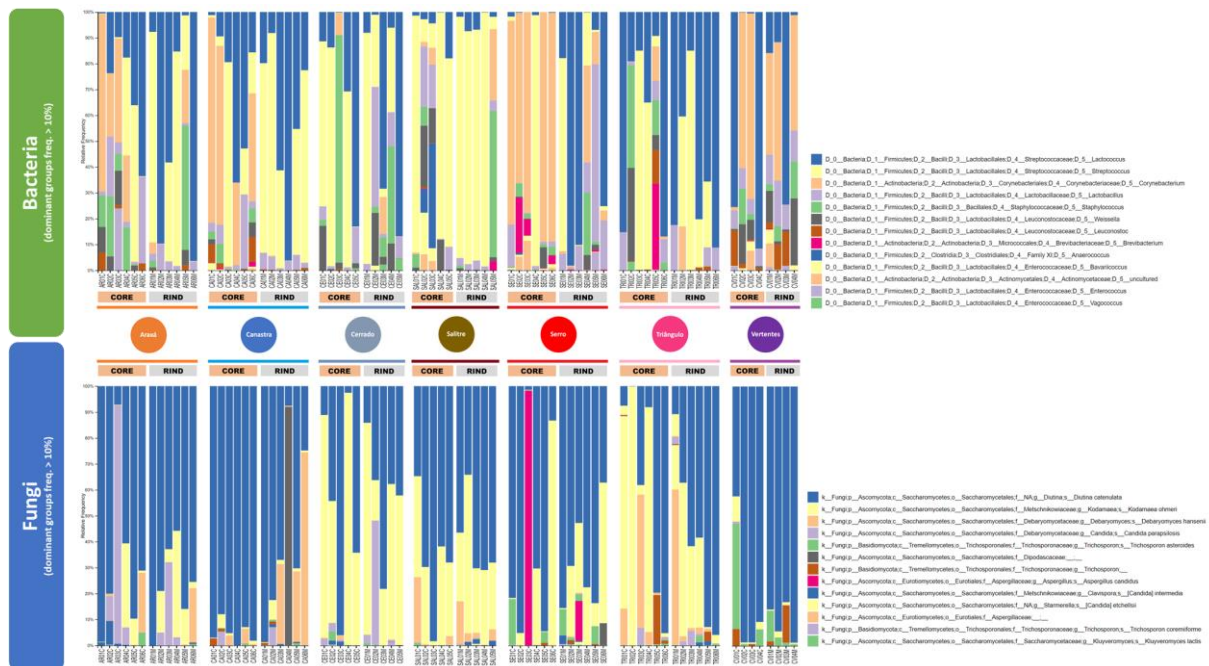


Figura 1. Gráfico de frequência de grupos bacterianos e fúngicos presentes nas amostras agrupados por microrregião.

Grandes diferenças na composição microbiana foram para duas das sete variedades (Vertentes e Serro), retratando as diferenças entre esses dois microambientes em relação aos processos ecológicos e metabólicos (Figura 2 e Tabela 1).

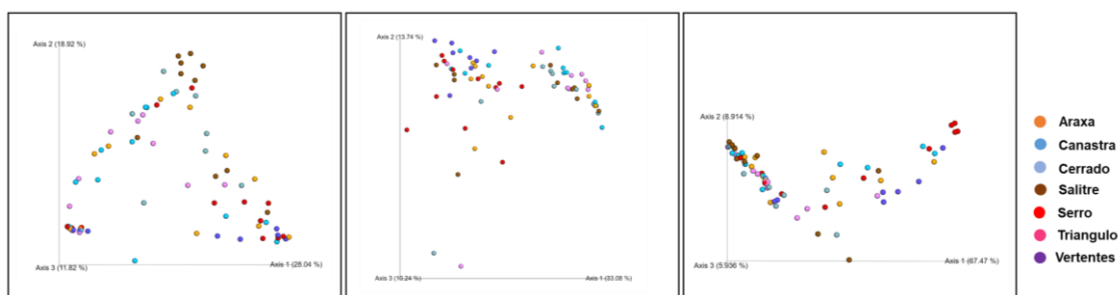


Figura 1. Análise de coordenadas principais realizada por três métodos de geração de matrizes de dados: Bray-curtis (esquerda), Unifrac não-ponderada (centro) e Unifrac ponderada (direita).

As comunidades de fungos apresentaram diferenças entre as comunidades, mas entre as variedades de queijo não foi possível encontrar o mesmo padrão, provavelmente devido à presença de grupos de fungos dominantes (*Diutinia*, *Kodamaea* e *Debaryomyces*) em todas as comunidades de queijo (Tabela 1).

Tabela 1. β -Análises de diversidade para amostras de cada microrregião produtora do QMA (comparações de pares por PERMANOVA)

Pairwise comparisons (PERMANOVA)		Bray-curtis	Unweighted	Weighted	Pairwise comparisons (PERMANOVA)		Bray-curtis	Unweighted	Weighted
Group 1	Group 2	p-value	p-value	p-value	Group 1	Group 2	p-value	p-value	p-value
Core communities					Rind communities				
Araxa	Canastra	0.441	0.331	0.229	Araxa	Canastra	0.786	0.750	0.839
	Cerrado	0.566	0.242	0.739		Cerrado	0.315	0.181	0.083
	Salitre	0.047	0.185	0.537		Salitre	0.011	0.224	0.162
	Serro	0.277	0.162	0.458		Serro	0.036	0.090	0.075
	Triangulo	0.359	0.835	0.929		Triangulo	0.287	0.193	0.215
	Vertentes	0.070	0.051	0.011	Vertentes	0.501	0.227	0.682	
Canastra	Cerrado	0.654	0.226	0.067	Canastra	Cerrado	0.219	0.286	0.081
	Salitre	0.072	0.009	0.322		Salitre	0.015	0.614	0.106
	Serro	0.438	0.010	0.015		Serro	0.122	0.201	0.133
	Triangulo	0.630	0.425	0.109		Triangulo	0.248	0.373	0.153
	Vertentes	0.013	0.007	0.003		Vertentes	0.772	0.194	0.779
Cerrado	Salitre	0.357	0.299	0.334	Cerrado	Salitre	0.410	0.145	0.281
	Serro	0.860	0.054	0.667		Serro	0.014	0.023	0.013
	Triangulo	0.187	0.480	0.628		Triangulo	0.765	0.681	0.737
	Vertentes	0.201	0.022	0.054		Vertentes	0.275	0.072	0.111
	Serro	0.035	0.419	0.198		Serro	0.006	0.125	0.015
Salitre	Triangulo	0.005	0.262	0.215	Salitre	Triangulo	0.045	0.182	0.389
	Vertentes	0.021	0.014	0.048		Vertentes	0.024	0.144	0.158
	Triangulo	0.248	0.187	0.349		Serro	0.002	0.182	0.020
Serro	Vertentes	0.225	0.052	0.068	Serro	Vertentes	0.215	0.085	0.251
	Vertentes	0.017	0.025	0.009		Triangulo	0.256	0.072	0.174



CONCLUSÕES

Identificamos microrganismos comuns (dominantes) que já foram relatados na literatura como relacionados ao processo de produção do queijo. Por outro lado, também observamos grupos específicos relacionados a cada variedade de queijo Minas artesanal, destacando a importância de comunidades microbianas indígenas representativas para a determinação de atributos sensoriais típicos de cada variedade de queijo Minas artesanal.

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 fermentoendógeno 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.