



**BRUNA ISABELLA REIS CESARIO**

**SUCCESSÃO MICROBIANA NO PROCESSO DE MATURAÇÃO  
DO QUEIJO MINAS ARTESANAL PRODUZIDO NA REGIÃO  
DE ARAXÁ- MG, COM A PRESENÇA DE MOFO BRANCO**

**LAVRAS - MG  
2022**

**BRUNA ISABELLA REIS CESARIO**

**SUCESSÃO MICROBIANA NO PROCESSO DE MATURAÇÃO DO QUEIJO MINAS  
ARTESANAL PRODUZIDO NA REGIÃO DE ARAXÁ-MG, COM A PRESENÇA DO  
MOFO BRANCO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Ciência dos Alimentos, para obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Luís Roberto Batista  
Orientador (a)

Dra. Fabiana Reinis Franca Passamani  
Coorientador (a)

**LAVRAS - MG**

**2022**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Reis Cesario, Bruna Isabella.

Sucessão microbiana no processo de maturação do Queijo  
Minas Artesanal produzido na região de Araxá-MG, com a presença  
do mofo branco / Bruna Isabella Reis Cesario. - 2022.

74 p. : il.

Orientador(a): Luis Roberto Batista.

Coorientador(a): Fabiana Reinis Franca Passamani.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de  
Lavras, 2022.

Bibliografia.

1. Microbiota. 2. *Geotrichum candidum*. 3. Metagenômica  
*shotgun*. I. Batista, Luis Roberto. II. Passamani, Fabiana Reinis

**BRUNA ISABELLA REIS CESARIO**

**SUCESSÃO MICROBIANA NO PROCESSO DE MATURAÇÃO DO QUEIJO MINAS  
ARTESANAL PRODUZIDO NA REGIÃO DE ARAXÁ-MG, COM A PRESENÇA DO  
MOFO BRANCO**

**MICROBIAL SUCCESSION IN THE RIPENING PROCESS OF MINAS  
ARTISANAL CHEESE FROM ARAXÁ-MG, IN THE PRESENCE OF WHITE MOLD**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Micologia de Alimentos, para obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 29 de abril de 2022

Dr. Luiz Ronaldo de Abreu UFLA

Dra. Juliana Jorge Paschoal FAZU

Prof. Dr. Luís Roberto Batista  
Orientador (a)

Dra. Fabiana Reinis Franca Passamani  
Coorientador (a)

**LAVRAS - MG  
2022**

Raphael e Benedito, por vocês.

*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e aos bons espíritos que estiveram ao meu lado inspirando-me e dando-me forças para que este trabalho fosse realizado.

Agradeço à Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos pela oportunidade e pelo apoio para a realização deste trabalho. Bem como, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e também à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio dado a esta pesquisa.

Ao professor Luís Roberto Batista, pela confiança, leveza e orientação nesses anos de projeto e pesquisa. À Fabiana Reinis Franca Passamani, pela coorientação, amizade e crença no meu potencial. Ao professor Luiz Ronaldo de Abreu, pelo conhecimento dividido de forma tão genuína.

À técnica de laboratório Cleusa Maria, pelas análises físico-químicas realizadas e pela disponibilidade em ajudar sempre.

Ao meu esposo Raphael, por estar sempre ao meu lado sendo minha força, meu esteio e minha motivação perante as dificuldades. Obrigada por sempre vibrar, verdadeiramente, por mim.

Ao meu filho Benedito, minha grande inspiração para ir adiante. Você é minha luz e meu amor.

Aos meus pais Adejamir (*in memoriam*) e “Lola” (*in memoriam*) que de onde estão, com certeza, encontram-se orgulhosos e felizes.

Às parentes queridas Mãe Isabel, Tia Cedna, Avó Tuta, Tia Lucia Helena, minha sogra Adriana, por serem mulheres fortes que me ensinaram a ser forte também. Ao meu Tio Neliton (Paizão), ao meu sogro Caru, à Paloma e à Flora, pelo amor de vocês segui firme o caminho. Também ao meu irmão Alisson e aos meus sobrinhos Joaquim (Zé) e Isadora (Dodora), por sempre me fazerem rir, tornando esta trajetória mais leve.

Em especial aos produtores e amigos Ravana, Marli e Joel, sem vocês esse projeto não seria realizado.

Aos meus colegas de laboratório e mestrado, que se tornaram uma família, em especial Miriam, Michele, João Pedro, Ianca, Suzana e Natasha, agradeço por serem meu lar longe de casa. E à minha querida Luciana, “Lulu” pelos cuidados destinados ao Benê, pela lealdade e pela amizade.



*“Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muito, nos aproxima.”*

**Louis Pasteur**

## RESUMO

Feito na região de Araxá-MG, o Queijo Minas Artesanal (QMA) é maturado com a presença do mofo branco – obtido de leite cru e “pingo” – e, nesse sentido, carrega uma vasta gama de microrganismos que, somada às características culturais, ambientais e tradicionais do feitiço do queijo araxaense, fornece atributos especiais e particulares a este laticínio produzido na cidade mineira. A microbiota dos queijos artesanais ainda não foi totalmente desvendada no que se diz respeito aos fungos filamentosos, às leveduras e às bactérias que qualificam o *Terroir* das diversas regiões produtoras. O objetivo deste estudo foi identificar os microrganismos envolvidos na qualidade, identidade e autenticidade regional dos queijos, por meio do reconhecimento e da categorização de fungos filamentosos, leveduras e bactérias característicos do Queijo Minas Artesanal, produzido na região de Araxá-MG, bem como analisar comportamentos e sucessões de dominância durante a maturação e também averiguar as características físico-químicas desse produto lácteo. As amostras foram coletadas em queijaria certificada na região de Araxá-MG, no período das águas, no decorrer do período de maturação (0, 15, 30 e 60 dias). Obteve-se um total de 187.010 sequências de qualidade adequadas para leitura (*reads*), com média de 46.752 *reads* por amostra ao nível taxonômico de espécies e gêneros de fungos e de bactérias. Quanto aos parâmetros físico-químicos, somente pH, umidade e proteína apresentaram diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) ao longo da maturação. As espécies bacterianas mais abundantes foram *Lactococcus lactis subsp. lactis* CV56, *Corynebacterium variabile* DSM 44702, *Brevibacterium aurantiacum*, *Streptococcus salivarius* 57.I, *Streptococcus thermophilus*, *Vibrio casei*, *Bacillus cereus*, *Lactobacillus brevis*, *Streptococcus equinus*, *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus vestibularis* e *Leuconostoc mesenteroides*. As espécies de fungos mais abundantes foram as leveduras *Candida catenulata*, *Geotrichum candidum*, *Kluyveromyces lactis* e *Torulaspota delbrueckii*. Espécies de fungos filamentosos não apresentaram abundância relativa significativa. Os gêneros mais abundantes de bactérias foram, *Streptococcus* sp., *Actinoalloteichus* sp., *Marinomonas* sp., *Lactococcus* sp, quanto aos fungos, os mais abundantes foram as leveduras *Kluyveromyces* sp. *Candida* sp., *Saccharomyces* sp. e *Torulaspota* sp. e o gênero de fungos filamentosos *Fusarium* sp. A partir da identificação e do comportamento das espécies e dos gêneros, foi possível obter mais informações sobre a microbiota do QMA de Araxá-MG.

Palavras-chave: Microbiota. *Geotrichum candidum*. Metagenômica *Shotgun*.

## ABSTRACT

Minas Artesanal Cheese (QMA) produced in Araxá-MG is ripened in the presence of white mold obtained from raw milk and “pingo”, which carry a wide range of microorganisms, that alongside cultural, environmental, and cheese manufacturing characteristics provide unique and particular attributes to the cheeses produced in this place. The microbiota of artisanal cheeses has not yet been fully revealed concerning filamentous fungi, yeasts, and bacteria that make up the terroir of the various producing regions. This study aimed to identify the microorganisms involved in the quality, identity and regional authenticity of cheeses through the identification of bacteria, filamentous fungi and yeasts on Minas Artesanal Cheese produced in the region of Araxá-MG, their behavior and dominance successions during ripening, as well as analyzing physicochemical characteristics of the cheese. The samples were collected on a certified farm from Araxá-MG, during the rainy season, and during the ripening period (0, 15, 30, and 60 days). A total of 187,010 quality sequences suitable for reading (reads) were generated, with an average of 46,752 reads per sample at the taxonomic level of species and genera of fungi and bacteria. As for the physicochemical parameters, only pH, moisture and protein showed statistical differences ( $p < 0.05$ ) throughout ripening. The most abundant bacterial species were *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CV56, *Corynebacterium variabile* DSM 44702, *Brevibacterium aurantiacum*, *Streptococcus salivarius* 57.I, *Streptococcus thermophilus*, *Vibrio casei*, *Bacillus cereus*, *Lactobacillus brevis*, *Streptococcus equinus*, *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus vestibularis*, and *Leuconostoc mesenteroides*. The most abundant fungal species were *Candida catenulata*, *Geotrichum candidum*, *Kluyveromyces lactis*, and *Torulaspora delbrueckii*. No significant relative abundance was observed for filamentous fungi species. The most abundant genera of bacteria were *Streptococcus* sp., *Actinoalloteichus* sp., *Marinomonas* sp., *Lactococcus* sp. As for fungi, the most abundant were the yeasts *Kluyveromyces* sp. *Candida* sp., *Saccharomyces* sp., and *Torulaspora* sp. and the filamentous fungi genus *Fusarium* sp. Identifying the species and genus previously mentioned made it possible to obtain more information about the microbiota of the QMA from Araxá-MG.

Keywords: Microbiota. *Geotrichum candidum*. Shotgun metagenomics

## LISTA DE FIGURAS

### PRIMEIRA PARTE

Figura 1 – Localização do município de Araxá – MG .....	20
Figura 2 – Sequência de produção do QMA de Araxá– MG .....	21
Figura 3 – Maturação do queijo .....	23
Figura 4 – Diferença entre a metagenômica <i>shotgun</i> com a metagenômica amplicon .....	29

### SEGUNDA PARTE

Figura 1 – Sala de maturação do QMA, na microrregião de Araxá– MG .....	41
Figura 2 – Amostragem do QMA da microrregião de Araxá - MG .....	42
Figura 3 – Abundância relativa das espécies bacterianas encontradas no QMA de Araxá – MG .....	47
Figura 4 – Comportamento das espécies <i>Lactococcus lactis</i> <i>subsp. lactis</i> CV56 e <i>Corynebacterium variabile</i> DSM 44702 .....	49
Figura 5 – Abundância relativa dos gêneros bacterianos encontrados no QMA de Araxá – MG .....	50
Figura 6 – Abundância relativa de espécies fúngicas em diferentes dias de maturação de QMA da microrregião de Araxá- MG .....	52
Figura 7 – Comportamento das leveduras <i>Kluyveromyces lactis</i> e <i>Torulaspora delbrueckii</i> ao longo da maturação .....	54
Figura 8 – Abundância relativa de gêneros de fungos em diferentes dias de maturação de queijo minas artesanal da microrregião de Araxá-MG .....	56
Figura 9 – <i>Heatmap</i> com base na abundância das espécies fúngicas encontradas no QMA da microrregião do Araxá – MG .....	57

Figura 10 – Abundância relativa de bactérias, fungos filamentosos e leveduras durante todo o período de maturação no queijo artesanal da região de Araxá – MG .....	60
---	----

## LISTA DE TABELAS

### SEGUNDA PARTE

Tabela 1 – Levantamento de <i>reads</i> gerados ao longo da maturação .....	46
Tabela 2– Análises físico-químicas ao longo da maturação .....	62
Tabela 3 – Resultados dos Índices de diversidade .....	64

## LISTA DE QUADROS

### SEGUNDA PARTE

Quadro 1 – Índices de Alfa Diversidade	.....	45
---	-------	----

## SUMÁRIO

	<b>PRIMEIRA PARTE – INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>15</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>17</b>
<b>2.1</b>	<b>História do queijo e seu consumo.....</b>	<b>17</b>
<b>2.2</b>	<b>Produção de queijos artesanais em Minas Gerais.....</b>	<b>18</b>
<b>2.3</b>	<b>O município de Araxá.....</b>	<b>19</b>
<b>2.4</b>	<b>O queijo artesanal produzido na microrregião de Araxá – MG.....</b>	<b>20</b>
<b>2.5</b>	<b>Definição de Terroir.....</b>	<b>22</b>
<b>2.6</b>	<b>Maturação do Queijo Minas artesanal.....</b>	<b>23</b>
<b>2.7</b>	<b>Queijos artesanais maturados com a presença de fungos e leveduras.....</b>	<b>24</b>
<b>2.8</b>	<b>Bactérias ácido lácticas.....</b>	<b>27</b>
<b>2.9</b>	<b>Metagenômica Shotgun.....</b>	<b>27</b>
<b>3</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>30</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>31</b>
	<b>SEGUNDA PARTE.....</b>	<b>37</b>
	<b>ARTIGO 1 – Sucessão microbiana no processo de maturação do Queijo Minas Artesanal produzido na região de Araxá- MG, com a presença do mofo branco.....</b>	<b>37</b>
	<b>RESUMO.....</b>	<b>38</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>40</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>41</b>
<b>2.1</b>	<b>Amostragem dos queijos.....</b>	<b>41</b>
<b>2.2</b>	<b>Extração de DNA total das amostras de queijo.....</b>	<b>42</b>
<b>2.3</b>	<b>Amplificação do DNA.....</b>	<b>42</b>
<b>2.4</b>	<b>Purificação e Quantificação da Biblioteca.....</b>	<b>43</b>
<b>2.5</b>	<b>Bioinformática.....</b>	<b>43</b>
<b>2.6</b>	<b>Análises físico-químicas.....</b>	<b>44</b>
<b>2.7</b>	<b>Análises estatísticas.....</b>	<b>44</b>
<b>2.8</b>	<b>Análises de dados dos microrganismos.....</b>	<b>44</b>
<b>2.9</b>	<b>Alfa diversidade.....</b>	<b>44</b>
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>45</b>
<b>3.1</b>	<b>Metagenômica shotgun.....</b>	<b>45</b>
<b>3.2</b>	<b>Bactérias presentes no queijo.....</b>	<b>46</b>
<b>3.3</b>	<b>Fungos do QMA.....</b>	<b>51</b>
<b>3.4</b>	<b>Análises Físico – químicas.....</b>	<b>61</b>
<b>3.5</b>	<b>Índices de diversidade.....</b>	<b>63</b>
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>65</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>66</b>

<b>APÊNDICE A – Cartilha destinada aos produtores de Queijo Minas Artesanal da microrregião de Araxá-MG.....</b>	<b>73</b>
--	-----------

## **PRIMEIRA PARTE – INTRODUÇÃO GERAL**

## 1. INTRODUÇÃO

Conforme a Portaria nº146/1996 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), “Entende-se como queijo o produto fresco ou maturado que se obtém por separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído (integral, parcial ou totalmente desnatado), ou de soros lácteos, coagulados pela ação física do coalho, de enzimas específicas, de bactérias específicas, de ácidos orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes.” Já o queijo maturado é definido como sendo o queijo que sofreu as trocas bioquímicas e físicas necessárias para as características da variedade específica do queijo que se destina (BRASIL, 1996). Atualmente, as legislações referentes ao QMA possuem atualizações dinâmicas e cabe ressaltar que cada propriedade apresenta diferentes feitos do queijo com a utilização de agente coagulante microbiológico.

O Queijo Minas Artesanal (QMA) maturado, patrimônio imaterial de Minas Gerais e do Brasil, é um produto de extrema importância econômica e sociocultural para a localidade onde é produzido (FURTADO, 1980). E na região de Araxá-MG, a produção QMA é pautada no saber-fazer passado dos cidadãos mais velhos aos mais novos como uma cultural local.

Suas características marcantes estão ligadas às suas peculiaridades sensoriais, atribuídas pelos microrganismos originais do leite que conferem diversas características de sabor, textura e aroma ao queijo (DORES, 2013).

Concentrada em nove microrregiões produtoras, sendo elas as seguintes: Serro, Canastra, Cerrado, Araxá, Campo das Vertentes, Serra do Salitre, Triângulo Mineiro, Serras de Ibitipoca e Diamantina (MINAS GERAIS, 2022). A produção do QMA proporciona rendimentos e emprego a mais de 30 mil famílias em todo o Estado e esses núcleos familiares produzem, aproximadamente, 85 mil toneladas da mercadoria todos os anos (EMATER, 2021). Muitos produtores têm o queijo como fonte de renda. No ano de 2020, um total de 254 produtores foram cadastrados no programa Queijo Minas Artesanal e 19 produtores foram registrados com “Selo Arte”, permitindo que o QMA produzido por eles fosse comercializado em todo país (IMA, 2020).

Nesse panorama, os microrganismos encontrados naturalmente nos queijos podem sofrer uma variação no número de espécies e na população dessas espécies e isso se relaciona ao clima, à alimentação do rebanho e à forma de processamento do produto, justificando, dessa maneira, a singularidade de cada um dos queijos artesanais de Minas Gerais. Assim, o QMA do

Serro difere do QMA da Serra da Canastra que é distinto, por sua vez, do QMA de Araxá (MONTEIRO; MATTA 2018).

Sob essa perspectiva, o objetivo deste estudo foi a identificação dos microrganismos envolvidos tanto na qualidade quanto na identidade e na autenticidade regional dos queijos, por intermédio do reconhecimento e da categorização de bactérias, fungos filamentosos e leveduras característicos do Queijo Minas Artesanal, produzido na região de Araxá–MG. Ademais, comportamentos e sucessões de dominância durante a maturação nos dias 0, 15,30 e 60 foram analisados bem como as características físico-químicas do queijo foram averiguadas.

## **2 . REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 História do queijo e seu consumo**

A produção de queijo é datada de 6000 anos antes de Cristo e foi bem estabelecida durante a era do Império Romano. Considera-se que existam cerca de 500 variedades de queijos advindos do leite de vaca e cerca de 500 variedades advindas do leite de ovelhas e cabras (KALANTZOUPOULOS, 1993). No Brasil, este produto foi trazido pelos colonizadores portugueses logo nos anos iniciais da colônia (IEPHA, 2018).

O consumo atual de queijo no Brasil é estimado em 5,5 kg por pessoa/ano, abaixo do valor, recomendado pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), de 9 quilos/pessoa/ano (USDA, 2019; ABIQ, 2019). Além disso, este consumo está voltado, majoritariamente, para queijos considerados mais “populares”, como prato e mussarela.

Entre os anos 2005 e 2016, o valor de vendas de queijos cresceu em 509%, passando o comércio de leite longa vida, sendo comercializados cerca de 785 mil toneladas vendidas em 2016 (IBGE, 2019). Em 2019, o mercado global de queijos aumentou 2,3% para US\$ 114,1 bilhões, subindo pelo terceiro ano consecutivo após dois anos de declínio (ABIQ, 2021).

Mesmo em um cenário pandêmico, como na pandemia da Covid-19, a produção de queijos no Brasil, em 2020, absorveu 8,746 bilhões de litros de leite, 2,8% a mais que em 2019. Todavia, o consumo não acompanhou este crescimento. (EMBRAPA, 2021).

Atualmente, o Estado de Minas Gerais é responsável por 40% da produção de queijos no território nacional, o que corresponde ao volume de 1,2 milhão de toneladas de queijo produzidas no ano de 2020. As exportações brasileiras do produto, no mesmo ano, alcançaram a receita de 76 milhões de dólares (EMATER, 2022).

## 2.2 Produção de queijos artesanais em Minas Gerais

Documentos datados do século XVIII demonstraram que a fabricação do Queijo Minas Artesanal (QMA) foi habitual nessa época. Exploradores portugueses viajaram para a região central do Brasil à procura de ouro e acabaram introduzindo a prática de fabricação de queijos baseada, principalmente, nas técnicas utilizadas na Serra da Estrela – cordilheira montanhosa portuguesa – porém, diferentemente do queijo produzido no país lusitano, o QMA não se assemelha ao queijo produzido em Portugal, pois este é feito com leite de ovelha e agente coagulante de uma flor do cardo.

O queijo mineiro tem características semelhantes ao queijo São Jorge, que é produzido na ilha de São Jorge, nos Açores. Este queijo é produzido com leite de vaca, usa coalho animal para coagulação, sendo este maturado. Após a decadência da mineração, no início do século XIX, o queijo artesanal mineiro foi estruturado na economia local e generalizado (KAMIMURA *et al.*, 2019), sendo até hoje economicamente importante para o Estado, seja para o mercado externo, seja para o interno.

Conforme o Decreto nº 42.645/2002 entende-se por Queijo Minas Artesanal, o queijo elaborado, na propriedade de origem do leite, a partir do leite cru, hígido, integral e recém-ordenhado, utilizando-se, na sua coagulação, a quimosina de bezerro pura e no ato da prensagem somente o processo manual, e que o produto final apresente consistência firme, cor e sabor próprios, massa uniforme, isenta de corantes e conservantes, com ou sem olhaduras mecânicas, conforme a tradição histórica e cultural da região do Estado onde for produzido (IMA, 2002). Mesmo havendo as regulamentações dos processos produtivos, a manufatura do QMA apresenta variação nas diversas regiões mineiras.

No ano de 2018, foi estabelecida uma nova legislação, a Lei nº 13.680 de 14 de junho de 2018, onde foi permitida a inspeção de produtos artesanais por órgãos estaduais de saúde pública e a substituição do selo do Serviço Federal de Inspeção pelo selo “ARTE” (BRASIL, 2018), facilitando, dessa forma, a comercialização deste produto. Em 2021, a Instrução Normativa nº 2033 veio dispor sobre os novos parâmetros físico-químicos do QMA.

Minas Gerais é considerado o maior fabricante de queijos artesanais do Brasil, sendo este produzido por aproximadamente 27.000 pequenos e médios agricultores que vivem em 519.823 municípios do estado. Nessa ótica, a produção de queijo no Estado de Minas Gerais constitui uma fonte de renda para as famílias de agricultores, além de o Estado ser o responsável

por mais de um quarto da produção leiteira nacional (CORREIA; ASSIS, 2017; EMBRAPA, 2021).

Atualmente, existem nove microrregiões queijeiras consideradas tradicionais pelo Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) no Estado de Minas Gerais: Araxá, Serra da Canastra, Cerrado (anteriormente chamada Alto Paranaíba), Serra do Salitre, Triângulo Mineiro, Campo das Vertentes, Serro, Diamantina e Serras de Ibitipoca – sendo esta última contemplada pela Portaria n° 2.016/2020.

Estas são as únicas microrregiões que podem processar QMA de leite cru e comercializá-lo fora do estado, estas também são regiões que cumprem as exigências sanitárias necessárias para esta comercialização. Entretanto, de forma dinâmica, outras regiões vêm sendo certificadas e habilitadas para a comercialização do QMA.

### **2.3 O município de Araxá**

Araxá está localizada no Planalto de Araxá, integrando a região do Alto Paranaíba, no sudoeste do estado de Minas Gerais (Figura 1) sendo que suas terras formaram, no passado, um amplo território. Estabelecido como um dos primeiros núcleos de ocupação colonial que incluía, ainda, o chamado Triângulo Mineiro, Araxá nasceu como fruto da atuação dos criadores de gado e dos tropeiros na lida diária em busca da sobrevivência (EMATER, 2003).

A fundação da cidade de Araxá teve início em 1788, data em que foi celebrada a primeira missa do território. Sua denominação foi consolidada como município, pela lei provincial n° 1259, de 19-12-1865 (IPDSA, 2022).

Segundo a classificação de Köppen, o clima de Araxá é entendido como quente e temperado, sendo considerada como CWA, característica climática típica do Sudeste do Brasil (ALVARES *et al.*, 2013). Tendo uma temperatura média de 20.2°C e índice pluviométrico de 1626 mm, sendo junho o mês mais seco com precipitação de 17 mm e janeiro, o mês mais chuvoso com 297 mm, e, neste referido mês, o município atinge também a média de temperatura mais alta (CLIMATE, 2020).

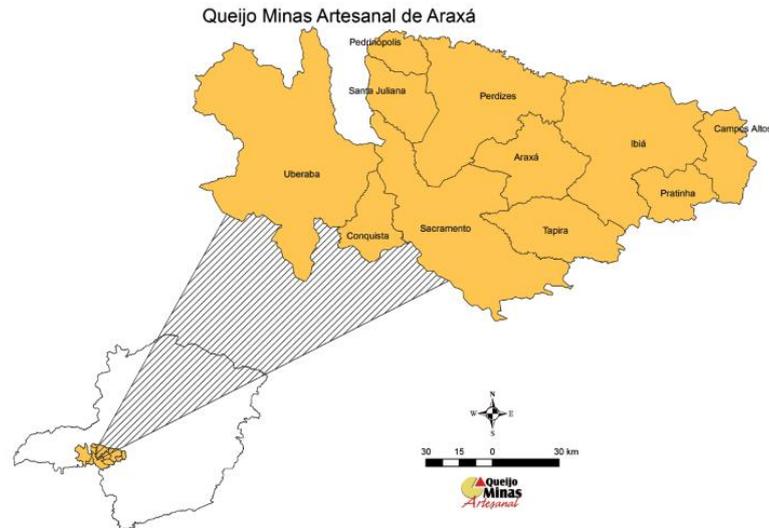
Nesta região, localizada no sudoeste de Minas Gerais, o início da colonização deu-se pela procura de minerais preciosos, o que atrelou intrinsecamente a produção de queijos artesanais à história do povoamento local (EMATER, 2004).

A produção de QMA na região de Araxá (Figura 1) constitui uma tradição consolidada datada de mais de duzentos anos. As características de solo, vegetação e clima existentes na

localidade permitem a produção de um alimento único, diferenciado e que faz parte do hábito alimentar da população local (SERTÃOBRAS, 2016).

As cidades produtoras que fazem parte da microrregião de Araxá são: Araxá, Tapira, Pratinha, Conquista, Ibiá, Campos Altos, Perdizes, Pedrinópolis, Sacramento e Medeiros (EMATER, 2003).

Figura 1 – Localização do município de Araxá-MG.



Fonte: EMATER (2016).

#### 2.4 O queijo artesanal produzido na microrregião de Araxá - MG

Originalmente, o QMA é obtido a partir de leite cru e integral, mantidas suas características naturais advindas das propriedades rurais que desenvolvem o beneficiamento da pecuária leiteira. No QMA, como seu próprio nome diz, o processo produtivo é todo artesanal, onde o leite cru não passa pelo processamento térmico da pasteurização. É um produto vivo, que, no decorrer do tempo, sofre diversas transformações, permitindo que os microrganismos presentes influenciem diretamente na maturação conferindo um sabor único ao produto. Outrossim, também apresenta influência das condições climáticas de cada região, ambiente de produção e composição das culturas iniciadoras (ARPQMAA, 2016; BEMFEITO *et al.*, 2016).

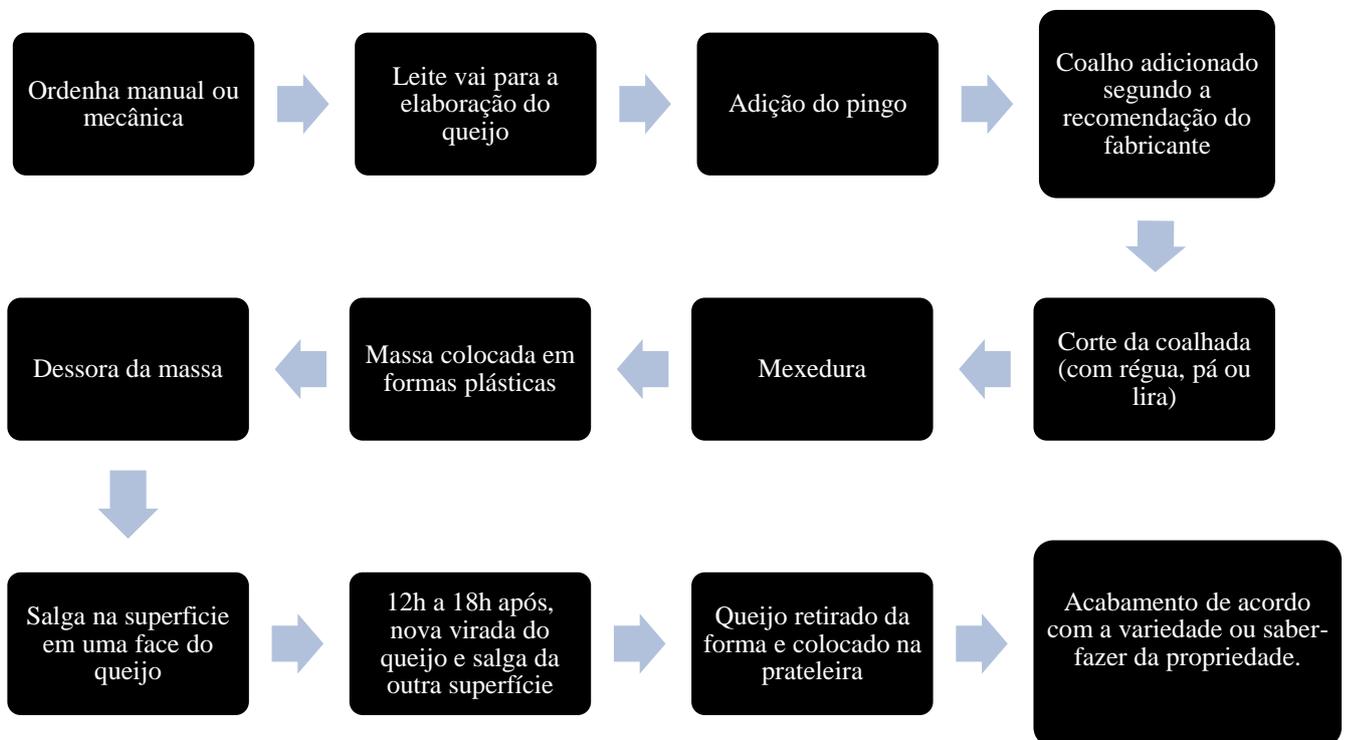
Nessa lógica, retoma-se o fato que o queijo tradicionalmente produzido em Araxá apresenta, a princípio, a técnica introduzida pelos colonizadores portugueses, oriundos da região da Serra da Estrela (EMATER, 2003).

Em estudo realizado com consumidores, o queijo de Araxá foi definido, sensorialmente, apresentando sabores salgados e azedos, atributos sensoriais firmes e friáveis com característica

física marcante. Na maioria dos queijos araxaenses, essa caracterização física marcante se dá presença de creme branco, diferente do queijo Canastra que foi considerado com sabor doce e característica física marcante, a casca amarelada (RODRIGUES *et al.*, 2020).

Logo, cada feitiço de queijo é apontado como uma arte única de cada produtor e, por essa razão, o processo produtivo do QMA araxaense segue, geralmente, um organograma de produção (FIGURA 2). De forma geral, a partir da ação do coalho o leite transforma-se em coalhada e, após a formação de gel, esta é cortada. Em seguida, realiza-se o descanso da massa e, tempo depois, é executada a mexedura – um processo manual – para haver a separação do soro na massa. O próximo passo ocorre após cerca de 45 minutos a 1 hora e consiste na colocação da massa em formas cilíndricas, prensada manualmente para dessorar. Quando o queijo obtém firmeza, é feita a salga seca, com sal grosso em sua parte de cima. Por fim, passadas 8 a 12 horas, o produto lácteo é virado e salga-se a outra parte (ARPQMAA, 2016). Os queijos produzidos nesta região carregam consigo, nesse sentido, a história do local. Pode-se até dizer que um pedaço de queijo consegue transmitir um senso do lugar e das identidades ambientais e culturais associadas (BERNO; FUSTÉ-FORNÉ, 2020).

Figura 2 – Sequência de produção do QMA de Araxá-MG.



Fonte: Adaptado de EMATER (2003).

## 2.5 Definição de *Terroir*

Alguns conceitos diferentes são utilizados para definir o *Terroir*. Dentre as possíveis definições, este pode ser delimitado como a interação do homem com o seu ambiente englobado pelo saber-fazer: produção, cultura, ambiente e patrimônio. Por essa razão, eles são precursores de grande diversidade biológica e cultural humana. *Terroir* podem ser expressos por produtos, tipicidade, originalidade e distinção a eles associados. Assim, são geradores de valores e bens. Um *terroir*, sob uma ótica complementar, é um espaço vivo e inovador, onde grupos de pessoas recorrem à sua herança para construir um desenvolvimento viável e sustentável. O *terroir*, portanto, contribui para responder às expectativas dos consumidores em termos de diversidade, autenticidade, cultura nutricional, equilíbrio e saúde. (UNESCO, 2005).

Em termos científicos o *terroir* baseia-se em uma agregação de atributos geográficos, naturais do ambiente, químicos, conferindo ao alimento sabor único (VAUDOUR, 2002; BARHAM, 2003; SPIELMANN; GÉLINAS-CHEBAT, 2012). No Queijo Minas Artesanal de região de Araxá – MG, foco desta pesquisa, a interação dos fatores socioambientais e tradicionais, tão atrelados ao conceito holístico de *terroir*, influem diretamente no singular sabor desse patrimônio da cultura brasileira, sendo, desse modo, de uma riqueza gastronômica e identitária ímpar esse processo de associação multifatorial que abarca desde as territorialidades do sudoeste mineiro quanto o feitio geracional da receita do queijo.

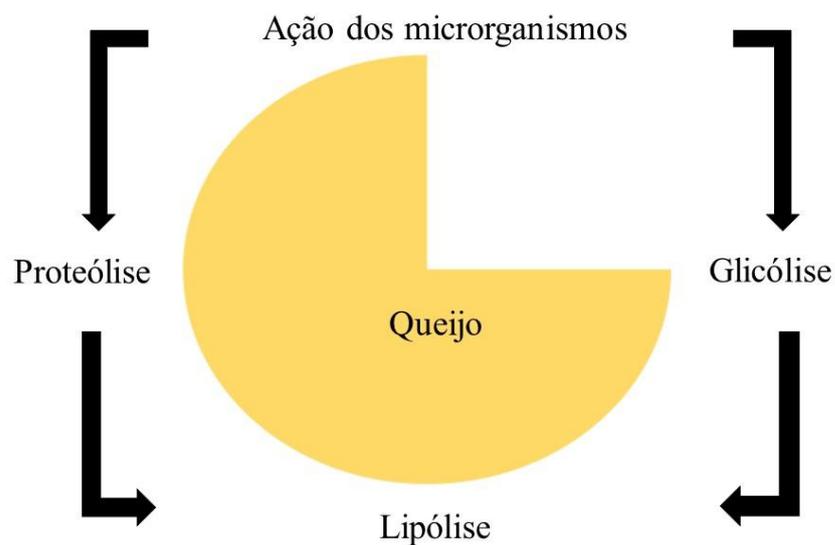
A fabricação de queijos é um exemplo de transmissão de autenticidade e representação do *terroir* (BERNO; FUSTÉ-FORNÉ, 2020). Nesse diapasão, a maioria das pesquisas sobre *terroir* relacionadas ao queijo está focada no queijo europeu feito com leite cru, onde já existem apelações específicas (TURBES *et al.*, 2016). Porém, ainda faltam estudos específicos e, preferencialmente, nacionais relacionados ao *terroir* de queijos artesanais produzidos no Brasil. O QMA pode ser considerado, analogamente, “um organismo vivo”, em permanente evolução dos processos produtivos, mesmo assim mantendo-se seu *terroir* – sua origem clara, distinta e específica (ARPQMAA, 2016).

Existem alguns fatores que influenciam no *Terroir* do queijo, além da forma da produção do leite, principal componente do queijo (TURBES *et al.*, 2016; VASCONCELOS, 2019). Em cada etapa da fabricação de queijo, mais do que apenas na seleção e manejo do leite, as características exclusivas do local em que o queijo é produzido moldam o resultado do produto final (BERNO, 2020; PERIN *et al.*, 2017). Destarte, tendo conhecimento sobre os componentes que são a estrutura para formação do *Terroir*, podemos dizer que estes irão influenciar na composição do queijo e, conseqüentemente, em sua maturação.

## 2.6 Maturação do Queijo Minas artesanal

A maturação pode ser resumida em uma cadeia de processos físicos, bioquímicos e microbiológicos (Figura 3) que ocorrem em todos os queijos, à exceção daqueles que sua consumação for realizada fresca. Esta cadeia de processos ocorridos modifica a composição química dos queijos, sobretudo, no que tange a seu conteúdo em açúcares, proteínas e lipídeos. A variação do tempo de maturação é definida pelo tipo de queijo e, neste processo, algumas características são desenvolvidas, como as organolépticas e as de textura, particulares de cada um deles (PERRY, 2004).

Figura 3 – Maturação do queijo.



Fonte: Autor (2022).

A Instrução Normativa N° 30 de agosto de 2013 define que

A produção de queijos elaborados a partir de leite cru, com período de maturação inferior a 60 (sessenta) dias, fica restrita a queijaria situada em região de indicação geográfica registrada ou tradicionalmente reconhecida e em propriedade certificada como livre de tuberculose e brucelose, de acordo com o disposto no Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT) (BRASIL, 2013).

O período de maturação do queijo artesanal de Araxá - MG ficou definido pela Portaria IMA nº 2051 de abril de 2021, de 14 (quatorze) dias para a microrregião de Araxá, Canastra e Serra do Salitre, mínimo de 17 (dezesete) dias para a microrregião do Serro e para as demais regiões do Estado, caracterizadas ou não como produtoras de QMA, o período mínimo de maturação é de 22 (vinte e dois) dias ou pelo maior período especificado em estudos científicos (IMA, 2021). Esses períodos foram assim definidos segundo a realização de vários estudos voltados para análise e segurança da composição microbiológica dos queijos das supracitadas regiões.

O acompanhamento da maturação em queijos artesanais também se faz importante e necessário, pois o QMA, embora seja muitas vezes consumido fresco, tradicionalmente, é fabricado para ser consumido maturado (COSTA JÚNIOR, 2014). E, dessa maneira, amostrar o queijo durante as diferentes fases da maturação faz-se imprescindível para compreender detalhadamente a dinâmica dos microrganismos durante esse processo (CRUVINEL, 2017).

A maturação é um dos fatores de destaque que auxilia no controle da microbiota indesejável nos queijos, importante para segurança e consumo desse produto, além de ser diretamente ligada à formação sensorial do produto final (DORES, 2013).

Dentre as modificações sofridas no queijo, a proteólise é, provavelmente, o evento bioquímico mais importante durante a maturação da maioria das variedades de queijo, com um grande impacto no sabor e na textura (FOX, 1989). Alguns microrganismos como fungos e bactérias são participantes ativos nesse processo de proteólise e lipólise, auxiliando na formação de características funcionais de textura, sabor e da qualidade do queijo (FOX, 2004).

Os fungos são de maneira frequente considerados contaminantes comuns do leite e dos produtos lácteos e são, principalmente, estudados por sua ação de deterioração, no entanto, a presença de certas espécies de fungos filamentosos é importante para as características reológicas e sensoriais de alguns queijos amadurecidos (LARSEN; JENSEN, 1999). Alguns fungos conseguem sobreviver ao longo da maturação, pois se encontram na superfície externa de queijos, onde conseguem se manter viáveis mesmo em condições inóspitas ao seu desenvolvimento (FOX *et al.*, 2000).

## **2.7 Queijos artesanais maturados com a presença de fungos e leveduras**

Alguns microrganismos presentes nos alimentos ocasionam alterações consideradas favoráveis, modificando características originais de determinados produtos (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

No Brasil, não há um regulamento técnico específico sobre a identidade e a qualidade dos queijos maturados com a presença de mofo branco em sua superfície (PEREIRA *et al.*, 2020a).

Recentemente, diversos estudos são realizados e relacionados à composição da micro e da microbiota presentes nos QMAs das diferentes regiões mineiras.

Considerando que as regiões produtoras de queijo possuem características específicas, tanto quanto ao processo produtivo quanto ao ambiente de produção, o estudo para a definição da microbiota no queijo artesanal de Minas pode contribuir para estabelecer indicações geográficas como a Denominação de Origem Protegida (DOP) na União Europeia (SANT'ANNA *et al.*, 2019). Nos estudos relativos à microbiota, poucos foram direcionados para a investigação extensiva da comunidade fúngica em queijos (HYMERY *et al.*, 2014).

Os fungos filamentosos encontrados nos queijos podem ser originários de matérias-primas, como o leite, ou podem ser introduzidos durante a fabricação de queijos, seja do ambiente, seja da inoculação de culturas comerciais de maturação (HYMERY *et al.*, 2014), estes fungos são responsáveis pelo desenvolvimento de sabores e de aromas característicos de determinados queijos (AIDOO; NOUT, 2010).

Em estudo sobre a microbiota de queijos artesanais do Serro, Souza *et al.* (2021) identificou uma população com a dominância das espécies *Debaryomyces hansenii*, *Yarrowia lipolytica*, *Candida zeylanoides*, *Kluyveromyces lactis*, *Cladosporium cladosporioides* (complexo) e *Penicillium roqueforti*. Destacando que as espécies *D. Hansenii*, *Geotrichum candidum*, *Yarrowia lipolytica*, *Candida zeylanoides* e *Kluyveromyces lactis* foram importantes para as características sensoriais do QMA.

Leveduras podem contribuir positivamente para o desenvolvimento dos sabores característicos durante a maturação do queijo ou podem causar deterioração do produto (LANDELL; HARTFELDER; VALENTE, 2006). Estudos realizados com “pingos” e queijos artesanais brasileiros demonstraram uma grande variedade leveduriforme em sua composição (LANDELL; HARTFELDER; VALENTE, 2006; LIMA *et al.*, 2009, ARAGÃO, 2018; CARDOSO *et al.*, 2015). Em particular, leveduras estão associadas à microbiota secundária de uma grande variedade de queijos artesanais e podem desempenhar um papel importante na maturação de tais queijos (CARDOSO *et al.*, 2015).

Algumas espécies são encontradas com maior frequência nos queijos artesanais, por exemplo, a levedura *Debaryomyces hansenii*; a população elevada dessa espécie em queijos pode ser relacionada às suas características fisiológicas, como tolerância ao pH ácido, resistência a baixa atividade de água e reduzidas ou altas concentrações de sal, bem como à

capacidade de crescer nas baixas temperaturas de armazenamento que caracterizam o ambiente de amadurecimento (FERREIRA; VILJOEN, 2003); esta espécie foi predominantemente isolada em queijos artesanais do Serro (CARDOSO *et al.*, 2015) e Canastra (NÓBREGA *et al.*, 2008).

Algumas espécies influenciam diretamente na formação de sabor do queijo como a *Kluyveromyces lactis* (LANDELL; HARTFELDER; VALENTE, 2006; ARAGÃO, 2018; LIMA *et al.*, 2009; NÓBREGA *et al.*, 2008), *Kluyveromyces marxianus* (NÓBREGA *et al.*, 2008; CARDOSO *et al.*, 2015) e *Candida zeylanoides* (LANDELL; HARTFELDER; VALENTE, 2006; NÓBREGA *et al.*, 2008) e *Geotrichum candidum* que, por sua ampla diversidade genotípica e fenotípica das cepas, teve sua classificação como levedura ou fungo do tipo levedura é dificultada. Contudo, há, aproximadamente, 20 anos este microrganismo vem sendo classificado como uma levedura dimórfica (KURTZMAN; FELL, 1998; BARNETT; PAYNE; YARROW, 1990; PERKINS *et al.*, 2020; JACQUES *et al.*, 2016). Qualquer que seja sua classificação, *G. candidum* possui muitas vias metabólicas diferentes que são de particular interesse para a indústria de laticínios (BOUTROU, 2005). *Geotrichum candidum* (teleomorfia: *Galactomyces candidus*), pode ser encontrado em diversos habitats como: solo, gramíneas, silagens, frutas, alimentos para animais, insetos, no homem e em outros mamíferos (BARNETT, 1990). Este microrganismo também é naturalmente encontrado no leite cru e geralmente está presente na superfície de queijos maturados (GUEGUÉN, 1984). Sua temperatura ótima de crescimento está na faixa de 5 a 38°C, sendo a ideal em torno de 25°C, com o pH ideal em torno de 5,0-5,5.

Dentre os mecanismos de participação das diversas leveduras no processo de maturação, podemos destacar sua atuação nas seguintes reações: no consumo de lactato propiciando a formação de metabólitos alcalinos, na fermentação da lactose, na lipólise, na proteólise, e na formação de compostos aromáticos (ROSSI *et al.*, 1998), importantes na composição da microbiota do queijo.

A microbiota do queijo é um sistema dinâmico que se desenvolve durante a fabricação e maturação desse laticínio e pode influenciar na qualidade, nas propriedades organolépticas e na segurança do produto final, fatores estes que determinam as preferências dos consumidores. O estudo da dinâmica dos consórcios microbianos durante a fabricação e maturação do queijo é fundamental para entender o papel desses microrganismos nas características sensoriais do produto final (ANASTASIOU *et al.*, 2022).

O perfil microbiano dos queijos pode diferir entre as regiões produtoras e até mesmo entre os produtores de uma mesma região, e essas diferenças podem estar relacionadas ao

processo de produção, à inclusão ou não de fermentos, e à composição das bactérias ácido lácticas presentes (JONNALA *et al.*, 2018).

## 2.8 Bactérias ácido lácticas

As bactérias ácido lácticas (BAL) estão presentes naturalmente nos produtos lácteos fermentados ou são adicionadas como culturas iniciadoras (*starters*), contribuindo com o aroma, textura, valor nutricional e segurança microbiológica (PEREIRA *et al.*, 2020 b).

As bactérias lácticas (BAL) compreendem uma ampla gama de gêneros, incluindo um número considerável de espécies. Os gêneros mais importantes de BAL são *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus* e *Bifidobacterium* (KLEIN *et al.*, 1998). Essas bactérias têm como principais características a produção de ácido láctico pela fermentação de carboidratos, são Gram positivas, não formadoras de esporos, catalase e oxidases negativas e anaeróbias facultativas (SILVA *et al.*, 2017). São as principais responsáveis pela fermentação do leite e podem ser divididas por sua forma de ação em homofermentadoras, que produzem, principalmente, o ácido láctico a partir da fermentação da glicose, e em heterofermentadoras, que geram outros produtos como lactato, dióxido de carbono, ácido acético, diacetil e etanol (OLIVEIRA, 2014). A ação antagonista de espécies de BAL contra microrganismos indesejáveis em alimentos tem sido descrita inclusive em queijos de outras regiões (ALEXANDRE, 2002). As espécies lácticas de *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus fermentum*, e *Lactobacillus brevis* isoladas do leite cru mostraram capacidade em inibir *Listeria monocytogenes* em situações *in vitro* (MACZUGA, 2020).

## 2.9 Metagenômica Shotgun

A aplicação de ferramentas independentes de cultivo, permitem uma investigação detalhada da microbiota dos alimentos e essas abordagens têm sido cada vez mais utilizadas para determinar não só a composição das comunidades microbianas, como também para entender como ocorre a sucessão desses microrganismos durante as diferentes etapas que envolvem a produção do alimento (QUIGLEY, 2011).

A aplicação dessas tecnologias de sequenciamento de DNA de alto rendimento, facilitam a identificação mais precisa do microbioma do queijo, além do estudo detalhado de

sua potencial funcionalidade e sua contribuição para o desenvolvimento das propriedades organolépticas específicas (ANASTASIOU *et al.*, 2022).

A partir do estudo da microbiota sequenciada dos alimentos, podemos obter inúmeras informações que fornecem importantes indicadores de segurança e qualidade (BECK *et al.*, 2021).

Uma dessas ferramentas é a metagenômica que permite o estudo de comunidades de organismos microbianos diretamente em seus ambientes naturais, pela aplicação de técnicas genômicas (LONG *et al.*, 2007).

A aplicação dessas tecnologias de sequenciamento de DNA de alto rendimento facilita a identificação mais precisa do microbioma do queijo, além do estudo detalhado de sua potencial funcionalidade e sua contribuição para o desenvolvimento das propriedades organolépticas específicas (ANASTASIOU *et al.*, 2022). Atualmente, existem algumas abordagens metagenômicas voltadas ao estudo da composição dos microrganismos presentes no ambiente do queijo.

A diferença entre as abordagens de metagenômicas habituais (Figura 4) são que as leituras de sequências (*reads*) de shotgun podem ser analisadas aplicando todas as abordagens de bioinformática (montagem, mapeamento e *k-mer* análise, dependente de alinhamento e livre de alinhamento) e isso permite obter genomas inteiros (OLIVEIRA, 2018). As leituras de *Amplicon* são geralmente analisadas por mapeamento, agrupamento e abordagens filogenéticas (SEKSE *et al.*, 2017).

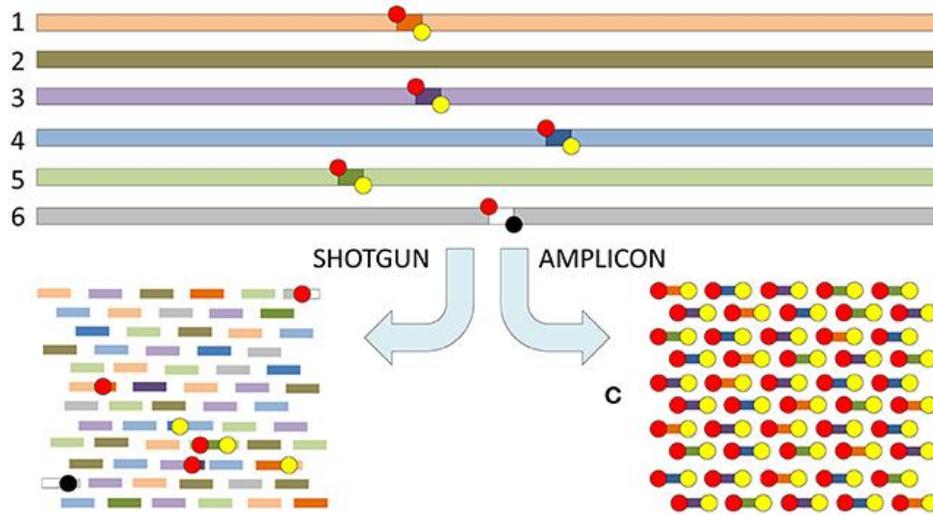
O sequenciamento metagenômico de DNA *Shotgun* é uma ferramenta de sequenciamento ambiental relativamente nova e fornece informações sobre a biodiversidade e a função dessa comunidade em um determinado sistema.

O DNA é, então, extraído de todas as células de que compõem um sistema, mas em vez de direcionar um *locus* genômico específico para amplificação, todo o DNA é subsequentemente cortado em pequenos fragmentos sequenciados independentemente, resultando em sequências de DNA (ou seja, leituras) que se alinham a vários locais genômicos (SHARPTON, 2014).

Na metagenômica shotgun, todo o DNA extraído é totalmente sequenciado de maneira não direcionada, fornecendo não apenas resultados de identificação taxonômica, mas também informações sobre o potencial metabólico da comunidade (FILIPPIS; PARENTE; ERCOLINI 2018). Além de proporcionar uma visão sobre todo o DNA presente em uma amostra, também oferece uma perspectiva mais abrangente da diversidade microbiana de uma amostra, no que

diz respeito à riqueza de táxons microbianos em todos os níveis ou à presença de famílias de genes ou biomarcadores em geral (SEKSE *et al.*, 2017).

Figura 4 – Diferença entre a metagenômica *shotgun* com a metagenômica amplicon.



Fonte: Sekse *et al.*, (2017).

### 3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As amostras geraram um total de 187.010 sequências de qualidade adequadas para leitura (*reads*), o D0 obteve a maior quantidade de *reads* geradas e também perdidas (50,86%), D15 a menor quantidade de *reads* geradas e o maior aproveitamento nas leituras com o menor índice de *reads* perdidas (32,06%).

Os valores médios dos parâmetros físico-químicos do QMA Araxá-MG foram: pH: 6,19; Cinzas: 3,5%; Umidade: 45,9%; NaCl: 2,94%; Gordura: 29% e Proteína: 22,5%, sendo este classificado como um queijo de média umidade.

As espécies bacterianas mais abundantes foram *Lactococcus lactis subsp. lactis* CV56, *Brevibacterium aurantiacum*, *Streptococcus salivarius* 57.I, *Streptococcus thermophilus*, *Vibrio casei*, *Bacillus cereus*, *Lactobacillus brevis*, *Streptococcus equinus*, *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus vestibularis* e *Leuconostoc mesenteroides*, as espécies de fungos mais abundantes foram as leveduras *Candida catenulata*, *Geotrichum candidum*, *Kluyveromyces lactis* e *Torulaspota delbrueckii*. Espécies de fungos filamentosos não apresentaram abundância relativa significativa. Os gêneros mais abundantes de bactérias foram, *Streptococcus sp.*, *Actinoalloteichus sp.*, *Marinomonas sp.*, *Lactococcus sp.*, quanto aos fungos, os mais abundantes foram as leveduras *Kluyveromyces sp.*, *Candida sp.*, *Saccharomyces sp.* e *Torulaspota sp.* e o gênero de fungos filamentosos *Fusarium sp.*

A microbiota geral do QMA de Araxá-MG, em relação às espécies ao longo de toda maturação, foi por maioria composta por bactérias ácido lácticas principalmente pelos microrganismos *Lactococcus lactis subsp. lactis* CV56 e *Corynebacterium variabile* DSM 44702, quanto aos fungos as espécies de leveduras mais abundantes foram *Candida catenulata* e *Geotrichum candidum*. A abundância por maioria de um número relativamente reduzido de espécies pode sugerir que as condições ambientais ou do queijo promoveram a seleção da microbiota, mais estudos devem ser realizados para serem observadas as interações dos microrganismos com o ambiente. Os dados fornecidos neste estudo podem auxiliar em um possível reconhecimento de Identificação Geográfica, além de contribuir para as definições do *Terroir* do Queijo Minas Artesanal de Araxá-MG.

## REFERÊNCIAS

- AIDOO, K. E.; NOUT, M.J R. Functional yeasts and molds in fermented foods and beverages. **Fermented foods and beverages of the world**, p. 127-148, 2010.
- ALEXANDRE, D.P.; SILVA, M.R.; SOUZA, M.R. et al. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de queijo-de-minas artesanal do Serro (MG) frente a microrganismos indicadores. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.54, p.424-428, 2002.
- ALVARES, C. A. *et al.* Köppen's climate classification map for Brazil. *Meteorologische Zeitschrift*, v. 22, n. 6, p.711-728, 2013.
- ANASTASIOU, R. *et al.* Omics Approaches to Assess Flavor Development in Cheese. **Foods**, v. 11, n. 2, p. 188, 2022.
- ARAGÃO, M. O. P. **Diversidade de fungos filamentosos e leveduras em queijo minas artesanal das Microrregiões do Serro e Serra da Canastra**. 2018. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2018.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDUSTRIAS DE QUEIJO. **Mercado global de queijos bate recorde em 2019**. 2021. Disponível em: <[https://www.abiq.com.br/noticias\\_ler.asp?codigo=2373&codigo\\_categoria=6&codigo\\_subcategoria=5](https://www.abiq.com.br/noticias_ler.asp?codigo=2373&codigo_categoria=6&codigo_subcategoria=5)>. Acesso em 10 de abril 2021.
- ASSOCIAÇÃO REGIONAL DOS PRODUTORES DE QUEIJO MINAS ARTESANAL QUEIJO ARAXÁ - O PINGO DA ALMA: **História do queijo minas artesanal Araxá**. Araxá: Fundação Acia, p. 120, 2016.
- BARHAM, E. Translating terroir: the global challenge of French AOC labeling. **Journal of rural studies**, v. 19, n. 1, p. 127-138, 2003.
- BARNETT, J. A.; PAYNE, R. W.; YARROW, D. **Yeasts: characteristics and identification**. 1990.
- BECK, K. L. *et al.* Monitoring the microbiome for food safety and quality using deep shotgun sequencing. **NPJ science of food**, v. 5, n. 1, p. 1-12, 2021.
- BEMFEITO, R. M. *et al.* Temporal dominance of sensations sensory profile and drivers of liking of artisanal Minas cheese produced in the region of Serra da Canastra, Brazil. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 10, p. 7886-7897, 2016.
- BERNO, T.; FUSTÉ-FORNÉ, F. Imaginaries of cheese: revisiting narratives of local produce in the contemporary world. **Annals of Leisure Research**, v. 23, n. 5, p. 608-626, 2020.
- BRASIL. **Lei nº 13.680, de 14 de junho de 2018**. Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2015-2018/2018/Lei/L13680.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2015-2018/2018/Lei/L13680.htm)>. Acesso em 03 maio 2020.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa n° 30 de 07 de agosto de 2013**. Brasília, DF.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria n° 146 de 07 de março de 1996**. Brasília, DF.

CARDOSO, V. M. *et al.* The influence of seasons and ripening time on yeast communities of a traditional Brazilian cheese. **Food Research International**, v. 69, p. 331-340, 2015.

CLIMATE. **Clima de Araxá**. 2020. Disponível em: <<https://pt.climate-data.org/america-do-sul/brasil/minas-gerais/araxa-24937/>>. Acesso em 30 de março de 2020.

CORREIA, V. T. V.; ASSIS, I. C. L. **Queijos artesanais: revisão de literatura**. Nutritime, v. 14, n. 06, p. 8001-8008. 2017. Disponível em: <<https://docplayer.com.br/64505026-Queijos-artesanais-revisao-deliteratura.html>> Acesso em 19 de outubro de 2021.

COSTA JÚNIOR, L. C. G. *et al.* Maturação do Queijo Minas Artesanal da Microrregião Campo das Vertentes e os efeitos dos períodos seco e chuvoso. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 69, n. 2, p. 111-120, 2014.

CRUVINEL, L. A. **Caracterização das comunidades procarióticas do Queijo Minas Artesanal Canastra e sua importância para sustentabilidade**. 2017. Dissertação (Mestrado Profissional em Sustentabilidade e Tecnologia Ambiental) - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Minas Gerais, Bambuí, 2017.

DIAS, G. **Influência do uso de *Geotrichum candidum* nas características físico-químicas e sensoriais do queijo tipo Camembert**. 2007. Dissertação (Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

DORES, M. T. **Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus aureus* isolados de queijo minas artesanal da Canastra**. 2013. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Anuário Leite, 2021**. Disponível em: <[www.embrapa.br](http://www.embrapa.br)>. Acesso em 26 de outubro de 2021.

EMPRESA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL DE MINAS GERAIS. **Dia mundial do queijo**. 2022. Disponível em: <[https://www.emater.mg.gov.br/portal.do/site-noticias/dia-mundial-do-queijo/?flagweb=novosite\\_pagina\\_interna\\_noticia&id=26194](https://www.emater.mg.gov.br/portal.do/site-noticias/dia-mundial-do-queijo/?flagweb=novosite_pagina_interna_noticia&id=26194)>. Acesso em 10 de abril de 2022.

\_\_\_\_\_. **Dia dos queijos artesanais de minas gerais será comemorado no próximo domingo**. 2021. Disponível em: <[https://www.emater.mg.gov.br/portal.do/site-noticias/dia-dos-queijos-artesanais-de-minas-gerais-sera-comemorado-noproximodomingo/?flagweb=novosite\\_pagina\\_interna&id=25561](https://www.emater.mg.gov.br/portal.do/site-noticias/dia-dos-queijos-artesanais-de-minas-gerais-sera-comemorado-noproximodomingo/?flagweb=novosite_pagina_interna&id=25561)>. Acesso em 10 de abril de 2022.

\_\_\_\_\_. **Serras da Ibitipoca é identificada como a 8ª região produtora de Queijo Minas Artesanal**. 2020. Disponível em [https://www.emater.mg.gov.br/portal.do/site-noticias/serras-da-ibitipoca-e-identificada-como-a-8-regiao-produtora-de-queijo-minas-artesanal/?flagweb=novosite\\_pagina\\_interna&id=25333](https://www.emater.mg.gov.br/portal.do/site-noticias/serras-da-ibitipoca-e-identificada-como-a-8-regiao-produtora-de-queijo-minas-artesanal/?flagweb=novosite_pagina_interna&id=25333)>. Acesso em 09 de março de 2022.

\_\_\_\_\_. **Queijo Minas Artesanal Região de Araxá.** 2016.

\_\_\_\_\_. **Caracterização da Microrregião da Serra da Canastra como Produtora Tradicional de Queijo Minas Artesanal.** 2004.

\_\_\_\_\_. **Caracterização da microrregião de Araxá como produtora tradicional de queijo Minas artesanal. Araxá, MG.** 2003. Disponível em: <<http://www.emater.mg.gov.br>>. Acesso em 26 de dezembro de 2022.

FERREIRA, A. D.; VILJOEN, B. C. Yeasts as adjunct starters in matured Cheddar cheese. **International journal of food microbiology**, v. 86, n. 1-2, p. 131-140, 2003.

FILIPPIS, F.; PARENTE, E.; ERCOLINI, D. Recent past, present, and future of the food microbiome. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 9, p. 589-608, 2018.

FOX, P.F; McSWEENEY P.L.H. **Cheese: an overview.** Cheese: chemistry. Phys Microbiol. 2004.

FOX, P. F. Proteolysis during cheese manufacture and ripening. **Journal of Dairy Science.**, v. 72, p. 1379-1400, 1989.

FOX, P. F *et al.* **Fundamentals of Cheese Science.** Gai ther sburg: Aspen, 587 p. 2000.

FRANCO, B. D. G; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos.** São Paulo, SP, Editora Atheneu, 2008.

FURTADO, M. M. Queijo do Serro: tradição na história do povo mineiro. **Revista Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.35, p.33-36, 1980.

HYMERY, N. *et al.* Filamentous fungi and mycotoxins in cheese: a review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 4, p. 437-456, 2014.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. 2019. Disponível em:<[www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br)>. Acesso em: 22 de outubro 2021.

INSTITUTO DE PLANEJAMENTO E DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL DE ARAXÁ. 2022. < <http://ipdsa.org.br/menu/link/109/a-cidade>>. Acesso em 03 de fevereiro de 2022.

INSTITUTO ESTADUAL DO PATRIMÔNIO HISTÓRICO E ARTÍSTICO DE MINAS GERAIS. 2018 <<http://www.iepha.mg.gov.br/index.php/programas-e-aco-es/patrimonio-cultural-prottegido/bens-registrados/details/2/4/bens-registrados-modo-de-fazer-o-queijo-artesanal-da-regi%C3%A3o-do-serro>>. Acesso em 20 de abril de 2021.

INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. Governo do estado de Minas Gerais. **Portaria N° 2033, de 23 de janeiro de 2021.** Acesso em 30 de março de 2021.

\_\_\_\_\_. **Queijo Minas Artesanal.** Disponível em: < <http://www.ima.mg.gov.br/queijo-minas-artesanal>> Acesso em março de 2020.

\_\_\_\_\_. **Decreto N° 42.645 de 2002.** Belo Horizonte, MG, 2002.

JACQUES, N. *et al.* Specific populations of the yeast *Geotrichum candidum* revealed by molecular typing. **Yeast**, v. 34, n. 4, p. 165-178, 2017.

JONNALA, B. R. Y. *et al.* Sequencing of the cheese microbiome and its relevance to industry. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 1020, 2018.

KALANTZOUPOULOS, G.C. **Cheeses from ewes' and goats' milk**. In: FOX, P.F. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. V.2, 2.ed. Chapman and Hall, London, United kingdom, 1993. 577p.

KAMIMURA, B. A. *et al.* Brazilian artisanal cheeses: an overview of their characteristics, main types and regulatory aspects. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 18, n. 5, p. 1636-1657, 2019.

KAMIMURA, B. A. *et al.* Amplicon sequencing reveals the bacterial diversity in milk, dairy premises and Serra da Canastra artisanal cheeses produced by three different farms. **Food Microbiology**, v. 89, 2020.

KLEIN, G. *et al.* Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. **International journal of food microbiology**, v. 41, n. 2, p. 103-125, 1998.

KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. 1998. **The Yeasts – A taxonomic Study**. 4<sup>o</sup> Edição. 1074 pp. Amsterdam, NL: Elsevier.

LANDELL, M. F.; HARTFELDER, C.; VALENTE, P. Identification and enzymatic profile of yeasts isolated from artisanal cheese in Southern Brazil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, n. 1, p. 49-55, 2006.

LARSEN, M. D.; JENSEN, K. The effects of environmental conditions on the lipolytic activity of strains of *Penicillium roqueforti*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 46, n.2, p.159-166, 1999.

LIMA, C. D. L. C. *et al.* Bactérias do ácido láctico e leveduras associadas com o queijo-de-minas artesanal produzido na região da Serra do Salitre, Minas Gerais. **Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia**, v. 61, p. 266-272, 2009.

LONG, N. *et al.* Machine learning classification procedure for selecting SNPs in genomic selection: application to early mortality in broilers. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 124, p. 377–389, 2007.

MACZUGA, J. M. **Potencial antagonista de bactérias do ácido láctico isoladas do leite cru contra *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes***. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2020.

MINAS GERAIS. **Governador anuncia reconhecimento da região de Diamantina como produtora de Queijo Minas**. Disponível em: <<https://www.agenciaminas.mg.gov.br/noticia/governador-anuncia-reconhecimento-da-regiao-de-diamantina-como-produtora-de-queijo-minas-artesanal>>. Acesso em 10 de fevereiro de 2022.

MONTEIRO, R. P.; MATTA, V. M. **Queijo Minas Artesanal**: valorizando a agricultura familiar. 2018. Disponível em:<<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/199625/1/Livro-Queijo-Minas-Artesanal-Ainfo.pdf>>. Acesso em: 03 maio 2020.

NÓBREGA, J. E. *et al.* Variações na microbiota leveduriforme do fermento endógeno utilizado na produção do queijo Canastra. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 63, n. 364, p. 14-18, 2008.

OLIVEIRA, J. S. **Prospecção de genes aplicados à biodegradação de hidrocarbonetos e produção de surfactantes utilizando abordagens computacionais**. 2018. Doutorado (Doutorado em Biotecnologia Rede Nordeste de Biotecnologia - RENORBIO). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal. 2018.

OLIVEIRA, L. G. **Caracterização microbiológica e físico-química durante a maturação em diferentes épocas do ano de queijo Minas artesanal de produtores cadastrados da mesorregião de Campo das Vertentes – MG**. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

PEREIRA, A. C. P. *et al.* Assessment of physicochemical, textural and microbiological properties of brazilian white mold surface-ripened cheeses: a technological approach. **Ciência Rural**, v. 50, 2020a.

PEREIRA, M. T.; SANTOS, J. S.; SANTANA, E. H. W. Importância das Bactérias Ácido Lácticas e não Starter (NSLAB) na Tecnologia de Produção dos Derivados Lácteos. **Ensaio e Ciência C Biológicas Agrárias e da Saúde**, v. 24, n. 4, p. 348-352, 2020b.

PERIN, L. M. *et al.* Bacterial ecology of artisanal Minas cheeses assessed by culture-dependent and-independent methods. **Food microbiology**, v. 65, p. 160-169, 2017.

PERKINS, V. *et al.* Phenotypic and genetic characterization of the cheese ripening yeast *Geotrichum candidum*. **Frontiers in microbiology**, v. 11, p. 737, 2020.

PERRY, K. S.P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química nova**, v. 27, n. 2, p. 293-300, 2004.

QUIGLEY, E. M.M. Gut microbiota and the role of probiotics in therapy. **Current opinion in pharmacology**, v. 11, n. 6, p. 593-603, 2011.

RODRIGUES, J. F. *et al.* Sorting task as a tool to elucidate the sensory patterns of artisanal cheeses. **Journal of Sensory Studies**, v. 35, n. 3, 2020.

ROSSI, J. *et al.* Enzymatic evolution during ripening of Tallegio cheese related to the surface microflora. International Dairy Federation, 1998.  
SANT'ANNA, F. M. *et al.* Microbial shifts in Minas artisanal cheeses from the Serra do Salitre region of Minas Gerais, Brazil throughout ripening time. **Food microbiology**, v. 82, p. 349-362, 2019.

SEKSE, C. *et al.* High throughput sequencing for detection of foodborne pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2017.

SHARPTON, T. J. An introduction to the analysis of shotgun metagenomic data. **Frontiers in plant science**, v. 5, p. 209, 2014.

SILVA, N. *et al.* Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. 5.ed., São Paulo: Varela; 560p., 2017.

SOUZA, T. P. *et al.* Mycobiota of Minas artisanal cheese: Safety and quality. **International Dairy Journal**, v. 120, 2021.

SPIELMANN, N.; GÉLINAS-CHEBAT, C. Terroir? That's not how I would describe it. **International Journal of Wine Business Research**, 2012.

TURBES, G. *et al.* Evidence of terroir in milk sourcing and its influence on Cheddar cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 7, p. 5093-5103, 2016.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E CULTURA. **The Future Needs Terroirs**. 2005. Disponível em: <[http://www.unesco.org/new/fileadmin/MULTIMEDIA/HQ/SC/pdf/sc\\_mab\\_terroirs\\_EN.pdf](http://www.unesco.org/new/fileadmin/MULTIMEDIA/HQ/SC/pdf/sc_mab_terroirs_EN.pdf)> Acessado em: 12 de junho de 2021.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Foreign Agricultural Service**. 2019. Disponível em: <<http://www.usdabrazil.org.br/pt-br/reports/dairy-and-products-annual-4.pdf>>. Acesso em: 10 de abril de 2022.

VASCONCELOS, C. M. **Caracterização físico-química e microbiológica de queijo artesanal de ovelha produzido em minas gerais, em diferentes períodos de maturação**. 2019. Dissertação (Mestrado de Curso de Ciência Animal), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2019.

VAUDOUR, E. The quality of grapes and wine in relation to geography: Notions of terroir at various scales. **Journal of Wine Research**, v. 13, n. 2, p. 117-141, 2002.

## SEGUNDA PARTE

### **ARTIGO 1 – Sucessão microbiana no processo de maturação do Queijo Minas Artesanal produzido na região de Araxá- MG, com a presença do mofo branco**

Bruna Isabella Reis Cesario<sup>1</sup>, Luís Roberto Batista<sup>1\*</sup>, Fabiana Reinis Franca Passamani<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, Minas Gerais, Brasil

\*Autor correspondente:

Luís Roberto Batista, Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras (UFLA), CEP 37200-900, Lavras, Minas Gerais, Brasil

Tel.: (+55) (35) 3829 1401 18

E-mail: luisrb@dca.ufla.br

## RESUMO

A identificação das bactérias, fungos filamentosos e leveduras presentes do Queijo Minas Artesanal produzido na região de Araxá–MG, seus comportamentos e sucessões de dominância durante a maturação, bem como, as características físico-químicas do queijo, foram os objetivos desse estudo. Quanto aos parâmetros físico-químicos somente pH, umidade e proteína apresentaram diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) ao longo da maturação. Os gêneros mais abundantes de bactérias foram, *Streptococcus sp.*, *Actinoalloteichus sp.*, *Marinomonas sp.*, *Lactococcus sp* e as espécies *Lactococcus lactis subsp. lactis* CV56, *Corynebacterium variabile* DSM 44702, *Brevibacterium aurantiacum*, *Streptococcus salivarius* 57.I, *Streptococcus thermophilus*, *Vibrio casei*, *Bacillus cereus*, *Lactobacillus brevis*, *Streptococcus equinus*, *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus vestibularis* e *Leuconostoc mesenteroides*. Quanto aos fungos, os gêneros mais abundantes foram as leveduras *Kluyveromyces sp.*, *Candida sp.*, *Saccharomyces sp.* e *Torulaspota sp.* e o *Fusarium sp.* (fungo filamentosos) sendo que as espécies de leveduras *Candida catenulata*, *Geotrichum candidum*, *Kluyveromyces lactis* e *Torulaspota delbrueckii* foram as predominantes. Espécies de fungos filamentosos não apresentaram abundância relativa significativa. As análises mostraram que a abundância de um número relativamente reduzido de espécies pode sugerir que as condições ambientais ou do queijo promoveram a seleção da microbiota.

Palavras-chave: Microbiota. *Geotrichum candidum*. Metagenômica *Shotgun*.

## ABSTRACT

The identification of bacteria, filamentous fungi and yeasts present in Queijo Minas Artesanal produced in the region of Araxá-MG, their behavior and dominance succession during maturation, as well as the physical-chemical characteristics of the cheese, were the objectives of this study. Regarding the physical-chemical parameters, only pH, humidity and protein showed statistical differences ( $p < 0.05$ ) during maturation. The most abundant bacteria genera were *Streptococcus sp*, *Actinoalloteichus sp*, *Marinomonas sp*, *Lactococcus sp*, and the species *Lactococcus lactis subsp. lactis* CV56, *Corynebacterium variabile* DSM 44702, *Brevibacterium aurantiacum*, *Streptococcus salivarius* 57. I, *Streptococcus thermophilus*, *Vibrio casei*, *Bacillus cereus*, *Lactobacillus brevis*, *Streptococcus equinus*, *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus vestibularis*, and *Leuconostoc mesenteroides*. As for fungi, the most

abundant genera were the yeasts *Kluyveromyces sp.*, *Candida sp.*, *Saccharomyces sp.* and *Torulaspota sp.* and *Fusarium sp.* (filamentous fungus) with the yeast species *Candida catenulata*, *Geotrichum candidum*, *Kluyveromyces lactis* and *Torulaspota delbrueckii* being the predominant ones. Filamentous fungal species did not show significant relative abundance. The analyses showed that the abundance of a relatively small number of species may suggest that the environmental or cheese conditions promoted the selection of the microbiota.

Keywords: Microbiota. *Geotrichum candidum*. Shotgun metagenomics.

## 1. INTRODUÇÃO

De acordo com a Portaria Nº 146/1996 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), “Entende-se como queijo o produto fresco ou maturado que se obtém por separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído (integral, parcial ou totalmente desnatado), ou de soros lácteos, coagulados pela ação física do coalho, de enzimas específicas, de bactérias específicas, de ácido orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes.” Já o queijo maturado, é definido como sendo o queijo que sofreu as trocas bioquímicas e físicas necessárias para as características da variedade específica do queijo que se destina (BRASIL, 1996).

O Queijo Minas Artesanal (QMA) maturado, patrimônio imaterial de Minas Gerais e do Brasil, é um produto de extrema importância econômica e sociocultural para a região na qual é produzido (FURTADO, 1980). A característica mais marcante deste produto está ligada às suas peculiaridades sensoriais, atribuídas pelos microrganismos originais do leite e que conferem diversas características de sabor, textura e aroma ao queijo (DORES, 2013).

Concentrada em nove microrregiões sendo elas: Serro, Canastra, Cerrado, Araxá, Campo das Vertentes, Serra do Salitre, Triângulo Mineiro, Serras de Ibitipoca e Diamantina (MINAS GERAIS, 2022). A produção do Queijo Artesanal de Minas Gerais compreende aproximadamente 9.445 produtores, que produzem cerca de 29 mil toneladas de queijo todos os anos e gera cerca de 27 mil empregos (EMATER, 2014). Atualmente, existem 254 produtores cadastrados no programa Queijo Minas Artesanal e 19 produtores registrados com “Selo Arte” (IMA, 2020).

Os microrganismos encontrados naturalmente nos queijos podem sofrer uma variação no número de espécies e na população dessas espécies e isso está relacionado ao clima, a alimentação do rebanho e a forma de processamento do produto, justificando assim a singularidade de cada um dos queijos artesanais de Minas. Dessa forma, o QMA do Serro difere do QMA da Serra da Canastra que é distinto do QMA de Araxá (MONTEIRO; MATTA, 2018).

Sendo assim, objetivo deste estudo foi caracterizar a microbiota de queijos artesanais durante o período de maturação da microrregião de Araxá – MG, com o desenvolvimento de fungo branco, com intuito de identificar os microrganismos presentes para avaliar a sucessão microbiana ao longo da maturação (0, 15, 30 e 60 dias) do QMA.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Amostragem dos queijos

As amostras foram coletadas em uma queijaria certificada, localizada na microrregião de Araxá-MG (Figura 1), no período das águas (novembro, 2019), sendo maturados em ambiente climatizado a 28°C. Foram coletados 3 queijos para cada tempo de maturação: 0, 15, 30 e 60 dias (D0, D15, D30 e D60). Depois de coletadas, as amostras de queijo foram transportadas sob refrigeração para o Laboratório de Micologia e Micotoxinas, do Departamento de Ciência dos Alimentos, da Universidade Federal de Lavras, onde foram armazenadas em congelamento rápido a - 80 °C.

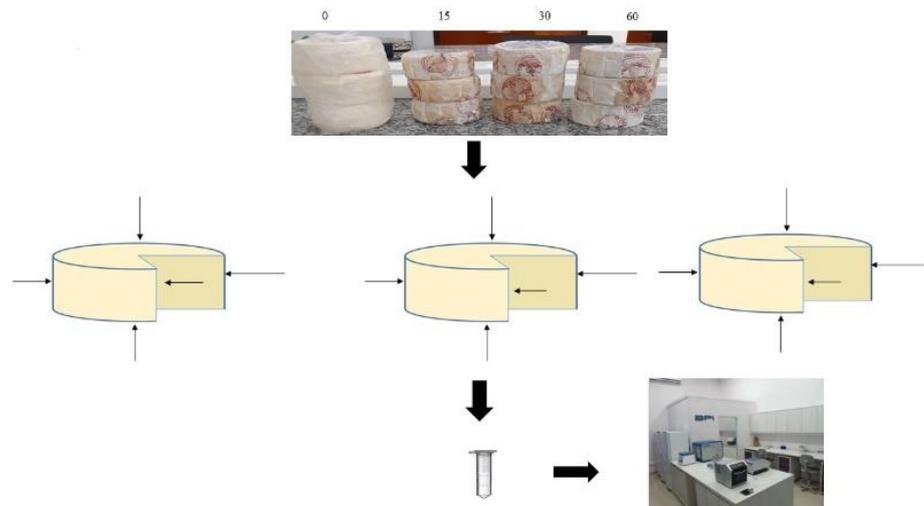
Figura 1 – Sala de maturação do QMA, na microrregião de Araxá – MG.



Fonte: Autor (2022).

Foi realizado uma amostragem composta das repetições para isso, foram coletadas pequenas porções, em pontos equidistantes de cada queijo (laterais, centro, parte superior e inferior), gerando assim um total de 4 subamostras, sendo 1 para cada tempo de maturação (Figura 2). Depois de coletadas, as amostras foram acondicionadas em microtubos (2 mL) e enviadas para análise de metagenômica.

Figura 2 – Amostragem do QMA da microrregião de Araxá – MG.



Fonte: Autor (2022).

## 2.2 Extração de DNA total das amostras de queijo

As amostras foram enviadas para a empresa “Biotecnologia, Pesquisa e Inovação” (BPI), onde o material genético de cada amostra teve seu DNA total extraído através do kit ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™ (Zymo Research cód. D6005) de acordo com protocolo do fabricante e passou por análise de qualidade através da quantificação por fluorescência utilizando o equipamento Qubit® 3.0 Fluorometer e kit Qubit™ dsDNA BR Assay (Thermo Fisher Scientific). O material genético foi fragmentado com ação de enzimas específicas e, de forma simultânea, foram adicionadas sequências adaptadoras (tags) de acordo com protocolo do kit Nextera XT Sample Preparation (Illumina).

## 2.3 Amplificação do DNA

Nesta etapa, amplificou-se material genético fragmentado, inserindo os indexadores nos adaptadores comuns, que são necessários para a geração de clusters e sequenciamento das amostras. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi realizada seguindo o protocolo do kit Nextera XT Index (Illumina). O programa de amplificação consiste em incubações à 72°C por 3 minutos e 95°C por 30 segundos, seguidos de 12 ciclos de 95°C por 10 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos e incubação final a 72°C por 5 minutos, de acordo com o

protocolo do fabricante. As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador Veriti™ Thermal Cycler (Applied Biosystems).

## 2.4 Purificação e Quantificação da Biblioteca

As bibliotecas geradas foram submetidas às etapas de purificação, utilizando bead magnética Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter), para remoção de fragmentos muito pequenos da população total de moléculas e restos de primers, de acordo com o protocolo do fabricante. Então, as bibliotecas purificadas foram quantificadas pela metodologia de PCR Tempo Real utilizando Kit KAPA Library Quantification Kit -Illumina/Universal (Roche), também de acordo com protocolo do fabricante. As amplificações em tempo real foram conduzidas em termociclador QuantStudio3™ (Applied Biosystems). Gerou-se um Pool equimolar das bibliotecas, por meio da normalização de todas as amostras a 3nM, para realização do sequenciamento, o qual foi conduzido utilizando a plataforma Illumina MiSeq de sequenciamento de nova geração (Illumina® Sequencing) e kit Miseq Reagent V2 Nano (500 ciclos) – 2 x 250 pb.

## 2.5 Bioinformática

As sequências foram processadas pelo equipamento MiSeq Illumina. Os dados brutos do sequenciamento Fastq foram processados no programa Kraken2 (WOOD; LU; LANGMEAD, 2019). Posteriormente, foram alinhados com as sequências de bactérias e fungos contidas no banco NCBI, o banco de dados utilizado para bactérias foi RefSeq complete bacterial genomes/proteins e para fungos RefSeq complete fungal genomes/proteins. Para a interpretação da leitura de algumas *Reads* as informações foram processadas pela extensão Dragen metagenomics na própria plataforma Illumina através da contagem total de produtos dos dados brutos (SOMERVILLE *et al.*, 2019), sendo coletados somente os valores referentes aos dias de maturação, e para a análise das contagens de *reads* e suas médias foi utilizado o programa Microsoft Excel 2013, com base em Cruvinel (2017). E para a leitura de identificação taxonômica dos microrganismos os dados brutos foram exportados para o programa Cosmos ID-HUB microbiome.

## 2.6 Análises físico-químicas

Para as análises físico químicas foram utilizados 2 amostras de queijo para cada tempo de maturação (0, 15, 30 e 60 dias).

As análises físico-químicas foram realizadas no Laboratório de Leites e Produtos Lácteos do Departamento de Ciências dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras, em duplicata, para cada tempo de maturação, sendo essas: pH, umidade, sal na umidade, gordura e cinzas de acordo com a AOAC, 1977.

## 2.7 Análises estatísticas

Os dados relativos à composição físico-química do queijo foram submetidos à análise de variância e, quando significativa, as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% ( $p < 0,05$ ) de significância utilizando-se o programa R Studio (versão 4.0.0) usando o pacote ExpDes.PT.

## 2.8 Análises de dados dos microrganismos

Para abundância relativa das espécies foram considerados táxons que apresentaram um índice mínimo de 0,1% de abundância (KAMIMURA *et al.*, 2019; NERO *et al.*, 2021; VERCE; VUYST; WECKX, 2019). E para as análises de microbiota central, foi realizada com base nas espécies e nos gêneros identificados que apresentaram uma prevalência amostral mínima de 10% durante os dias de maturação (NERO *et al.*, 2021). O *heatmap* foi gerado pelo software Heatmapper, e para a análise foram consideradas as espécies com abundância relativa acima de 0,1%, sendo assim, o processamento deu-se a partir do número de táxons incidentes. Para a abundância geral das espécies, foram considerados os táxons com no mínimo 0,1% de abundância relativa.

## 2.9 Alfa diversidade

Para alfa diversidade as seguintes fórmulas foram utilizadas:

**Quadro 1. Índices de Alfa Diversidade**

Índices	Denominação	Fórmulas
Diversidade	Shannon (H')	$H' = - \sum_{i=1}^S p_i \ln p_i$
	Simpson (D)	$D = \frac{\sum_{i=1}^S n_i(n_i - 1)}{N(N - 1)}$

Em que: H'= Índice de Shannon-Weaver. S = número de espécies, chamado também de riqueza. n=O número total de todos os indivíduos; pi=A abundância relativa de cada espécie, calculada pela proporção dos indivíduos de uma espécie pelo número total dos indivíduos na comunidade. Índice de Simpson: S=é o número de espécies; N= o total de organismos presentes; n é o número de indivíduos por espécie.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Metagenômica *shotgun*

As amostras geraram um total de 187010 sequências de qualidade adequadas para leitura (*reads*) (Tabela 1).

Tabela 1 – Levantamento de *reads* gerados ao longo da maturação.

Dias	Bactérias	Fungos	Total de <i>reads</i> gerados	Não classificados	% <i>Reads</i> perdidas
0	23595	1351	50751	25805	50.85
15	29205	393	43562	13964	32.06
30	23365	1963	47645	22317	46.84
60	29383	1030	45052	14639	32.49

O número médio de *reads* por amostra foi de 46.752, ao nível taxonômico de espécies e gêneros de fungos e bactérias. Em relação ao D0, foram geradas 23.595 sequências para bactérias (espécie e gênero) e 1.351 sequências para fungos (espécie e gênero) sendo o dia com maior número total de *reads* gerados e, por conseguinte, o dia com maior porcentagem de sequências não classificadas e *reads* perdidas (50,85%). No D15, foram obtidos 29.205 *reads*

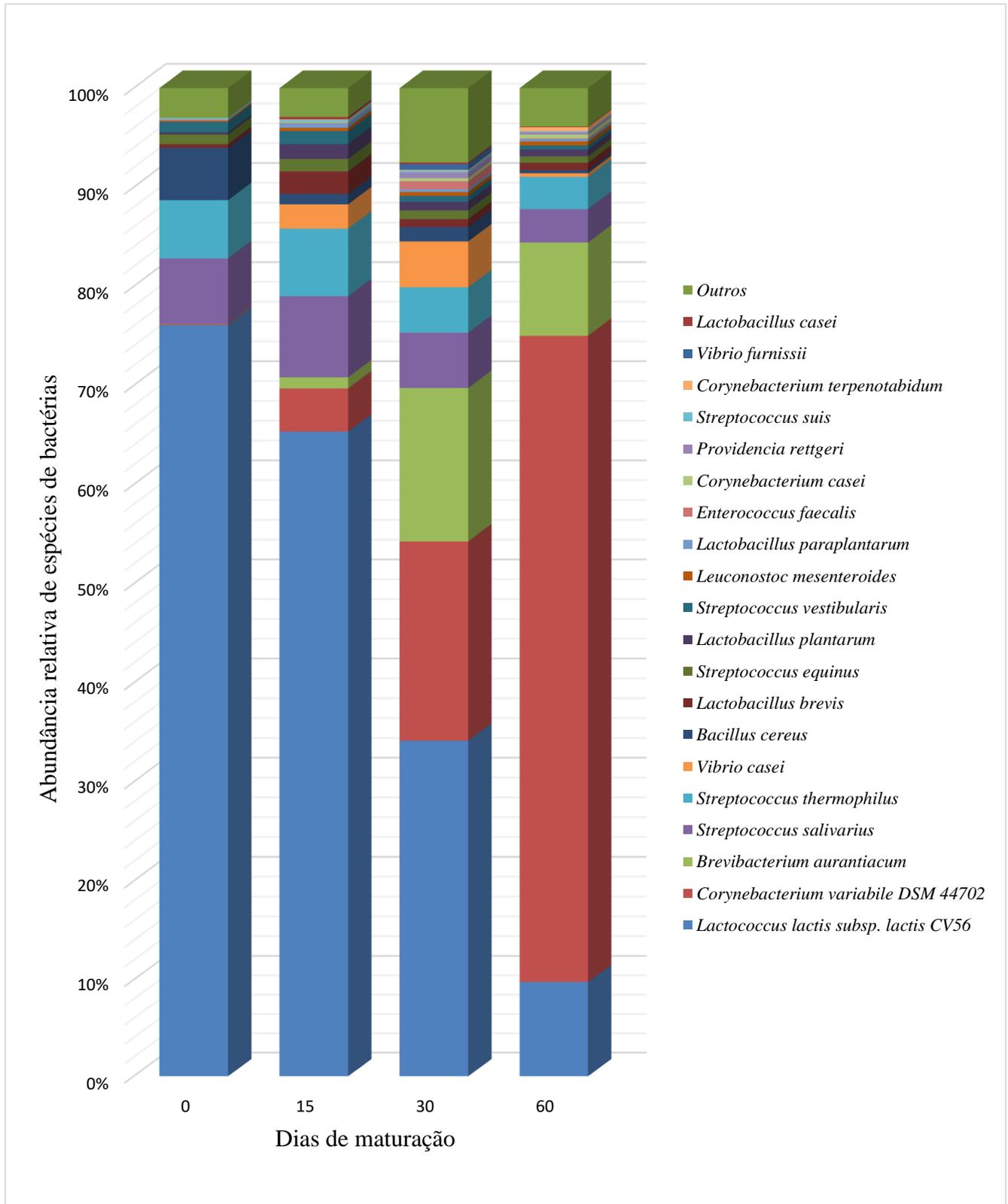
para bactérias (espécie e gênero) 393 para fungos (espécie e gênero), este dia atingiu a menor contagem de *reads* para fungos ao longo da maturação e a segunda maior contagem para bactérias, porém, foi o dia que a apresentou a menor quantidade total de *reads* gerados e a menor porcentagem de *reads* perdidas (32,06%). Ao D30, foram gerados um total de 47.645 *reads*, sendo essas 23.365 em relação a bactérias (espécie e gênero) e 1.963 para fungos (espécie e gênero), sendo o dia com o maior número de sequências geradas para fungos, o segundo maior dia no total de *reads* obtidos e o segundo maior também em porcentagem de perda de *reads* (46,84%). O D60 foi o dia em que 45.052 *reads* foram geradas, destes 29.383 foram para bactérias (espécie e gênero) e 1.030 para fungos (espécie e gênero), sendo o dia com o maior número de sequências obtidas para bactérias, e atingiu a porcentagem de 32,49% *reads* perdidas, sendo o segundo menor dia em relação a perda de sequências. Santanna *et al.*, (2019), ao estudar o microbioma de queijos Canastra (leite, pingo e queijo) ao longo da maturação obteve um total de 4.821,455 sequências obtidas. O ambiente do queijo pode gerar uma grande quantidade de *reads*, pois é rico em nutrientes que podem ser utilizados como substrato para os microrganismos presentes, favorecendo assim a sobrevivência e a alta incidência destes nas amostras.

### 3.2 Bactérias presentes no queijo

Diferenças no perfil microbiano podem ser úteis para estabelecer quais componentes microbianos podem ser responsáveis pela autenticação de queijos (KAMIMURA *et al.*, 2019). Os queijos, particularmente os queijos artesanais, contêm uma mistura muito diversificada de espécies bacterianas, algumas das quais ainda não foram sequenciadas e/ou os dados relevantes ainda não foram disponibilizados ao público (AFSHARI *et al.*, 2020).

Um total de 543 espécies com alto grau de similaridade bacteriana foram identificadas e essas espécies foram classificadas em 170 gêneros distintos. Considerando a abundância relativa das espécies bacterianas encontradas no QMA de Araxá algumas apresentaram dominância, como *Lactococcus lactis subsp. lactis* CV56, *Corynebacterium variabile* DSM 44702, *Brevibacterium aurantiacum*, *Streptococcus salivarius* 57.I, *Streptococcus thermophilus*, *Vibrio casei*, *Bacillus cereus*, *Lactobacillus brevis*, *Streptococcus equinus*, *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus vestibularis* *Leuconostoc mesenteroides* (Figura 3).

Figura 3 – Abundância relativa das espécies bacterianas encontradas no QMA de Araxá – MG.



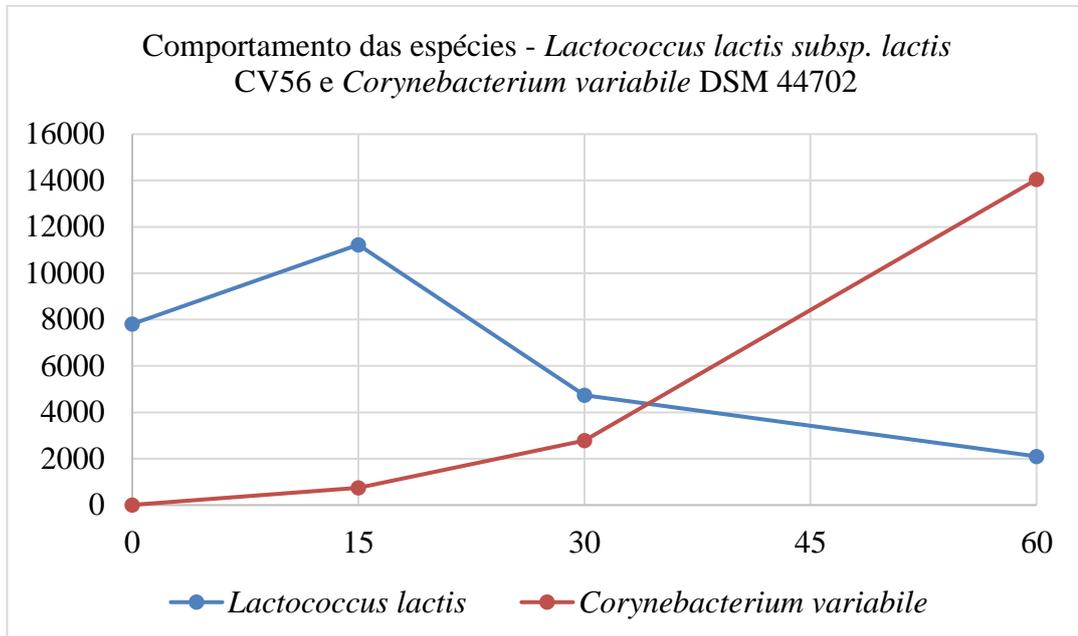
A microbiota central das espécies bacterianas foi composta por 3 espécies, sendo essas: *Lactococcus lactis subsp. lactis CV56*, *Corynebacterium variabile DSM 44702*, *Brevibacterium aurantiacum*.

A espécie *Lactococcus lactis subsp. lactis* CV56 foi a espécie prevalente até o 30º dia de maturação, com valores de incidência de 76,09% no D0, 65,34% no D15, havendo um decréscimo no D30 para 34,16% e 9,76% no D60 (Figura 4). A dominância dessa espécie também foi encontrada em QMAs de outras regiões produtoras, como Serro, Canastra, Campo das Vertentes e Serra do Salitre e na mesma região de Araxá-MG (NERO *et al.*, 2021; MARGALHO *et al.*, 2020; PERIN *et al.* 2017; NÓBREGA *et al.*, 2012, LIMA, 2009). Esse organismo é um componente comum de culturas iniciadoras usadas na produção de queijo (AFSHARI, 2020), e são reconhecidas por desempenharem papéis cruciais durante todas as fases do processo de maturação do queijo. *L. lactis* converte açúcares em ácido láctico, induzindo assim a acidificação e a coagulação do leite (TAN-A-RAM, 2011). Também produz pequenas quantidades de outros metabólitos e enzimas que contribuem para os aromas e sabores mais sutis que auxiliam na identidade dos diferentes tipos de queijos (SMIT; SMIT; ENGELS, 2005).

*Corynebacterium variabile* DSM 44702 (D0:0,09%; D15:4,35%; D30:20,10%; D60:65,24%) nos dias iniciais de maturação essa espécie apresentou abundância relativamente discreta, porém, a partir do D30 essa espécie foi a dominante nas amostras (Figura 4). Essa espécie faz parte da microbiota complexa na superfície de queijos maturados por esfregaço e contribui para o desenvolvimento de sabor e de propriedades de textura durante a maturação do queijo, sendo considerada segura e não patogênica (SCHRÖDER *et al.*, 2011).

*Brevibacterium aurantiacum* (D0:0%; D15:1,12%; D30:15,49%; D60:9,41%) teve seu início de incidência de forma discreta no D15, e seu pico no D30 e queda no D60, e essa bactéria tem sido usada há muito tempo como iniciadora no processo de maturação. Elas são usadas por sua capacidade de produzir pigmentação alaranjada e liberar uma variedade de aromas durante a maturação do queijo e por seu potencial inibitório contra patógenos alimentares (FORQUIN *et al.*, 2011).

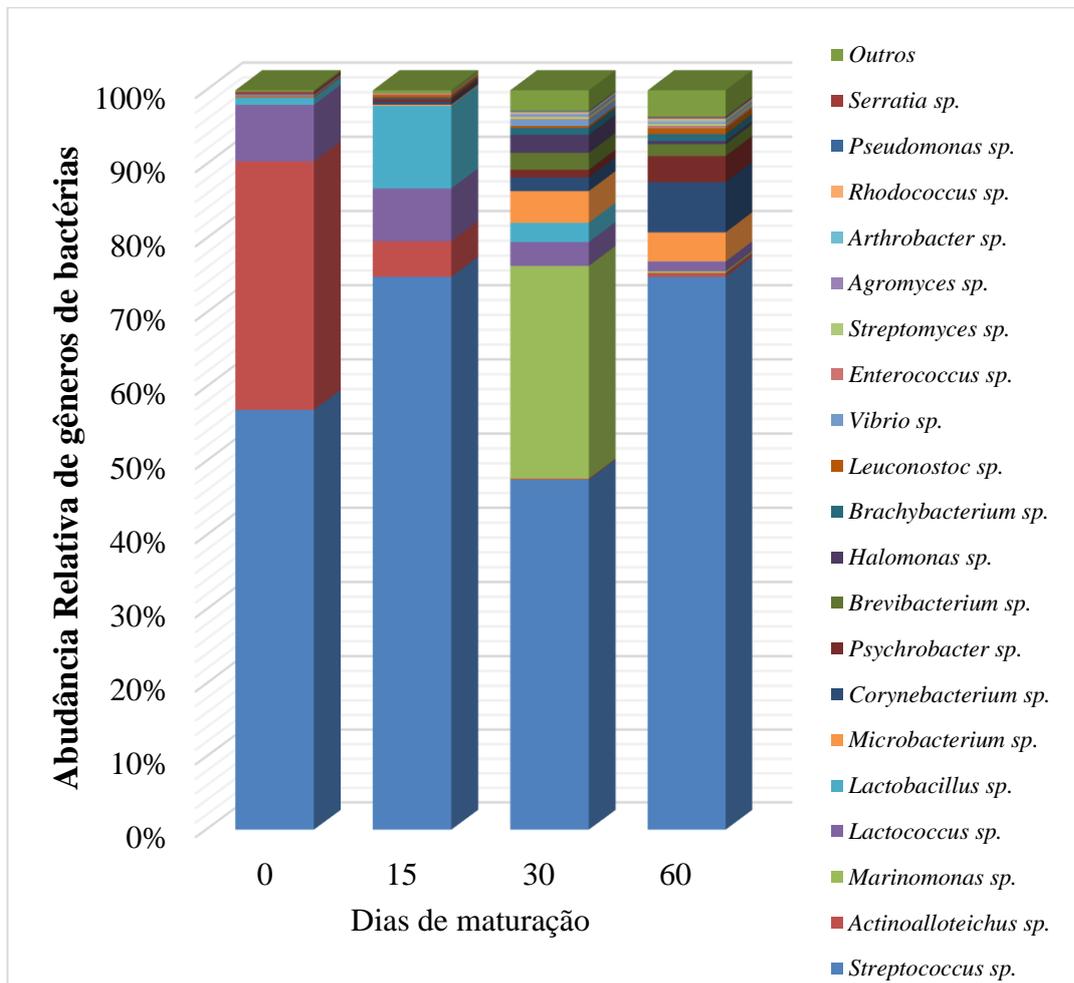
Figura 4 – Comportamento das espécies *Lactococcus lactis subsp. lactis* CV56 e *Corynebacterium variabile* DSM 44702.



*Lactococcus Lactis* e *Corynebacterium variabile* demonstraram comportamentos antagonísticos, o que pode ser visto no D30 de maturação (Figura 4). Isso pode ser explicado devido às alterações das características do queijo ao longo do período de maturação. *Lactococcus lactis* é uma bactéria que se desenvolve geralmente no início do período de maturação, acidificando o meio. No entanto, durante o processo de maturação, sua incidência pode ser reduzida pelo aumento do teor de sal, devido a sua sensibilidade a este (BRUNO; CARVALHO, 2009), fato não observado neste estudo. De forma antagonística, *C. variabile* é um microrganismo bastante tolerante ao sal, capaz de crescer na presença de 8,0% de NaCl e em valores de pH abaixo de 4,9. Sua presença em queijos artesanais ainda não tinha sido detectada em outros estudos, com exceção do estudo realizado por Ferreira (2020), onde o gênero desta espécie também foi um dos dominantes.

A microbiota central bacteriana do QMA de Araxá incluiu 4 gêneros de bactérias, *Streptococcus sp.*, *Actinoalloteichus sp.*, *Marinomonas sp.*, *Lactococcus sp.*, (Figura 5) a predominância do gênero *Streptococcus sp.* e *Lactococcus sp.*, também foi observada em queijos do Cerrado, Serro e Araxá (KAMIMURA *et al.*, 2020; NERO *et al.*, 2021; SANT'ANNA *et al.*, 2019; LUIZ *et al.*, 2017).

Figura 5 – Abundância relativa dos gêneros bacterianos encontrados no QMA de Araxá – MG.



Quanto ao gênero *Streptococcus sp.*, demonstrou-se alta incidência e dominância em todos os dias de maturação (D0: 56,93%; D15:74,85%; D30:47,50%; D60:74,86%) e seu pico de incidência foi ao D60, ou seja, no fim do processo de maturação (Figura 5). Algumas espécies pertencentes a esse gênero são de extrema importância no processo de fermentação láctica, como as espécies *Streptococcus salivarius* e *Streptococcus thermophilus* encontradas no presente estudo que são comumente achadas em queijos artesanais (NÓBREGA, 2012; SHANI *et al.*, 2021; NERO *et al.*, 2021). *Streptococcus thermophilus* é considerada a segunda cultura iniciadora mais importante do ponto de vista tecnológico após *Lactococcus Lactis*. O papel importante de *S. Thermophilus* na fermentação do leite deve-se à sua capacidade de converter a lactose em ácido láctico, causando uma rápida diminuição do pH e a produção de metabólitos importantes por suas propriedades tecnológicas, exopolissacarídeos e bacteriocinas (DELORME, 2008), porém, cabe destacar que a espécie *Strepcoccus agalactiae* presente neste

gênero, comumente encontrada em queijos artesanais, está ligada a incidência de mastite em rebanhos leiteiros.

O gênero *Actinoalloteichus sp.* (D0:33,48%; D15:4,80%; D30:0,14; D60:0,51), durante o início do processo de maturação (D0) foi o segundo mais abundante, porém, com o decorrer do tempo obteve queda brusca em sua incidência do D15 ao D60 (Figura 5), os microrganismos presentes nesse gênero apresentam amplo espectro de funções biológicas, incluindo antioxidantes, atividade antimicrobiana, antivírus e também é conhecido por seu potencial pigmentante (MANIVASAGAN *et al.*, 2014), não foram encontrados relatos desse gênero de outras regiões mineiras produtoras de QMA.

O gênero *Lactococcus sp.* (D0:10,63%; D15:7,11%; D30:3,21%; D60:1,29%), obteve redução de sua incidência a partir do D30 durante o processo de maturação (Figura 5), resultados semelhantes foram encontrados por Fontán *et al.*, (2001); Lopez-Diaz *et al.*, (2000) e Cruvinel (2017), onde esse gênero foi o mais abundante em todos os queijos analisados e no “pingo”, por fazer parte da microbiota iniciadora, as bactérias desse gênero geralmente tem sua presença reduzida durante o processo de maturação à medida que ocorre queda no pH e a concentração de sal aumenta (OLIVEIRA, 2014; BRUNO; CARVALHO, 2009; ANTONIO, 2021; CRUVINEL, 2017).

*Streptococcus sp.* e *Lactococcus sp.* são dois gêneros de extrema importância, pois neles estão inclusas importantes espécies BAL, nas quais seu metabolismo de aminoácidos e ácidos graxos influencia diretamente para o desenvolvimento do flavor do queijo (DALMASSO *et al.*, 2016).

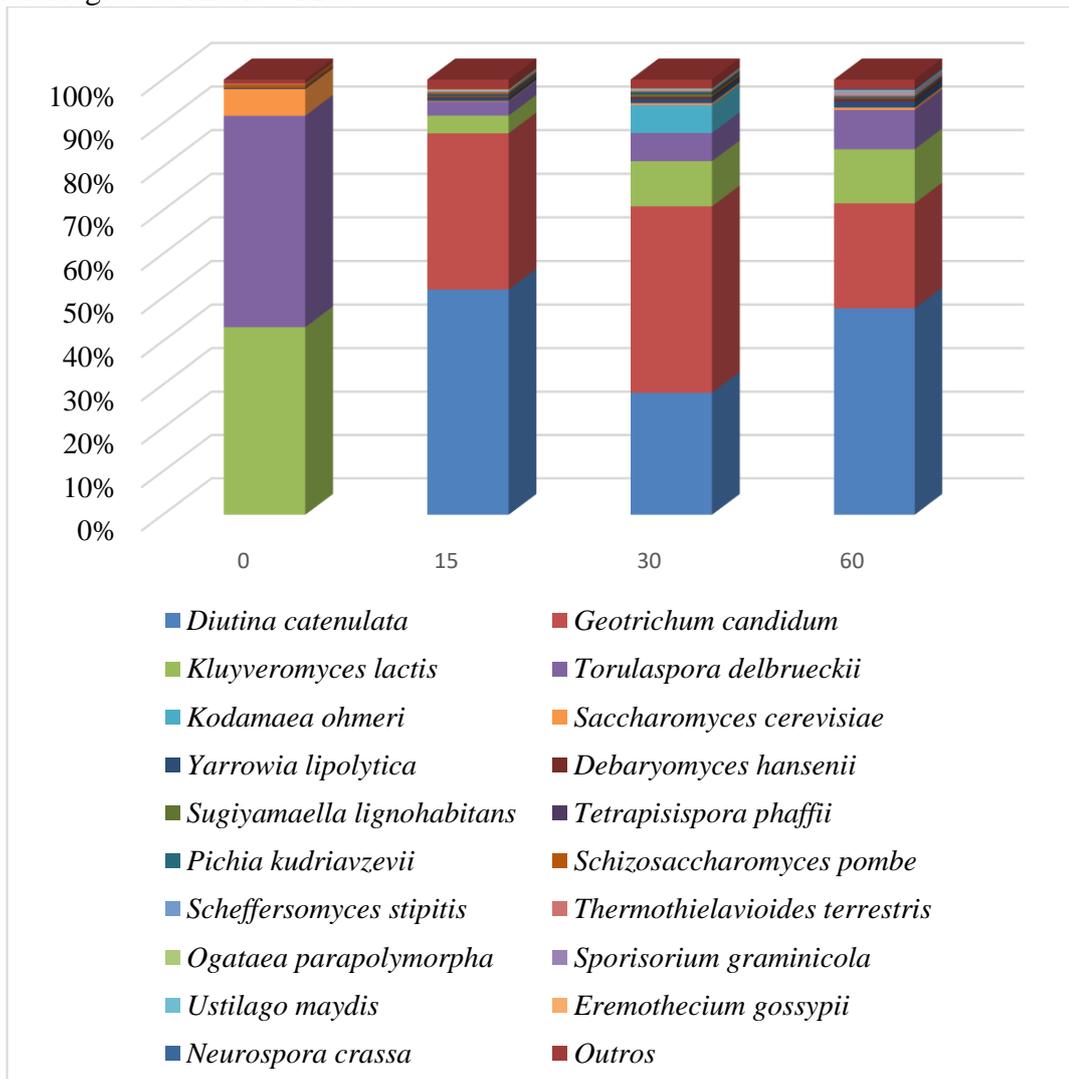
Gêneros indesejáveis também foram identificados, mas em baixa ocorrência na maioria dos dias, como as *Marinomonas sp.* (D0:0%; D15:0%; D30:28,69% D60:0,24%) em que os indivíduos presentes esse gênero foram incidentes em alta abundância somente a partir do D30, tendo um grande decréscimo ao D60. Ademais, táxons deste gênero geralmente estão correlacionados a patologias humanas.

### 3.3 Fungos do QMA

Um total de 70 espécies e 25 gêneros de fungos foram identificados. As espécies mais prevalentes sendo definidas como microbiota central foram *Candida catenulata*, *Geotrichum candidum*, *Kluyveromyces lactis*, *Torulaspora delbrueckii* (Figura 6), assim como no presente estudo, resultados semelhantes foram encontrados por Souza *et al.* (2021) que também observou a dominância das espécies de leveduras *Kluyveromyces lactis* e *Geotrichum candidum*, em

queijos da região do Serro. A prevalência das espécies de fungos filamentosos e de leveduras depende das características específicas de cada variedade de queijo e das etapas de fabricação, além disso, a composição das espécies de levedura muda muito ao longo do processo de maturação do queijo.

Figura 6 – Abundância relativa de espécies fúngicas em diferentes dias de maturação de QMA da microrregião de Araxá – MG.



De acordo com a abundância relativa dessas espécies, *Candida catenulata*, demonstrou o maior valor de incidência a partir do D15 de maturação, obtendo o maior valor médio de abundância neste citado dia (D0:0%; D15:51,81%; D30:28,13%; D60:47,51%), esta levedura também foi identificada em queijos de outras regiões como Canastra (época das águas) e Serro (época das águas e seca) (BORELLI, 2006; CARDOSO *et al.*, 2015). *Candida catenulata* é uma das responsáveis pela produção de proteases e lipases no leite e produtos lácteos

(PEREIRA-DIAS *et al.*, 2000) e compostos antimicrobianos (SEENTER, 2010), sendo relatada em queijos de casca florida em outros estudos (MOUNIER, *et al.*, 2006).

O segundo microrganismo mais abundante foi *Geotrichum candidum*, conhecido como mofo branco, (D0:0%; D15:35,83%; D30:42,76%; D60:24,07%) (Figura 6). Sua incidência ocorreu a partir do D15 de maturação, sendo a segunda espécie dominante neste dia, a dominante no D30, e novamente, a segunda mais abundante ao final da maturação no D60. A presença desta levedura em queijos artesanais é considerada benéfica, pois está envolvida principalmente na quebra de peptídeos em produtos de degradação menores, mas sem aumentar a concentração de aminoácidos livres (WYDER, 1998). As estirpes de *G.candidum* não assimilam a lactose, mas metabolizam galactose e posteriormente lactato (SOULIGNAC, 1995). Sensorialmente, queijos com a presença do *Geotrichum* obtiveram maior pontuação quando a presença desta foi a maior quantidade incidente em queijos tipo *camembert*, por propiciar aromas e sabores distintos (DIAS, 2009).

*Kluyveromyces lactis* demonstrou uma média de incidência alta no D0 (D0:43,20%; D15:4,03%; D30:10,36%; D60:12,42%) sendo a segunda maior dominância neste citado dia (Figura 6), apresentando decréscimo nos dias posteriores (D15 e D30) e com discreto aumento no D60, resultados semelhantes foram relatados por Lima (2009) e Souza *et al.* (2021). Em testes *in vivo*, essa levedura apresentou alta sobrevivência no trato gastrointestinal (ANDRADE, 2021), sendo um microrganismo que possui características funcionais interessantes e ausência de propriedades indesejáveis, podendo ser consideradas candidatas probióticas apropriadas, sobrevivendo ao trato gastrointestinal (FADDA *et al.*, 2017), este também é responsável pela formação de diversos compostos no desenvolvimento de sabor do queijo (SOUZA *et al.*, 2021), que são relatados como importantes para o aroma e sabor (ANDRADE, 2017) e se destaca também por sua grande habilidade de fermentação de lactose (FADDA *et al.*, 2004).

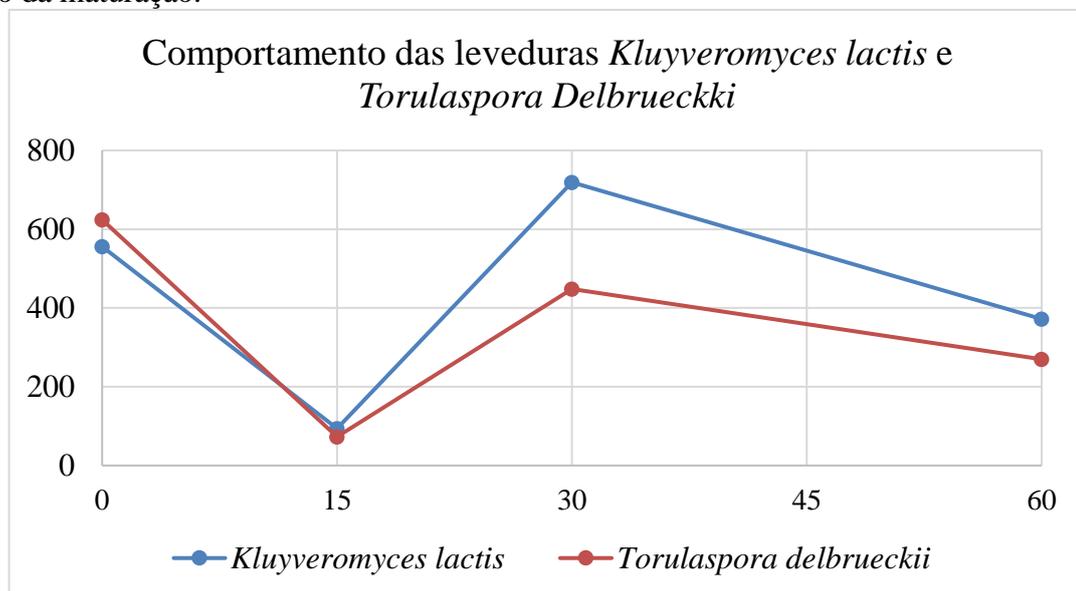
*Torulaspora delbrueckii* esteve presente durante todo processo de maturação (D0: 48,48%; D15: 3,16%; D30:6,45%; D60: 9,01%) do queijo, obtendo seu ápice ao D0 sendo a espécie mais abundante neste dia, com o decorrer da maturação sua abundância obteve queda no D15, e discreto aumento do D30 para o D60. De acordo com BORELLI (2006), ANDRADE, (2017) e ARAGÃO (2018), essa levedura mostrou-se importante para formação de sabor; e aromas no queijo da Serra da Canastra.

As espécies de fungos filamentosos não apresentaram abundância acima de 10% de incidência no presente trabalho, o que pode indicar qualidade e segurança no processo produtivo deste QMA, tendo em vista que em alguns casos o crescimento de fungos filamentosos pode

ser indesejável e indicativo de contaminação (SOBRAL *et al.*, 2017). Entretanto, é importante destacar que, na fabricação de algumas variedades de queijos, esses são desejáveis na microbiota do queijo, como é o caso dos queijos maturados com a presença do mofo branco (*Penicillium camemberti*) em queijos como o Camembert e o Brie e os fungos azuis (*Penicillium roqueforti*) em queijos como o Gorgonzola e o Roquefort (ZACARCHENCO *et al.*, 2011). Em alguns queijos especiais, a presença destes faz parte do processo de Denominação de Origem Protegida (DPO).

Duas espécies apresentaram comportamentos interessantes e semelhantes, *Kluyveromyces lactis* e *Torulaspora delbrueckii*, com incidência alta (em relação aos demais dias de maturação) no D0, queda ao D15, aumento da porcentagem populacional no D30, e posterior queda ao D60 (Figura 7). Essas leveduras são conhecidas por apresentarem potencial probiótico semelhantes em ambientes simulados com taxas de sobrevivência acima de 90% e em diferentes concentrações de NaCl, apresentando alta em suas populações após 21 dias de maturação em queijos que foram utilizando inóculos mistos de ambas culturas, sendo alternativas interessantes para produção de queijos (ANDRADE, 2017).

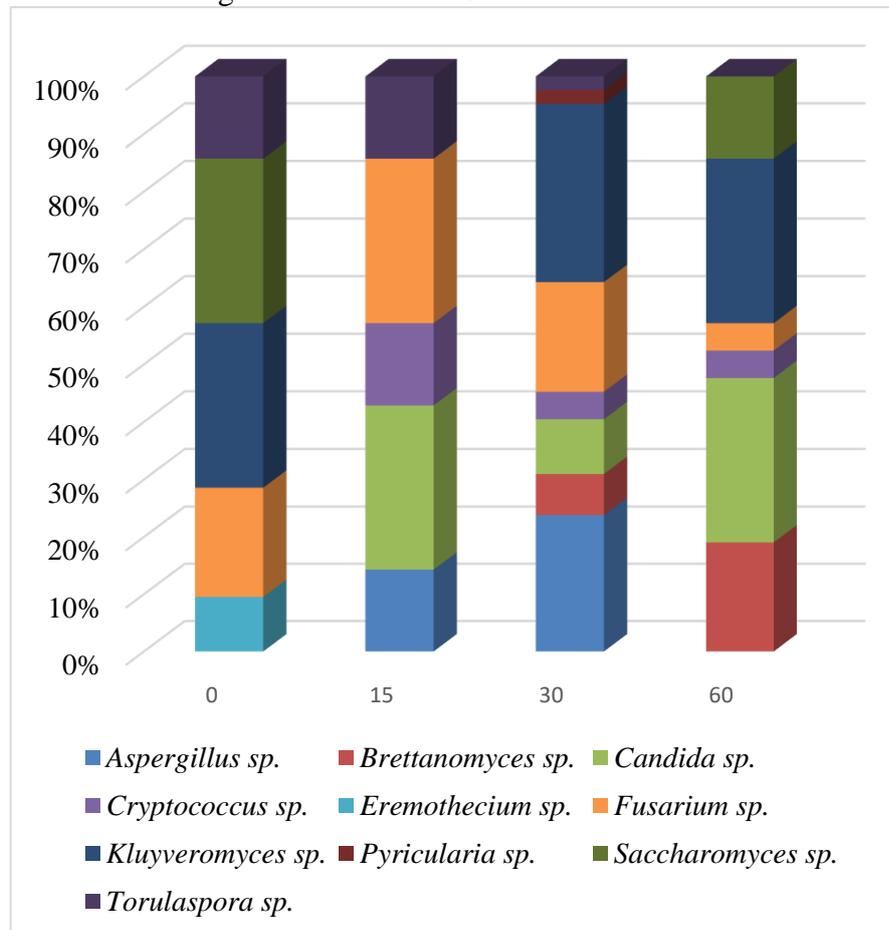
Figura 7 – Comportamento das leveduras *Kluyveromyces lactis* e *Torulaspora delbrueckii* ao longo da maturação.



A microbiota central fúngica do QMA Araxá incluiu 5 gêneros entre fungos filamentosos e leveduras, sendo estes *Kluyveromyces sp.*, *Fusarium sp.*, *Candida sp.*, *Saccharomyces sp.* e *Torulaspora sp.* O gênero *Kluyveromyces sp.* apresentou uma das maiores médias de incidência (D0:28,57%; D15:0%; D30:30,95; D60:28,57%) exceto ao D15 onde a

ocorrência desta não foi identificada, seu pico foi no D30 e ao D60 permaneceu com incidência relativamente elevada (Figura 8). Diversos estudos ressaltam a alta capacidade de produção de galactosidase por indivíduos presentes nesse gênero (SCHOLZ, 2011; SAMPAIO *et al.*, 2020, CARVALHO *et al.*, 2022). Esta importante enzima hidrolisa a lactose, carboidrato característico do leite, em seus monossacarídeos glicose e galactose, melhorando a digestibilidade dos derivados lácteos (SANTIAGO *et al.*, 2004).

Figura 8 – Abundância relativa de gêneros de fungos em diferentes dias de maturação de Queijo Minas Artesanal da microrregião de Araxá – MG.



Em relação aos fungos filamentosos, *Fusarium sp.* (D0:19,04%; D15:28,57%; D30:19,04%; D60:4,76%), se manteve presente durante todo o processo de maturação, sendo seu ápice ao D15, havendo decréscimo nos dias posteriores, sendo o gênero mais abundante no citado dia juntamente com o gênero *Candida sp.* (Figura 8). Táxons desse gênero foram relatados por Souza *et al.* (2021) em amostras do ar da sala de maturação de queijarias da região do Serro e também possivelmente advindos do leite cru. Cabe ressaltar que alguns microrganismos presentes nesse gênero estão, comumente, associados à produção de

micotoxinas (CROUS *et al.*, 2021). A presença de fungos filamentosos é comum em queijos manufaturados a partir da matéria prima “leite cru” (BUDAK, 2016; BACHMANN, 2001) e o Reino *Fungi* é onipresente no ambiente, seja no ar, na água ou no solo. Eles podem, portanto, contaminar facilmente o local de produção de queijo e o próprio produto. No queijo, crescem com muita facilidade, haja vista que podem superar condições desfavoráveis a outros microrganismos, como baixas temperaturas, atividade de água reduzida e altas concentrações de sal, pH baixo e falta de carboidratos (HOCKING; FAEDO, 1992).

*Candida sp.* (D0:0%; D15:28,57%; D30:9,52% D60:28,57%) foi notada a partir do D15, decaindo ao D30, e atingindo o mesmo valores de abundância inicial no D60, esse gênero também foi encontrado no período das águas por Aragão (2018). Esta é uma levedura que faz parte da microbiota do corpo humano e animais podendo ou não serem causadoras de patologias. Porém, *Candida intermedia* já foi correlacionada como agente ativo na formação de sabor de queijos (YONTEN; AKTAŞ, 2014; ARAGÃO, 2018; ANDRADE, 2017.)

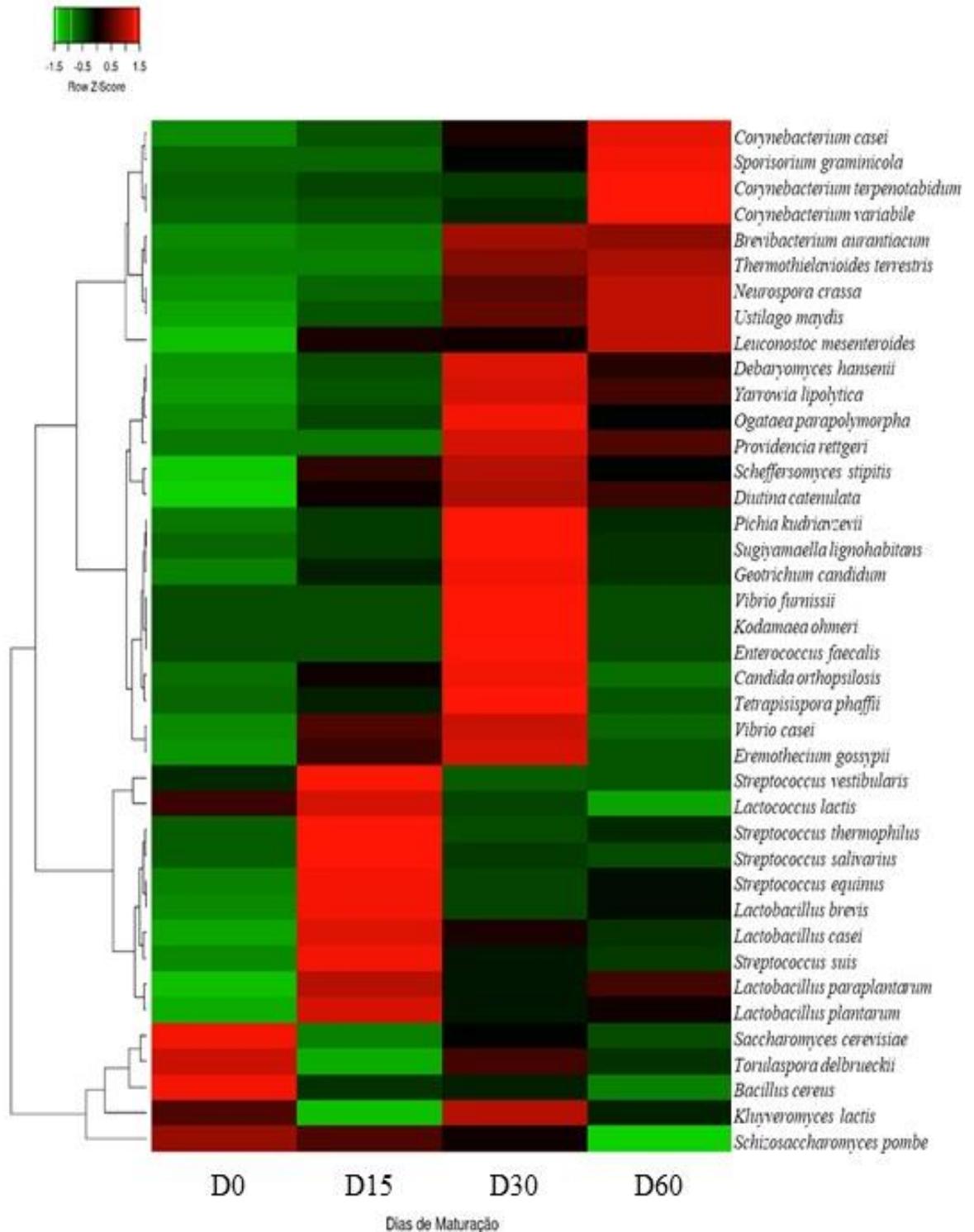
*Saccharomyces sp.* (D0:28,57%; D15:0%; D30:0%; D60:14,28%), juntamente com o gênero *Kluyveromyces sp.* (D0:28,57), foi o gênero mais abundante ao D0. Ao D15 e D30, não foram identificados táxons do gênero, porém ao D60 este se mostra presente no queijo, a não identificação de espécies desse gênero no D15 e D30 pode ter se dado pela competição com outros microrganismos presentes no queijo. Espécies desse gênero já se demonstraram eficientes no controle biológico de microrganismos indesejáveis devido a sua forma de ação: sua parede celular possui proteínas que têm capacidade de transpor as barreiras das membranas plasmáticas dos seus alvos, tornando-a mais eficientes na competição de espaços e de nutrientes em relação a outros microrganismos, como a espécie *Saccharomyces cerevisiae* encontrada no presente estudo (PLATANIA *et al.*, 2012).

As leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowia lipolytica*, *Debaryomyces hansenii* encontradas no presente estudo, foram responsáveis por produzirem um total de 56 compostos voláteis detectados sendo que a maioria (mais de 50%) eram aldeídos, cetonas, álcoois e ésteres serem importantes para a formação de sabor do queijo (SORENSEN *et al.*, 2011).

Sobre o gênero *Torulaspota sp.* (D0:14,28%, D15:14,28%; D30:2,38%; D60:0%), este foi presente a partir do D0 e manteve seus índices no D15, apresentou queda de abundância no D30 e sua presença não foi identificada no D60 de maturação. As leveduras presentes nesse gênero são habitualmente fermentativas (RAMÍREZ; VELÁZQUEZ, 2018). Em queijos de outras regiões, como do Serro e da Canastra, esse gênero de leveduras também foi identificado em alta abundância (ARAGÃO, 2018; CARDOSO *et al.*, 2015; BORELLI, 2006).

Por intermédio da análise de *Heatmap*, é possível observar quais microrganismos ao nível de espécie estão mais presentes e em maior concentração em cada dia ao longo da maturação (Figura 9).

Figura 9 – *Heatmap* com base na abundância das espécies fúngicas e bacterianas encontradas no QMA da microrregião do Araxá – MG.



\**Heatmap* mostrando a abundância microbiana nas amostras de queijo ao longo da maturação. Clusterização hierárquica para agrupamento das amostras com base no coeficiente de correlação de Pearson para a abundância de espécies com índice mínimo de 10% de incidência nas amostras de queijo. A escala apresentada de cores exprime a abundância escalonada (relativizada) de cada variável, denotada como Z-score (-1,5 a 1), com vermelho indicando alta abundância (do claro ao escuro) e verde (do claro ao escuro) indicando abundância baixa.

Ao D0 foram observados índices elevados de abundância das espécies *Lactococcus lactis subsp. lactis* CV56, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis*, *Bacillus cereus*, *Torulaspota delbrueckii* e *Saccharomyces cerevisiae*, sendo o dia de maturação com menor quantidade de interação entre os táxons analisados. Dentre as espécies abundantes, por maioria se manifestaram as leveduras, porém, de forma relativamente discreta quando observadas as abundâncias dos demais dias.

Em relação ao D15, destacaram-se *Schizosaccharomyces pombe*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paraplantarum*, *Streptococcus suis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus brevis*, *Streptococcus equinus*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis subsp. lactis* CV56, *Streptococcus vestibularis*, *Eremothecium gossypii*, *Vibrio casei*, *Candida orthopsilosis*, *Candida catenulata*, *Scheffersomyces stipitis* e *Leuconostoc mesenteroides*. Tendo as bactérias se manifestado em maior número de táxons abundantes, nota-se a presença das BAL neste dia em alta abundância como a *Lactococcus lactis subsp. lactis* CV56, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus plantarum*, e *Lactobacillus casei* e *Leuconostoc mesenteroides*, sendo que esta última espécie teve seu potencial probiótico e bacteriostáticos analisados em outros estudos, apresentando bons índices sobre bactérias patogênicas (PAULA *et al.* 2015). Oliveira (2014), concluiu que, em alguns casos, há um processo competitivo entre BAL, fungos e leveduras, onde, quando há maior incidência das bactérias ácido lácticas, a contagem de fungos e leveduras tendem a cair, a contagem de bolores e leveduras em seu trabalho foi menor que a de BAL no decorrer da maturação, sendo assim, concluiu-se que há competição entre estes microrganismos. Todavia, as espécies fúngicas possivelmente estão em desvantagem porque necessitam de uma maior concentração de oxigênio para prosperar.

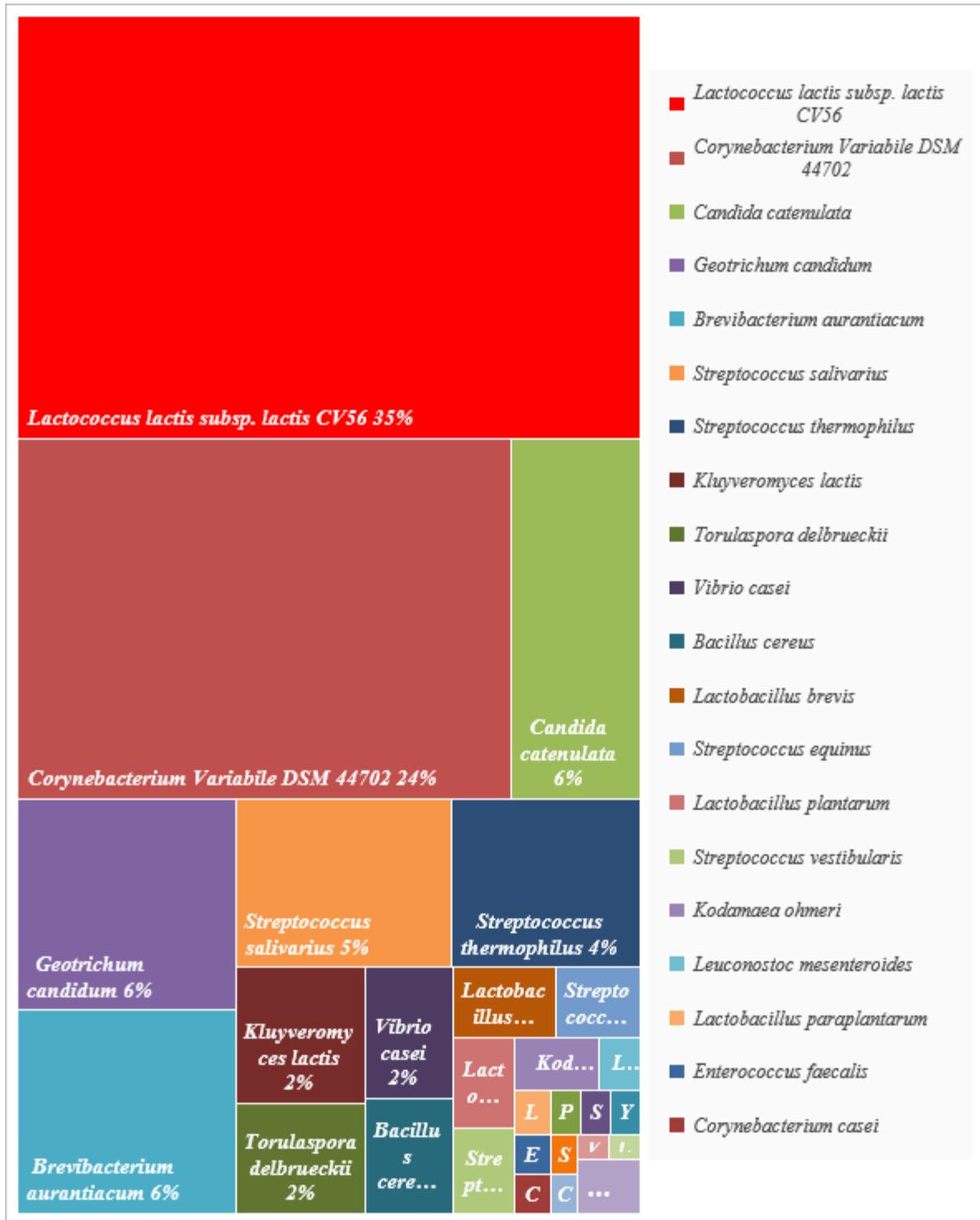
No D30, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis*, *Torulaspota delbrueckii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus casei*, *Eremothecium gossypii*, *Tetrapisispora phaffii*, *Candida orthopsilosis*, *Enterococcus faecalis*, *Kodamaea ohmeri*, *Vibrio furnissii*, *Geotrichum candidum*, *Sugiyamaella lignohabitans*, *Pichia kudriavzevii* *Candida catenulata*,

*Scheffersomyces stipitis*, *Providencia rettgeri*, *Ogataea parapolyomorpha*, *Yarrowia lipolytica*, *Debaryomyces hansenii*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Ustilago maydis*, *Neurospora crassa*, *Thermothielavioides terrestris*, *Brevibacterium aurantiacum*, *Corynebacterium variabile* DSM 44702, *Sporisorium graminicola*, *Corynebacterium casei*, sendo o dia que apresentou a maior quantidade de espécies abundantes nos dias de maturação analisados, nota-se uma alta abundância de leveduras incidentes, uma alta abundância de fungos e leveduras também foi encontrada ao D30 em queijos oriundos do Campos das Vertentes (OLIVEIRA, 2014). Por via, as leveduras são frequentemente detectadas em grande quantidade no ambiente do queijo, sendo que isto pode relacionado a uma boa capacidade em estabelecer-se devido ao substrato rico em proteínas, lipídios, açúcar e ácidos orgânicos (NÓBREGA *et al.*, 2008).

Por fim, no D60 foram observadas, *Lactobacillus paraplantarum*, *Candida catenulata*, *Scheffersomyces stipitis*, *Providencia rettgeri*, *Ogataea parapolyomorpha*, *Yarrowia lipolytica*, *Debaryomyces hansenii*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Ustilago maydis*, *Neurospora crassa*, *Thermothielavioides terrestris*, *Brevibacterium aurantiacum*, *Corynebacterium variabile* DSM 44702, *Corynebacterium terpenotabidum*, *Sporisorium graminicola* e *Corynebacterium casei*, onde se pôde notar uma queda no número de espécies abundantes em relação ao D30, isto pode ter se dado pelas mudanças no ambiente do queijo ao longo da maturação, neste dia houve menor incidência de abundância de bactérias ácido lácticas em relação ao início da maturação, exceto das *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum* e *L. paraplantarum* que se demonstraram abundantes neste dia. Com o avançar da maturação, as bactérias do gênero *Lactobacillus sp*, tendem a se manterem abundantes por serem mais resistentes ao sal, tolerantes ao meio ácido, e terem maior capacidade de sobrevivência em ambiente adverso como ausência de carboidratos fermentáveis, como no caso da *L. plantarum* (OLIVEIRA, 2014; MARINO; MAIFRENI; RONDININI, 2003).

Estudos mais aprofundados devem ser realizados para que sejam analisadas as correlações e possíveis sinergias dessas interações abundantes de fungos e bactérias. Quando levamos em consideração a abundância geral das espécies de bactérias, fungos filamentosos e leveduras, durante todo período de maturação alguns táxons se demonstraram dominantes na composição da microbiota do queijo. A Figura 10 nos mostra que poucas espécies entre bactérias, fungos filamentosos e leveduras dominaram a microbiota do queijo.

Figura 10 – Abundância relativa de bactérias, fungos filamentosos e leveduras durante todo o período de maturação no queijo artesanal da região de Araxá – MG.



Pôde-se observar que as espécies bacterianas *Lactococcus lactis subsp. Lactis CV56* (35%) e *Corynebacterium variabile DSM 44702* (24%) apresentaram maior abundância relativa em relação a todos os outros microrganismos detectados no queijo minas artesanal, produzido em uma propriedade da microrregião de Araxá-MG. As leveduras *Candida catenulata* (6%) e *Geotrichum candidum* (6%), a espécie bacteriana *Brevibacterium*

*auranticum* (6%) e as demais espécies identificadas estiveram abaixo de 5% de abundância relativa no ambiente do queijo. Estes microrganismos advindos do leite não tratado termicamente e do “pingo” utilizados na produção queijeira para fazer QMA, o leite cru e o “pingo” têm uma vasta microbiota natural composta, principalmente, de bactérias lácticas e leveduras, o que é significativo para as propriedades organolépticas do produto final, estes também podem carrear microrganismos patogênicos e degradantes, mas no presente estudo poucas espécies consideradas não benéficas no ambiente do queijo foram abundantes.

A microbiota do leite, por conseguinte, do queijo é fortemente influenciada pelo sistema geral de gestão da fazenda, o que torna difícil identificar a influência de uma única prática. Cabe destacar que essa biodiversidade pode flutuar em diferentes camadas do queijo, onde um pequeno número de espécies de bactérias lácticas são numericamente dominantes no núcleo e a superfície do queijo abriga inúmeras espécies de bactérias, leveduras e, principalmente, bolores. A diversidade entre queijos deve-se particularmente às grandes variações na dinâmica dos microrganismos da mesma espécie em diferentes tipos de queijos (MONTEL *et al.*, 2014).

Essa caracterização da microbiota pode nos fornecer uma identidade particular do queijo. Portanto, é importante salientar que identificar as espécies ou gêneros simboliza nos dar uma denominação de microrganismos marcadores das regiões produtoras e não ser uma ferramenta para uma padronização do QMA.

### **3.4 Análises Físico – químicas**

Na tabela 1 estão demonstrados os valores encontrados nas análises físico-químicas das amostras ao longo do período de maturação, sendo médias realizadas em três repetições. Os resultados obtidos estão na faixa de coeficiente de variação considerada normal (<30%) para amostras de origem biológica animal (SAMPAIO, 1998).

Tabela 2 – Análises físico-químicas ao longo da maturação.

Dias de Maturação	Análises Físico-químicas					
	pH	Cinzas	Umidade	NaCl na Umidade	Gordura	Proteína
D0	5.47b	3.39a	55.8a	3.04a	28b	17.6c
D15	6.39a	3.65a	43.3a	2.99a	30a	23.3b
D30	6.41a	2.98a	46.3ab	2.75a	28b	23.8b
D60	6.48a	3.98a	38.2b	2.99a	30a	25.1a
Media	6.19	3.50	45.9	2.94	29	22.5
CV%	1.52	11.70	8.6	7.22	0	1.2

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Na avaliação dos teores de pH, a média incidente foi 6,19, somente o D0 foi estatisticamente diferente ( $p < 0,05$ ) das demais amostras, onde o queijo recém-fabricado apresentou a menor média de pH. Sendo assim, durante o processo de maturação, houve um aumento dos valores de pH. Isto pode ser explicado pela degradação proteica advinda da ação de proteases oriundas do leite, ou mesmo dos fungos presentes dando origem a compostos nitrogenados alcalinos (DORES, 2007). Ademais, o pH de queijos dessa mesma região apresentou comportamento semelhante, com aumento do pH no decorrer da maturação (SALES, 2015). Já queijos das regiões da Canastra e Serro apresentaram valores médios de pH menores (NÓBREGA *et al.*, 2012; ARAGÃO, 2018; MACHADO, 2004). Nos queijos, as ações das proteases podem influenciar a variação do pH, e também a atividade microbiana exerce um importante papel nesta variação, como o tipo, a quantidade e a atividade do fermento utilizado (LIMA, 2021).

Quanto ao Teor de Cinzas, a média foi de 3,5% com o maior teor de cinzas ao D60 (3,98%) e o menor ao D30 (2,98%). Não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em nenhum dia entre as amostras, divergindo de outros estudos em que houve aumento gradativo da porcentagem com o decorrer da maturação (LIMA, 2021; FIGUEIREDO, 2018; CABRINI, 2017; SOBRAL, 2012). Diversos fatores podem influenciar quanto ao teor de cinzas e, dentre os mais importantes, podemos destacar a composição mineral do leite, nutrição animal, período do ano e estágios de lactação (LEMPK, 2013; SOBRAL, 2012).

A umidade apresentou valor médio de 45,9% e variou de forma significativa ( $p < 0,05$ ) ao final da maturação, sendo o menor índice no D60 (38,20%). Essa redução já era esperada, pois, é comum que a umidade diminua com o decorrer da maturação em virtude da perda de

água do queijo para o ambiente principalmente na superfície, assim como tal, resultados semelhantes foram encontrados por Pereira (2020) e por Sales (2015) em queijos da mesma microrregião de Araxá-MG. É estabelecido que o QMA tenha um teor máximo de umidade de 49,5% (MINAS GERAIS, 2008), valor que somente não foi atingido no queijo fresco (D0:55,8%), indicando alta umidade o que é esperado pela presença do soro na massa, os queijos curados habitualmente apresentam menores valores de umidade (SALES, 2015). De acordo com a média de umidade esse queijo pode ser classificado como um queijo de média umidade conforme Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos - RTIQ (BRASIL, 1996).

Quanto ao parâmetro sal na umidade, este apresentou valor médio de 2,94% e diferente do esperado não houve diferenças significativas ( $p > 0,05$ ), outros trabalhos observaram o aumento da porcentagem de sal no queijo com o transcorrer da maturação (PEREIRA, 2019; GUIMARÃES *et al.*, 2011), é comum que com a redução dos teores de umidade a porcentagem de sal aumente, devido a sua maior concentração. Queijos do Serro-MG e Canastra-MG obtiveram teores médios semelhantes durante a maturação com queijos fabricados com a utilização do “pingo” (VALE; RODRIGUES; MARTINS, 2018; FERRAZ, 2016).

O valor médio para gordura foi de 29%, sendo este um pouco acima do encontrado em queijos da mesma região (ARAÚJO, 2004), e apesar da gordura ser um dos fatores que mais sofre variações, pois é influenciada por diversos fatores como tipo de alimentação dada ao animal, raça, produção e período de lactação, no conteúdo de gordura não foram encontradas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ). A gordura contribui positivamente em diversas características do queijo tais como o sabor, textura e um precursor para muitos compostos aromatizantes lipossolúveis essenciais para a formação de compostos voláteis (SANTIS, 2016).

O teor de proteína obteve média de 22,5% e variou de forma significativa ( $p < 0,05$ ), demonstrando que o tempo de maturação influenciou neste parâmetro. O D0 (17,6%) diferiu dos demais dias, D15 (23,3%) e D30 (23,8%) não diferiram entre si e D60 (25,1%) diferiu dos demais dias de maturação. Queijos da mesma região de Araxá –MG atingiram valores médios semelhantes (MARTINS, 2004) o aumento da proteína total também foi observado em outras regiões como Serro e Canastra (PEREIRA, 2019; OLIVEIRA, 2018; FERRAZ, 2016; MARTINS, 2015). À medida que se diminui o percentual de umidade do queijo, alguns dos sólidos totais aumentam e, conseqüentemente, eleva-se a concentração de proteínas, um dos principais constituintes do queijo (SALES, 2015).

### 3.5 Índices de diversidade

São necessários diversos modelos geométricos porque um único valor não pode explicar adequadamente a estrutura particular de uma comunidade (LIMA, 2016).

Tabela 3 – Resultados dos Índices de diversidade.

Índices de Diversidade	Dias de maturação			
	0	15	30	60
<b>Dominância de Simpson</b>	0.50	0.37	0.13	0.38
<b>Diversidade de Simpson</b>	0.50	0.63	0.87	0.62
<b>Shannon</b>	1.23	1.69	2.42	1.65

O Índice de Simpson variou ao longo da maturação, porém, todos os dias demonstrou uma dispersão de microrganismos no ambiente do queijo. Foi demonstrado também que quanto menor a dominância das espécies, maior a diversidade. Quanto ao Índice de Shannon, este variou nas amostras entre 1,23 (D0) e 2,42 (D30) em que a maior diversidade foi encontrada ao D30 estando próximo de 3, indicando um alto índice de diversidade e riqueza neste dia, a menor diversidade foi ao D0. Alguns valores baixos de distribuição das comunidades microbianas podem ter se dado pela dominância e pela alta incidência de algumas espécies em relação a outras, ou seja, poucas espécies predominando as amostras analisadas.

#### 4. CONCLUSÃO

As espécies de fungos mais abundantes foram as leveduras. Espécies de fungos filamentosos não apresentaram abundância relativa significativa. Os gêneros mais abundantes de bactérias foram, *Streptococcus sp.*, *Actinoalloteichus sp.*, *Marinomonas sp.*, *Lactococcus sp.* Quanto aos fungos, os mais abundantes foram as leveduras *Kluyveromyces sp.*, *Candida sp.*, *Saccharomyces sp.* e *Torulaspota sp.* e o gênero de fungos filamentosos *Fusarium sp.*.

A microbiota geral do QMA de Araxá-MG, em relação às espécies ao longo de toda maturação, foi por maioria composta por bactérias ácido lácticas, sendo elas, principalmente, os microrganismos *Lactococcus lactis* e *Corinebacterium variabile*. Quanto aos fungos, as espécies de leveduras mais abundantes foram *Candida catenulata* e *Geotrichum candidum*.

Quanto aos parâmetros físico-químicos analisados somente: pH, umidade e proteína variaram de forma significativa estatisticamente ( $p < 0,05$ ).

Sendo assim, de acordo com as espécies encontradas, no presente estudo, este queijo pode ser considerado seguro para o consumo, visto que poucos táxons patogênicos obtiveram abundância relativa alta nos dias de maturação analisados.

A abundância, por maioria de um número relativamente reduzido de espécies, pode sugerir que as condições ambientais ou do queijo promoveram a seleção da microbiota. Portanto, mais estudos devem ser realizados para que sejam observadas as interações dos microrganismos com o ambiente. Os dados fornecidos neste estudo podem auxiliar em um possível reconhecimento de Identificação Geográfica, além de contribuir para as definições do *Terroir* do Queijo Minas Artesanal de Araxá-MG.

## REFERÊNCIAS

- AFSHARI, R. *et al.* Cheesomics: the future pathway to understanding cheese flavour and quality. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 60, n. 1, p. 33-47, 2020.
- ANDRADE, G. C. **Potencial probiótico de *Kluyveromyces lactis* e *Torulaspora delbrueckii* como culturas iniciadoras na produção de queijo**. 2021. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2021.
- ANDRADE, R. P. *et al.* Yeasts from Canastra cheese production process: Isolation and evaluation of their potential for cheese whey fermentation. **Food Research International**, v. 91, p. 72-79, 2017.
- ARAGÃO, M. O. P. **Diversidade de fungos filamentosos e leveduras em queijo minas artesanal das Microrregiões do Serro e Serra da Canastra**. 2018. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2018.
- ARAÚJO, R. A. B. M. **Diagnóstico socioeconômico, cultural e avaliação dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos do queijo Minas artesanal da região de Araxá**. 2004. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.
- ASSOCIAÇÃO DOS QUÍMICOS ANALÍTICOS OFICIAIS. **Métodos oficiais de análise**. 20 ed. 4ª rev. v. 2, 2016.
- BACHMANN, H. P. **Cheese analogues: a review**. *International Dairy Journal*, v. 11, n. 4-7, p. 505-515, 2001. Disponível em: <<http://www.periodicos.capes.org.br>>. Acesso em: 26 ago. 2001.
- BORELLI, B.M. **Caracterização das bactérias lácticas, leveduras e das populações de *Staphylococcus* enterotoxigênicos durante a fabricação do queijo de minas curado produzido na Canastra**. 2006. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria n° 146 de 07 de março de 1996**. Brasília, DF.
- BRUNO, L. M.; CARVALHO, J. D. G. **Microbiota láctica de queijos artesanais**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2009. 30 p.
- BUDAK, O. S, Wiebenga A, Bron PA, de Vries RP. **Protease and lipase activities of fungal and bacterial strains derived from an artisanal raw ewe's milk cheese**. *Int J Food Microbiol*. 2016 Nov 21;237:17-27. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.08.007. Epub 2016 Aug 13. PMID: 27541978.
- CABRINI, C. C. **Influência do fermento natural sobre as características microbiológicas, físico-químicas e perfil de textura do queijo Minas artesanal da região Campo das**

**Vertentes**. 2017. Dissertação (Mestrado em Produção Animal), Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros, 2017.

CARDOSO, V. M. *et al.* The influence of seasons and ripening time on yeast communities of a traditional Brazilian cheese. **Food Research International**, v. 69, p. 331-340, 2015.

CARVALHO, C. T. *et al.* Recovery of  $\beta$ -galactosidase produced by *Kluyveromyces lactis* by ion-exchange chromatography: Influence of pH and ionic strength parameters. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 94, 2022.

CROUS, P.W. *et al.* Fusarium: more than a node or a foot-shaped basal cell. **Studies in Mycology**, v. 98, 2021.

CRUVINEL, L. A. **Caracterização das comunidades procarióticas do Queijo Minas Artesanal Canastra e sua importância para sustentabilidade**. 2017. Dissertação (Mestrado Profissional em Sustentabilidade e Tecnologia Ambiental), Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Minas Gerais, Bambuí, 2017.

DALMASSO, A. *et al.* Characterization of microbiota in Plaisentif cheese by high-throughput sequencing. **LWT-Food Science and Technology**, v. 69, p. 490-496, 2016.

DELORME, C. Safety assessment of dairy microorganisms: *Streptococcus thermophilus*. **International journal of food microbiology**, v. 126, n. 3, p. 274-277, 2008.

DIAS, G. *et al.* Influência do uso de *Geotrichum candidum* nas características físico-químicas e sensoriais do queijo tipo camembert. In: XXVI Congresso Nacional de Laticínios, 2009. **Anais do XXVI Congresso Nacional de Laticínios**.

DORES, M. T. **Queijo Minas Artesanal da Canastra maturado à temperatura ambiente e sob refrigeração**. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

DORES, M. T. **Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus aureus* isolados de queijo minas artesanal da Canastra**. 2013. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

EMPRESA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL DE MINAS GERAIS. **Caracterização da microrregião de Araxá como produtora tradicional de queijo Minas artesanal**. Araxá, 2003. Disponível em: <<http://www.emater.mg.gov.br>>. Acesso em 26 de dezembro de 2014.

FADDA, M. E. *et al.* In vitro screening of *Kluyveromyces* strains isolated from Fiore Sardo cheese for potential use as probiotics. **LWT- Food Science and Technology**, v. 75, p. 100-106, 2017.

FADDA, M. E. *et al.* Occurrence and characterization of yeasts isolated from artisanal Fiore Sardo cheese. **International journal of food microbiology**, v. 95, n. 1, p. 51-59, 2004.

FERRAZ, W. M. **Queijo Minas artesanal da Serra da Canastra: influência do ambiente sobre a maturação**. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) –

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais , Rio Pomba, 2016.

FERREIRA, J. R. A. **Caracterização microbiológica do queijo minas artesanal comercializado em São Paulo: segurança, higiene e diversidade microbiana**. 2020. Dissertação (Mestrado em Bromatologia), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

FIGUEIREDO, R.C. **Perfil socioeconômico de agricultores familiares e caracterização de queijo Minas artesanal de Serra do Salitre (MG) em diferentes períodos de maturação e épocas do ano**. Dissertação. (Mestrado em Ciência Animal). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2018.

FONTÁN, M.C G. *et al.* Microbiological changes in ‘San Simón’ cheese throughout ripening and its relationship with physico-chemical parameters. **Food Microbiology**, v. 18, n. 1, p. 25-33, 2001.

FORQUIN, M. P. *et al.* Global regulation of the response to sulfur availability in the cheese-related bacterium *Brevibacterium aurantiacum*. **Applied and environmental microbiology**, v. 77, n. 4, p. 1449-1459, 2011.

FURTADO, M. M. Queijo do Serro: tradição na história do povo mineiro. **Revista Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.35, p.33-36, 1980.

GUIMARÃES, J. *et al.* Características físico-químicas do queijo Minas artesanal da Canastra. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 66, n. 380, p. 16-22, 2011.

HOCKING, A. D.; FAEDO, M. Fungi causing thread mould spoilage of vacuum packaged Cheddar cheese during maturation. **International journal of food microbiology**, v. 16, n. 2, p. 123-130, 1992.

INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. **Queijo Minas Artesanal**. Disponível em: <<http://www.ima.mg.gov.br/queijo-minas-artesanal>> Acesso em março de 2020.

KAMIMURA, B. A. *et al.* Brazilian artisanal cheeses: an overview of their characteristics, main types and regulatory aspects. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 18, n. 5, p. 1636-1657, 2019.

KAMIMURA, B. A. *et al.* Amplicon sequencing reveals the bacterial diversity in milk, dairy premises and Serra da Canastra artisanal cheeses produced by three different farms. **Food Microbiology**, v. 89, 2020.

LEMPK, M. W. **Caracterização físico-química, microbiológica e tecnológica do queijo artesanal da microrregião de Montes Claros – MG**. 2013. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

LIMA, C. D. L. C. *et al.* Bactérias do ácido láctico e leveduras associadas com o queijo-de-minas artesanal produzido na região da Serra do Salitre, Minas Gerais. **Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia**, v. 61, p. 266-272, 2009.

LIMA, C. J. B. **Comparação da florística, diversidade e estrutura entre um cerrado sentido restrito e um agroecossistema agroecológico com preservação parcial da vegetação nativa.** 2016. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Ciências Naturais), Universidade de Brasília, Planaltina, 2016.

LIMA, C. F. **Estudo do tempo de maturação do queijo minas artesanal do triângulo mineiro: análises microbiológicas e físico-químicas.** 2021. Dissertação (Mestrado de Engenharia de Alimentos), Universidade Federal de Uberlândia, Patos de Minas, 2021.

LOPEZ-DIAZ, T. M. *et al.* Lactic acid bacteria isolated from a hand-made blue cheese. **Food Microbiology**, v. 17, n. 1, p. 23-32, 2000.

LUIZ, L. M. P. *et al.* Isolation and identification of lactic acid bacteria from Brazilian Minas artisanal cheese. **CyTA-Journal of Food**, v. 15, n. 1, p. 125-128, 2017.

MANIVASAGAN, P. *et al.* Pharmaceutically active secondary metabolites of marine actinobacteria. **Microbiological Research**, v. 169, n. 4, p. 262-278, 2014.

MARGALHO, L. P. *et al.* Brazilian artisanal cheeses are rich and diverse sources of nonstarter lactic acid bacteria regarding technological, biopreservative, and safety properties - Insights through multivariate analysis. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 9, p. 7908-7926, 2020.

MARINO, M; MAIFRENI, M; RONDININI, G. Microbiological characterization of artisanal Montasio cheese: analysis of its indigenous lactic acid bacteria. **FEMS microbiology letters**, v. 229, n. 1, p. 133-140, 2003.

MARTINS, J. M. **Características físico-químicas e microbiológicas durante a maturação do queijo minas artesanal da região do Serro.** 2006. 158f. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. Disponível em: <<http://www.locus.ufv.br/bitstream/handle/123456789/499/texto%20completo.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>.

MARTINS, J. M. *et al.* Determining the minimum ripening time at room temperature and under refrigeration of Minas artisanal cheese, a traditional Brazilian cheese. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 219-230, 2015.

MINAS GERAIS. **Governador anuncia reconhecimento da região de Diamantina como produtora de Queijo Minas.** Disponível em: <<https://www.agenciaminas.mg>

[.gov.br/noticia/governador-anuncia-reconhecimento-da-regiao-de-diamantina-como-produtora-de-queijo-minas-artesanal](https://www.agenciaminas.mg.gov.br/noticia/governador-anuncia-reconhecimento-da-regiao-de-diamantina-como-produtora-de-queijo-minas-artesanal)>. Acesso em 10 de fevereiro de 2022.

MINAS GERAIS (Estado). **Decreto nº 44.864, de 1 de agosto de 2008.** Altera o regulamento da Lei nº 14.185 de 31 de janeiro de 2002 que dispõe sobre o processo de produção de Queijo Minas Artesanal. Belo Horizonte. Disponível em: <<http://www.almg.gov.br/>>. Acessado em 10 de abril de 2021

MONTEIRO, R. P.; MATTA, V. M. **Queijo Minas Artesanal: valorizando a agricultura familiar.** 2018. Disponível

em:<<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/199625/1/Livro-Queijo-Minas-Artesanal-Ainfo.pdf>>. Acesso em: 03 maio 2020.

MONTEL, M.C. *et al.* Traditional cheeses: rich and diverse microbiota with associated benefits. **International journal of food microbiology**, v. 177, p. 136-154, 2014.

MOUNIER, J. *et al.* Sources of the adventitious microflora of a smear-ripened cheese. **Journal of Applied Microbiology**, v. 101, n. 3, p. 668-681, 2006.

NERO, L. A. *et al.* Lactic microbiota of the minas artisanal cheese produced in the serro region, Minas Gerais, Brazil. **LWT**, v. 148, 2021.

NÓBREGA, J. E. *et al.* Variações na microbiota leveduriforme do fermento endógeno utilizado na produção do queijo Canastra. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 63, n. 364, p. 14-18, 2008.

NÓBREGA, J. E. *et al.* **Microbial biodiversity, physicochemical descriptors and sensory characteristics of artisan cheeses produced in the Serra da Canastra and Serro regions, Minas Gerais.** 2012. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2012.

OLIVEIRA, L. G. **Caracterização microbiológica e físico-química durante a maturação em diferentes épocas do ano de queijo Minas artesanal de produtores cadastrados da mesorregião de Campo das Vertentes – MG.** 2014. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

OLIVEIRA, S. P. P. *et al.* Características físico-químicas de queijo Minas artesanal do Serro fabricados com pingo e com rala. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 73, n. 4, p. 235-244, 2018.

PEREIRA, D. A. **Efeito de diferentes condições de maturação nas características do Queijo Minas artesanal.** 2019. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) , Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2019.

PEREIRA-DIAS, S. *et al.* Characterization of yeast flora isolated from an artisanal Portuguese ewes' cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 60, n. 1, p. 55-63, 2000.

PLATANIA, C. *et al.* Efficacy of killer yeasts in the biological control of *Penicillium digitatum* on Tarocco orange fruits (*Citrus sinensis*). **Food microbiology**, v. 30, n. 1, p. 219-225, 2012.

RAMÍREZ, M. F; VELÁZQUEZ, R. M. **The Yeast *Torulaspora delbrueckii*: an interesting but difficult-to-use tool for winemaking.** 2018.

SALES, G.A. **Caracterização microbiológica e físico-química de queijo Minas Artesanal da microrregião de Araxá - MG durante a maturação em diferentes épocas do ano.** 2015. Dissertação (Dissertação em Ciência Animal). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.

SAMPAIO, F. C. *et al.* Cheese whey permeate fermentation by *Kluyveromyces lactis*: a combined approach to wastewater treatment and bioethanol production. **Environmental technology**, v. 41, n. 24, p. 3210-3218, 2020.

SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 221p.

SANT'ANNA, F. M. *et al.* Microbial shifts in Minas artisanal cheeses from the Serra do Salitre region of Minas Gerais, Brazil throughout ripening time. **Food microbiology**, v. 82, p. 349-362, 2019.

SANTIAGO, P. A. *et al.* Estudo da produção de beta-galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus*. **Food Science and Technology**, v. 24, n. 4, p. 567-572, 2004.

SANTIS, V. B. G. **Queijo Minas padrão com baixo teor de sódio e gordura: caracterização físico-química e sensorial**. 2016. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2016.

SCHOLZ, E. B. **Estudo cinético de *kluyveromyces marxianus* CBS 6556 a partir de fontes alternativas de carbono e nitrogênio visando a síntese de  $\beta$ -galactosidase**. 2011. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos), Universidade da Região de Joinville, Joinville, 2011.

SCHRÖDER, J. *et al.* Complete genome sequence of *Corynebacterium variabile* DSM 44702 isolated from the surface of smear-ripened cheeses and insights into cheese ripening and flavor generation. **BMC genomics**, v. 12, n. 1, p. 1-23, 2011.

SENER, L. **Otimização da produção da purificação de compostos antimicrobianos de leveduras para o desenvolvimento de um novo agente antifúngico**. 2010. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

SHANI, N. *et al.* Evaluation of a new culture medium for the enumeration and isolation of *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* from cheese. **Food Microbiology**, v. 95, 2021.

SMIT, G.; SMIT, B. A.; ENGELS, W. J.M. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. **FEMS microbiology reviews**, v. 29, n. 3, p. 591-610, 2005.

SOBRAL, D. **Efeito da Nisina na contagem de *Staphylococcus aureus* e nas características do queijo Minas artesanal da região de Araxá**. 2012. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de alimentos), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2012.

SOBRAL, D. *et al.* Principais defeitos em queijo Minas artesanal: uma revisão. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 72, n. 2, p. 108-120, 2017.

SOMERVILLE, V. *et al.* Long-read based de novo assembly of low-complexity metagenome samples results in finished genomes and reveals insights into strain diversity and an active phage system. **BMC microbiology**, v. 19, n. 1, p. 1-18, 2019.

SORENSEN, L. M. *et al.* Flavour compound production by *Yarrowia lipolytica*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Debaryomyces hansenii* in a cheese-surface model. **International dairy journal**, v. 21, n. 12, p. 970-978, 2011.

SOULIGNAC, L. **Propriétés des levures fromagères. Influence des sources de carbones utilisées sur leur aptitudes a désacidifier les caillés et à former des composés d'arôme.** Thèse. Institut National Agronomique Paris, Grignon, 1995.

SOUZA, T. P. *et al.* Mycobiota of Minas artisanal cheese: Safety and quality. **International Dairy Journal**, v. 120, 2021.

TAN-A-RAM, P. *et al.* Assessment of the diversity of dairy *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolates by an integrated approach combining phenotypic, genomic, and transcriptomic analyses. **Applied and environmental microbiology**, v. 77, n. 3, p. 739-748, 2011.

VALE, R. C; RODRIGUES, M. P. J; MARTINS, J. M. Influência do tipo de fermento nas características físico-químicas de queijo Minas artesanal do serro–Minas Gerais, maturado em condições controladas. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 73, n. 2, p. 82-90, 2018.

VERCE, M; VUYST, L.; WECKX, S. Shotgun metagenomics of a water kefir fermentation ecosystem reveals a novel *Oenococcus* species. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 479, 2019.

WOOD, D. E.; LU, J; LANGMEAD, B. Improved metagenomic analysis with Kraken 2. **Genome biology**, v. 20, n. 1, p. 1-13, 2019.

WYDER, M.T. **Identification and characterisation of the yeast flora in kefir and smear ripened cheese: contribution of selected yeasts to cheese ripening.** 1998. Tese. Federal Institute of Technology, Zurich. 1998.

YONTEN, V; AKTAŞ, N. Exploring the optimum conditions for maximizing the microbial growth of *Candida intermedia* by response surface methodology. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 44, n. 1, p. 26-39, 2014.

ZACARCHENCO, P. B. *et al.* Bcores e leveduras em queijos. **Revista Leite e Derivados**, v. 29, p. 92-99, 2011.

**APÊNDICE A- Cartilha destinada aos produtores de Queijo Minas Artesanal da microrregião de Araxá-MG.**

O que TEM NO MEU **QUEIJO?**

MICROORGANISMOS PRESENTES NO QUEIJO MINAS ARTESANAL DE ARAXÁ-MG

BRUNA ISABELLA REIS CESARIO  
LUIS ROBERTO BATISTA  
FABIANA REINIS FRANÇA PASSAMANI

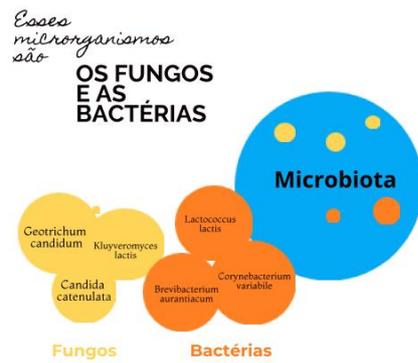
Laboratório de Micologia e Micotoxinas  
Departamento de Ciências dos Alimentos  
Universidade Federal de Lavras - UFLA

Quem é QUE ESTÁ AQUI?

Um queijo é um universo, onde dentro dele encontramos diversos microrganismos

Cada região de Minas Gerais, do seu jeitinho, produz queijos que possuem características especiais, além disso, cada uma delas têm microrganismos que são responsáveis por diversos aspectos presentes no queijo





No queijo estes vivem de forma harmônica trabalhando como uma linda sinfonia para a formação de sabores, reações, cores e também para que os microrganismos não desejáveis não se desenvolvam!

Abundância relativa de bactérias, fungos filamentosos e leveduras durante o período de maturação no queijo artesanal da região de Araxá - MG.

Os microrganismos e diversos atributos geográficos, naturais do ambiente e químicos, conferem ao queijo um sabor único

Contribuindo para que o Queijo Minas de Araxá seja essa maravilha que conhecemos.

sendo seguro para os consumidores



*Agradecimentos*

