



**DEBORA KAROLINA MEJIA MENDEZ**

**IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS E FUNGOS  
FILAMENTOSOS DA MICROBIOTA *TERROIR* DE QUEIJOS  
ARTESANAIS PRODUZIDOS NA SERRA DA CANASTRA**

**LAVRAS - MG**

**2022**

**DEBORA KAROLINA MEJIA MENDEZ**

**IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS E FUNGOS FILAMENTOSOS DA  
MICROBIOTA *TERROIR* DE QUEIJOS ARTESANAIS PRODUZIDOS NA SERRA  
DA CANASTRA**

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 a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Luís Roberto Batista  
Orientador (a)

Prof. Dr. Luiz Ronaldo de Abreu  
Coorientador (a)

Dra. Suzana Reis Evangelista  
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).

Mendez, Debora Karolina Mejia.

Identificação de leveduras e fungos filamentosos da microbiota  
*terroir* de queijos artesanais produzidos na Serra da Canastra /  
Debora Karolina Mejia Mendez. - 2022.  
55 p.

Orientador(a): Luís Roberto Batista.

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

1. Queijo Minas Artesanal. 2. Produtores. 3. Microbiota  
Terroir. I. Batista, Luís Roberto. II. Título.

**DEBORA KAROLINA MEJIA MENDEZ**

**IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS E FUNGOS FILAMENTOSOS DA  
MICROBIOTA *TERROIR* DE QUEIJOS ARTESANAIS PRODUZIDOS NA SERRA  
DA CANASTRA**

**IDENTIFICATION OF *TERROIR* MICROBIOTA YEASTS AND FILAMENTAL  
FUNGI IN ARTISAN CHEESES PRODUCED IN SERRA DA CANASTRA**

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.

APROVADA em 14 de junho de 2022

Dr. Luís Roberto Batista UFLA

Dr. Héctor Alonzo Gómez Gómez (UNAG Honduras)

Dr. Luiz Ronaldo Abreu UFLA



---

Prof. Dr. Luís Roberto Batista  
Orientador (a).

**LAVRAS - MG  
2022**

*À minha filha Angela Victoria por ser o motor  
de minha vida e minha maior inspiração para  
fazer tudo.*

*A minha mãe Flora e meu pai Alfredo por seu  
apoio.*

*Dedico!*

## AGRADECIMENTOS

À Deus por me permitir cumprir com meus sonhos.

À Universidade Federal de Lavras, ao Departamento e ao Programa de Pós Graduação em Ciência dos Alimentos pela oportunidade concedida para a realização deste trabalho.

À Programa de Honduras 20/20 pela concessão da bolsa de estudos.

À Universidade Nacional de Agricultura (Honduras) por acreditar em mim e me dar a oportunidade de continuar com meus estudos.

Ao professor Luís Roberto Batista por confiar e acreditar em mim e por toda a orientação e conhecimento transmitido.

À pesquisadora Suzana Reis pela paciência, orientação, ajuda e amizade.

À pesquisadora Michele de Oliveira pela paciência, orientação, ajuda em todo o processo de aprendizagem e amizade.

Ao professor Luiz Ronaldo de Abreu, pela disponibilidade e apoio. À Cleuza, do Laboratório de Laticínios pela ajuda com as análises físico-químicas.

Aos amigos do Laboratório de Micologia e Micotoxinas de Alimentos, em especial a Gabriela e Bruna.

À Javier Bú pelo apoio incondicional e da mesma forma para seus padres Mirna Sagrario e Adan Bú por cuidar de minha filha Angela Victoria.

Agradeço especialmente a meus pais Flora e Alfredo, meus irmãos Duma, Wilfredo, Jonny, Yimi, Lidinia, Evelin, Paola pelos conselhos, incentivo e apoio em todos os momentos.

Aos amigos Mario, Keysi, Kathy, Arlin, Pablo, Miguel, Emerson, Jeaneth e à Ana Caroline por seu apoio em cada momento de meus estudos.

A todas as pessoas que acreditaram em mim e contribuíram de alguma forma para que esse trabalho fosse concluído.

A todos, muitas graças!

## RESUMO

A microbiota dos queijos maturados é diretamente influenciada por fatores ambientais do local de origem, tais como clima, solo e relevo, por esta razão os queijos artesanais são reconhecidos o mesmo que sua importância econômica em muitos países incluindo Brasil. O Estado de Minas Gerais é o maior produtor do Queijo Minas Artesanal do Brasil. Na Serra da Canastra – MG, produz Queijo Minas Artesanal e por ser feito com leite cru e culturas do soro natural “pingo” são produzidos queijos únicos por sua microbiota endógena. Essa microbiota *terroir* varia de fazenda em fazenda, já que são feitas pelas famílias daquela região. O presente trabalho teve por objetivo a identificação de leveduras e fungos filamentosos da microbiota *terroir* da casca e do interior do Queijos Artesanais produzidos na microrregião da Serra da Canastra, bem como avaliar suas características físico-químicas. As amostras foram levadas em sacos estéreis ao laboratório de Micologia de Ciência dos Alimentos, para identificação de leveduras foi usada a análise do perfil proteômico MALDI-TOF MS. As leveduras para ambos a casca o interior foram *Kluyveromyces lactis*, *Trichosporon coremiiforme*, *Candida catenulata*, *Kodamaea ohmari*, as espécies identificadas só na casca foram *Trichosporon japonicum*, *Torulasporea delbrueckii* e *Candida intermedia*, e no interior identificou-se maior diversidade, *Rhodotorula mucilagenosis*, *Candida lucitaniae*, *Candida parapsilosis*, *Lactobacillus brevis* e *Trichosporon asahii*. Para os fungos isolados para a casca e interior encontrou-se *Cladosporium cladosporoides* (herbarum) *Cladosporium sphaerospermum*, *Geotrichum Candidu*, *Fusarium solani*, *Geotrichum silvicola* e espécie do complexo *Cladosporium cladosporoides*. Os fungos filamentosos que prevaleceram na casca *Odiendron Griseum*, *Fusarium verticillioides* e *Fusarium oxysporum*. Já no interior *Penicillium* sp e *Rizopus oryzae*. Nos parâmetros físico-químicos o pH da casca foi o único que não apresentou diferença estatística significativa. Neste estudo permitiu-se conhecer as leveduras e fungos filamentosos presentes nas diferentes amostras do QMA, mostrando a importância que estes têm nas características organolépticas como sabor já que são queijos únicos de cada fazenda e sendo de apoio para os produtores e as pessoas que consomem.

**Palavras chave:** Queijo Minas Artesanal. Produtores. Microbiota *Terroir*. Pingo

## ABSTRACT

The microbiota of artisan cheeses is directly influenced by environmental factors of the place of origin, such as climate, soil and relief, for this reason artisan cheeses are recognized as well as their economic importance in many countries, including Brazil. The State of Minas Gerais is the largest producer of Artisan Minas Cheese in Brazil. In the Sierra de la Canastra - MG, they produce Artisanal Minas Cheese and because it is made with raw milk and natural whey cultures "pingo", unique cheeses are produced due to their endogenous microbiota. This microbiota of *terroir* varies from one farm to another, since they are made by the families of that region. The objective of this work was to identify yeasts and filamentous fungi from the *terroir* microbiota of the rind and interior of artisanal cheeses produced in the Sierra de la Canastra, as well as to evaluate their physicochemical characteristics. The samples were taken in sterile bags to the Food Science Mycology Laboratory, to identify the yeasts, the MALDI-TOF MS proteomic profile analysis was used. The yeasts for both the shell and the interior were *Kluyveromyces lactis*, *Trichosporon coremiiformes*, *Candida catenulata*, *Kodamaea ohmari*, the species identified only in the shell were *Trichosporon japonicum*, *Torulasporea del bruekii* and *Candida intermedia*, and in the interior a greater diversity was identified, *Rhodotorula mucilagenosis*, *Candida lucitaniae*, *Candida parapsilosis*, *Lactobacillus brevis* and *Trichosporon asahii*. The isolated fungi for the shell and interior were found *Cladosporium cladosporoides* (herbalum) *Cladosporium sphaerospermum*, *Geotrichum Candidu*, *Fusarium solani*, *Geotrichum sp.* and *Cladosporium cladosporoides* complex. The filamentous fungi that predominated in the shell, *Odiodendron Griseum*, *Fusarium verticillioides* and *Fusarium oxysporum*. Inside, *Penicillium sp.* and *Rhizopus oryzae*. In the physicochemical parameters, the pH of the shell was the only one that did not present a statistically significant difference. In this study it was possible to know the yeasts and filamentous fungi present in the different samples of the QMA, showing the importance they have in the organoleptic characteristics such as the flavor since they are unique cheeses from each farm and being of support for producers and consumers. people who consume

**Keywords:** Mining artisanal cheese. Producers. Soil microbiota. Release

## LISTA DE FIGURAS

### PRIMEIRA PARTE

Figura 1 – Mapa do Estado de Minas Gerais representando as oito microrregiões reconhecidas pela EMATER e cadastradas no IMA para a produção de Queijo Minas Artesanal.....16

Figura 2 – Fluxograma de fabricação de Queijo Canastra.....17

### SEGUNDA PARTE

Figura 1 – Modelo esquemático de preparo da amostra da casca para técnica de diluição seriada.....33

Figura 2 – Modelo esquemático de preparo da amostra do interior para técnica de diluição seriada.....34

Figura 3 – Dendrograma das leveduras isoladas das amostras F1, F2, F3, F4, F5 e F6 da casca do Queijo Minas Artesanal da Serra da Canastra.....40

Figura 4 – Dendrograma das leveduras isoladas das amostras F1, F2, F3, F4, F5 e F6 do interior do Queijo Minas Artesanal da Serra da Canastra.....42

Figura 5 – Frequência de ocorrência das espécies de fungos filamentosos para a casca presentes nas amostras F1, F2, F3, F4, F5 e F6 de queijo Minas Artesanal da microrregião da Serra Canastra.....44

Figura 6 – Frequência de ocorrência das espécies de fungos filamentosos para o interior presentes nas amostras F1, F2, F3, F4, F5 e F6 de queijo Minas Artesanal da microrregião da Serra Canastra.....45

## LISTA DE TABELAS

### SEGUNDA PARTE

Tabela 1– Fazendas onde foram feitas as coletas de Queijo Minas Artesanal da Serra da Canastra-MG.....	33
Tabela 2 – Parâmetros usados para os valores gerados pelo MALDI – TOF MS.....	36
Tabela 3 – Composição físico-química das seis amostras da casca do Queijo Minas Artesanal da microrregião da Serra da Canastra.....	46
Tabela 4 – Composição físico-química das seis amostras do interior do Queijo Minas Artesanal da microrregião da Serra da Canastra.....	47

## LISTA DE QUADROS

### SEGUNDA PARTE

Quadro 1 – Espécies de leveduras identificadas das amostras F1, F2, F3, F4, F5 e F6 da casca do Queijo Minas Artesanal da Serra da Canastra.....	39
Quadro 2 – Espécies de leveduras identificadas das amostras F1, F2, F3, F4, F5 e F6 da casca do Queijo Minas Artesanal da Serra da Canastra.....	41
Quadro 3 – População total do meio DRBC o YEPG das UFC/g para a casca.....	43
Quadro 4 – Populações médias totais do meio DRBC o YEPG das UFC/g de fungos filamentosos no interior.....	45

## SUMÁRIO

<b>PRIMEIRA PARTE – INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>13</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>16</b>
<b>2.1 Produção de queijos artesanais em Minas Gerais.....</b>	<b>16</b>
<b>2.2 Microrregião da Serra da Canastra .....</b>	<b>17</b>
<b>2.2.1 Processo de fabricação do queijo Minas Artesanal da Serra da Canastra.....</b>	<b>17</b>
<b>2.2.2 O Pingo.....</b>	<b>19</b>
<b>2.2.3 Maturação.....</b>	<b>19</b>
<b>2.3 <i>Terroir</i>.....</b>	<b>20</b>
<b>2.4 Fatores que influenciam o desenvolvimento dos fungos em queijo .....</b>	<b>21</b>
<b>2.4.1 pH .....</b>	<b>21</b>
<b>2.4.2 Umidade .....</b>	<b>21</b>
<b>2.4.3 Atividade de água.....</b>	<b>21</b>
<b>2.4.4 Temperatura de maturação .....</b>	<b>22</b>
<b>2.4.5 Sal (Cloreto de sódio).....</b>	<b>22</b>
<b>2.5 Diversidade de fungos filamentosos e leveduras em queijos .....</b>	<b>22</b>
<b>2.6 Metodologias utilizadas para a identificação da microbiota.....</b>	<b>23</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>25</b>
<b>SEGUNDA PARTE.....</b>	<b>30</b>
<b>ARTIGO 1 - Identificação de fungos da microbiota <i>Terroir</i> de Queijos Artesanais produzidos na Serra da Canastra.....</b>	<b>30</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>31</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>31</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>32</b>
<b>2.1 Amostragem.....</b>	<b>32</b>
<b>2.2 Avaliação da microbiota por método dependente de cultivo .....</b>	<b>33</b>
<b>2.3 Purificação e Identificação dos isolados .....</b>	<b>34</b>
<b>2.4 Preservação dos isolados.....</b>	<b>34</b>
<b>2.5 Identificação fenotípica de fungos filamentosos .....</b>	<b>35</b>
<b>2.6 Identificação por MALDI-TOF MS .....</b>	<b>35</b>
<b>2.7 Análises físico-químicas .....</b>	<b>36</b>
<b>2.7.1 pH .....</b>	<b>37</b>
<b>2.7.2 Umidade .....</b>	<b>37</b>

<b>2.7.3</b>	<b>Gorduras .....</b>	<b>37</b>
<b>2.7.4</b>	<b>Cinza.....</b>	<b>37</b>
<b>2.7.5</b>	<b>Proteína Total (PT) .....</b>	<b>38</b>
<b>2.8</b>	<b>Análise estatística .....</b>	<b>38</b>
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>38</b>
<b>3.1</b>	<b>Método usado para avaliar a microbiota dependente de cultivo .....</b>	<b>38</b>
<b>3.2</b>	<b>Leveduras.....</b>	<b>38</b>
<b>2.8.1</b>	<b>Fungos filamentosos .....</b>	<b>43</b>
<b>2.9</b>	<b>Análises físico-químicas .....</b>	<b>46</b>
<b>3.</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>47</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>51</b>

## **PRIMEIRA PARTE – INTRODUÇÃO GERAL**

## 1. INTRODUÇÃO

Define-se por queijo o produto fresco ou maturado obtido a partir da separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído, ou de soros lácteos, coagulado pela ação de coalho, de enzimas ou bactérias específicas, ácidos orgânicos isolados ou combinados e de qualidade apta para uso alimentar. De acordo com a lei Federal nº 13.680 o queijo artesanal é aquele elaborado por métodos tradicionais, com vinculação e valorização territorial, regional ou cultural, conforme protocolo de elaboração específico estabelecido para cada tipo e variedade, e com emprego de boas práticas agropecuárias e de fabricação (BRASIL, 2018). O estado de Minas Gerais destaca-se como maior produtor de queijos do Brasil e é conhecido pela grande variedade desse produto. A tradição da fabricação de queijos no estado, no entanto, não se restringe às sete microrregiões reconhecidas pela Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Minas Gerais (EMATER) como produtoras de queijo Minas artesanal.

Dentre as diversas microrregiões responsáveis pela fabricação de queijos a Serra da Canastra é considerada como melhor produtora de queijo minas artesanais de Minas Gerais, pela combinação de elementos da região que resultam em queijos únicos, assim como, sua microbiota endógena (RESENDE *et al.*, 2011).

Um dos pontos importantes na elaboração de queijos é a maturação, um processo físico, bioquímico e microbiológico que ocorre em todos os queijos, exceto aqueles que são consumidos frescos. Este processo altera a composição química dos queijos, assim como seu conteúdo em açúcares, proteínas e lipídeos. O tempo de maturação varia para cada tipo, e é neste processo que se desenvolvem as características organolépticas e de textura, características de cada um dos queijos (PERRY, 2004).

Nesse sentido, e durante a fabricação do queijo Minas artesanal a utilização do leite cru é considerado um veiculador de microrganismos patogênicos, sendo este um problema de saúde (SOUZA *et al.*, 2015). A composição da microbiota dos alimentos se relaciona com ao local da fabricação dos mesmos (RYCHLIK *et al.*, 2017).

Dessa forma, as características edafoclimáticas de uma região está relacionada com o conceito de *terroir* já que está especificada com a produção nas características do queijo, assim como, na manutenção de práticas típicas dos produtores (BENKERROUM, 2016).

Estudos realizados com o método cultura-independente tornam se importante o mundo da ecologia microbiana do leite e queijos, permite a extração de DNA diretamente do alimento, sem necessidade de cultivo em meios de cultura (RANDOZZO, 2009). Alguns desses estudos mostram a microbiota *terroir* do serro (SOUZA, 2019) e da região da Canastra (ARAGÃO,

2018), a diversidade de fungos e leveduras em QMA. O presente trabalho se faz com o objetivo da identificação de leveduras e fungos filamentosos da microbiota *terroir* de queijos artesanais produzidos na Microrregião da Serra da Canastra.

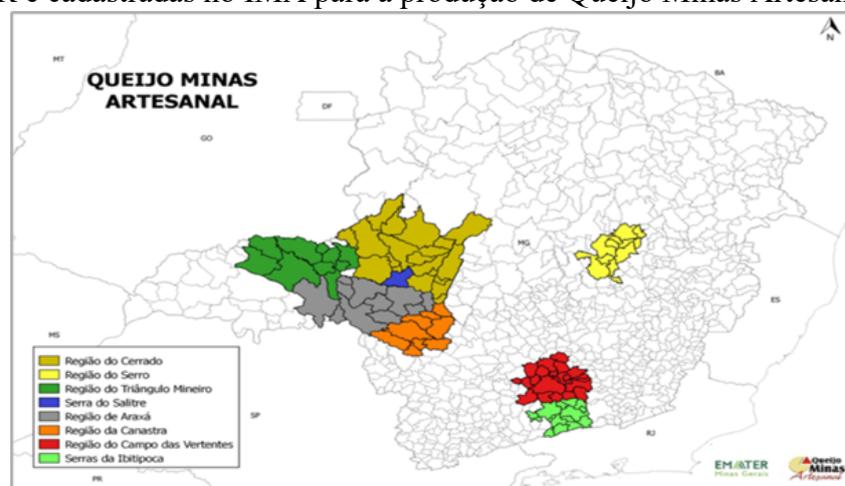
## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Produção de queijos artesanais em Minas Gerais

No Brasil alguns queijos artesanais são nomeados de acordo com a região ou estado em que são produzidos, e de acordo com sua histórica e alta relevância econômica (BEMFEITO *et al.*, 2016; KAMIMURA *et al.*, 2019). O estado de Minas Gerais é o maior produtor de queijos do Brasil, sendo conhecido inclusive pela diversidade de tipos desse produto (SANT'ANNA *et al.*, 2019). Dentre os queijos mais produzidos nesse estado está o Queijo Minas Artesanal (QMA), o qual teve seu modo de fazer considerado como Patrimônio Cultural do Brasil pelo Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional (IPHAN, 2020).

A tradição do queijo no estado de Minas Gerais, ainda é tão forte e vai no aumento, no ano 2021 outra região foi registrada como produtora do Queijo Minas Artesanal; Serras da Ibitipoca e as outras sete já cadastradas, Araxá, Campo das Vertentes, Canastra, Cerrado, Serra do Salitre, Serro e Triângulo Mineiro e serras, reconhecidas pela Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Minas Gerais (EMATER, 2020). Recentes premiações mundiais dos queijos produzidos no estado, juntamente à valorização da produção artesanal, fizeram com que produtores de regiões tais como Alagoa e Diamantina se unissem com o objetivo de alcançarem o atestado de indicação geográfica (ESTADO DE MINAS, 2019).

Figura 1 – Mapa do Estado de Minas Gerais representando as oito microrregiões reconhecidas pela EMATER e cadastradas no IMA para a produção de Queijo Minas Artesanal.



Fonte: EMATER (2020).

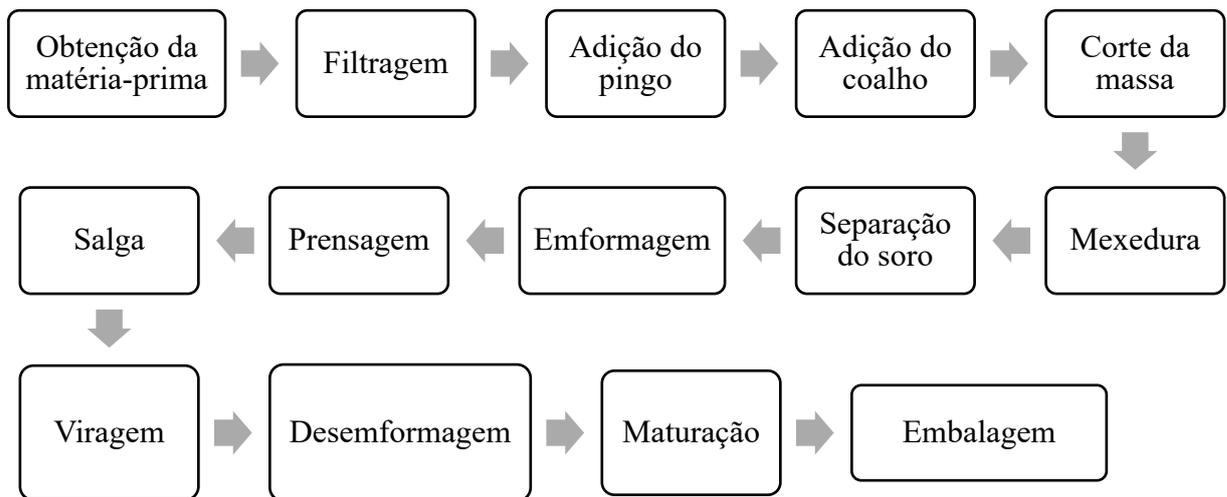
## 2.2 Microrregião da Serra da Canastra

A combinação de elementos da região da Serra da Canastra faz queijos únicos, assim como sua microbiota endógena (RESENDE *et al.*, 2011). No 2015 o queijo Minas artesanal da Serra da Canastra e escolhido como melhor do Estado (EMATER, 2015). E segundo a Portaria IMA nº 1810, de 24 de abril de 2018, alterado artigo 1º da Portaria nº 694, de 17 de novembro de 2004, a microrregião da Canastra, está composta pelos municípios de Bambuí, Córrego D'anta, Delfinópolis, Medeiros, Piumhi, São João Batista da Glória, São Roque de Minas, Tapiraí e Vargem Bonita, como produtora de QMA.

### 2.2.1 Processo de fabricação do queijo Minas Artesanal da Serra da Canastra

A família rural está involucrada na fabricação do queijo da Canastra, sendo está a maior fonte de ingressos. As variações em suas características físico-químicas dependem do processo de fabricação; assim como a utilização do “pingo” (GUIMARÃES *et al.*, 2011). Segundo Junior *et al.*, (2009) o seguinte fluxograma da fabricação do queijo da Canastra é usado na região.

Figura 2– Fluxograma de fabricação de Queijo Canastra.



Fonte: Adaptado Junior *et al.*, (2009).

Detalhamento das etapas:

- ✓ Obtenção da matéria-prima (ordenha): a ordenha pode ser manual, sendo o leite coletado pelo ordenhador em um balde, ou mecânica, quando o leite é retirado com o auxílio de uma ordenhadeira mecânica, evitando, assim, o contato manual do ordenhador com os animais.

- ✓ Filtragem: O leite é filtrado em coadores de nylon. O tempo entre a ordenha e o início da produção do queijo é de até 90 minutos, sendo o queijo produzido com leite cru, não submetido à refrigeração.
- ✓ Adição do pingo: O pingo, fermento lácteo natural utilizado tradicionalmente na produção do queijo Canastra. Normalmente esta etapa ocorre concomitantemente à adição do coalho. Após a adição de ambos os ingredientes o leite é mexido para homogeneização da mistura e, então, deixado em repouso
- ✓ Adição de coalho: O coalho industrial é adicionado ao leite em temperatura ambiente, conforme recomendação do fabricante.
- ✓ Corte da massa: No momento em que o ponto de corte é atingido, a massa é cortada com o auxílio de uma pá para separação do soro.
- ✓ Mexedura: Após o corte, a massa é mexida com determinada intensidade, com o intuito de quebrá-la em pedaços menores e auxiliar a liberação do soro.
- ✓ Separação do soro a primeira dessoragem: Nessa etapa o excesso de soro, que já se encontra na superfície do tanque, é retirado com o auxílio de um balde ou vasilha.
- ✓ Enformagem: A massa é colocada em panos de nylon denominados dessoradores e espremida com as mãos para que o excesso de soro seja eliminado. Em seguida, a massa já espremida, mas ainda no ponto de ser moldada, é colocada em formas de plástico abertas em ambas as extremidades. O peso da peça varia de 1 a 2 kg, dependendo da quantidade de massa utilizada e de soro eliminado.
- ✓ Salga: Depois de lavados os queijos estão prontos para a salga, que consiste na adição de sal grosso por toda a superfície de um dos lados do queijo. O sal permanece na superfície por cerca de 6 horas e, após esse período, é retirado.
- ✓ Viragem: O queijo é virado, e uma nova camada de sal é adicionada do outro lado da peça, sendo mantido por aproximadamente 12 horas.
- ✓ Desenformagem: No dia seguinte, o sal é retirado dos queijos, que são mantidos na forma até o dia seguinte (por aproximadamente mais 24 horas), quando então são lavados para retirada do excesso de sal, desenformados, grosados e colocados em prateleiras de maturação.
- ✓ Maturação: Os queijos são colocados em tábuas de madeira e virados diariamente, para que a maturação ocorra uniformemente na peça. O período de maturação dos queijos Canastra será de 22 dias segundo Minas Gerais, 2017.
- ✓ Embalagem: O queijo Canastra deve ser embalado em saco plástico rotulado. O rótulo deve conter as seguintes informações de acordo com regulamento técnico estabelecido (MINAS GERAIS, 2002): Denominação “QUEIJO MINAS ARTESANAL” de forma visível e em letras

destacadas, em tamanho uniforme, de acordo com as normas de rotulagem; Lista de ingredientes; Informação nutricional; Conteúdo líquido ou a menção “pesar à vista do consumidor”; Data de fabricação; Prazo de validade; Menção “PRODUTO ELABORADO COM LEITE CRU”; Microrregião de origem.

### 2.2.2 O Pingo

“Pingo” é uma fração de soro fermentado, proveniente do dessoramento dos queijos elaborados no dia anterior, isto contém culturas lácticas selecionadas, características de cada região (LEITE, 1993; NÓBREGA, 2012). No estudo realizado na região de Serro-MG foram isoladas amostras de fermentos endógeno naturais (pingo e rala), foram identificadas nove espécies de leveduras incluindo *Kluyveromyces lactis*, *Candida catenulata*, *Candida intermedia*, *Trichosporon japonicum*.

### 2.2.3 Maturação

A fase de maturação é a fase final da produção do queijo minas artesanal da Canastra, possui 22 dias como período mínimo de maturação, determinado por legislação (MINAS GERAIS, 2017).

Segundo Perry (2004) e Costa Júnior *et al.* (2014) a maturação é uma cadeia de processos físicos, bioquímicos e microbiológicos que ocorre em todos os queijos, exceto aqueles que são consumidos frescos. Estes processos alteram a composição química dos queijos, principalmente no que tange a seu conteúdo em açúcares, proteínas e lipídeos. O tempo de maturação varia para cada tipo e é neste processo que se desenvolvem as características organolépticas e de textura, de cada um deles. A maturação dos queijos é feita, na maioria dos casos, em câmaras com controle de temperatura e umidade. Tradicionalmente o índice de maturação é medido pela degradação de caseína, através da avaliação da proporção entre nitrogênio total e nitrogênio solúvel, assim denominado o nitrogênio oriundo de matéria orgânica. Este índice deve aumentar com o avanço da maturação.

Mukdsi *et al.* (2014), o principal processo ocorrido na maturação, especialmente dos queijos duros, é a degradação das proteínas ou proteólise. Esta é efetuada pelos sistemas enzimáticos do coalho e é fator preponderante para a qualidade do queijo, sobretudo nos aspectos sabor e consistência (PERRY, 2004; COSTA JÚNIOR *et al.*, 2014).

A maturação do queijo envolve uma série muito complexa de eventos inter-relacionados, resultando no desenvolvimento do sabor e da textura característica da variedade de queijo. Mcsweeney (2004); Dores (2007), demonstram que a maturação sob temperatura de refrigeração não foi suficiente para reduzir a microbiota patogênica a níveis inferiores ao limite legal, gerando queijos com 64 dias de maturação com baixa qualidade microbiológica e descaracterizado sensorialmente.

As principais reações bioquímicas que ocorrem durante o processo de maturação são glicólise, lipólise e proteólise, cuja importância relativa depende da variedade, e nos quais os constituintes principais do queijo, proteínas, lipídios e lactose são degradados a produtos primários. Estas reações primárias são responsáveis principalmente pelas mudanças básicas na textura e "flavour" que ocorrem durante a maturação. No entanto, os produtos primários são degradados a produtos secundários, que determinam os aspectos mais refinados da textura e do "flavour" (BALDINI, 1998).

### **2.3 Terroir**

O conceito de *Terroir* francês refere-se a diferentes critérios, conferindo assim particularidades do produto alimentício ao lugar onde surge; microclima, topografia, solos e os conhecimentos junto com a experiência acumulada pelos produtores ao longo do tempo, influenciando no produto final (TONIETTO, 2007; BARHAM, 2003; ALBUQUERQUE; FONTES).

Nos EUA utilizam o termo *Terroir* como um meio para dar valor a seus produtos artesanais, tomando este em duas direções; Como marketing, aumentando o capital cultural de um queijo, e a exposição do local de origem aumentando os ganhos de suas vendas (PAXSON, 2010).

Kindstedt (2005) o *Terroir* é um conjunto de elementos que é recopilada pelo pastoreio de ruminantes e a gente que trabalha para fazer os queijos únicos de forma artesanal. Esse tipo de gente conhece o lugar e sabem de que jeito fazer o produto, fundindo assim duas abordagens antropológicas, político-econômicas e fenomenológicas (TRUBEK; BOWEN, 2008). Da mesma forma que é classificado como o resultado produtivo do capitalismo de mercado (ESCOBAR, 2001).

Os queijeiros com interesse de fazer "sabor *terroir*" são pessoas que usam leites cru, não importa que os queijos frescos tenham mais oportunidade de serem vendidos mais rápido para obter seus lucros (PAXSON, 2010).

Silva (2020) compara a microbiota de queijos artesanais de leite cru produzidos nos nove municípios que compreendem a região da Serra da Canastra, identificando a existência de uma microbiota. De Souza *et al.* (2021), mostrou a microbiota presente no ar nas salas de maturação e no QMA.

## **2.4 Fatores que influenciam o desenvolvimento dos fungos em queijo**

Tem diferentes fatores que influenciam no queijo, o principal é a microbiota esta altera e intensifica o sabor, aroma, textura e aparência do produto, ao igual que o teor de água, concentração de sal e pH (BERESFORD *et al.*, 2001).

### **2.4.1 pH**

O pH mede a concentração de hidrogênio de um alimento ou solução e é geralmente representado pela equação:  $\text{pH} = \log 1 / [\text{H}^+]$ . A microbiota de alimentos pouco ácidos ( $\text{pH} > 4,5$ ) é muito variada onde se desenvolvem a maioria das bactérias, inclusive as patogênicas, bolores e leveduras (HOFFMANN, 2001).

### **2.4.2 Umidade**

Segundo Beresford *et al.* (2001), quando aumenta o teor de umidade, o queijo fica mais suscetível à deterioração.

Segundo Brasil (1996), os queijos são classificados de baixa umidade aqueles até 35,9% e de muito alta umidade 55,0%. Guimarães (2011) observou que o queijo Minas artesanal da Canastra tem um teor de umidade de 43,63% sendo isso um valor de umidade de acordo com a legislação estadual. Nos queijos artesanais a desidratação é muito intensa em temperatura ambiente (JUNIOR *et al.*, 2009).

### **2.4.3 Atividade de água**

É a medida de água liberada em um alimento, que não está vinculada a outros componentes, permitindo o crescimento de microrganismos (HENAO; QUEIROZ; HAJ-ISA 2009).

Estudo feito por Figueiredo *et al.* (2015), a atividade de água dos queijos avaliados apresentou valores distintos ( $p \leq 0,05$ ) durante os meses avaliados, sendo menor valor observado nos queijos produzidos em maio e julho, os quais apresentam menor umidade e maior teor de massa seca. Permitindo o maior desenvolvimento de microrganismos.

#### **2.4.4 Temperatura de maturação**

A temperatura deve ser de 12 a 18°C sob ambiente climatizado em temperatura ambiente. Após sofrer o período de maturação, deve ter temperaturas de refrigeração inferiores a 10°C (BRASIL, 2019).

#### **2.4.5 Sal (Cloreto de sódio)**

O consumo de sal no organismo causa retenção de água, em quantidades excessivas, esse também promove a hipertensão arterial (LIMA; SANTOS, 2017).

Na produção de queijo, o cloreto de sódio (sal) é um ingrediente determinante no sabor e também na conservação do produto. É de muita importância a tomar em conta a ingestão diária aceitável. Segundo Magalhães *et al.*, (2009) no estudo feito na casca de queijos artesanais da Canastra o Cloreto de Sódio presente no “pingo” inibe a fermentação das bactérias lácteas.

### **2.5 Diversidade de fungos filamentosos e leveduras em queijos**

O QMA, tem maior crescimento de diferentes espécies de micro-organismos, por ser feito com leite cru e faz uso do “pingo” criando assim condições adequadas para o desenvolvimento dos mesmos (ARAGÃO, 2018). Estudos feitos por Petersen; Westall; Jespersen (2002) e Vacheyrou *et al.* (2011), mostram que diferentes bolores e leveduras podem ajudar no amadurecimento de queijos especiais, assim como contaminá-los. Outros estudos mostram espécies de bolores e leveduras isolados de leite, salmoura e queijos, sendo as mais comuns *Candida catenulata*, *Candida intermedia*, *Candida lusitaniae*, *Candida parapsilosis*, *Candida rugosa*, *Candida zeylanoides*, *Cryptococcus curvatus*, *Issatchenkia orientalis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia fermentans*, *Pichia guilliermondii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii* (anamorfo: *Candida colliculosa*), e *Yarrowia lipolytica* (BORELLI *et al.*, 2006; CALLON *et al.* 2007; EL SHEIKHA *et al.*, 2009; FADDA *et al.*, 2004; JACQUES; CASAREGOLA, 2008; LOPANDIC *et al.*, 2006).

O fungo *Geotrichum candidum* se reconhece como fungo de leite (CALLON *et al.*, 2007; LAVOIE *et al.*, 2012; BUDAK *et al.*, 2016), *G. Candidum* é descrito como fungo do tipo levedura por seu comportamento filamentosos e unicelular microscopicamente. Os fungos filamentosos estão presentes apenas na superfície dos queijos (ROPARS, 2012), sem tomar em conta os queijos azuis, estes se desenvolvem nas “veias”. Existe uma grande necessidade.

## 2.6 Metodologias utilizadas para a identificação da microbiota

Muitas pesquisas tem sido objeto de estudo da diversidade microbiana durante a fabricação e maturação do queijo, usando tecnologias novas, como meios de cultura seletivos, e identificação fenotípica, só que a maioria das vezes não permite a discriminação entre espécies (PERIN, 2014).

Estes são divididos em: Métodos cultura-dependentes, baseadas no cultivo bacteriano seguido do isolamento e identificação fenotípica e molecular; e métodos cultura-independentes, como extração de DNA ou RNA diretamente do alimento, dispensando o cultivo em meios de cultura.

Métodos cultura-independente torna-se importantes o mundo da ecologia microbiana de leite e queijos, permite a extração de DNA diretamente do alimento, sem necessidade de cultivo em meios de cultura (RANDAZZO, 2009).

Alguns métodos mais utilizados são eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE), eletroforese em gel de gradiente de temperatura (TGGE) e hibridização *in situ* por fluorescência (FISH). Essas técnicas possuem as vantagens de serem realizadas mais rapidamente, são mais específicas e sensíveis, permitem a identificação de micro-organismos não cultiváveis, e de células estressadas.

O análise quantitativa no nível de uma única célula é possível por meio da Hibridização por Fluorescência *in situ* de célula inteira (FISH), que ainda é o método mais preciso para o estudo quantitativo de populações microbianas em micro-habitat naturais.

A análise de FISH pode ser usada para fornecer detecção de uma única etapa do domínio ao nível de espécie e pode ser usada para detectar populações localizadas interna ou externamente. O FISH é a possibilidade de detectar e quantificar microrganismos não cultiváveis e determinar no local conteúdo de rRNA celular e metabólico (RANDAZZO; CAGGIA; NEVIANI, 2009).

Outro método utilizado na cultura microbiana é análise espectrométrica utilizando (Matrix Assisted Laser Dessorption/Ionization - Time of Flight: Ionização/Dessorção por Laser

Assistida por Matriz com analisador de Tempo de Voo) MALDI-TOF, iniciou-se estudos para aplicação na identificação de microrganismos (WATSON; SPARKMAN, 2007).

Essa técnica consiste na ionização por dessorção a laser assistida por matriz, cuja sigla em inglês é MALDI (Matrix Assisted Lazer Desorption Ionization), seguido pela detecção em um analisador do tipo tempo de voo, sigla TOF (*Time of flight*) (GOULART, 2013).

Atualmente o estado da arte de identificação de microrganismos, utilizando MALDI-TOF, permite procedimentos mais rápidos, com maior sensibilidade de certeza de identificação, (PERIN, 2021). Obtendo os dados brutos do MALDI-TOF o conjunto a análise de *cluster* terá uma partição de uma população heterogênea em vários subgrupos mais homogêneos e os elementos são agrupados de acordo com a semelhança (DONI, 2004).

## REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, H. M; FONTES, M. J. V. A experiência do Terroir no Brasil e na França: uma poderosa ferramenta de Marketing The Terroir experience in Brazil and France: a powerful Marketing tool.
- 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.
- BALDINI, V. L. S. **Proteólise em queijo tipo prato durante a maturação.** 1998. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.
- BARHAM, E. Translating terroir: the global challenge of French AOC labeling. **Journal of rural studies**, v. 19, n. 1, p. 127-138, 2003.
- 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.
- BENKERROUM, N. Mycotoxins in dairy products: A review. **International dairy journal**, v. 62, p. 63-75, 2016.
- BERESFORD, T. P. *et al.* Recent advances in cheese microbiology. **International dairy journal**, v. 11, n. 4-7, p. 259-274, 2001.
- BORELLI, B.M. *et al.* Yeast populations associated with the artisanal cheese produced in the region of Serra da Canastra, Brazil. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v.22, p.1115-1119, 2006.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Lei Federal nº 13.680 de 14 de Junho de 2018.** Brasília, DF. 2018.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria nº 146 de 07 de março de 1996.** Brasília, DF. 1996.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria 1.937, de 14 de agosto de 2019.** Brasília, DF. 1996.
- BUDAK, S. O. *et al.* The diversity and evolution of microbiota in traditional Turkish Divle Cave cheese during ripening. **International Dairy Journal**, v. 58, p. 50-53, 2016.
- CALLON, C. *et al.* Stability of microbial communities in goat milk during a lactation year: molecular approaches. **Systematic and applied microbiology**, v. 30, n. 7, p. 547-560, 2007.
- 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, 2014.

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

DONI, M. V. Análise de cluster: métodos hierárquicos e de particionamento. Universidade Presbiteriana Mackenzie, 2004.

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.

EL SHEIKHA, A. F. *et al.* Determination of fruit origin by using 26S rDNA fingerprinting of yeast communities by PCR–DGGE: preliminary application to Physalis fruits from Egypt. **Yeast**, v. 26, n. 10, p. 567-573, 2009.

EMPRESA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL DO ESTADO DE MINAS GERAIS – EMATER. 2020. **Serras da Ibitipoca é identificada como a 8ª região produtora de queijo minas artesanal**. Disponível em: <[https://www.emater.mg.gov.br/portal.do?flagweb=novosite\\_pagina\\_interna&id=25333](https://www.emater.mg.gov.br/portal.do?flagweb=novosite_pagina_interna&id=25333)>. Acesso em 27 de março de 2022.

EMPRESA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL DO ESTADO DE MINAS GERAIS – EMATER. 2015. **O queijo artesanal Minas Canastra é eleito como o melhor do estado**. Disponível: <<https://www.serradacanastra.com.br/noticias/queijo-minas-artesanal-da-canastra-e-escolhido-o-melhor-do-estado>>. Acesso em 11 abril de 2022.

ESCOBAR, A. Depois da Natureza: Passos para uma Ecologia Política Antiessencialista. *Current Anthropology* 40(1):1–30. 2001 A Cultura Fica em Lugares: Reflexões sobre Globalismo e Sub- Estratégias alternativas de Localização. *Geografia Política* 20:139-174.

ESTADO DE MINAS. 2019. **Região de Diamantina será reconhecida como produtora do Queijo Minas Artesanal**. Disponível em: <<https://www.agenciaminas.mg.gov.br/noticia/regiao-de-diamantina-sera-reconhecida-como-produtora-do-queijo-minas-artesanal>>. Acesso em 11 abril de 2022.

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.

FIGUEIREDO, S. P. *et al.* Características do leite cru e do queijo Minas artesanal do serro em diferentes meses. **Archives of Veterinary Science**, v. 20, n. 1, 2015.

GOULART, V.A.M. Maldi-tof: uma ferramenta revolucionária para as análises clínicas e pesquisa do câncer. *Nanocell News*. Vol. 1, n. 3.

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.

HENAO, J. D.; QUEIROZ, M. R; HAJ-ISA, N. Umidade de equilíbrio de café cereja descascado baseadas em métodos estático e dinâmico. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 13, p. 470-476, 2009.

HOFFMANN, F. L. Fatores limitantes à proliferação de microrganismos em alimentos. *Brasil alimentos*, v. 9, n. 1, p. 23-30, 2001.

INSTITUTO DO PATRIMÔNIO HISTÓRICO E ARTÍSTICO NACIONAL DE MINAS - IPHAN. **Identidade Mineira**. 2020. Disponível em: <<http://portal.iphan.gov.br/pagina/detalhes/612>> Acesso em: 20 de março de 2020.

INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA - IMA. **Portaria IMA nº1810 de 24 de abril de 2018**. Disponível em: <<http://ima.mg.gov.br/institucional/portarias/1819-portarias/1963-portarias-ano-2018>>. Acesso em 16 de janeiro 2022.

JACQUES, N; CASAREGOLA, S. Safety assessment of dairy microorganisms: the hemiascomycetous yeasts. **International journal of food microbiology**, v. 126, n. 3, p. 321-326, 2008.

JUNIOR, L. C. G. C. *et al.* Variações na composição de queijo Minas artesanal da Serra da Canastra nas quatro estações do ano. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 64, n. 371, p. 13-20, 2009.

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.

KINDSTEDT, P. **American farmstead cheese: the complete guide to making and selling artisan cheeses**. Chelsea Green Publishing, 2005.

LAVOIE, K. *et al.* Characterization of the fungal microflora in raw milk and specialty cheeses of the province of Quebec. **Dairy science & technology**, v. 92, n. 5, p. 455-468, 2012.

LEITE, M.O. **Isolamento e seleção de culturas lácticas nacionais resistentes a bacteriófagos para elaboração de queijo Minas curado**. 1993. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

LIMA, N.; SANTOS, C. MALDI-TOF MS for identification of food spoilage filamentous fungi. **Current Opinion in Food Science**. p. 26-30. 2017.

LOPANDIC, K. *et al.* Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques. **Food microbiology**, v. 23, n. 4, p. 341-350, 2006.

MAGALHÃES, A. R. *et al.* Avaliação da viabilidade técnica do emprego de resina para tratamento da casca de queijos artesanais da Canastra. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v. 64, n. 370, p. 39-43, 2009.

McSWEENEY, P. L.H. Biochemistry of cheese ripening. *International journal of dairy technology*, v. 57, n. 2-3, p. 127-144, 2004.

MINAS GERAIS. 2002. **Aprova o Regulamento da Lei nº 14.185, de 31 janeiro de 2002, que dispõe sobre o processo de produção de Queijo Minas Artesanal**. Disponível em: <<https://www.lexml.gov.br/urn/urn:lex:br;minas.gerais:estadual:lei:2011-01-13;19492>>. Acesso em 8 de maio de 2022.

MINAS GERAIS. **Portaria IMA nº 1736, de 27 de julho de 2017**. Belo Horizonte, MG. 2017.

MUKDSI, M. C. A. *et al.* The secreted esterase of *Propionibacterium freudenreichii* has a major role in cheese lipolysis. *Applied and environmental microbiology*, v. 80, n. 2, p. 751-756, 2014.

NÓBREGA, J. E. **Biodiversidade microbiana, descritores físico-químicos e sensoriais dos queijos artesanais fabricados nas regiões da Serra da Canastra e do Serro, Minas Gerais.** 2012. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos; Tecnologia de Alimentos; Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2012.

PAXSON, H. Locating value in artisan cheese: reverse engineering terroir for new-world landscapes. *American Anthropologist*, v. 112, n. 3, p. 444-457, 2010.

PERIN, L. M. **Diversidade molecular da microbiota láctica bacteriocinogênica de leite de cabra e caracterização de seu potencial bioconservador para a produção de queijo Minas.** 2014. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

PERIN, T. F. **Identificação de salmonella sp. e Listeria monocytogenes utilizando a técnica de MALDI-TOF.** 2021. Trabalho de Conclusão de curso (Graduação Química Industrial) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2021.

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

PETERSEN, K. M; WESTALL, S; JESPERSEN, L. Microbial succession of *Debaryomyces hansenii* strains during the production of Danish surfaced-ripened cheeses. *Journal of dairy science*, v. 85, n. 3, p. 478-486, 2002.

RANDAZZO, C. L.; CAGGIA, C.; NEVIANI, E. Application of molecular approaches to study lactic acid bacteria in artisanal cheeses. *Journal of Microbiological Methods*, v. 78, n. 1, p. 1-9, 2009.

RESENDE, M. F. S. *et al.* Queijo de minas artesanal da Serra da Canastra: influência da altitude das queijarias nas populações de bactérias ácido lácticas. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 63, n. 6, p. 1567-1573, 2011.

ROPARS, J. *et al.* A taxonomic and ecological overview of cheese fungi. *International journal of food microbiology*, v. 155, n. 3, p. 199-210, 2012.

RYCHLIK, T. *et al.* Application of the PCR-DGGE technique to the fungal community of traditional Wielkopolska fried ripened curd cheese to determine its PGI authenticity. *Food Control*, v. 73, p. 1074-1081, 2017.

SANT'ANNA, F. M. **Microbioma de queijo Minas Artesanal da Serra do Salitre ao longo do período de maturação.** 2019. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2019.

SILVA, J. M. M. **Microbiota core de queijos de leite cru produzidos na região da Serra da Canastra.** 2020. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2020.

SOUZA, T. P. **Microbiota terroir em Queijo Minas Artesanal da microrregião do Serro: segurança e qualidade.** 2019. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2019.

SOUZA, V. *et al.* Estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de queijo Minas artesanal de Araxá. *Ars Veterinaria*, v. 31, n. 1, p. 19-23, 2015.

TONIETTO, J. 2007. Afinal o que é o terroir? Disponível: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/147755/1/Tonietto-BonVivant-v8-n98-p8-abr2007.pdf>>. Acesso em 10 maio de 2022.

TRUBEK, A. B.; BOWEN, S. Creating the taste of place in the United States: can we learn from the French? **GeoJournal**, v. 73, n. 1, p. 23-30, 2008.

VACHEYROU, M. *et al.* Cultivable microbial communities in raw cow milk and potential transfers from stables of sixteen French farms. **International journal of food microbiology**, v. 146, n. 3, p. 253-262, 2011.

WATSON, J. T; SPARKMAN, O. D. **Introduction to mass spectrometry: instrumentation, applications, and strategies for data interpretation.** John Wiley & Sons, 2007.

## SEGUNDA PARTE

### **ARTIGO 1 - Identificação de leveduras e fungos filamentosos da microbiota *Terroir* de Queijos Artesanais produzidos na Serra da Canastra**

Debora Karolina Mejia Mendez<sup>1</sup>, Luís Roberto Batista<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](mailto:luisrb@dca.ufla.br)

## RESUMO

O queijo produzido na região da Serra da Canastra conhecido como Queijo Minas Artesanal (QMA), é processado de forma artesanal, com leite cru e usando soro natural “pingo” e oriundo de Minas Gerais, maior estado produtor de queijo no Brasil. A microbiota *terroir* que existe na Serra da Canastra proporciona aos queijos diferentes combinações sensoriais, tornando-se únicos da região. Os fungos filamentosos e leveduras são de grande importância nestes queijos. Este trabalho teve como objetivo identificar os fungos da microbiota *terroir* da casca e do interior do Queijos Artesanais produzidos na Serra da Canastra, bem como avaliar suas características físico-químicas. Foram coletadas amostras de seis fazendas diferentes, nas cidades de São Roque de Minas - MG. Os fungos foram isolados e caracterizados através do método dependente de cultivo e MALDI- TOF MS. Foram determinados os seguintes parâmetros físico-químicos: umidade, pH, gordura, cinza e proteína do QMA. Das amostras analisadas a fazenda que apresentou maior diversidade de leveduras na casca foi F2 e no interior foi F1. E amostra da F5 maior diversidade de fungos filamentosos na casca e no interior foi F1. A microbiota de leveduras presentes na amostra da F2 foram *Kluyveromyces lactis*, *T. coremiiforme*, *Torulaspora delbruekii* e *Candida catenulata*. Para o interior a microbiota presente na amostra da F1, foram *Kluyveromyces lactis*, *T. coremiiforme*, *Candida parapsilosis*, *Trichosporon asahii* e *Candida catenulata*. E para os fungos filamentosos para a casca foram da amostra F5, *Geotrichum Candidu*, *Fusarium solani*, *Odiiodendron*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium oxysporum*. E para o interior *Penicillium* sp. E espécies do complexo *C. cladosporoides*. Para os parâmetros físico-químicos todas as amostras apresentaram diferença estatística significativa com exceção de pH na casca. As espécies identificadas neste trabalho permitem ter um conhecimento dos fungos que caracterizam a microbiota *terroir*, presentes nas fazendas avaliadas, assim como os resultados do análises mostram uma diversidade de microrganismos comuns no ambiente estes achados podem ajudar o compreender melhor a microbiota presente nos queijos e seu potencial de impacto na qualidade do produto final. Dentro disso, *Geotrichum candidum* tem um papel importante pois destaca as características organolépticas do queijo. Os fungos encontrados no interior como *penicillum* sp. São benéficos para a saúde, ajudando a combater as bactérias nocivas que prejudicam nosso corpo.

Palavras-chave: Queijo artesanal. Microbiota *terroir*. Soro. Leite cru.

## 1. INTRODUÇÃO

O Queijo Minas Artesanal (QMA) produzido na região da Serra de Canastra tem uma combinação de diferentes elementos nativos da comunidade; da mesma forma que as informações sobre sua microbiota endógena são limitados (RESENDE *et al.*, 2011). O QMA por ser produzido de forma artesanal, com leite cru, apresenta grande variabilidade na microbiota e em alguns casos até microrganismos patogênicos, causando danos ao consumidor final (COSTA *et al.*, 2013; MONTEL *et al.*, 2014). Assim como agregando valor com o uso do “pingo” dando diferentes sabor, odor e consistência aos queijos já que contêm microrganismos nativos, oferecendo uma de queijos na região (EMATER, 2022).

Com essa microbiota endógena, e com a maturação, são encontradas diferentes espécies de fungos e leveduras sendo alguns benéficos e portadores de transformações nos queijos (TOGAY, *et al.*, 2020). A aplicação de medidas sanitárias e cumprimento das normas e exigências da legislação vigente garante as características e qualidade do QMA, reconhecido no mundo (EMATER, 2022).

Do mesmo jeito o desenvolvimento de metodologias que permitem a identificação de espécies novas e a influência que causam no queijo, é muito importante à segurança da qualidade (PERIN, 2021; OLIVEIRA *et al.*, 2015).

O perfil microbiológico do QMA desta região é pouco conhecido (ARAGÃO, 2018). Alguns estudos tem a contribuição, no desenvolvimento de características sensoriais do produto (RESENDE *et al.*, 2011). E de muita importância os conhecimentos de este já que pode contribuir as melhoras do mesmo queijo bem como na comercialização assim como no consumo. Oliveira (2010) utilizou o fungo *Penicillium roqueforti*, para obtenção de aroma de queijo. Outro estudo feito por KATILI, 2006, o desenvolvimento do fungo *Penicillium candidum* no interior apresentam características diferenciadas como sabor, aroma e textura.

Desse modo, objetivo foi determinar as leveduras e fungos filamentosos da microbiota *terroir* de queijos artesanais produzidos na Microrregião da Serra da Canastra-MG, assim como avaliar suas características físico-químicas.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Amostragem**

As amostras foram coletadas em queijarias produtoras certificadas, localizadas nos municípios de São Roque de Minas, região da Serra da Canastra, no estado de Minas Gerais, Brasil.

Foram coletadas amostras em 6 propriedades, segundo tabela 1, QMA maturados entre 45 e 60 dias no mês de agosto no ano de 2021.

As amostras foram embaladas (embalagem própria), armazenadas em sacos estéreis e transportadas para o Laboratório de Micologia e Micotoxinas, do Departamento de Ciência dos Alimentos, da Universidade Federal de Lavras, onde foram posteriormente analisadas.

Tabela 1– Fazendas onde foram feitas as coletas de Queijo Minas Artesanal da Serra da Canastra-MG.

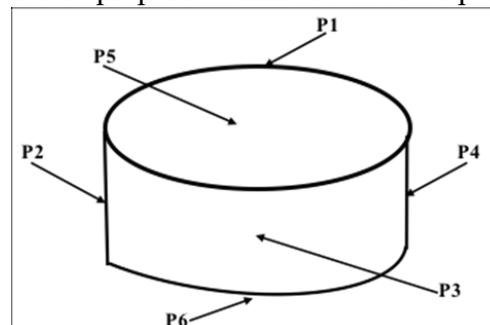
Fazendas	Codificação	Coordenadas Geográficas		
		Latitude	Longitude	Altitude
Fazenda 1.	F1	20°01'44.7"S	46°27'46.6"W	1.061 m
Fazenda 2.	F2	20°06'24"S	46°19'15"W	825 m
Fazenda 3.	F3	20°04'46.7"S	46°55'10.9"W	1.100 m
Fazenda 4.	F4	20°01'86.4"S	46°46'89.7"W	1.300 m
Fazenda 5.	F5	20°11'23.0"S	46°25'36.6"W	1.302 m
Fazenda 6.	F6	20°18'56.2"S	46°36'20.4"W	1.358 m

## 2.2 Avaliação da microbiota por método dependente de cultivo

O método realizado para o isolamento de fungos filamentosos e leveduras a partir das amostras de QMA foi a técnica de diluição seriada.

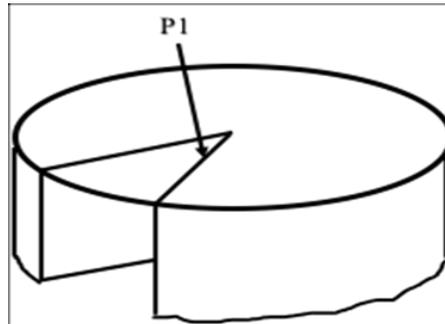
Utilizou-se 10 g de casca de queijo triturada grosseiramente, obtidas de 4 pontos equidistantes da lateral (P1, P2, P3 e P4), 1 ponto central da base e outro da superfície (P5 e P6) conforme a Figura 1. 10 g do interior de queijo triturada grosseiramente, obtida de 1 ponto central da base do interior (P1) conforme a Figura 2.

Figura 1 – Modelo esquemático de preparo da amostra da casca para técnica de diluição seriada.



Fonte: Adaptado de Aragão (2018).

Figura 2 – Modelo esquemático de preparo da amostra do interior para técnica de diluição seriada.



Fonte: Autor (2022).

A casca e o interior, foram trituradas separadamente adicionados em 90 mL de água peptonada com concentração de 0,1%. A solução foi acondicionada em saco estéril e levada para agitação em Stomacker, onde foi submetida à 490 golpes/2 minutos. Em seguida procedeu-se com a diluição seriada e alíquotas de 0,1 mL das diluições foram inoculadas nos seguintes meios de cultura: Ágar Dichloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC); Dichloran Glicerol Medium Base (DG18) (1,0mL de Dicloran; 5,0g/L de Peptona Bacteriológica; 1,0g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,5g/L de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 220g/L de Glicerol; 15,0g/L de Ágar; 1mg/L de cloranfenicol); e Yeast Extract Peptone Glucose Ágar (YEPG) pH 3,5.

Após um período de incubação por 7 dias em BOD à 25°C, foi realizada a contagem em unidades formadoras de colônias (UFC/g).

### 2.3 Purificação e Identificação dos isolados

Após o período de incubação foi realizado a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC), caracterização fenotípica e empregada a técnica de raiz quadrada para determinar o total de fungos filamentosos e leveduras que seriam isolados. Em seguida, os isolados foram transferidos para meio de purificação MA e incubados em BOD 25 °C por 7 dias (fungos filamentosos) e 28 °C por 48 horas (leveduras). Após a obtenção das colônias puras os isolados foram preservados e iniciou-se o processo de identificação.

### 2.4 Preservação dos isolados

Os fungos filamentosos identificados foram preservados em duplicata por dois métodos distintos. Por meio de coleta dos esporos com auxílio de papel filtro em tubos Eppendorf, preservados à temperatura de -18 °C e, como método principal de preservação, a técnica de

criopreservação a -80 °C, adicionado 0,5 mL de solução de glicerol a 20% e armazenada à -80 °C.

As leveduras identificadas foram armazenadas em duplicata em tubos Eppendorf, preservados pela técnica de criopreservação a -80 °C. Primeiramente foram adicionados 0,5 mL de caldo YEPG em tubos Eppendorf. Em seguida a levedura foi repicada com o auxílio de uma alça de platina no caldo nutriente e incubada em BOD a 28 °C por 48 horas ou até turvação do meio. Posteriormente foi adicionado 0,5 mL de solução de glicerol a 40% e armazenada à -80 °C. Outro método utilizado para preservação das leveduras foi o repique direto para uma solução crioprotetora de glicerol a 20%.

Os isolados após a identificação foram depositados na Coleção de Cultura de Microorganismos do Departamento de Ciência dos Alimentos (CCDCA) da Universidade Federal de Lavras.

## 2.5 Identificação fenotípica de fungos filamentosos

Para identificação do gênero de fungo filamentoso os isolados de *Aspergillus* e *Penicillium* foram crescidos em meios de cultura Ágar Czapek Levedura (CYA) [K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 1,0 g; concentrado czapec: 10,0 mL; extrato de levedura: 5,0 g, ágar: 15,0 g, água destilada: 1 L; (concentrado czapec: NaNO<sub>3</sub>: 30,0 g, KCl: 5,0 g, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O: 5,0 g, FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O: 0,1 g, ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O: 0,1 g, CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O: 0,05 g, água destilada: 100 mL)] a 25 °C e 37 °C e Ágar Extrato de Malte e Levedura (MEA) (extrato de malte: 20,0 g, peptona bacteriológica: 1,0 g, glicose: 30,0 g, ágar: 20,0 g, água destilada: 1L) a 25 °C por um período de 7 dias a para os demais gêneros utilizou-se o meio de cultura MEA a 25 °C por 7 dias. Após o período de incubação foram avaliadas as características macroscópicas e microscópicas das colônias dos fungos, conforme os manuais de identificação específico para cada gênero, sendo para *Aspergillus*, utilizado o Manual de Klich (2002), para o gênero *Penicillium*, o Manual de Pitt (2000) e para os demais gêneros, o Manual de Samson *et al.* (2000).

## 2.6 Identificação por MALDI-TOF MS

As leveduras após purificação e avaliação morfológica, foram submetidos a análises do seu perfil de proteínas ribossomais a fim de realizar um agrupamento e possível identificação das espécies utilizando MALDI- TOF MS. As colônias foram crescidas em placas de Petri contendo meio Yeast Extract Peptone Glucose Ágar (YEPG), incubadas em BOD à 28 °C por

18 horas. Após o crescimento para análise das leveduras foram transferidas aproximadamente  $3 \times 10^7$  células de cada isolado para microtubos estérei, adicionados 300  $\mu$ L de água ultra pura, levada a homogeneização em vórtex por 30 segundos, posteriormente adicionados 900  $\mu$  de etanol, homogeneizado em vórtex por 30 segundos, e em seguida sanicados em ultrasonic cleaner por 5 minutos a uma temperatura de 40°C, e centrifugados 13000 rpm por 2 minutos, posteriormente descartou o sobrenadante e adicionou 50  $\mu$ L solução de ácido fórmico 70%, homogeneizado em vórtex por 30 segundos, e adicionado de 50  $\mu$ L de acetonitrila ecentrifugado a 13000 rpm por 2 minutos. Foi transferida para a placa MALDI-TOF MS. 1  $\mu$ L da suspensão. Após evaporação quase completa, foi adicionado 1  $\mu$ L de solução matriz homogeneizado [solução saturada de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxi-cinâmico (CHCA) em acetonitrila a 50%; ácido trifluoroacético a 2,5%] (OLIVEIRA *et al.*, 2015).

Para a calibração do equipamento foi empregado a cepa *Escherichia coli* K12, cultivada em meio Ágar Luria-Bertani (LB) (bactotripton, 1,0 g; extrato de bactoheyeast, 0,5 g; NaCl, 1,0 g; ágar, 15,0 g; água destilada, 1 L) incubada em BOD à 37 °C por 18 horas. Para a calibração do equipamento foi empregado a cepa *Escherichia coli* K12, cultivada em meio Ágar Luria-Bertani (LB) (bactotripton, 1,0 g; extrato de bactoheyeast, 0,5 g; NaCl, 1,0 g; ágar, 15,0 g; água destilada, 1 L) incubada em BOD à 37 °C por 18 horas. Após incubação, aproximadamente 1  $\mu$ g de material celular de uma única colônia de *E. coli* K12 foi transferido, em triplicata, diretamente para a placa MALDI flex target e adicionou-se a solução matriz para a análise (LIMA, SANTOS 2017).

Os espectros de massa foram processados com o pacote de software 3.0 do MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) para agrupamento estatístico e identificação microbiana (CARVALHO, 2017).

Tabela 2 – Parâmetros usados para os valores gerados pelo MALDI – TOF MS.

Parâmetros	Detalhes
<2,000	Alta probabilidade de identificação de espécies
1,700 - 1,999	Identificação provável da espécie
>1,500	Identificação não confiável da espécie

Fonte: Adaptado de Aragão (2018).

## 2.7 Análises físico-químicas

As amostras de QMA foram submetidas as análises físico-químicas em três repetições para a casca e para o interior avaliando os teores de umidade, gorduras, pH, proteína total. Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Leite e Produtos Lácteos do Departamento de

Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras de acordo com os procedimentos da Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2006) e da Instrução Normativa No 68, de 12 de dezembro de 2006, que define os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos (BRASIL, 2006).

### **2.7.1 pH**

O pH da amostra foi determinado utilizando-se pHmetro previamente calibrado, introduzindo-se o eletrodo diretamente em 5g da amostra homogênea com 50mL de água destilada, em triplicata (AOAC, 2006).

### **2.7.2 Umidade**

Foi tomada 3g de amostra para a determinação do percentual de umidade se deu por secagem da amostra em estufa a  $102 \pm 2$  °C. Após secagem as amostras foram mantidas à temperatura ambiente em dessecador até obtenção de massa constante.

### **2.7.3 Gorduras**

O percentual de lipídeos foi obtido pelo método butirométrico, utilizando-se butirômetro especial para queijo (método de Van Gulik), baseado na digestão da matéria orgânica pelo ácido sulfúrico. Após a separação da gordura por ação do álcool isoamílico e centrifugação, realizou-se a leitura em escala própria.

### **2.7.4 Cinza**

O conteúdo de cinzas dos queijos foi determinado a partir de 2 g da amostra, as quais foram pesadas diretamente em cadinho de porcelana previamente tarado. Em seguida, carbonizou-se a amostra em chapa aquecedora, de modo a se evitar o espalhamento e a perda da gordura. Finalmente, a amostra foi colocada em mufla a 540 °C por 18 horas. Ao final desse período os cadinhos foram transferidos para dessecadores para resfriamento e pesagem.

### **2.7.5 Proteína Total (PT)**

Para obter o teor de proteína primeiro determinou-se o teor de nitrogênio total, sendo determinado pelo método micro Kjeldahl, compreendendo as fases de digestão, destilação e titulação, conforme método (AOAC, 2006). Em seguida é multiplicado o percentual de nitrogênio total pelo fator de conversão 6,38, de acordo com a fórmula:  $PT = NT \times 6,38$

### **2.8 Análise estatística**

As diferenças estatísticas entre a avaliação físico-químicas das amostras foram avaliadas empregando-se a análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade utilizando o software InfoStat 4.5 (FERREIRA, 2014).

Para agrupamento estatístico e identificação microbiana os espectros de massa foram processados com o pacote de software 3.0 do MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) (CARVALHO, 2017).

## **3. RESULTADOS**

### **3.1 Método usado para avaliar a microbiota dependente de cultivo**

### **3.2 Leveduras**

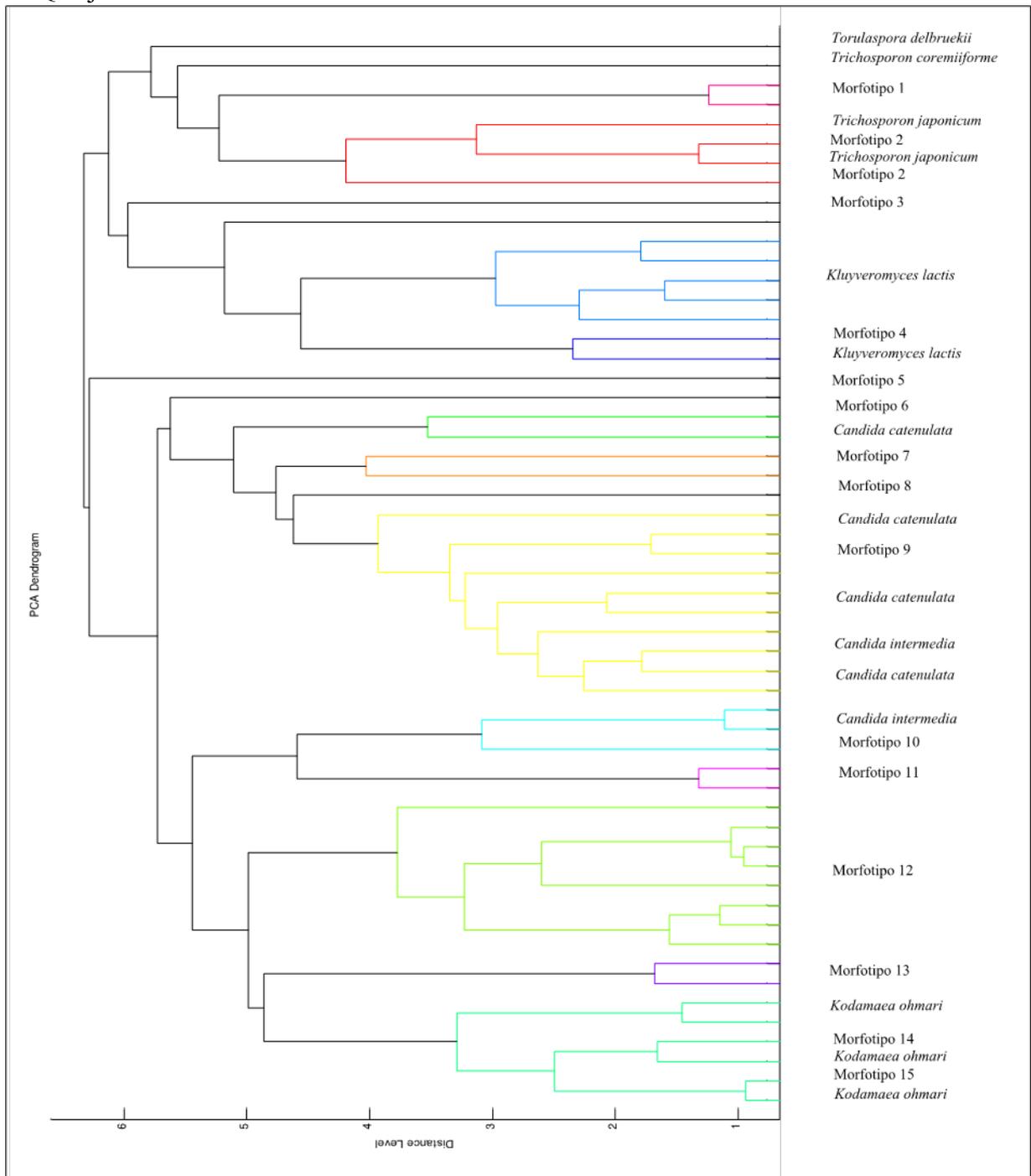
Foram avaliadas 25 leveduras da casca do Queijo Minas Artesanal da Serra da Canastra, das quais; amostra fazenda 1: 4 leveduras, amostra da fazenda 2, foram avaliadas 6 leveduras; amostra da fazenda 3: 5 leveduras, fazenda 4: 4 de leveduras, fazenda 5: 3 leveduras e da fazenda 6: 3 de levedura, explicado na tabela a seguir.

Quadro 1– Espécies de leveduras identificadas das amostras F1, F2, F3, F4, F5 e F6 da casca do Queijo Minas Artesanal da Serra da Canastra.

Fazenda	Codificação	Espécies identificadas	Total de espécies por fazenda
Fazenda 1	F1	<i>Kluyveromyces lactis</i>	2
		<i>Kodamaea ohmari</i>	2
Fazenda 2	F2	<i>Kluyveromyces lactis</i>	1
		<i>T. coremiiforme</i>	1
		<i>Torulaspota delbruekii</i>	1
		<i>Candida catenulata.</i>	3
Fazenda 3	F3	<i>Trichosporon japonicum</i>	1
		<i>Candida catenulata.</i>	3
		<i>Candida intermedia</i>	1
Fazenda 4	F4	<i>Kluyveromyces lactis</i>	3
		<i>Kodamaea ohmari</i>	1
Fazenda 5	F5	<i>Kluyveromyces lactis</i>	1
		<i>Candida catenulata.</i>	2
Fazenda 6	F6	<i>Trichosporon japonicum</i>	1
		<i>Candida catenulata.</i>	2

Na Figura 3, a seguir observa-se o dendograma realizado a partir do perfil proteico obtido no MALDI-TOF as leveduras isoladas das fazendas, 1, 2, 3, 4 e 5, respectivamente da casca, do Queijo Minas Artesanal da microrregião da Serra da Canastra.

Figura 3 – Dendrograma das leveduras isoladas das amostras F1, F2, F3, F4, F5 e F6 da casca do Queijo Minas Artesanal da Serra da Canastra.



Fonte: Autora (2022)

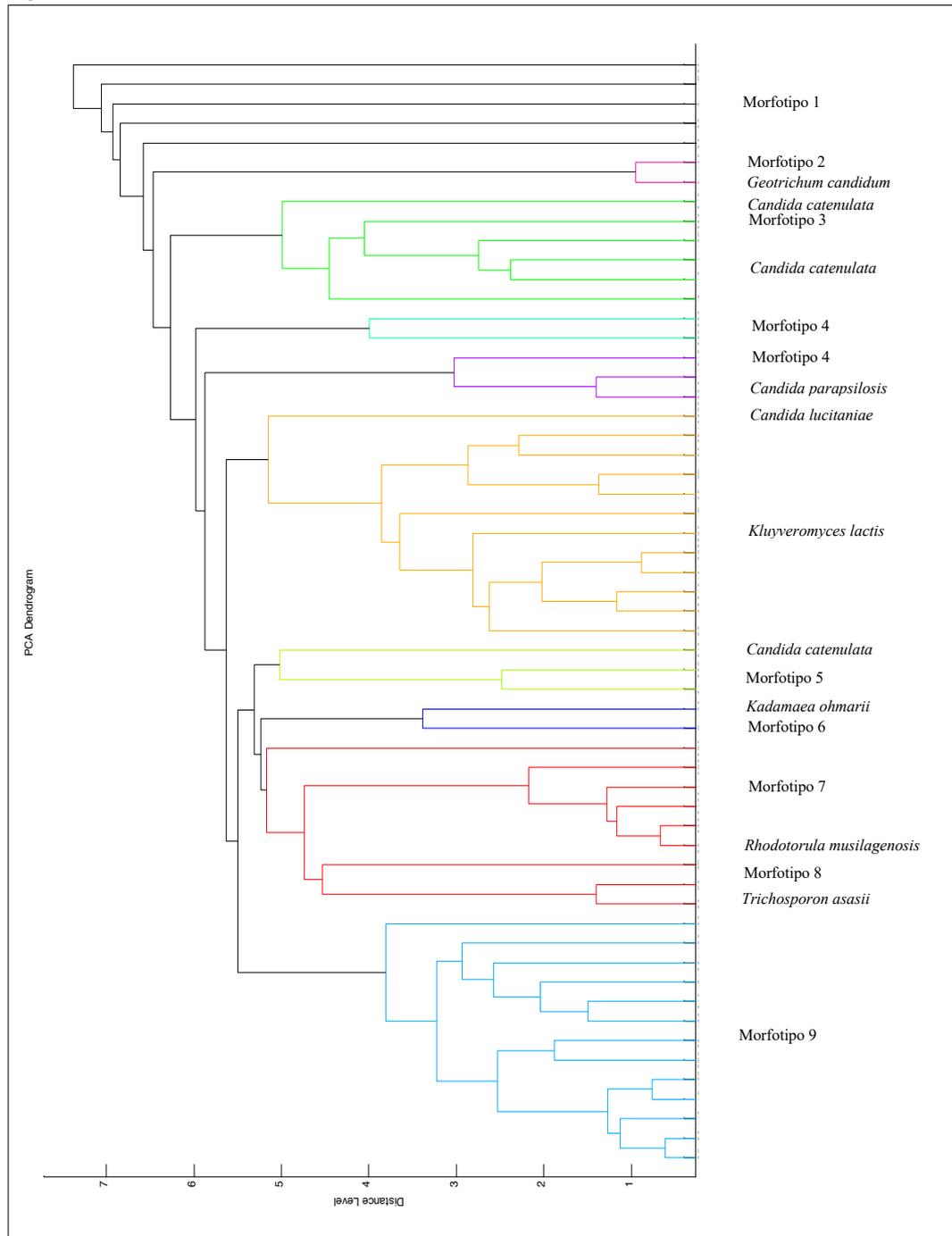
Para o interior foram avaliadas 26 leveduras do Queijo Minas Artesanal da Serra da Canastra amostra da F1: 8 leveduras; amostra da F2 foram identificadas 6 leveduras; amostra da F3: 5 leveduras; amostra da F4: 4 leveduras; amostra da F5: 1 levedura; amostra da F6: 2 leveduras. Na Figura 4, a seguir observa-se o dendrograma realizado a partir do perfil proteico

obtido no MALDI-TOF as leveduras isoladas das amostras F1, F2, F3, F4, F5 e F6 respectivamente do interior, do Queijo Minas Artesanal da microrregião da Serra da Canastra.

Quadro 2 – Espécies de leveduras identificadas das amostras F1, F2, F3, F4, F5 e F6 do interior do Queijo Minas Artesanal da Serra da Canastra.

<b>Fazenda</b>	<b>Codificação</b>	<b>Espécies identificadas</b>	<b>Total de espécies por fazenda</b>
Fazenda 1	F1	<i>Kluyveromyces lactis</i>	3
		<i>Trichosporon asahii</i>	3
		<i>Candida parapsilosis</i>	1
Fazenda 2	F2	<i>Kluyveromyces lactis</i>	1
		<i>Candida catenulata.</i>	3
		<i>Geotrichum candidum</i>	1
		<i>Rhodotorula mucilagenosis</i>	1
Fazenda 3	F3	<i>Kodamaea ohmari</i>	1
		<i>Rhodotorula mucilagenosis</i>	1
		<i>Candida lucitaniae</i>	1
		<i>Candida parapsilosis</i>	2
Fazenda 4	F4	<i>Kluyveromyces lactis</i>	2
		<i>Candida catenulata.</i>	1
Fazenda 5	F5	<i>Kluyveromyces lactis</i>	1
Fazenda 6	F6	<i>Kluyveromyces lactis</i>	1
		<i>Candida catenulata.</i>	1

Figura 4 – Dendrograma das leveduras isoladas das amostras F1, F2, F3, F4, F5 e F6 do interior do Queijo Minas Artesanal da Serra da Canastra.



Fonte: Autora (2022)

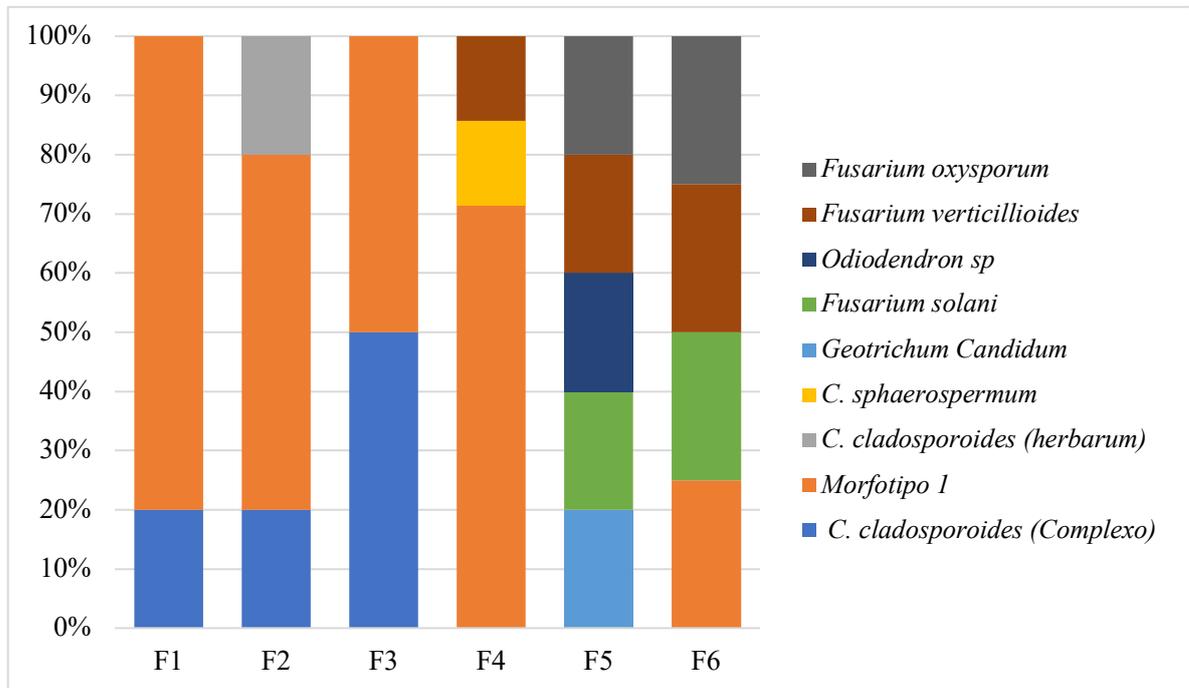
### 2.8.1 Fungos filamentosos

Foi avaliado a microbiota de fungos filamentosos das 6 fazendas do Queijo Minas artesanal, foram avaliados morfologicamente 27 isolados dos fungos filamentosos para casca, dos quais 13 foram identificados de acordo com os manuais de identificação.

Quadro 3 – População total do meio DRBC o YEPG das UFC/g para a casca.

AMOSTRA	MEIO	POPULAÇÃO TOTAL POR MEIO (UFC/g)
F1	DRBC	$3,0 \times 10^8$ UFC/g
	YEPG	$3,3 \times 10^8$ UFC/g
F2	YEPG	$3,5 \times 10^8$ UFC/g
	YEPG	$4 \times 10^8$ UFC/g
F3	DRBC	$6,7 \times 10^7$ UFC/g
	YEPG	$5,5 \times 10^7$ UFC/g
F4	DRBC	$5,2 \times 10^8$ UFC/g
	YEPG	$3,8 \times 10^8$ UFC/g
F5	DRBC	$1,0 \times 10^9$ UFC/g
	YEPG	$7,2 \times 10^8$ UFC/g
F6	DRBC	$8,4 \times 10^8$ UFC/g
	DRBC	$1,0 \times 10^8$ UFC/g

Figura 5 – Frequência de ocorrência, espécies de fungos filamentosos para a casca presentes nas amostras F1, F2, F3, F4, F5 e F6 de queijo Minas Artesanal da microrregião da Serra Canastra.



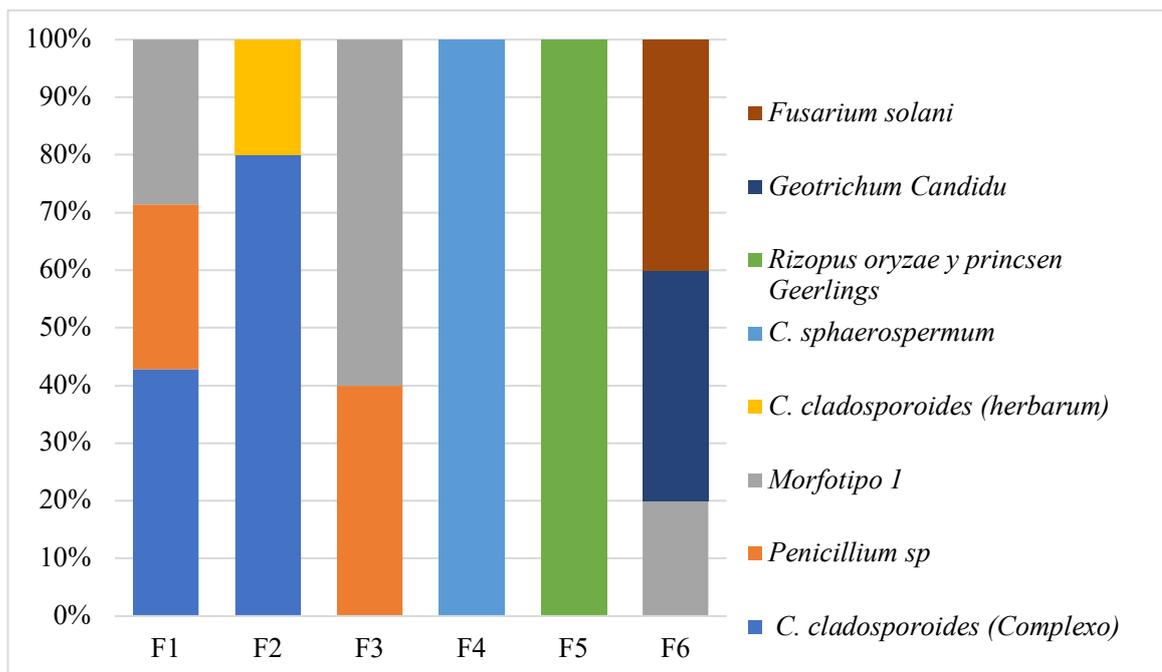
As amostras que apresentou maior diversidade de fungos na casca foi F5 com o 20% *Fusarium oxysporum*, 20% *Fusarium verticillioides*, 20% *Odiodendrom sp* 20%, *Geotrichum candidu* 20% e espécies do complexo *Cladosporium cladosporioides*. As amostras que apresentaram a menor diversidade foram a amostra F1 com espécies do complexo *Cladosporium cladosporioides* e F3 sendo identificados espécies do complexo *Cladosporium cladosporioides*.

Para o interior do Queijo Minas Artesanal da Serra da Canastra foi avaliado a microbiota de fungos filamentosos das 6 fazendas do Queijo Minas artesanal foram validados 31 isolados dos fungos filamentosos, dos quais 23 foram identificados de acordo com os manuais de identificação. A fazenda com maior diversidade identificada foi F:1 com 3 espécies distintas identificadas.

Quadro 4 – Populações médias totais do meio DRBC o YEPG das UFC/g de fungos filamentosos no interior.

FAZENDAS	MEIO	POPULAÇÃO MEIA TOTAIS POR MEIO (UFC/g)
F1	DRBC	$8 \times 10^5$ UFC/g
	YEPG	$6 \times 10^5$ UFC/g
F2	DRBC	$3,5 \times 10^8$ UFC/g
	YEPG	$3,8 \times 10^8$ UFC/g
F3	DRBC	$2,0 \times 10^5$ UFC/g
	YEPG	$1,2 \times 10^5$ UFC/g
F4	DRBC	$3,8 \times 10^5$ UFC/g
	YEPG	$3,4 \times 10^3$ UFC/g
F5	DRBC	$1,2 \times 10^5$ UFC/g
	YEPG	$7 \times 10^5$ UFC/g
F6	DRBC	$7,0 \times 10^5$ UFC/g
	YEPG	$6,8 \times 10^5$ UFC/g

Figura 6 – Frequência de ocorrência, espécies de fungos filamentosos para o interior presentes nas amostras F1, F2, F3, F4, F5 e F6 de queijo Minas Artesanal da microrregião da Serra Canastra.



Já no interior a amostras que apresentou maior diversidade de fungos foi F:1 do complexo *Cladosporium cladosporioides* com um 43%, e *Penicillium sp*. Com 20% a amostra F:6 com *Fusarium solani* com 40% da diversidade, *Geotrichum Candidu* com 40%. As amostras que apresentaram a menor diversidade foram a amostra F:3 com 40% de *Penicillium sp*.

## 2.9 Análises físico-químicas

Na Tabela 1 observam-se as características físico-químicas analisadas das Amostras F1, F2, F3 F4, F5 e F6, da casca do QMA da microrregião da Serra da Canastra.

Tabela 3 – Composição físico-química das seis amostras da casca do Queijo Minas Artesanal da microrregião da Serra da Canastra.

Amostra	pH	Gordura (%)	Umidade (%)	Cinzas (%)	Proteína (%)
F1	6.21 ± 0.051 a	25.6 ± 0.000 a	39.24 ± 0.603 b	4.67 ± 0.042 d	25.6 ± 0.208 g
F2	6.22 ± 1.281 a	36.4 ± 0.000 e	44.09 ± 1.049 c	4.19 ± 0.298 c	24.76 ± 0.409 d
F3	6.02 ± 0.075 a	33.4 ± 0.000 d	36.44 ± 0.477 a	2.80 ± 0.104 b	24.29 ± 0.000 b
F4	5.59 ± 0.123 a	44.0 ± 0.000 f	36.69 ± 2.134 a	1.89 ± 0.137 a	19.88 ± 0.202 a
F5	5.65 ± 0.576 a	30.0 ± 0.000c	37.04 ± 0.440 a	4.09 ± 0.452 c	27.03 ± 0.416 c
F6	6.29 ± 0.031 a	26.0 ± 0.000 b	43.13 ± 1.096 c	5.03 ± 0.108 d	25.72 ± 0.624 g

\*Letras diferentes na mesma coluna mostram diferença estatística significativa a  $p \leq 0,05$ .

De acordo com os dados obtidos para o valor de pH são estatisticamente iguais ( $p > 0,05$ ) em todas as amostras da casca. Os valores variam do menor para a amostra F6 com 5,59 e a maior F5 com 6,29.

Na avaliação do teor de gordura todas as amostras diferiam estatisticamente ( $p > 0,05$ ). Amostra que apresentou menor teor de gordura foi F1 com 25,6% e maior foi a amostra F6 com 44%. Para a umidade as amostras F3 com 36,44%, F6 com 36,69% e F5 37,04% são estatisticamente igual ( $p > 0,05$ ) e as amostras F1, F2 e F4, apresentam diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ). De acordo com estes valores (gordura e umidade) determinou-se o percentual de gordura no extrato seco (GES), apresentando o porcentual de 42,14% para F1, 65,10% para F2, 52,56% para amostra F3, 69,51% para amostra F6, 47,66% para F5 e 45,73% para F4. As amostras do interior com a GES foram 62,33% para F1, 44,88% para F2, 51,57% para F3, 60,28% para F6, 62,77% para F5 e 39,62%.

O valor da cinza na casca da amostra F1 e F4 são estatisticamente iguais ( $p > 0,05$ ) e as amostras, F2, F5 ( $p > 0,05$ ), as amostras F3, F6 apresentam diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ).

A porcentagem de proteína para todas as amostras mostrou diferenças estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ), amostra que apresentou maior teor de proteína foi F:5 com 27,03% e menor teor foi a amostra F:4 com 19,88%.

Na Tabela 2 observam-se as características físico-químicas analisadas das Amostras F1, F2, F3 F4, F5, F6, do interior do QMA da microrregião da Serra da Canastra.

Tabela 4 – Composição físico-química das seis amostras do interior do Queijo Minas Artesanal da microrregião da Serra da Canastra.

Amostra	pH	Gordura (%)	Umidade (%)	Cinzas (%)	Proteína (%)
F1	5.06 ± 0.110 a	32.0 ± 0.000 c	48.66 ± 2.820 cd	2.67 ± 0.505 b	25.36 ± 0.947 c
F2	5.34 ± 0.400 ab	21.8 ± 0.000 a	51.42 ± 0.490 d	3.44 ± 0.362 c	20.24 ± 0.416 a
F3	5.46 ± 0.036 b	40.0 ± 0.000 f	22.43 ± 1.390 a	5.37 ± 0.026 b	20.48 ± 0.416 a
F4	5.19 ± 0.168 ab	38.0 ± 0.000 e	36.95 ± 1.600 b	1.57 ± 0.141a	21.19 ± 0.409 a
F5	5.46 ± 0.000 b	34.0 ± 0.000 d	45.84 ± 2.083 c	4.09 ± 0.590 c	24.29 ± 0.710 bc
F6	5.26 ± 0.026 ab	28.0 ± 0.000 b	46.95 ± 0.388 c	3.58 ± 0.373 c	23.81 ± 0.900 b

\*Letras diferentes na mesma coluna mostram diferença estatística significativa a  $p \leq 0,05$ .

O valor do pH para o interior do QMA foi estatisticamente igual ( $p > 0,05$ ) para as amostras F2, F6 e F4, sendo diferentes das demais. A amostra F3 e F5 são estatisticamente iguais ( $p > 0,05$ ) entre ambas e diferente das outras amostras, F1 apresentou diferença estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ), menor valor de pH foi a mostra F1 com 5,06 e maior valor de pH foram f:3 e F:5 com 5,46.

Para o teor de gordura todas as amostras diferiam estatisticamente ( $p < 0,05$ ). Sendo a amostra F:2 com 21,08% com menor valor e a mostra com maior valor foi F3 com 40%.

A avaliação para a umidade no interior apresenta diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) para todas as amostras. A amostra com maior teor de umidade foi F2 com 51,42% a que teve menor teor foi F3 com 22,43%.

O valor da cinza no interior da amostra F6 foi estatisticamente diferente ( $p < 0,05$ ) das demais, as amostras F1, F3 são estatisticamente iguais ( $p > 0,05$ ) apresentando valor médio de 4,02%. Para F2, F5 e F4 são estatisticamente iguais ( $p > 0,05$ ) apresentando valores em média de 5.36%.

Para os valores da proteína total no interior das amostras F2, F3, F6 são estatisticamente iguais ( $p > 0,05$ ) apresentando valores médios de 21,51%. As amostras F5 e F4 são estatisticamente iguais ( $p > 0,05$ ) apresentando valores médio de 23,42%. A amostra F1 é estatisticamente igual ( $p > 0,05$ ) a amostra F5 e apresentam valores médios de 24.82%.

### 3. DISCUSSÃO

A legislação Brasileira não tem padrão máximo ou mínimo legal para quantificação de bolores e leveduras em queijo Minas Artesanal (OLIVEIRA, 2014). Aragão (2018), encontrou em duas propriedades da serra da Canastra de queijo Minas Artesanal, valores médios de contagem de bolores e leveduras de  $20,9 \times 10^5$  UFC/g para verão/úmido, e  $26,8 \times 10^3$  UFC/g para inverno/seco. Outro estudo feito por Borelli *et al.*, (2006), na mesma região a contagem de

bolores e leveduras foram entre  $2,5 \times 10^3$  e  $7,9 \times 10^7$  UFC/g. Para Salvador *et al.* (2001), a contagem de bolores e leveduras esteve acima de  $5,0 \times 10^3$  UFC/g em 3 amostras de queijo parmesão e em 13 de queijo prato. Neste estudo a contagem média total de fungos e leveduras têm uma variação em quanto o interior de  $7,0 \times 10^5$  UFC/g e  $6,8 \times 10^5$  UFC/g, e para a casca de  $1,2 \times 10^8$  UFC/g e  $8,4 \times 10^8$  UFC/g, esses dados em comparação com os estudos encontrados do contagem de bolores e leveduras tem valores mais baixos, isso pode significar que os produtores ao longo dos anos implementaram técnicas para melhorar seus queijos.

A técnica usada neste trabalho permitiu-se verificar algumas espécies de fungos filamentosos e leveduras em QMA das seis propriedades da microrregião da serra da Canastra (CRUVINEL, MELO; LACORTE, 2017; PADILHA, 2013; KAMIMURA *et al.*, 2020).

Estudos feitos por Ribeiro *et al.* (2020), identificou-se fungos filamentosos em queijos azuis maturados, *Aspergillus aculeatus*, *Penicillium roqueforti*, *Penicillium solitum* outra espécie encontrada foi *Geotrichum candidum*. Espécies semelhantes foram encontradas no presente estudo como *Penicillium* sp encontrada nas amostras F1 e F3 do interior e *Geotrichum candidum* encontrou-se na amostra F6 do interior e na amostra F5 da casca. Sendo verificada em outros queijos como Camember para melhora do sabor e aroma, por sua ação no metabolismo de proteínas (DIAS *et al.*, 2012; BOUTROU; GUÉGUEN, 2005). Também foi usado na microbiota do amadurecimento do queijo (MARTIN; COTON, 2016). A espécie *Fusarium* identificada neste estudo já foi verificada em outros queijos como; Queijo Minas Artesanal da serra da canastra (Aragão 2018) e Souza (2019) observou-se *Penicillium commune*. Outro estudo por Banjara; Suhr; Hallen-Adams (2015), encontrou-se o gênero *Penicillium* e *Aspergillus* em queijos. Outra espécie *Cladosporium* foi encontrado neste trabalho e foi verificada por, (BANJARA; SUHR; HALLEN-ADAMS, 2015; DEMIREL *et al.*, 2005). (FURTADO, 2011) *Cladosporium herbarum* e *Cladosporium cladosporioides*, encontrou-se com frequência em queijos duros.

A espécie *Geotrichum candidum* identificada neste estudo já foi verificada em outros trabalhos como (BOUTROU; GUÉGUEN, 2005; POTTIER *et al.*, 2008). Isolados de leveduras identificadas neste estudo dos gêneros, *Candida*, *Debaryomyces*, *Dekkera*, *Dipodascus*, *Galactomyces*, *Kluyveromyces*, *Kodamaea*, *Pichia*, *Rhodospiridium*, *Saccharomyces*, *Schizoblastosporion*, *Sporidiobolus*, *Torulaspora*, *Trichosporon*, *Yarrowia* e *Zygosaccharomyces*, foram verificados por Landell; Hartfelder; Valente (2006).

Outras espécies identificadas neste estudo como, *Debaryomyces hansenii* e *Kluyveromyces lactis* foram encontrados em QMA (LIMA *et al.*, 2009; PEREIRA *et al.* 2019).

Assim como, *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis*, *Kodamaea ohmeri* and *Torulaspora delbrueckii* (BORELLI *et al.*, 2006).

A espécie *Candida catenulata*, encontrada na casca de três amostras, pode ter sido originária do pingo usado no QMA da Serra da Canastra nesta investigação, assim como em outros trabalhos (Santos, 2021; Miranda, 2020; Cardozo, 2017). Para *C. intermédia* encontrada na casca em duas amostras, sendo avaliada em outros estudos Nóbrega *et al.*, (2008) estando presente no fermento endógeno utilizado para fabricação do queijo Canastra. Assim como leveduras *Debaryomyces hansenii*, *Torulaspora delbrueckii* e *Kluyveromyces lactis*. Encontradas neste trabalho.

A espécie *T. coremiiforme*. *T. japonicum* identificada neste estudo em duas amostras na casca e no interior, sendo verificada por Aragão (2021); Sousa (2019), encontrou em QMA da Serra da Canastra e do Serro.

A levedura *T. japonicum* foi avaliada por Miranda (2020), demonstrando no estudo de isolados de fermento “rala” e “pingo” dos quais os isolados de levedura das duas amostras submetidas a diferentes análises dentre eles atividade de lipase e as espécies *Yarrowia lipolitica* e *T. japonicum* do fermento “rala” apresentaram atividade lipolítica e *Yarrowia lipolytica* do “pingo”. Sendo esta enzima de muita importância nos queijos já que hidrolisa os triglicerídeos em ácidos graxos e glicerídeos parciais tendo como resultado a formação de aroma sem danificar a textura (BERESFORD *et al.*, 2001).

Com relação a microbiota presente no interior os gêneros de leveduras diferentes da casca foram, *Trichosporon coremiiforme*, *Candida parapsilosis*, *Rhodotorula mucilagenosis*, *Candida lucitaniae*, observase maior diversidade de leveduras e segundo Furtado (2011), isso pode acontecer por diferentes processos como; a prensagem ou o tempo de maturação, tendo pH mais alto devido ao teor de lactose nos queijos. E neste estudo as amostras do interior tiveram um pH maior que na casca.

Quanto aos análise físico-químicos (pH, gordura, umidade, cinzas e proteína total) foram determinados neste trabalho segundo o Regulamentos Técnicos de Identidade e qualidade dos Produtos Láteos, Portaria nº 146, de 7 de março 1996 (BRASIL, 1996), como queijo de baixa umidade até 35,9% e dentre as seis amostras o queijo da fazenda três foi encontrado de baixa umidade com 29.43%. A amostras de média umidade entre 36,0 e 45,9%, foram encontradas (F1, F4, F5 e F6). Só a amostra da fazenda dois foi determinada como queijo de alta umidade entre 46,0 e 54%. Pesquisadores como Ide; Benedet (2001), a umidade em queijo tem relação ao forma o tempo de prensagem e quantidade o tipo de salga. Ter um controle da umidade e dos outros parâmetros é difícil já que os queijos são feitos da forma artesanal

(OLIVEIRA, 2013). Para o Regulamento Técnico de Identidade e qualidade dos Produtos Láteos, os queijos não inferiores a 55,0% de umidade são conhecidos como massa branda ou mole e de muita alta umidade, sendo sometidos ou não a tratamento térmico após fermentação (BRASIL, 1996).

O teor de gordura teve uma diferença significativa para todas as amostras. Foram classificadas como queijos gordos as amostras (F1, F2, F3 e F5) por seu conteúdo 45,0 e 59,9% de gordura no extrato seco (BRASIL, 1996), como queijo extra gordo a amostra F4 e semi-gordo a amostra F6. Estudo feito por Resende (2011), em queijo Minas Artesanal os teores de lipídios variam entre 27,0 e 29,5% e neste estudo foi diferente de 27 e 41%. De Oliveira (2013), analisou QMA em três microrregiões e obteve como resultado os teores de lipídeos para Serro de 28%, Cerrado 27,62% e na região da Canastra 28,0%.

Os percentuais médias de proteínas, de todas as amostras tem uma variação de 22,48 e 48,58%, todas amostras apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os percentuais médios de proteína, da casca e do interior. Resende (2011), encontrou valores médios de proteínas em queijo Minas Artesanal da Serra da Canastra de (23,50 e 24,42%). E segundo a portaria nº 146/1996 deve ser de 20% e 30% no percentual mínimo de proteína, neste estudo a amostra F4 e F6 não cumpriu com a normativa (BRASIL, 1996).

Em termos dos teores de cinzas nos queijos é de grande importância já que tem impacto significativo na textura (ROCHA, 2004). Neste estudo os resultados médias das seis amostras de queijo têm uma variação de 1,73 e 7,31%. Lempk (2013), seu estudo em queijo artesanal encontrou-se valores médios de cinzas em torno de 4,05%. Outro estudo por Silva (2007) na Serra da Canastra encontrou valores de 4,45%.

Nassu; Lima; Andrade (2009), em sua pesquisa demonstrou valores de pH acima de 6,0. Neste estudo não teve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) estatisticamente. Os valores vão de 5,59 e 6,26 para a casca e para o interior vão de 5,07 e 5,46 de pH, fazendo um relacionamento dos fungos e leveduras neste trabalho, a maior diversidade de fungos foi no interior demonstrando que o gênero de fungos que teve maior representação foi *C. clodospoide* e de leveduras *Kluyveromyces lactis*. Estudo realizado por Souza (2019) em suas amostras analisadas correspondientes ao pH e as leveduras e fungos encontrou-se susceptível fungos filamentosos *Aspergillus fumigatus*, *Cladosporium* e leveduras como *Candida zeylanoides*, *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis* e *Yarrowia lipolytica*. Um ponto a tomar em consideração é a prensagem no momento da fabricação já que a massa contém um considerável teor de lactose (RESENDE, 2011).

Diversos fatores tem uma interação importante nos queijos, como localização geográfica, umidade e acidez estes são os principais direcionadores das mudanças na dinâmica populacional (SANT'ANNA, 2019; OLIVEIRA, 2013).

#### 4. CONCLUSÃO

O resultado obtido neste trabalho demonstra a microbiota de fungos filamentosos e leveduras presentes nas amostras de Queijo Minas Artesanal avaliadas na Serra da Canastra, bem como os parâmetros físico-químicos.

Tal microbiota permitiu a segurança de consumir queijos já que a maior diversidade de leveduras e fungos são de grande importância para o consumidor, além de fornecer qualidades como, textura, sabor, entre outras.

A maior diversidade de leveduras no interior foi a espécie *Kluyveromyces lactis*, *Candida catenulata*, *T. coremiiforme*, *Candida parapsilosis* e *Candida intermedia*. E para fungos a maior identificação foi no interior *C. cladosporoides*, *Penicillium sp*, *Geotrichum Candidu* e *Fusarium solani*. Com o trabalho fornece informação para os produtores tomarem em consideração as melhoras, da mesma forma o conteúdo benéfico das leveduras e fungos em seus queijos.

Em geral os resultados indicam que a casca o interior do queijo tem composições químicas diferentes, a casca tende a ter um pH mais alto maiores níveis de proteína, cinza y lipídios, enquanto o interior do queijo mostra uma maior humidade; essas diferenças podem ser devidas a interações com o ambiente externo, as características próprias do queijo a denominação de origem.

#### REFERÊNCIAS

AOAC. Official methods of analysis of the Association Analytical Chemists. 18.ed. Gaithersburg, Maryland, 2006.

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.

ARAGÃO, M. *et al.* Fungal Community and Physicochemical Profiles of Ripened Cheeses. 2021.

BANJARA, N.; SUHR, M. J.; HALLEN-ADAMS, H. E. Diversity of yeast and mold species from a variety of cheese types. **Current microbiology**, v. 70, n. 6, p. 792-800, 2015.

BERESFORD, T. P. *et al.* Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal*, v.19, p.259-274, 2001.

BORELLI, B. M. *et al.* Yeast populations associated with the artisanal cheese produced in the region of Serra da Canastra, Brazil. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v.22, p.1115-1119, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Portaria nº 146, de 7 de março de 1996.** Brasília, 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006.** Brasília, DF, 2006.

BOUTROU, R; GUÉGUEN, M. Interests in *Geotrichum candidum* for cheese technology. **International journal of food microbiology**, v. 102, n. 1, p. 1-20, 2005.

CARVALHO, B. F. *et al.* Fermentation profile and identification of lactic acid bacteria and yeasts of rehydrated corn kernel silage. **Journal of Applied Microbiology**, v. 122, n. 3, p. 589-600, 2017.

CRUVINEL, L. A.; MELO, S. N.; LACORTE, G. A. Uso de ferramentas genéticas na identificação das comunidades bacterianas de queijos artesanais: uma revisão sistemática da literatura. **ForScience**, v. 5, n. 2, 2017.

COSTA, H. H. S. *et al.* Potencial probiótico in vitro de bactérias ácido-láticas isoladas de queijo-de-minas artesanal da Serra da Canastra, MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 6, p. 1858-1866, 2013.

DEMIREL, R. *et al.* Microfungi in cultivated fields in Eskişehir province (Turkey). **Journal of Basic Microbiology: An International Journal on Biochemistry, Physiology, Genetics, Morphology, and Ecology of Microorganisms**, v. 45, n. 4, p. 279-293, 2005.

DIAS, G. *et al.* Influência do uso de cultura adjunta nas características físico-químicas e sensoriais do queijo tipo Camembert. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 3, p. 500-506, 2012.

EMPRESA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL DO ESTADO DE MINAS GERAIS - EMATER. **Dispõe sobre o reconhecimento mais uma região produtora do Queijo Minas Artesanal.** 2022. Disponível em: < [www.emater.mg.gov.br/portal.do/site-noticias/minas-gerais-podera-reconhecer-mais-uma-regiao-produtora-do-queijo-minas-artesanal-/?flagweb=novosite\\_pagina\\_interna\\_noticia&id=25910](http://www.emater.mg.gov.br/portal.do/site-noticias/minas-gerais-podera-reconhecer-mais-uma-regiao-produtora-do-queijo-minas-artesanal-/?flagweb=novosite_pagina_interna_noticia&id=25910) > Acesso em 11 de março de 2022.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. *Ciência e agrotecnologia*, v. 38, n. 2, p. 109-112, 2014.

FURTADO, M. M. Principais defeitos dos queijos duros. *Queijos Duros*, p. 168-169, 2011.

- IDE, L. P. A; BENEDET, H. Contribuição ao conhecimento do queijo colonial produzido na região serrana do estado de Santa Catarina, Brasil. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 25, n. 6, p. 1351-1358, 2001.
- 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. **J. Food Microbiol.**, v. 89, 103453, 2020.
- KAMIMURA, B. A. *et al.* Large-scale mapping of microbial diversity in artisanal Brazilian cheeses. **J. Food Microbiol.**, v. 80, p. 40 - 49, 2019.
- KATILI, Luciana Morita; BONASSI, Ismael Antonio; ROÇA, Roberto de Oliveira. Aspectos físico-químicos e microbianos do queijo maturado por mofo obtido da coagulação mista com leite de cabra congelado e coalhada congelada. **Food Science and Technology**, v. 26, p. 740-743, 2006.
- KLICH, M. A. Identification of common *Aspergillus* species. Utrecht: CBS, 2002. 116 p.
- LANDELL, M.F.; HARTFELDER, C.; VALENTE, P. Identificação e perfil enzimático de leveduras isoladas de queijo artesanal no sul do Brasil. **Acta Sci. Vet.**, v.34, p.49-55, 2006.
- 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, N; SANTOS, C. MALDI-TOF MS for identification of food spoilage filamentous fungi. **Current Opinion in Food Science**, v. 13, p. 26-30, 2017.
- LEMPK, M.W. **Caracterização físico-química, microbiológica e tecnológica do queijo artesanal da microrregião de Montes Claros – MG**, 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2013.
- MARTÍN, J.F; COTON, M. (2016). Queijo azul: Microbiota e metabólitos fúngicos. Em J. Frias, C. Martínez-Villaluenga & E. Peñas (Eds.), Alimentos fermentados na saúde e prevenção de doenças (Indivíduo. 12, págs. 275-303). Amsterdã: Elsevier.
- MIRANDA, N. M. Z. **Caracterização probiótica de leveduras isoladas de queijo Minas artesanal**. 2020. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2020.
- MONTEL, M. C. *et al.* Traditional cheeses: rich and diverse microbiota with associated 106 benefits. **International journal of food microbiology**, v. 177, p. 136-154, 2014.
- NASSU, R. T; LIMA, J. R; ANDRADE, A. S. A. Caracterização físico-química e análise sensorial de queijo de manteiga produzido no Rio Grande do Norte. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 40, n. 1, p. 54-59, 2009.
- 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, D. F. *et al.* Caracterização físico-química de queijos Minas Artesanal produzidos em diferentes microrregiões de Minas Gerais. **Oikos: Família e Sociedade em Debate**, v. 24, n. 2, p. 185-196, 2013.

OLIVEIRA, F. C. Produção de lipase por *Penicillium roqueforti* e sua aplicação na obtenção de aroma de queijo. 2010. 124 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/SP, 2010.

OLIVEIRA, L. **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), Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2014

OLIVEIRA, M. M. E. *et al.* Development and optimization of a new MALDI-TOF protocol for identification of the *Sporothrix* species complex. *Research in microbiology*, v. 166, n. 2, p. 102-110, 2015.

PEREIRA, M. N. *et al.* Microbiota do Queijo Artesanal Serrano produzido em Santa Catarina, Brasil. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 18, n. 4, p. 536-542, 2019.

ROCHA, A. M. P. **Controle de fungos durante a maturação de queijo Minas Padrão.** 2004. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul. 2004.

PADILHA, M. **Queijo petit-suisse probiótico e simbiótico: características tecnológicas e emprego de técnicas dependentes e independentes de cultivo na avaliação da sobrevivência dos probióticos no produto e em ensaios de sobrevivência in vitro.** 2013. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímico- Farmacêutica). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

PITT, J.I. A laboratory guide to common *Penicillium* species. Sydney. Food Science Australia, 187 p. 2000.

POTTIER, I. *et al.* Safety assessment of dairy microorganisms: *Geotrichum candidum*. **International journal of food microbiology**, v. 126, n. 3, p. 327-332, 2008.

RESENDE, M. F. S. *et al.* Queijo de minas artesanal da Serra da Canastra: influência da altitude das queijarias nas populações de bactérias acidoláticas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 6, p. 1567-1573, 2011.

RIBEIRO, E. S. *et al.* Ocorrência de fungos filamentosos isolados de queijo azul maturado. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 23, 2020.

ROCHA, A. M. P. **Controle de fungos durante a maturação do Queijo Minas Padrão.** Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2004.

SALVADOR, M. *et al.* Avaliação da qualidade microbiológica de queijo prato e parmesão ralado. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, v. 19, n. 1, 2001.

SANSOM, A. *et al.* Introduction to food-bourne fungi. Centraalbureau voor schimmel cultures. Baarn and Delft. 4th ed. 2000.

SILVA, J. G. **Características físicas, físico-químicas e sensoriais do queijo Minas artesanal da Canastra.** 2007. Tese. Dissertação (Ciências dos alimentos) – Universidade Federal de Lavras, UFLA.

SOUZA, T. P. **Microbiota terroir em Queijo Minas Artesanal da microrregião do Serro: segurança e qualidade.** 2019. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2019.

TOGAY, O. S. *et al.* Molecular characterization of yeasts isolated from traditional Turkish cheeses. **Food Science and Technology**, v. 40, p. 871-876, 2020.