



MIRIAM APARECIDA DE AGUILAR SANTOS

**CHARACTERIZATION OF ARTISANAL MINAS CHEESE
PRODUCED IN THE REGION OF SERRA DA CANASTRA:
FUNGAL DIVERSITY AND VOLATILE COMPOUNDS PROFILE**

**LAVRAS-MG
2021**

MIRIAM APARECIDA DE AGUILAR SANTOS

**CHARACTERIZATION OF ARTISANAL MINAS CHEESE PRODUCED IN THE
REGION OF SERRA DA CANASTRA: FUNGAL DIVERSITY AND VOLATILE
COMPOUNDS PROFILE**

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

Prof. Dr. Luís Roberto Batista
Orientador
Dra. Suzana Reis Evangelista
Coorientadora

**LAVRAS-MG
2021**

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

Santos, Miriam Aparecida de Aguiar.

Characterization of Artisanal Minas Cheese produced in the
region of Serra da Canastra : fungal diversity and volatile
compounds profile / Miriam Aparecida de Aguiar Santos. - 2021.
74 p. : il.

Orientador(a): Luís Roberto Batista.

Coorientador(a): Suzana Reis Evangelista.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2021.

Bibliografia.

1. Micobiota. 2. Casca florida. 3. Maturação. I. Batista, Luís
Roberto. II. Evangelista, Suzana Reis. III. Título.

MIRIAM APARECIDA DE AGUILAR SANTOS

**CHARACTERIZATION OF ARTISANAL MINAS CHEESE PRODUCED IN THE
REGION OF SERRA DA CANASTRA: FUNGAL DIVERSITY AND VOLATILE
COMPOUNDS PROFILE**

**CARACTERIZAÇÃO DE QUEIJOS MINAS ARTESANAIS PRODUZIDOS NA
REGIÃO DA SERRA DA CANASTRA: DIVERSIDADE FÚNGICA E PERFIL DE
COMPOSTOS VOLÁTEIS**

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

APROVADA em 30 de julho de 2021.
Dr. Cleube Andrade Boari UFVJM
Dr. Luiz Ronaldo de Abreu UFLA

Prof. Dr. Luís Roberto Batista
Orientador
Dra. Suzana Reis Evangelista
Coorientadora

**LAVRAS-MG
2021**

AGRADECIMENTOS

Quando paramos para pensar em tudo que Deus faz por nós fica impossível não sermos gratos. Por isso, agradeço em primeiro lugar a Ele, que está presente em todos os momentos da minha vida, proporcionando-me sabedoria, coragem e força nos momentos difíceis. “Tu és o meu Deus, graças te darei!” (Salmos 118:28-19).

Ao meu orientador Prof. Dr. Luís Roberto Batista, por todos os ensinamentos, pela orientação, amizade e confiança prestados durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

À minha coorientadora Dra. Suzana Reis, por toda a dedicação, atenção, ensinamento e apoio que serviram como pilares para a elaboração deste trabalho.

Ao professor Luiz Ronaldo de Abreu, por ser prestativo em todas as vezes que precisei.

Às laboratoristas Creusa, Pâmela e Cidinha, por todo o apoio técnico.

À Lidiany e Débora, por toda a ajuda na análise de cromatografia gasosa.

Ao meu companheiro Mateus, meu eterno agradecimento por caminhar ao meu lado e por me compreender e incentivar em todos os momentos e dificuldades.

Ao meu filho Miguel, que ainda não tem idade para entender o que é uma dissertação, agradeço por ser meu maior motivo de felicidade.

Aos meus colegas de curso, pela convivência.

A toda minha família, pelo apoio e incentivo, em especial aos meus pais Cida e Dimas e aos meus irmãos Ana Clara e Emanuel.

A todos os meus amigos do Laboratório de Micologia e Micotoxinas em Alimentos, em especial ao Luciano, Bruna, João Pedro, Nathasha, Fernanda, Thalissa, Michele, Mauro e Fabiana, por todo o apoio, não só na realização do projeto, mas nos momentos que a vida nos proporcionou.

À CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

À APROCAN e aos produtores que permitiram a coleta das amostras.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Ciências dos Alimentos, pela oportunidade concedida para a realização deste projeto de pesquisa.

Enfim, a todos que estiveram do meu lado e, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

*“Só se vê bem com o coração,
o essencial é invisível aos olhos.”*

Antoine de Saint-Exupéry

RESUMO

O Queijo Minas Artesanal é um produto tradicional de diversas regiões do estado de Minas Gerais, Brasil. Dentre as regiões oficialmente reconhecidas, a da Serra da Canastra recebe destaque devido à popularidade, cuja produção é regulamentada para o uso da Indicação de Procedência (IP) “Canastra”. Nos Queijos Minas Artesanais as condições ambientais da região de produção, tais como taxa de precipitação, temperatura e umidade afetam a comunidade microbiológica, gerando influências na segurança, na singularidade do produto, na qualidade e nos fatores nutricionais. Assim, a microbiota *terroir* presente em uma região específica influencia diretamente nas características do produto. Há poucas informações na literatura sobre esse queijo, sendo que o valor cultural, a importância econômica e o aumento da visibilidade internacional justificam esse produto como um importante objeto de pesquisa. O objetivo deste estudo foi caracterizar a diversidade fúngica e o perfil de compostos voláteis presentes nesse queijo protegido com Indicação de Origem. A comunidade fúngica das amostras foi investigada com abordagens dependentes de cultivo (cultivo, identificação morfológica e MALDI-TOF). O método de espectrometria de massas por microextração em fase sólida por cromatografia gasosa (SPME-GC) foi aplicado para determinar as características dos compostos voláteis presentes nos queijos. Uma complexa composição fúngica e de compostos voláteis foi observada nas amostras de queijo Canastra. As análises de diversidade fúngica revelaram a presença de 37 espécies diferentes de leveduras e bolores. Foi possível identificar *Fusarium sp.*, *Cladosporium cladosporioides* (complex), *Acremonium sp.*, *Trichotecium sp.*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus niger* e *Penicillium glabrum* em todas as amostras. No entanto, cada amostra demonstrou uma composição única de diversidade de fungos, uma vez que *Candida catenulata*, *Geotrichum candidum* e *Aspergillus versicolor* foram as principais espécies na amostra P1, P2 e P3, respectivamente. Um total de 66 compostos foram detectados: 15 ácidos, 12 álcoois, 23 ésteres, 9 cetonas, 3 aldeídos e 4 compostos diversos que não puderam ser classificados nesses grupos. Os ácidos foram o grupo mais importante identificado, sendo o ácido hexanoico, o ácido octanoico e o ácido decanoico os mais abundantes. Os ácidos graxos presentes nos queijos maturados contribuem para a formação do aroma e sabor em queijos, por suas propriedades aromáticas ou por serem precursores de álcoois, ésteres, cetonas e outros compostos. Nossos resultados mostram, portanto, que estudos futuros devem verificar a contribuição exata de cada fungo no perfil de compostos voláteis do queijo Minas artesanal.

Palavras-chave: Micobiota. Maturação. Casca florida. Microextração em fase sólida.

ABSTRACT

Artisanal Minas Cheese is a traditional cheese produced in several regions of the state of Minas Gerais, Brazil. This type of cheese is developed in a simple way though techniques introduced by Portuguese settlers and it constitutes one of the main economic activities of several families that rely on family agriculture. In the state of Minas Gerais, seven regions are registered in the Artisanal Minas Cheese Program. Among them, Serra da Canastra is highlighted due to the popularization of its cheeses, which are regulated for the use of the Indication of Origin (IP) "Canastra". In artisanal Minas cheese, the environmental conditions of region such as precipitation rate, temperature and humidity affect the microbiological community, generating influences on safety, singularity, quality and nutritional factors. Thus, the terroir microbiota present in a specific region direct the characteristics of the product. There is little scientific information about this cheese, and the culture value, the economy importance and the increased of international visibility justify this product as an important object of research. The aim of this study was to characterize the fungal diversity and the volatile compounds profile present in this protected Indication of Origin cheese. The fungal community of the samples were investigated by culture-dependent approaches (culturing, morphological identification and MALDI-TOF). Moreover, the method of solid-phase micro-extraction gas chromatography mass spectrometry (SPME-GC) was applied to determinate the characteristics volatile compounds of this cheese. Complex fungal diversity and volatile compound profile was observed. The fungal diversity analyses revealed the presence of 37 different species of yeasts and molds. It was able to identify *Fusarium* sp., *Cladosporium cladosporioides* (complex), *Acremonium* sp., *Trichotecium* sp., *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus niger* and *Penicillium glabrum* in all samples. However, each sample demonstrated a unique fungal diversity composition, as *Candida catenulata*, *Geotrichum candidum* and *Aspergillus versicolor* were the major species in the sample P1, P2 and P3, respectively. A total of 66 compounds were detected: 15 acids, 12 alcohols, 23 esters, 9 ketones, 3 aldehydes, and 4 miscellaneous compounds which could not be classified in these groups. The acids were the most important group identified, with hexanoic acid, octanoic acid and decanoic acid being the most abundant. The fatty acids present in matured cheese contribute to cheese aroma, by their aromatic properties or being precursors of alcohols, esters, ketones, and others compounds. Our results therefore show that future studies should verify the exact contribution of each fungus to the volatile compound profile on Canastra cheese.

Keywords: Mycobiota. Ripening. Bloomy rind. Solid phase microextraction.

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

Figura 1 - Mapa da região da Canastra produtora de Queijo Minas Artesanal.	16
Figura 2 - Fluxograma do processo de fabricação do QMA.	18
Figura 3 - Esquema do equipamento utilizado na técnica de MALDI-TOF.	23
Figura 4 - Vias metabólicas envolvidas na maturação de queijos: (a) proteólise, (b) lipólise e (c) metabolismo da lactose, lactato e citrato.	24

SEGUNDA PARTE

ARTIGO 1

Figure 1 - A schematic diagram of the process for gathering the samples for analysis.	39
Figure 2 - Relative abundance of fungal population present in cheese samples culture using the media DRBC.	45
Figure 3 - Relative abundance of fungal population present in cheese samples culture using the media DG18.	46
Figure 4 - Principal component analysis: (A) the volatile compounds and (B) the fungal diversity of P1, P2 and P3 samples of Artisanal Minas Cheese.	63

LISTA DE TABELAS

SEGUNDA PARTE

ARTIGO 1

Table 1 - Physicochemical composition and fungal population of P1, P2 and P3 samples from artisanal Minas cheese from the Canastra region.....	42
Table 2 - Odor description and relative content of the identified volatiles in Minas artisanal Canastra cheese.....	54
Table 3 - Identified fungi in Canastra cheese and their volatile compound contribution	61

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	11
1	INTRODUÇÃO.....	11
2	REFERÊNCIAL TEÓRICO	14
2.1	Produção de queijos artesanais em Minas Gerais	14
2.2	Produção de queijos na Serra da Canastra.....	15
2.3	Definição de <i>Terroir</i>	18
2.3.1	Diversidade microbiológica em QMA.....	19
2.4	Métodos de avaliação da diversidade microbiana em queijos.....	21
2.4.1	Métodos dependentes de cultura	21
2.4.1.1	Identificação da micobiota pelo método MALDI-TOF MS.....	22
2.5	Compostos orgânicos presentes em queijos maturados	23
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	25
	REFERÊNCIAS.....	27
	SEGUNDA PARTE - ARTIGO.....	32
	ARTIGO 1 - Characterization of artisanal Minas cheese produced in the region of Serra da Canastra: fungal diversity and volatile compounds profile 1-Butanol, 3-methyl-, acetate	55

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

O Queijo Minas Artesanal (QMA) é um produto originado no estado de Minas Gerais, Brasil, sendo produzido de forma tradicional a partir do leite cru de vaca, coalho comercial e cultura iniciadora (pingo). Após a produção, o queijo passa por um processo de maturação sob condições ambientais naturais, fazendo com que este produto apresente atributos únicos e características sensoriais desejáveis pelos consumidores (PERIN *et al.*, 2017).

Dentre as regiões produtoras de QMA, a Serra da Canastra recebe atenção e grande popularidade para seus queijos, com mais de dois séculos de produção. Em decorrência das propriedades apresentadas pelos QMA produzidos na região da Serra da Canastra, estes foram regulamentados para o uso da Indicação de Procedência “Canastra” em queijos produzidos em sete municípios da região (APROCAN, 2011). Além da Indicação de Procedência, os queijos produzidos pelos produtores certificados são comercializados com a marca coletiva “Região do queijo da Canastra”, registrada pela Associação dos Produtores de Queijo Canastra (APROCAN).

O processo produtivo do QMA foi introduzido no Brasil pelos portugueses durante o período colonial, porém foi adaptado para a realidade encontrada no Brasil. As etapas de produção são simples e essa atividade é a principal fonte de renda de várias famílias, agregando a este produto alto valor econômico, social e cultural (BORELLI *et al.*, 2006).

Intencionalmente ou não, a produção de queijo é um processo que envolve uma grande comunidade microbiológica. Ao longo da produção, várias são as etapas que envolvem a transformação do leite até o queijo e todas essas etapas atuam como vetores potenciais para o desenvolvimento de microrganismos. Enzimas microbianas presentes no leite são responsáveis pela geração de diversos compostos que ocorrem durante a produção do queijo e no período de maturação (PENLAND *et al.*, 2021). Além disso, as transformações na composição físico-química causam a susceptibilidade à colonização por microrganismos ambientais (BOKULICH; MILLS, 2013).

As características apresentadas pelos QMA são desenvolvidas principalmente na etapa de maturação, quando é possível observar a morte da cultura iniciadora e o desenvolvimento da microbiota secundária formada principalmente por leveduras e fungos filamentosos. Os microrganismos que se desenvolvem nessa etapa são responsáveis por reações do tipo glicólise, lipólise e principalmente a proteólise, com a liberação de compostos, tais como ácidos graxos,

álcoois, cetonas e ésteres. Estes e outros compostos são responsáveis pelo desenvolvimento das características desejáveis em queijos maturados (PAGTHINATHAN; NAFEES, 2015; PENLAND *et al.*, 2021).

A composição da microbiota dos alimentos está intimamente relacionada com as condições ambientais (precipitação, umidade e temperatura), região de produção, as matérias-primas utilizadas e os processos de fabricação. Dessa maneira, o termo “microbiota *terroir*” define a relação única entre a comunidade microbiana e as características de um determinado produto alimentício (RYCHLIK *et al.*, 2017). Observa-se a necessidade de estudos voltados para essa área, uma vez que são poucos os dados sobre as comunidades microbianas presentes em queijos, principalmente dados relacionados à diversidade fúngica.

O odor, o sabor e a textura são os principais critérios na escolha e aceitabilidade de queijos, sendo os dois primeiros influenciados sobretudo pela composição dos compostos orgânicos voláteis presentes nos queijos e são desenvolvidos durante a etapa de maturação, quando há a interação da microbiota presente nos queijos com a matriz alimentar (DRAKE; DELAHUNTY, 2017). O perfil dos compostos orgânicos voláteis em queijos maturados é determinado pelas proteínas, gorduras, lactose e enzimas encontradas no leite, além do desenvolvimento de microrganismos e processos bioquímicos que ocorrem durante o tempo de maturação, como glicólise, lipólise e proteólise (NI *et al.*, 2020).

É possível encontrar uma grande variedade de fungos presentes em queijos. Diversos estudos relataram a presença de fungos filamentosos e leveduras em queijos maturados em todo o mundo (ANDRADE *et al.*, 2017; KIRTIL; METIN; ARICI, 2021; PENLAND *et al.*, 2021; SOUZA *et al.*, 2021). Em trabalho realizado com queijos maturados do Serro, os autores empregaram técnicas de plaqueamento e MALDI-TOF para a avaliação da comunidade fúngica presente nas amostras. Entre as espécies identificadas, destacam-se *Debaryomyces hansenii*, *Yarrowia lipolytica*, *Candida zeylanoides*, *Kluyveromyces lactis*, *Cladosporium cladosporioides* (complex), *Penicillium roqueforti* e *Geotrichum candidum* (SOUZA *et al.*, 2021).

O cenário do QMA no Brasil é incerto, principalmente para os queijos maturados com a presença de fungos, também conhecidos como “queijos de casca florida” ou “queijos mofados”. Atualmente, os produtores enfrentam a falta de uma legislação sólida que regulamente o setor de queijos de casca florida, fazendo com que a produção e comércio desses aconteçam na informalidade.

Diante do exposto, os objetivos neste estudo foram:

- a) Obter o conhecimento sobre os fungos filamentosos e leveduras presentes em amostras de Queijo Minas Artesanal da Serra da Canastra-MG;
- b) Avaliar as características físico-químicas e o perfil de compostos voláteis do Queijo Minas Artesanal maturado produzido na região da Serra da Canastra-MG;
- c) Correlacionar as características encontradas, afim de traçar um possível *terroir* do produto;
- d) Depositar os microrganismos isolados e identificados na Coleção de Cultura de Microrganismos do Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras (CCDCA – UFLA), expandindo assim o acervo existente e disponibilizando os isolados para estudos futuros.

2 REFERÊNCIAL TEÓRICO

2.1 Produção de queijos artesanais em Minas Gerais

O queijo é um alimento mundialmente consumido há muitos anos. Indícios obtidos a partir de utensílios apontam que a produção desse produto é datada entre cerca de 5.200 e 4.900-4.800 a.C. (SALQUE *et al.*, 2013). A produção da maioria dos queijos é simples e requer componentes básicos: leite, coalho, sal e microrganismos. Entretanto, além das diversas maneiras que os ingredientes podem ser empregados, as mudanças nas etapas de processamento e diversidade ambiental colaboram para a produção de características únicas que distinguem o produto de região para região. Dessa forma, pode-se encontrar mais de 1000 variedades de queijos com sabores e formas diferentes (JANY; BARBIER, 2008).

O Brasil apresenta uma enorme variedade de queijos artesanais, que se diferenciam pelos aspectos sociais e culturais que influenciam os métodos tradicionais de desenvolvimento. Esses queijos exibem características típicas e únicas, tais como textura e sabor; como consequência da origem, composição das culturas iniciadoras, matérias-primas e condições de maturação (KAMIMURA *et al.*, 2019). Nesse cenário, o estado de Minas Gerais se destaca pela quantidade, variedade e qualidade dos queijos produzidos, com ênfase no Queijo Minas Artesanal. Este tipo de queijo resistiu aos processos modernos de produção, uma vez que é produzido e comercializado principalmente por pequenos produtores inseridos no agronegócio familiar. Além disso, no ano de 2008 o Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional (IPHAN) conferiu ao “Modo artesanal de fazer queijo nas regiões do Serro, da Serra da Canastra e Salitre/Alto do Paranaíba” o título de Patrimônio Cultural do Brasil, inserindo-o no Livro dos Saberes e aumentando ainda mais a tradição relacionada a esse alimento (IPHAN, 2008).

A Portaria nº 1.969 de 26 de março de 2020, do IMA, que dispõe sobre a produção de Queijo Minas Artesanal (IMA, 2020), define-os como:

Considera-se como Queijo Minas Artesanal o queijo elaborado a partir do leite cru, hígido, integral, de produção própria, com utilização de soro fermento (pingo), e que o produto final apresente consistência firme, cor e sabor próprios, massa uniforme, isenta de corantes e conservantes, com ou sem olhaduras mecânicas, e que satisfaça os seguintes requisitos:

- I – processo com o início em até noventa minutos após o começo da ordenha;
- II – fabricação com leite que não tenha sofrido tratamento térmico;
- III – utilização como ingredientes de culturas lácticas naturais, como pingo, soro fermentado ou soro-fermento, coalho e sal;

IV – maturação, conforme o período estipulado para as microrregiões que possuam pesquisas científicas ou, na sua ausência, pelo maior período determinado por meio dos estudos científicos.

Em Minas Gerais, a Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Minas Gerais (EMATER) em parceria com o Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) executam o Programa Queijo Minas Artesanal. O programa tem o intuito de assegurar a segurança alimentar, a partir da implantação de boas práticas de fabricação e controle sanitário do rebanho, impulsionar e organizar os produtores, além de definir a cadeia produtiva.

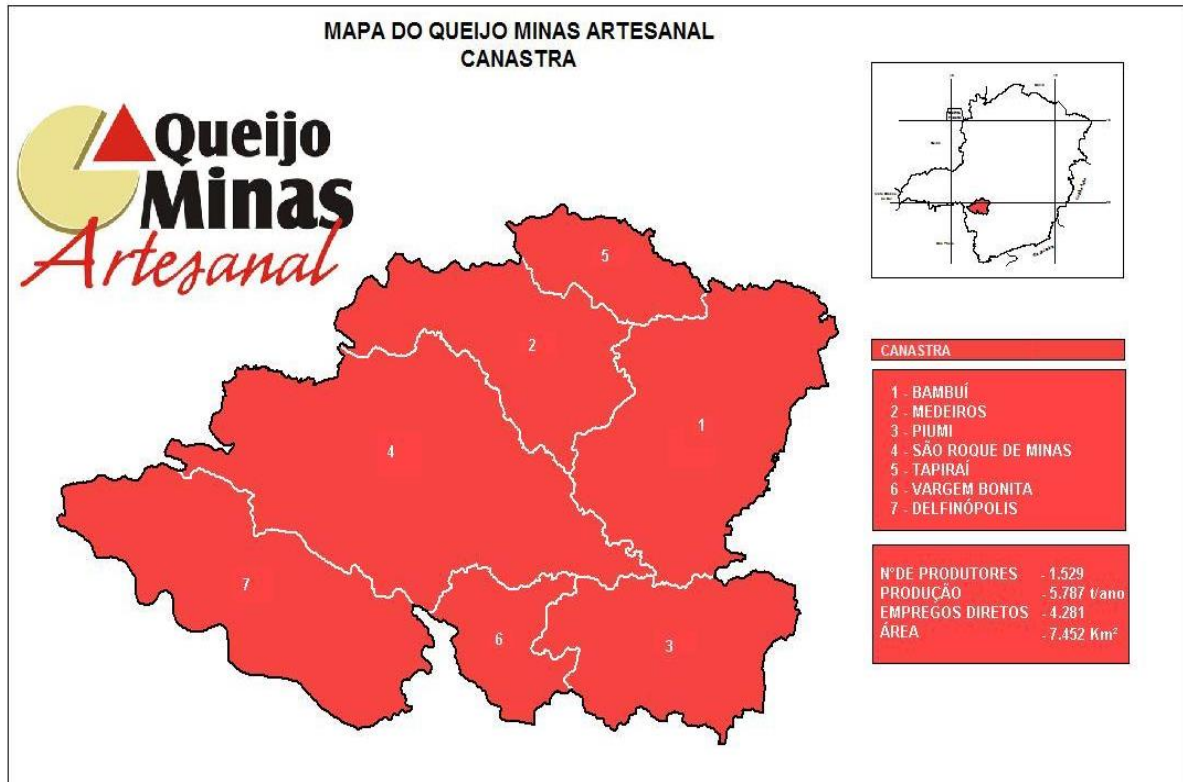
2.2 Produção de queijos na Serra da Canastra

Situada no estado de Minas Gerais, a região da Canastra abriga o Parque Nacional da Serra da Canastra, sendo este criado pelo Decreto nº 70.355, de 3 de abril de 1972 e, desde então, administrado pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio). O parque abrange municípios como Vargem Bonita, São Roque de Minas, São João Batista do Glória, Sacramento, Delfinópolis e Capitólio (BRASIL, 1972; IPHAN, 2019).

A região da Canastra é localizada no sudoeste do estado de Minas Gerais (20°20'S-46°40'W), apresenta o Cerrado como bioma predominante, possui planaltos de 800 a 1500 m de altura e precipitação anual de 1300 a 1700 mm. Além disso, a região possui clima subtropical de altitude, com inverno seco e frio de abril a setembro (média de temperatura de 17°C) e verão quente e úmido de outubro a março (média de temperatura de 22°C) (SZABÓ *et al.*, 2018).

Devido às suas particularidades relacionadas com o clima, vegetação nativa e modo de produção, o queijo produzido nessa região apresenta características exclusivas. Em consequência destas características e a popularidade do produto, regulamentou-se então o uso da Indicação de Procedência (IP) “Canastra” para o Queijo Minas Artesanal produzido em sete municípios da Serra da Canastra, sendo estes Bambuí, Medeiros, Piumhi, São Roque de Minas, Tapiraí, Vargem Bonita e Delfinópolis, apresentados na Figura 1 (APROCAN, 2011).

Figura 1 - Mapa da região da Canastra produtora de Queijo Minas Artesanal.



Fonte: (EMATER, 2019).

O Queijo Minas Artesanal da Canastra é produzido de forma tradicional por mais de 200 anos, uma vez que a forma de produção foi introduzida pelos imigrantes portugueses no final do século XVIII e adaptada para as condições da região. Além disso, a produção do Queijo Canastra configura a principal atividade econômica de várias famílias da região, o que faz deste produto uma herança cultural passada de geração para geração com alto valor social e cultural associados (BORELLI *et al.*, 2006).

O Queijo Canastra é produzido a partir do leite cru de vaca inoculado com o coalho comercial e “pingo”. O pingo consiste em uma cultura iniciadora obtida a partir do soro adquirido na produção anterior de queijo e constituída principalmente de bactérias do ácido láctico e leveduras. Após a produção, o queijo é maturado sob condições ambientais naturais, onde ocorre o desenvolvimento de características sensoriais desejáveis. A Portaria nº 1.736 de 27 de julho de 2017 define o período de maturação do queijo Minas Artesanal como no mínimo de 22 dias para a microrregião da Canastra (IMA, 2017). Assim, o produto final apresenta atributos únicos que despertam o interesse dos consumidores, como sabor considerado denso e encorpado (ANDRADE *et al.*, 2017; PERIN *et al.*, 2017).

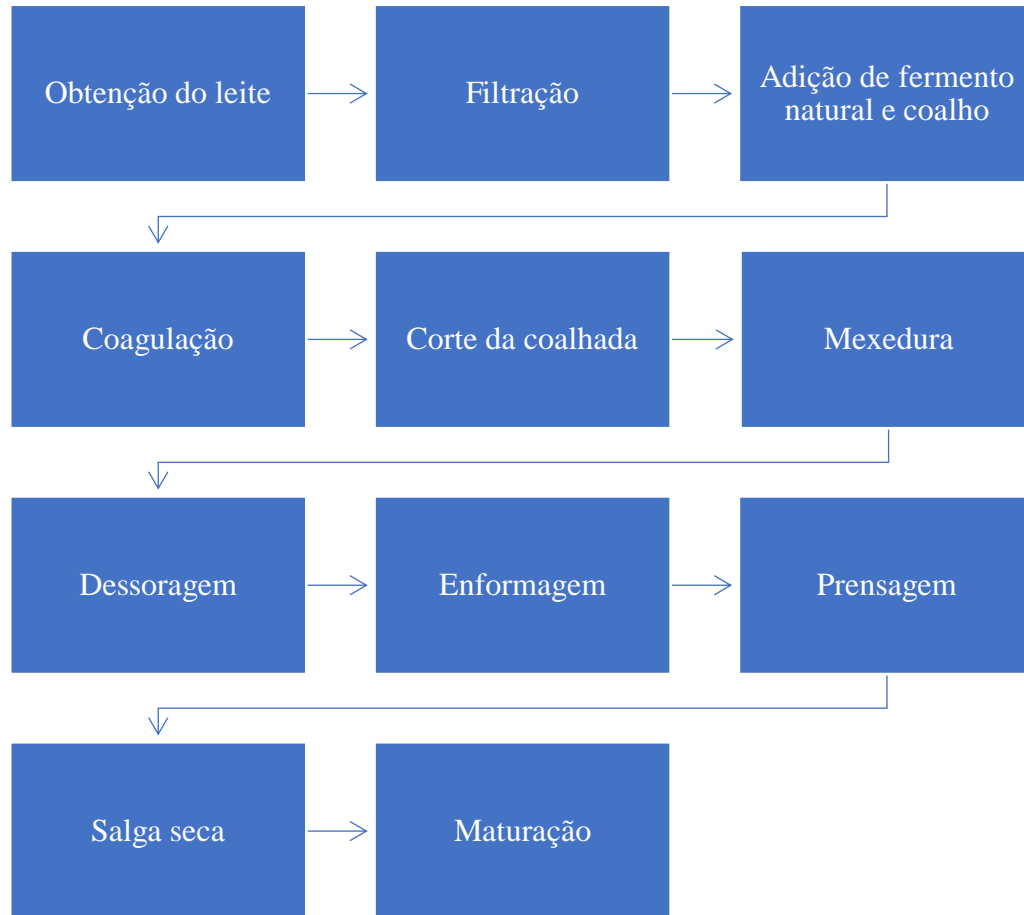
Atualmente, observa-se uma diversificação no modo de produção dos queijos artesanais com a inserção de diversos novos produtos no mercado. No Brasil, os queijos mofados, também conhecidos como queijos de casca florida (*bloomy rind*), estão tornando tendência e despertando o interesse dos produtores e consumidores. A etapa de maturação prolongada, associada a diversos fatores de produção, permite o crescimento de fungos ao longo da casca dos queijos. Esses fungos são responsáveis por alterações visuais, de textura, odor e sabor nos produtos, gerando um produto que possui características peculiares para uma parte dos consumidores brasileiros, mas que são largamente apreciadas no território europeu.

As etapas de produção do Queijo Canastra são simples e sustentam a tradição deste produto. Apesar de incluírem etapas similares, cada variedade de queijo possui características sensoriais diferentes que são influenciadas por alterações nas fases de produção e principalmente pela diversidade da comunidade microbiana local, sendo esta o resultado das características ambientais de cada região (PERIN *et al.*, 2017).

De acordo com IPHAN (2014), o Queijo Minas Artesanal (QMA) ainda é fabricado conforme a tradição, entretanto algumas melhorias foram implantadas no intuito de adequar o modo de produção às condições higiênico-sanitárias adequadas. Um exemplo são as formas de madeira que foram, ao longo dos anos, substituídas por formas de plástico, uma vez que a higienização completa da madeira é impossível. Entretanto, alguns atos ainda são resistentes à mudança, pois em algumas propriedades ainda é possível encontrar bancas queijeiras de madeira.

De acordo com a Portaria IMA nº 1.969 de 26 de março de 2020, o processo de fabricação do QMA adota as etapas apresentadas na Figura 2 (IMA, 2020).

Figura 2 - Fluxograma do processo de fabricação do QMA.



Fonte: IMA (2020).

2.3 Definição de *Terroir*

Terroir é um termo que eclodiu na França a partir de movimentos sociopolíticos que tinham como objetivo proteger os produtos tradicionais da agricultura francesa de interesses internos e externos (DEMOSSIER, 2011). Esse termo é embasado na ideia que as características de uma determinada região são responsáveis por atributos únicos e específicos de certos produtos, especialmente produtos alimentícios artesanais. Deste modo, o termo *terroir* também vincula um produto a uma região e às tradições locais de uma comunidade (TURBES *et al.*, 2016).

Baseado no conceito do termo *terroir*, a União Europeia (UE) estabeleceu a Denominação de Origem Protegida (DOP), que é responsável por promover e proteger a designação de produtos agrícolas (ex.: Champagne, Camembert, Parmigiano-Reggiano). O DOP são indicações geográficas protegidas precisas que garantem que um produto é oriundo de uma região delimitada e que seus atributos estão relacionados a esse local de origem,

pertinente a características ambientais naturais, ao modo de produção e a tradição das pessoas que habitam essa região (CLIMENT-LÓPEZ; ESTEBAN-RODRÍGUEZ, 2018; TURBES *et al.*, 2016).

Os produtos lácteos, principalmente os queijos, assumem uma relação complexa com a área em que são produzidos. Diferentes condições climáticas, variedades de solo, raças bovinas e vegetações utilizadas na alimentação dos bovinos influenciam a composição química do leite e, como consequência, resulta na qualidade dos queijos. Além disso, as condições ambientais colaboram com o desenvolvimento da comunidade microbiológica nativa, que afeta diretamente o produto final.

Os alimentos fermentados são considerados as formas mais antigas de biotecnologia e historicamente estão baseados na ocorrência natural de microrganismos na matriz dos alimentos. A comunidade microbiana contribui para um cenário complexo nos alimentos, uma vez que a presença de uma microbiota específica influencia na segurança, qualidade, fatores nutricionais e na singularidade do produto final. Dessa forma, o termo “microbiota *terroir*” surge a partir da necessidade de explicar a profunda relação entre a comunidade microbiana nativa e as características de um determinado produto alimentício (CAPOZZI; SPANO, 2011; FELDER; BURNS; CHANG, 2012).

Diferentes estudos avaliaram a biodiversidade microbiológica nativa de alimentos fermentados com a intenção de determinar a presença de padrões microbiológicos (BOKULICH *et al.*, 2016). Knight *et al.* (2015) realizaram análises químicas de vinhos produzidos com Sauvignon Blanc a partir de linhagens regional e geneticamente diferenciadas de *Saccharomyces cerevisiae* de seis regiões vinícolas da Nova Zelândia. Baseado nesse estudo, foi possível demonstrar que as diferentes linhagens produziram compostos metabólicos distintos, evidenciando pela primeira vez a relação direta entre a microbiota regional e as características de um vinho pronto para o consumo (KNIGHT *et al.*, 2015).

2.3.1 Diversidade microbiológica em QMA

A microbiota *terroir* também está presente em produtos lácteos fermentados, onde a comunidade microbiológica exerce papel complexo e importante nas características do produto final. Os queijos, por exemplo, oferecem uma matriz alimentar complexa capaz de favorecer o crescimento de organismos procariontes e eucariontes. Essas comunidades estão presentes e desenvolvem ao longo de todas as etapas de produção, desde o emprego de leite até a etapa de maturação (FLÓREZ; MAYO, 2006).

Vários são os fatores no processamento de queijos que afetam diretamente a microbiota *terroir*. Por exemplo, na produção de Queijo Minas Artesanal o emprego de leite cru, a qualidade do pingo utilizado e as condições do ambiente de maturação são alguns dos fatores cruciais para a expressão da microbiota *terroir*.

O leite não é submetido a tratamentos térmicos nesse tipo de queijo, dessa forma o produto apresenta uma população microbiana mais heterogênea. Além disso, o pingo utilizado como cultura *starter* é coletado na produção de queijo do dia anterior e possui composição variada composta por bactérias, principalmente bactérias do ácido láctico, e leveduras (ANDRADE *et al.*, 2017).

Na maturação observa a morte da cultura *starter*, o crescimento de bactérias não lácticas (flora adventícia) e o desenvolvimento da microflora secundária formada principalmente por fungos. Os microrganismos e reações bioquímicas que se desenvolvem nessa etapa produzem reações do tipo glicólise, lipólise, proteólise e liberação de compostos voláteis, responsáveis pelo desenvolvimento das características sensoriais (PAGTHINATHAN; NAFEES, 2015).

Há uma grande diversidade microbiológica presente nos QMA. A matriz alimentar encontrada do leite e as características desenvolvidas em cada parte do processo favorecem o crescimento de diversos microrganismos. Além disso, o clima da região propicia o desenvolvimento de diferentes gêneros de microrganismos.

É possível encontrar diversos trabalhos que analisaram os microrganismos presentes em QMA de diversas regiões de Minas Gerais. Entretanto, esses trabalhos foram direcionados principalmente para o estudo da comunidade bacteriana e de leveduras. Na literatura, pouco se encontra sobre a diversidade de fungos filamentos presentes em QMA, mesmo esses sendo de grande importância para as características desenvolvidas. Souza *et al.* (2021) analisaram a diversidade fúngica presente em queijos Minas artesanais da região do Serro onde se observou uma grande variedade de fungos destacando a incidência de *G. candidum*, *Debaryomyces hanseni*, *Yarrowia lipolytica*, *Candida zelandensis*, *Kluyveromyces lactis* e *P. roquefortii*.

Andrade *et al.* (2017) analisaram as leveduras envolvidas nas etapas de produção e em amostras de QMA da Canastra. Os autores empregaram as técnicas de MALDI-TOF e sequenciamento da região ITS para a identificação de leveduras presentes nas amostras analisadas. A partir dos resultados, os autores reportaram a presença de *Kluyveromyces lactis*, *Torulaspota delbrueckii* e *Candida intermedia* nas amostras de QMA.

Podem ser observados na literatura diversos trabalhos realizados com o objetivo de identificar a diversidade fúngica de queijos maturados de outras regiões, principalmente na Europa. Em trabalho realizado em queijos maturados na Turquia foi possível determinar a

presença de 40 diferentes fungos, com a predominância de *Penicillium roqueforti* (KIRTIL; METIN; ARICI, 2021). Já em outro trabalho realizado em queijo Cabrases tradicional da Espanha, foi possível identificar *Geotrichum candidum*, *P. roqueforti*, *P. chrysogenum*, *P. griseofulvum*, *D. hansenii*, *Kluyveromyces lactis* e *Candica silvae* como principais representantes fúngicos.

2.4 Métodos de avaliação da diversidade microbiana em queijos

A determinação da comunidade microbiana em alimentos compostos por matrizes complexas, como os queijos maturados, é de grande importância, uma vez que esse conhecimento contribui com aspectos relacionados aos avanços na área de segurança alimentar, tecnologias de produção empregadas e conhecimento sobre a origem geográfica (PERIN *et al.*, 2017). Além disso, a determinação da comunidade microbiana permite um melhor controle e informações sobre as propriedades sensoriais de interesse nos alimentos. Por estes motivos, as comunidades microbianas de diversos queijos já foram determinadas utilizando métodos tradicionais dependentes de cultivo e técnicas moleculares independentes de cultivo (JANY; BARBIER, 2008).

2.4.1 Métodos dependentes de cultura

Os métodos tradicionais, dependentes de cultura, consistem em técnicas de cultura que buscam a identificação dos microrganismos baseadas em características fenotípicas. Comumente, os métodos dependentes de cultura são úteis para a compreensão do potencial fisiológico dos organismos isolados, além de serem mais baratos quando comparados com métodos baseados em apenas análises moleculares, motivos pelos quais são amplamente utilizados (SILVETTI *et al.*, 2017; TEMMERMAN; HUYS; SWINGS, 2004). Entretanto, a avaliação da comunidade microbiana utilizando métodos dependentes de cultivo pode não ser suficiente para revelar toda a diversidade de amostras complexas, como queijos maturados (PERIN *et al.*, 2017).

As metodologias baseadas em técnicas dependentes de cultivo apresentam limitações que impedem o crescimento dos microrganismos no ambiente de laboratório, como baixa produtividade, planejamento extenso para grandes escalas e morosidade dos resultados (TEMMERMAN; HUYS; SWINGS, 2004). Por exemplo, estresse e injúrias causados nas células não são reparados em meio de cultura seletivo, podendo interferir na identificação dos

microrganismos, além de que pequenas populações podem ter o crescimento inibido por populações numericamente mais abundantes (HUGENHOLTZ; GOEBEL; PACE, 1998; JANY; BARBIER, 2008).

Entretanto, existem alternativas práticas para diminuir as limitações e aumentar a eficiência dos métodos dependentes de cultivo. Uma das possibilidades é a utilização de diferentes meios de cultivo, já que as necessidades e demandas variam entre os microrganismos. Assim, cada meio empregado permite o crescimento e isolamento de espécies compatíveis com as características apresentadas pela composição do meio de cultura, abrangendo uma maior gama de espécies a serem isoladas. Outra abordagem que pode ser empregada para diminuir as limitações apresentadas pelos métodos dependentes de cultivo é a combinação de técnicas de identificação de microrganismos, além da identificação baseada nas características morfológicas.

2.4.1.1 Identificação da microbiota pelo método MALDI-TOF MS

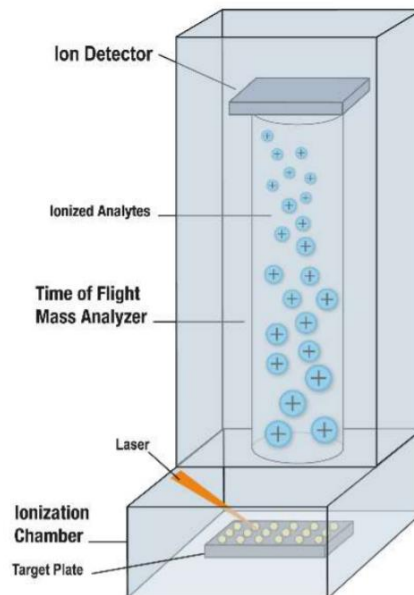
Atualmente, métodos de identificação de microrganismos baseado em proteômica são amplamente empregados. Neste cenário, há destaque para a utilização da técnica de ionização por dessorção a laser assistida por matriz, seguida pela detecção em um analisador do tipo tempo de voo, (*Matrix Associated Laser Desorption Ionization - Time of Flight / MALDI-TOF*) (PATEL, 2019).

A técnica de MALDI-TOF é amplamente empregada na identificação de microrganismos em contextos clínicos (GAUTIER *et al.*, 2014; MCMULLEN *et al.*, 2016; RYCHERT *et al.*, 2018). Porém é possível observar o aumento dos trabalhos que empregaram a técnica para a avaliação da diversidade microbiana em alimentos. Estudo realizado por Quéro *et al.* (2019) demonstrou o MALDI-TOF como alternativa às metodologias convencionais para a identificação rápida e confiável de fungos deteriorantes em alimentos e ambientes industriais (QUÉRO *et al.*, 2019). Já em estudo realizado com queijos maturados de cabra, os autores empregaram com sucesso o MALDI-TOF combinado com técnicas moleculares para identificar a comunidade microbiológica presente nas amostras analisadas. No estudo em questão, *G. candidum* foi identificado como a espécie fúngica predominante nas amostras (PENLAND *et al.*, 2021).

A utilização do MALDI-TOF permite a identificação microbiológica rápida e de menor custo, podendo ser aplicado em bactérias, leveduras e fungos filamentosos. A técnica consiste em um sistema onde o material a ser estudado é depositado em uma placa dotada de uma matriz

polimérica. A placa é então irradiada com um laser, fazendo com que a amostra seja vaporizada e ocorra a ionização das moléculas. As moléculas são então sugadas por um tubo de vácuo e carregadas até um detector (FIGURA 3). O tempo de chegada de cada molécula determina o resultado, sendo este obtido através da construção de um pico gráfico para cada espécie analisada. Os resultados são então interpretados através de bases de dados já existentes (PASTERNAK, 2012).

Figura 3 - Esquema do equipamento utilizado na técnica de MALDI-TOF.



Fonte: Patel (2019).

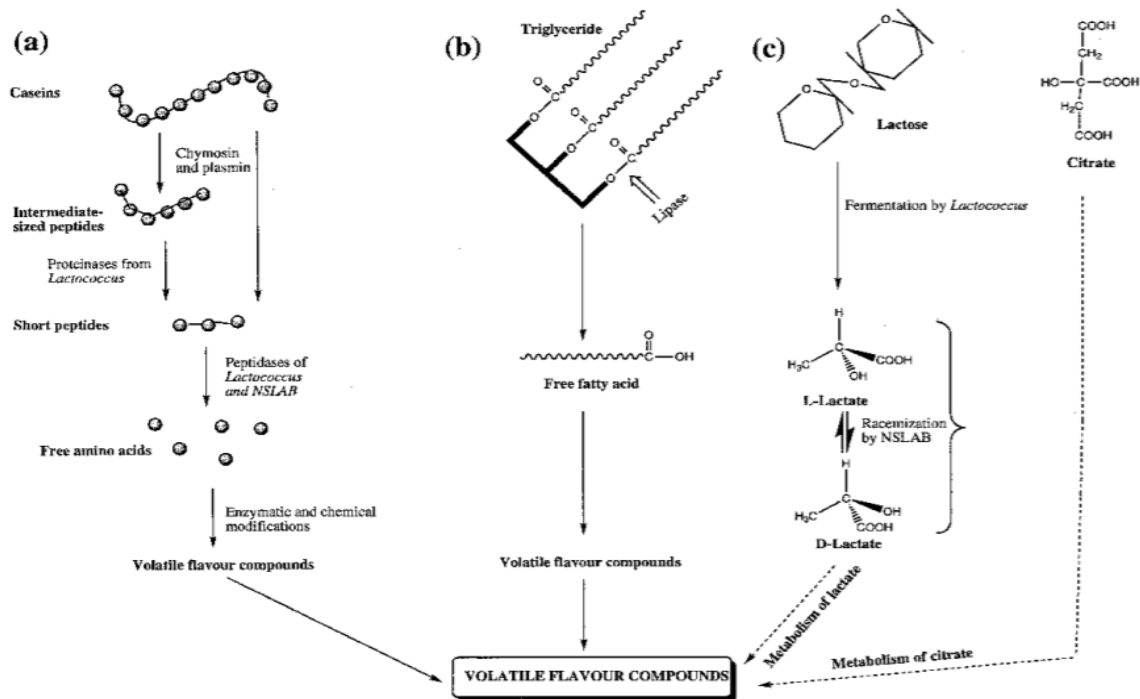
2.5 Compostos orgânicos presentes em queijos maturados

O consumo de queijos maturados está sendo disseminado mundialmente, deixando de ser algo pertencente apenas a cultura europeia. As características tão desejadas desses queijos são atribuídas a diversos fatores geográficos, culturais e à formação de compostos voláteis produzidos por bactérias no início da produção e por fungos durante o período de maturação (SUZUKI-IWASHIMA *et al.*, 2020).

A interação dos microrganismos com a matriz alimentar é um fator decisivo para a geração de metabolitos relacionados com o produto final. Uma infinidade de compostos está associada aos sabores identificados em queijos, sendo as principais vias metabólicas envolvidas na formação desses compostos a glicólise, lipólise e proteólise (FIGURA 4). Entre os mecanismos que ocorrem durante a etapa de maturação podemos citar como predominantes:

metabolismo residual de lactose, lactato e citrato, liberação de ácidos graxos livres, reações catabólicas associadas a degradação da caseína em diversos peptídeos e aminoácidos livres e vias catabólicas de ácido graxos livres (MCSWEENEY; SOUSA, 2000).

Figura 4 - Vias metabólicas envolvidas na maturação de queijos: (a) proteólise, (b) lipólise e (c) metabolismo da lactose, lactato e citrato.



Fonte: (MCSWEENEY; SOUSA, 2000).

Diversos estudos objetivaram a identificação de compostos voláteis em queijos maturados responsáveis pela formação de flavor. Com o emprego de GC-MS, Penland *et al.* (2021) identificaram 54 compostos voláteis presentes em amostra de queijos maturados de cabra. Os autores associaram os compostos 3-metil-1-butanol, ácido 3-metil-butanoico, ácido 3-metil propanoico, 2-fenilacetaldeído e 2-fenil-etanol com os períodos iniciais de maturação. Além disso, diversos compostos foram associados com o período tardio de maturação, principalmente o álcool secundário 2-heptanol, metil cetonas (non-8-en-2-ona, octan-3-nona, 2-pentanona, 2-heptanona, 2-hexanona, 2-nonanona) e ácidos graxos (ácido butanoico, hexanoico, pentanoico, octanoico, nonanoico e decanoico).

Suzuki-Iwashima *et al.* (2020) identificaram, a partir de análises conduzidas em diferentes tempos de maturação, a presença de ácidos graxos, metil cetonas e álcoois secundários em queijos maturados com *Penicillium camemberti*. Os autores comprovaram, assim, a contribuição do fungo filamentosos para as características de aroma desenvolvidas em queijos maturados com fungos.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O Queijo Minas Artesanal é um produto tradicional de diversas regiões do estado de Minas Gerais, Brasil, e atualmente constitui uma das principais atividades econômicas de várias famílias dependentes da agricultura familiar. Dentre as regiões produtoras do QMA, a Serra da Canastra recebe papel de destaque devido à popularidade dos seus queijos, sendo estes protegidos quanto à indicação de origem, regulamentados para o uso da Indicação de Procedência (IP) “Canastra”.

Nos QMA, a composição da diversidade fúngica é influenciada pelas condições ambientais da região de produção, tais como taxa de precipitação, temperatura e umidade. O desenvolvimento desses microrganismos nos queijos está relacionado com a presença da microbiota *terroir*, as singularidades do produto, segurança e qualidade alimentar.

A interação dos microrganismos com a matriz alimentar é um fator decisivo para a geração de metabolitos relacionados com o produto final. Uma infinidade de compostos voláteis, produzidos principalmente pela atividade enzimática de fungos no estágio de maturação, está associada à formação do sabor e aroma identificados em queijos, sendo as principais vias metabólicas envolvidas na formação desses compostos a glicólise, lipólise e proteólise.

Diante do exposto, nesta pesquisa foram avaliados a diversidade fúngica e o perfil de compostos voláteis presentes nos Queijos Minas Artesanais da Serra da Canastra. Dentre as diversas técnicas de identificação, os métodos dependentes de cultivo empregados neste trabalho (identificação morfológica e MALDI-ToF) demonstraram ser ferramentas importantes e eficientes para a determinação da população fúngica presente nas amostras analisadas.

Importantes fungos, associados com a produção de queijos por outros autores, foram identificados nesta pesquisa, como *G. candidum*, *K. lactis*, *T. delbrueckii*, *C. catenulata*, e *K. ohmerim*. Na literatura, esses isolados são de extrema importância para a produção de queijos, uma vez que produzem uma enorme gama de compostos voláteis responsáveis por notas sensoriais desejáveis em queijos maturados.

Algumas espécies associadas com a produção de micotoxinas ou com casos clínicos foram identificadas nas amostras de QMA. Entretanto, futuros estudos precisam ser realizados para a identificação dos riscos oferecidos por essas espécies quando presentes em queijos sob as condições específicas de maturação. A presença do fungo não é o único indicativo da produção de micotoxinas ou patogenicidade, uma vez que diversos fatores são necessários para que haja o risco, como quantidade presente, umidade relativa e temperatura do meio.

Os resultados obtidos neste trabalho podem ser considerados em estudos futuros, como por exemplo a análise isolada de cada fungo filamentosos, quando presentes em Queijos Minas Artesanais, para identificação da produção de compostos voláteis e micotoxinas, visto que ainda não existe registro dessas informações na literatura.

Este trabalho é inovador, pois foi avaliada toda a diversidade fúngica com a identificação de leveduras e fungos filamentosos. Além disso, o trabalho contou com a identificação do perfil de compostos voláteis. Além de ser uma grande contribuição para o meio acadêmico, esses dados serão de grande valia para os produtores de queijos, visto que nesse meio há uma lacuna e grandes dificuldades em obter essas informações.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, R. P. *et al.* Yeasts from Canastra cheese production process: Isolation and evaluation of their potential for cheese whey fermentation. **Food Research International**, [Amsterdam], v. 91, p. 72–79, Jan. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28290329/>. Acesso em: 19 dez. 2020.
- APROCAN - Associação dos Produtores de Queijo Canastra. **Ata de Assembleia Geral Extraordinária da Associação dos Produtores de Queijo Canastra**. 2011. Disponível em: www.inpi.gov.br/menu-servicos/indicacao...de.../Canastra.pdf. Acesso em: 16 fev. 2021.
- BOKULICH, N. A. *et al.* A new perspective on microbial landscapes within food production. **Current Opinion in Biotechnology**, [London], v. 37, p. 182–189, Feb. 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0958166915001718>. Acesso em: 15 fev. 2021.
- BOKULICH, N. A.; MILLS, D. A. Facility-specific "house" microbiome drives microbial landscapes of artisan cheesemaking plants. **Applied and Environmental Microbiology**, [Washington], v. 79, n. 17, p. 5214–5223, June 2013. Disponível em: <https://europemc.org/article/med/23793641>. Acesso em: 19 jan. 2021.
- BORELLI, B. M. *et al.* Yeast populations associated with the artisanal cheese produced in the region of Serra da Canastra, Brazil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [New York], v. 22, n. 11, p. 1115–1119, Apr. 2006. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11274-006-9151-3>. Acesso em: 15 jan. 2021.
- BRASIL. **Decreto nº 70.355, de 3 de abril de 1972**. Diário Oficial da União. Seção 1. p. 2873, 1972. Disponível em: <https://www.lexml.gov.br/urn/urn:lex:br:federal:decreto:1972-04-03;70355>. Acesso em: 18 dez. 2020.
- CAPOZZI, V.; SPANO, G. Food microbial biodiversity and “microbes of protected origin”. **Frontiers in Microbiology**, [Switzerland], v. 2, n. 237, p. 1–3, Nov. 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3226094/>. Acesso em: 19 nov. 2020.
- CLIMENT-LÓPEZ, E.; ESTEBAN-RODRÍGUEZ, S. Paisaje y patrimonio territorial en las Denominaciones de Origen vinícolas del Valle del Ebro (España). **E3S Web of Conferences**, [Spain], v. 50, n. 01046, p. 1–6, Oct. 2018. Disponível em: https://www.e3s-conferences.org/articles/e3sconf/abs/2018/25/e3sconf_terroircongress2018_01046/e3sconf_terroircongress2018_01046.html. Acesso em: 12 nov. 2020.
- DEMOSSIER, M. Beyond terroir: territorial construction , hegemonic discourses, and French wine culture. **Journal of the Royal Anthropological Institute**, [London], v. 17, p. 685–705, Nov. 2011. Disponível em: <https://rai.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1467-9655.2011.01714.x>. Acesso em: 18 jan. 2021.
- DRAKE, M. A.; DELAHUNTY, C. M. **Cheese: Chemistry, physics and microbiology**. chapter 20: sensory character of cheese and its evaluation. 4th ed. Amsterdam: Elsevier Ltd, 2017.

EMATER - Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Minas Gerais. **Programa queijo Minas artesanal**. 2019. Disponível em: http://www.emater.mg.gov.br/portal.cgi?flagweb=site_tpl_queijo&id=3301. Acesso em: 19 fev. 2021.

FELDER, D.; BURNS, D.; CHANG, D. Defining microbial terroir: The use of native fungi for the study of traditional fermentative processes. **International Journal of Gastronomy and Food Science**, [Netherlands], v. 1, n. 1, p. 64–69, Jan. 2012. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878450X11000047>. Disponível em: 13 dez. 2020.

FLÓREZ, A. B.; MAYO, B. Microbial diversity and succession during the manufacture and ripening of traditional, Spanish, blue-veined Cabrales cheese, as determined by PCR-DGGE. **International Journal of Food Microbiology**, [Amsterdam], v. 110, n. 2, p. 165–171, July 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16806553/>. Acesso em: 11 jan. 2021.

GAUTIER, M. *et al.* Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: Revolutionizing clinical laboratory diagnosis of mould infections. **Clinical Microbiology and Infection**, [Malden], v. 20, n. 12, p. 1366–1371, Dec. 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24995483/>. Acesso em: 22 fev. 2021.

HUGENHOLTZ, P.; GOEBEL, B. M.; PACE, N. R. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. **Journal of Bacteriology**, [Washington], v. 180, n. 18, p. 4765–4774, Sept. 1998. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC107498/>. Acesso em: 23 jan. 2021.

IMA - Instituto Mineiro de Agropecuária. **Portaria IMA nº 1736, de 27 de julho de 2017**. 2017. Disponível em: http://www.ima.mg.gov.br/index.php?preview=1&option=com_dropfiles&format=&task=frontfile.download&catid=1350&id=14644&Itemid=1000000000000. Acesso em: 22 jan. 2021.

IMA - Instituto Mineiro de Agropecuária. **Portaria IMA nº 1969, de 26 de março de 2020**. 2020. Disponível em: http://ima.mg.gov.br/index.php?preview=1&option=com_dropfiles&format=&task=frontfile.download&catid=1706&id=17923&Itemid=1000000000000. Acesso em: 18 fev. 2021.

IPHAN - Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional. **Modo artesanal de fazer queijo de Minas: Serro, Serra da Canastra e Serra do Salitre/Alto Paranaíba**. 2014. Disponível em: http://portal.iphan.gov.br/uploads/publicacao/Dossie_Queijo_de_Minas_web.pdf. Acesso em: 16 fev. 2021.

IPHAN - Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional. **Parque Nacional da Serra da Canastra (MG)**. 2019. Disponível em: <http://portal.iphan.gov.br/pagina/detalhes/868>. Acesso em: 13 jan. 2021.

IPHAN - Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional. **Registro dos Queijos Artesanais de Minas, a ser inscrito no Livro dos Saberes**. 2008. Disponível em: <http://portal.iphan.gov.br/>. Acesso em: 18 fev. 2021.

JANY, J. L.; BARBIER, G. Culture-independent methods for identifying microbial communities in cheese. **Food Microbiology**, [London], v. 25, n. 7, p. 839–848, Oct. 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18721671/>. Acesso em: 22 jan. 2021.

KAMIMURA, B. A. *et al.* Large-scale mapping of microbial diversity in artisanal Brazilian cheeses. **Food Microbiology**, [London], v. 80, p. 40–49, June 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S074000201831027X>. Acesso em: 17 fev. 2021.

KIRTIL, H. E.; METIN, B.; ARICI, M. Identification of filamentous fungi in Turkish mold-ripened cheeses and screening of mycotoxin genes of *Penicillium roqueforti* isolates. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, [Slovakia], v. 10, n. 4, p. 657–662, Feb./Mar. 2021. Disponível em: <https://office2.jmbfs.org/index.php/JMBFS/article/view/2942>. Acesso em: 19 abr. 2021.

KNIGHT, S. *et al.* Regional microbial signatures positively correlate with differential wine phenotypes: evidence for a microbial aspect to terroir. **Scientific Reports**, [London], v. 5, n. 14233, p. 1–10, Sept. 2015. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/srep14233>. Acesso em: 15 nov. 2020.

MCMULLEN, A. R. *et al.* Evaluation of the vitek ms matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for identification of clinically relevant filamentous fungi. **Journal of Clinical Microbiology**, [Washington], v. 54, n. 8, p. 2068–2073, Aug. 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27225405/>. Acesso em: 12 fev. 2021.

MCSWEENEY, P. L. H.; SOUSA, M. J. Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review. **Le Lait - Dairy Science & Technology**, [London], v. 80, n. 3, p. 293–324, May/June 2000. Disponível em: <https://lait.dairy-journal.org/articles/lait/abs/2000/03/10301/10301.html>. Acesso em: 22 nov. 2020.

NI, Q. *et al.* The volatile organic compound profile of ripened cheese is influenced by crude protein shortage and conjugated linoleic acid supplementation in the cow's diet. **Journal of Dairy Science**, [Champaign], v. 103, n. 2, p. 1377–1390, Feb. 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002203021931046X>. Acesso em: 19 jan. 2021.

PAGTHINATHAN, M.; NAFEES, M. S. M. Biochemistry of cheese ripening. **AGRIEAST Journal of Agricultural Sciences**, [Pakistan], v. 10, p. 16–26, Jan. 2015. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/313258453_Biochemistry_of_cheese_ripening. Acesso em: 22 fev. 2021.

PASTERNAK, J. New methods of microbiological identification using MALDI-TOF. **Medical Developments**, São Paulo, v. 10, n. 1, p. 118–119, Mar. 2012. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/eins/a/B5YjmWMZs8TrYqYDP7dnJsJ/?lang=en>. Acesso em: 22 jan. 2021.

PATEL, R. A moldy application of MALDI: MALDI-ToF mass spectrometry for fungal identification. **Journal of Fungi**, [Basel], v. 5, n. 1, p. 1-4, Jan. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30609833/>. Acesso em: 14 fev. 2021.

PENLAND, M. *et al.* Linking Pélardon artisanal goat cheese microbial communities to aroma compounds during cheese-making and ripening. **International Journal of Food Microbiology**, [Amsterdam], v. 345, May 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168160521000891>. Acesso em: 14 jun. 2021.

PERIN, L. M. *et al.* Bacterial ecology of artisanal Minas cheeses assessed by culture-dependent and -independent methods. **Food Microbiology**, [London], v. 65, p. 160–169, Aug. 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0740002016306086?via%3Dihub>. Acesso em: 22 fev. 2021.

QUÉRO, L. *et al.* Development and application of MALDI-TOF MS for identification of food spoilage fungi. **Food Microbiology**, [London], v. 81, p. 76–88, Aug. 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0740002017311450>. Acesso em: 22 fev. 2021.

RYCHERT, J. *et al.* Multicenter evaluation of the Vitek MS v3.0 system for the identification of filamentous fungi. **Journal of Clinical Microbiology**, [Washington], v. 56, n. 2, p. e01353-17, Jan. 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29142047/>. Acesso em: 27 dez. 2020.

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**, [Oxford], v. 73, p. 1074–1081, Mar. 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956713516305679>. Acesso em: 25 dez. 2020.

SALQUE, M. *et al.* Earliest evidence for cheese making in the sixth millennium bc in northern Europe. **Nature**, [London], v. 493, n. 7433, p. 522–525, Jan. 2013. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nature11698>. Acesso em: 18 dez. 2020.

SILVETTI, T. *et al.* Microbial population profile during ripening of Protected Designation of Origin (PDO) Silter cheese, produced with and without autochthonous starter culture. **LWT - Food Science and Technology**, [Amsterdam], v. 84, p. 821–831, Oct. 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0023643817304267>. Acesso em: 24 dez. 2020.

SOUZA, T. P. DE *et al.* Mycobiota of Minas artisanal cheese: safety and quality. **International Dairy Journal**, [Oxford], v. 120, Sept. 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0958694621001138>. Acesso em: 02 jul. 2021.

SUZUKI-IWASHIMA, A. *et al.* Metabolomics analyses of the combined effects of lactic acid bacteria and *Penicillium camemberti* on the generation of volatile compounds in model mold-surface-ripened cheeses. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, [Osaka], v. 129, n. 3, p. 333–347, Mar. 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1389172319304505>. Acesso em: 11 fev. 2021.

SZABÓ, M. P. J. *et al.* Ticks (Acari: Ixodidae) in the Serra da Canastra National Park in Minas Gerais, Brazil: species, abundance, ecological and seasonal aspects with notes on rickettsial infection. **Experimental and Applied Acarology**, [Dordrecht], v. 76, n. 3, p. 381–397, Oct. 2018. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10493-018-0300-9>. Acesso em: 12 nov. 2020.

TEMMERMAN, R.; HUYS, G.; SWINGS, J. Identification of lactic acid bacteria : independent methods. **Trends in Food Science & Technolog**, [London], v. 15, n. 7-8, p. 348–359, July/Aug.2004. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924224404000032>. Acesso em: 17 nov. 2020.

TURBES, G. *et al.* Evidence of *terroir* in milk sourcing and its influence on Cheddar cheese. **Journal of Dairy Science**, [Champaign], v. 99, n. 7, p. 5093-5103, July 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002203021630162X>. Acesso em: 17 jan. 2021.

1 **SEGUNDA PARTE - ARTIGO**

2

3 **ARTIGO 1 - CHARACTERIZATION OF ARTISANAL MINAS CHEESE PRODUCED**
4 **IN THE REGION OF SERRA DA CANASTRA: FUNGAL DIVERSITY AND VOLATILE**
5 **COMPOUNDS PROFILE**

6

7 Elaborado de acordo com as normas do International Journal of Food Microbiology

8

ISSN: 0168-1605

9

(versão preliminar)

10

11 Miriam Aparecida de Aguiar Santos, João Pedro Marinho Guimarães, Suzana Reis

12

Evangelista, and Luis Roberto Batista*

13

14 Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas
15 Gerais, 37200-900, Brasil.

16

17 *Corresponding author:

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

19 E-mail address: luisrb@dca.ufla.br (L. R. Batista)

20 Abstract

21 Canastra cheese is an artisanal Minas cheese produced from raw cow's milk and a natural whey
22 from the previously produced cheese, known as "pingo". This study aimed to characterize the
23 fungal diversity and the volatile compounds profile present in this cheese of regulated
24 Indication of Origin. The fungal community of the samples was investigated by culture-
25 dependent techniques (culturing, morphological identification, and MALDI-TOF). Moreover,
26 the method of solid-phase microextraction gas-chromatography mass spectrometry (SPME-
27 GC) was applied to determine the characteristic volatile compounds of this cheese. A complex
28 fungal diversity and volatile compound profile were observed. The fungal diversity revealed
29 the presence of 37 different species of yeasts and molds. However, each sample demonstrated
30 a unique fungal diversity composition. *Candida catenulata*, *Geotrichum candidum*, and
31 *Aspergillus versicolor* were the most abundant species in samples P1, P2, and P3, respectively.
32 A total of 66 volatile compounds was detected: 15 acids, 12 alcohols, 23 esters, 9 ketones, 3
33 aldehydes, and 4 miscellaneous compounds. The most abundant acids detected were hexanoic
34 acid, octanoic acid, and decanoic acid. Considering esters, the most abundant compounds were
35 ethyl hexanoate, ethyl decanoate, and ethyl butanoate. The most prevalent ketones were 2-
36 Nonanone, 2-Heptanone, and 2-Undecanone. These compounds can be mainly associated with
37 the presence of *G. candidum*, *Kluyveromyces lactis*, *Torulaspota delbrueckii*, *C. catenulate*,
38 and *Kodamaea ohmerim*, which are responsible for the sensory notes of musty, oily, fruity, malt,
39 burnt cheesy, buttery, sweet, green, floral, waxy, among others. However, future studies
40 should evaluate the role and the ability of those fungi to produce mycotoxin in cheese, as well
41 as control the growth of certain species during ripening, resulting in a safe and high-quality
42 product.

43 Keywords: Mycobiota; Bloomy Rind Cheese; Ripening.

44 1. Introduction

45

46 Artisanal Minas cheese (AMC), which is produced through traditional simple
47 techniques by using raw cow milk, *pingo* (lactic starter culture resulting from the previous
48 cheese production), rennet and salt, then ripened under environmental conditions (Perin et al.,
49 2017). AMC production transcends generations and is the main income source of many
50 Brazilian families, especially in the state of Minas Gerais, giving this product important cultural
51 and economic values (EMATER, 2021).

52 The Serra da Canastra region plays an important role in the production and marketing
53 of AMC in Brazil. Licensed cheese produced in this region has had the Geographical Indication
54 certification seal since 2012 in the Indication of Origin category (IO), being denominated as
55 Canastra cheese (SEBRAE, 2012). Several factors such as geographical conditions (weather,
56 altitude, rainfall), traditional techniques, and ripening conditions contribute to the cheese
57 production in Serra da Canastra and are responsible for the flavor and texture of these products
58 (Resende et al., 2011).

59 It is possible to find a wide variety of AMC, among which the bloomy rind cheese stands
60 out. Right after milking, the “*pingo*” and rennet are used to coagulated the milk. Then, the curds
61 are cut and transferred to molds for cheese shaping and the whey are removed by hand pressure.
62 The artisanal Minas cheese are salted by adding NaCl on both sides of the cheese, one by time.
63 After salting, the artisanal cheese from Canastra is ripened on wooden shelves at room
64 temperature and it must be matured for at least 22 days (Andrade et al., 2019; Pineda et al.,
65 2020).

66 During ripening, bloomy rind cheeses develop a rind consisting mainly of fungi. As a
67 result, the final product is characterized by a thick skin and the firm consistency on the interior.

68 Such microorganisms are capable of producing enzymes and other compounds that change the
69 cheese's texture, odor, flavor, and visual aspect (Pineda et al., 2020).

70 Surface mold ripened cheeses gained notoriety in Brazil very recently, especially after
71 some producers had their cheeses awarded in important international competitions such as the
72 “*Mondial du Fromage et des Produits Laitiers*” held in Tour, France (Globo Rural, 2019;
73 Pereira, 2018). Before that, little was known about the production and consumption of this
74 variety of cheese in Brazil.

75 However, the whole microbiota present in AMC remains unknown. According to our
76 knowledge, few studies have focused on identifying AMC's mycobiota. It is also possible to
77 observe a considerable knowledge gap concerning the development of fungi on AMC, mainly
78 filamentous fungi. Currently, there is no specific legislation for this cheese, based on the lack
79 of knowledge about the fungi characteristics that develop on the surface of ripened cheeses.
80 The existence of pathogenic fungi and mycotoxins in AMC are unknown for producers and for
81 the state inspection service. Thus, these factors are public health issues for consumers. The sale
82 of moldy artisanal chesses is not yet officially allowed, once quality is a fundamental
83 requirement to commercialize food products. The knowledge of the fungus which develop
84 during the ripened stage is important to clarify the doubts surrounding this product, in order to
85 avoid the existing bottleneck in the production and marketing of a type of cheese that is widely
86 consumed worldwide.

87 Souza et al. (2021) identified the fungal population of AMC samples produced in the
88 region of Serro (MG) through morphological identification and MALDI-TOF and the authors
89 observed the predominance of *Debaryomyces hansenii*, *Yarrowia lipolytica*, *Candida*
90 *zeylanoides*, *Kluyveromyces lactis*, *Cladosporium cladosporioides* (complex), and *Penicillium*
91 *roqueforti*. In a study carried out with samples of milk, *pingo*, and Canastra's cheese, Andrade
92 et al. (2017) identified *Kluyveromyces lactis*, *Tolulaposra delbrueckii*, and *Candida intermedia*

93 as the predominant yeasts in the analyzed samples. In another study by Borelli et al. (2006), the
94 authors evaluated samples of *pingo* and Canastra's cheese and identified *Kodamaea ohmeri*,
95 *Debaryomyces hansenii*, *Tolulaposra delbrueckii*, and *Kluyveromyces lactis* as the predominant
96 yeasts.

97 Initially, the lactic acid bacteria present in *pingo* act to cause a pH drop, favoring the
98 colonization of yeasts and filamentous fungi (Spinnler and Genie, 2004). The presence of fungi
99 in ripened cheeses, mostly as part of the secondary microbiota, contributes to the development
100 of the attributes and influences these products' quality and food safety. Fungi play a crucial role
101 in the addition, removal, or modification of compounds during ripening which are responsible
102 for changes in texture, flavor, aroma, color, nutritional characteristics such as vitamins, and the
103 production of mycotoxins (Anelli et al., 2019; McSweeney, 2004; Spinnler and Genie, 2004).

104 Odor, taste and texture are the main criteria affecting consumers' choice and
105 acceptability of cheeses. These factors are strongly influenced by volatile compounds present
106 in cheeses and by changes in composition during the ripening stage, when there is an interaction
107 of the microbiota with the food matrix (Drake and Delahunty, 2017; McSweeney, 2004). The
108 profile of volatile organic compounds in ripened cheeses consists of proteins, fats, lactose, and
109 enzymes found in milk, in addition to the development of microorganisms and biochemical
110 processes that take place during ripening such as glycolysis, lipolysis, and proteolysis (Ni et al.,
111 2020).

112 The characteristic flavor and aroma of ripened cheeses are formed by a complex balance
113 between volatile and non-volatile compounds present in milk and compounds released in the
114 reactions that occur during fermentation and ripening, such as glycolysis, lipolysis, proteolysis
115 and secondary. Free fatty acids indirectly contribute to the development of cheese aroma and
116 flavor, acting as precursors in the production of volatile compounds such as ketones, primary
117 and secondary alcohols, esters and aldehydes. Acetate, acetaldehyde, diacetyl, ethanol, and

118 ketones are formed in the metabolism of residual lactose and lactic and citric acids.
119 Furthermore, amino acids are converted to aldehydes, alcohols, carboxylic acids, ammonia, α -
120 ketoacids, amines, amides, and compounds from enzymatic pathways (Hayaloglu et al., 2013;
121 McSweeney, 2004; McSweeney and Sousa, 2000).

122 The lack of knowledge about the fungal diversity and the compounds found in the AMC
123 is one of the greatest obstacles faced by producers, implying the absence of specific legislation
124 in this sector (Pineda et al., 2020). Studies in this area would help to evidence and justify this
125 product's Geographical Indication records, besides collaborating to the development of
126 legislation. Thus, this study aimed at identifying not only the mycobiota of artisanal Minas
127 cheeses produced in the Serra da Canastra region, but also its volatile compounds profile and
128 physico-chemical properties.

129

130 **2. Material and methods**

131

132 *2.1. Sampling*

133

134 For this study, samples of AMC were collected in June 2019 in three certified cheese
135 producers located in São Roque de Minas, Serra da Canastra region, in the state of Minas Gerais,
136 Brazil. In each production farm, ripening occurred in a ripening room with temperature and
137 humidity determined by its location under environmental conditions. According to the national
138 meteorological organization of Brazil (INMET), the total precipitation rate and average
139 temperature in Serra da Canastra for the month of June in 2019 were 0 mm and 16.99 °C,
140 respectively (INMET, 2021). These parameters characterize the cold and dry weather
141 conditions during the winter in Serra da Canastra.

142 Two cheese wheels were collected from each dairy and coded as P1 (20°11'8.07"S,
143 46°21'23.42"O), P2 (20°12'27.05"S, 46°21'37.25"O), and P3 (20°13'18.28"S, 46°20'25.67"O).
144 Samples P1 and P2 had been ripened for 22 days, whereas P3 for over 60 days. Samples were
145 packed in sterile bags and transported under refrigeration to the Mycology and Mycotoxins
146 laboratory of the Food Science Department at the Federal University of Lavras, where they
147 were stored until subjected to analysis.

148

149 *2.2. Physicochemical analysis*

150

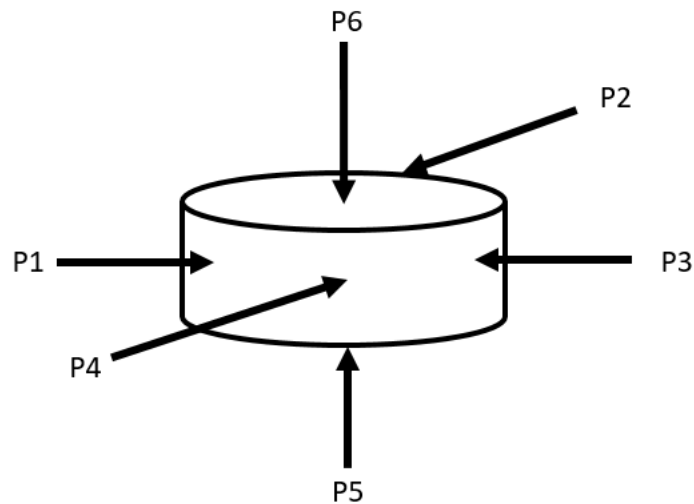
151 Physicochemical analyses of the AMC samples were carried out in triplicate at the Milk
152 and Dairy Products Laboratory of the Food Science Department at the Federal University of
153 Lavras. Samples were fractioned to obtain aliquots from the cheeses' rind and inner part.
154 Subsequently, the sodium chloride content, pH, and moisture content were determined
155 according to methodologies suggested by the Association of Official Analytical Chemists (Baur
156 and Ensminger, 1977).

157

158 *2.3. Mycobiota assessment through culture-dependent methods*

159

160 The serial dilution technique was used to assess AMC samples' mycobiota. A total of
161 25 g of each sample was scooped out of six equidistant points from the cheese rind (Figure 1).



162

163 **Fig. 1.** A schematic diagram of the process for gathering the samples for analysis.

164

165 This material was coarsely crushed and transferred into sterile plastic bags with 225 mL
 166 of 0.1% peptone water, followed by homogenization at 490 stokes/min for 2 minutes in a
 167 stomacher (Mayo Homogenius HG 400, São Paulo, Brazil). Subsequent serial dilutions were
 168 carried out with the homogenized material and 0.1 mL aliquots were inoculated in Dichloran
 169 Rose Bengal Chloramphenicol (DRBC) medium (Merck, Darmstadt, Germany) and Dichloran
 170 Glycerol Medium Base (DG18) (Merck, Darmstadt, Germany) using the surface spreading
 171 method with a Drigalski spatula, and incubated at 25°C for 5 to 7 days (Silva et al., 2007).

172 After the incubation period, present microorganisms were counted in colony forming
 173 units (CFU/g) and the square root technique was used to determine the total number of
 174 filamentous fungi and yeasts to be isolated. Afterwards, the fungi were purified on Malt Extract
 175 Agar (MEA) medium (Merck, Darmstadt, Germany) and incubated at 25°C for 7 days. Isolates
 176 were then preserved for future identification.

177 Colonies of filamentous fungi with morphological characteristics belonging to
 178 *Aspergillus* and *Penicillium* genera were identified following the methods described by Klich
 179 (2002) and Pitt (2000), respectively. *Aspergillus* and *Penicillium* isolates were incubated in

180 Czapek Yeast Agar (CYA) medium (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) at 25°C and 37°C and in
181 Malt Yeast Extract Agar (MEA) medium (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) at 25°C for 7 days.
182 After incubation, microscopic and macroscopic characteristics were observed and compared
183 with the information described by Klich (2002), Pitt (2000), Samson et al. (2002), and Samson
184 et al. (2014).

185 Yeast isolates were reactivated in Yeast Extract Peptone Glucose Agar (YEPG) (1%
186 yeast extract (Merck), 2% bacteriological peptone (HiMedia), 2% glucose (Merck), 1.5% agar
187 (Merck) in pH 5) at 28°C for 48 hours. Yeast colonies were characterized according to the
188 morphology described by Kurtzman et al. (2011).

189 Fungal isolates were analyzed using the Matrix Assisted Laser Desorption Ionization
190 Time-of-Flight (MALDI-TOF) technique. Each isolated strain was prepared in triplicate and
191 analyzed in the microflex MALDI-TOF spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany),
192 using the *Escherichia coli* K12 strain as external calibration, according to the methodology
193 described by Resende et al. (2018). The generated spectra were processed using the MALDI
194 Biotyper 3.0 software package (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) for microbial
195 identification. The spectra were exported and compared with those already existing in the
196 database.

197

198 *2.4. Volatile compounds analysis*

199

200 Volatile compounds present in the AMC samples were characterized using solid phase
201 microextraction coupled with high resolution gas chromatography/mass spectrometry (MEFS-
202 CGAR/EM). The methodology was specifically developed and tested for ripened cheeses by
203 *Central de Análise e Prospecção Química* (CAPQ) in the Federal University of Lavras. For
204 sample preparation, amounts of the cheese rind and mass were ground with liquid nitrogen,

205 fractionated and placed in 20 mL vials and subjected to analyses. The solid phase
206 microextraction technique was employed using DVB/CAR/PDMS fiber
207 (dininylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane) with a film thickness of 50/30 nm. Samples
208 were incubated at 60°C for 10 minutes and then the fiber was exposed in the headspace for 30
209 min.

210 After extraction, the fiber was inserted into the chromatograph injector (SHIMADZU-
211 CG/MS-QP2010) for separation and identification of the adsorbed volatile compounds from the
212 samples. The molecules were desorbed into the injector (SHIMADZU-AOC5000) at 250°C for
213 5 min, in Splitless mode. The equipment was equipped with a Slb-5MS fused silica capillary
214 column (Supelco, 30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m) with initial oven temperature raised to 40°C for
215 10 min, and then set to 230°C, at a rate of 5°C/min, with a total running time of 53 minutes.
216 Helium gas was used as a carrier gas with a flow rate of 2.0 mL/min.

217 Compounds were identified from the integration of the obtained peaks and their
218 comparison with the mass spectra present in the NIST database (GCMS Solution Library,
219 2020). Results were expressed as a percentage of the area of each identified analyte.

220

221 *2.5. Statistical analysis*

222

223 The statistical analysis of the data was performed using the Sisvar 5.6 software (Ferreira,
224 2014). Principal component analysis (PCA) was carried out using the Senso Maker software to
225 determine the differences between the analyzed cheese samples. PCA analysis is not a
226 classification method, but it enables grouping by Euclidean distances in the multidimensional
227 space created by PCA (Pillonel et al., 2003).

228 **3. Results and discussion**

229

230 *3.1. Physicochemical analyses and counts of filamentous fungi and yeasts' population*

231

232 The physicochemical composition and fungal population of the AMC samples from three
 233 cheese producers were determined through the performed analyses, and results are available in
 234 Table 1.

235

236 **Table 1**

237 Physicochemical composition and fungal population of P1, P2 and P3 samples from artisanal
 238 Minas cheese from the Canastra region.

Sample	Parameters			Population mean (log CFU/g)	
	Moisture (%)	NaCl (%)	pH	DRBC	DG18
P1	42.44±3.74	0.47±0.25	5.58±0.05	7.90±0.74	6.93±0.51
P2	41.69±1.20	0.18±0.15	5.55±0.19	7.28±0.32	7.27±0.13
P3	37.80±0.86	0.49±0.13	6.5±0.45	6.68±0.32	6.60±0.46

239

240 The NaCl content was 0.47% (P1), 0.18% (P2), and 0.49% (P3) and pH values ranged
 241 from 5.58 (P1) to 6.50 (P3). The observed NaCl contents were lower than those found by Souza
 242 et al. (2021) in studies performed with Minas artisanal cheeses produced in Serro, which varied
 243 from 0.10% to 0.20%. In studies carried out with Minas cheeses from different regions, Oliveira
 244 et al. (2013) observed higher sodium chloride percentages (1.88%) in relation to those found in
 245 this study for artisanal cheeses from Serra da Canastra.

246 Silva et al. (2011) detected a pH of 5.24 for artisanal cheeses from the Canastra region.

247 The authors reported high variability in this parameter, which may be related to variations in
 248 the pressing process which affects the final pH of the product due to higher or lower lactose
 249 retention. The observed variations of these parameters are also explained by the fact that it is a
 250 handcrafted product whose production process is not standardized and may differ according to

251 the producer, such as the added amount of “pingo”, time to coagulated the curds and the added
252 amount of salt.

253 Moisture contents of samples P1, P2, and P3 were 42.44%, 41.69, and 37.80%,
254 respectively. Silva et al. (2011) and Oliveira et al. (2013) reported moisture contents of 43.63%
255 and 44.90%, respectively, when studying artisanal cheeses from Serra da Canastra. These
256 values are close to those found in the present study. In addition, the lower moisture content
257 found in sample P3 can be explained by the extended ripening time. The moisture content of
258 the samples, which ranged from 37.80 % to 42.44 %, classified the AMC from Canastra as
259 medium moisture content, according the legislation (BRASIL, 1996). The presented result
260 indicates the moisture content meets the current legislation, which establishes values of up to
261 45% moisture for Minas Artisanal cheeses (IMA, 2020).

262 The fungal population in the AMC samples ranged from 6.60 to 7.90 log CFU/g. The
263 result confirms the Artisanal Minas Cheeses present favorable conditions for the development
264 of fungi.

265

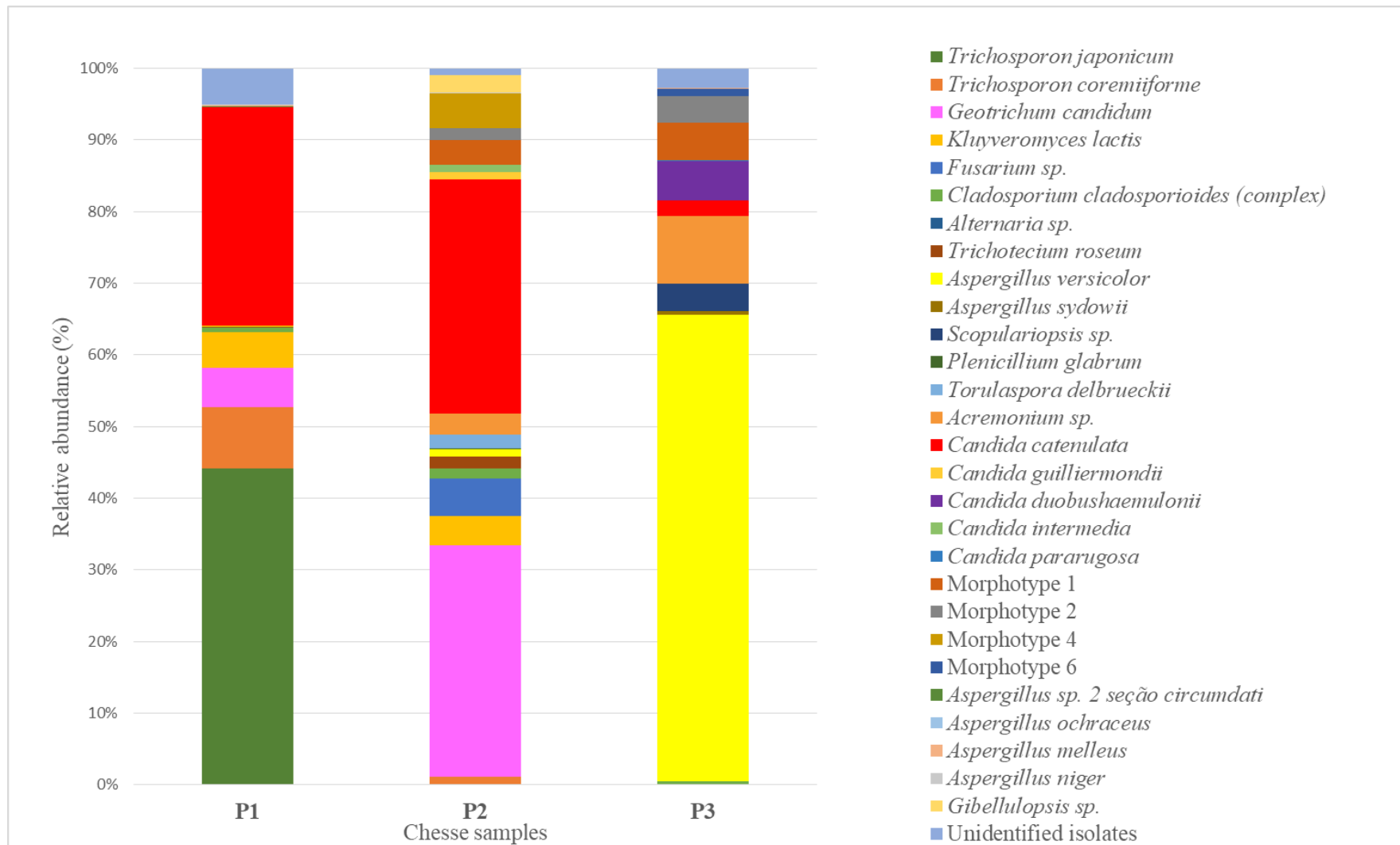
266 *3.2. Fungal diversity determined through a culture-dependent method*

267

268 The experimental setting of culture-dependent methods made it possible to precisely
269 study the cheeses’ fungal community. It was possible to combine plating followed by
270 morphological identification of the isolates and MALDI-TOF as a high-throughput technique
271 to describe fungal diversity at the species level.

272 A total of 596 isolates was obtained from the plating of samples, with 16 different genera
273 being identified. Out of the total number of isolates, 194 were from sample P1, 192 from P2,
274 and 210 from P3. Species identified on DRBC and DG18 culture media are shown in Figures 2
275 and 3, respectively. Several species were identified on the cheeses, which demonstrates the high

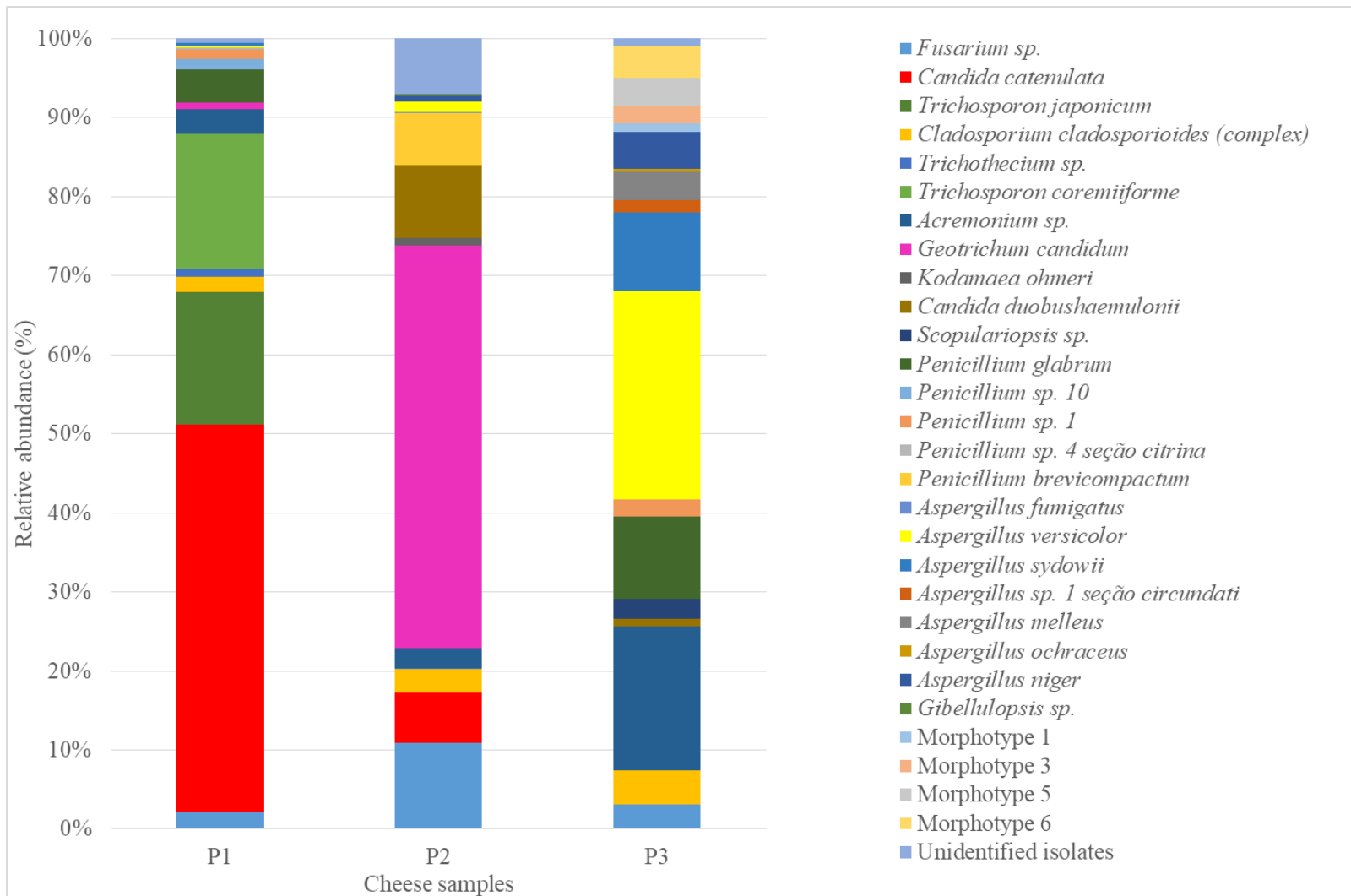
276 diversity present on Minas Artisanal cheeses. This result corroborates the studies found in the
277 literature (Andrade et al., 2017; Borelli et al., 2006; Cardoso et al., 2015; Souza et al., 2021).



278

279

Fig. 2. Relative abundace of fungal population present in cheese samples culture using the media DRBC.



280

281

Fig. 3. Relative abundace of fungal population present in cheese samples culture using the media DG18.

282 It was possible to identify 21, 22, and 20 species on samples P1, P2, and P3 respectively.
283 Representatives of the genera *Fusarium*, *Cladosporium cladosporioides* (complex),
284 *Aspergillus*, *Penicillium*, *Acremonium*, and *Candida* were identified in all samples, alongside
285 the identification at the species level of *Aspergillus versicolor* and *Penicillium glabrum*.
286 Identified genera such as *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Scopulariopsis*, *Fusarium*,
287 *Alternaria*, and *Trichosporon* are common in ripened cheeses and dairy environments (Hymery
288 et al., 2014; Kirtil et al., 2021; Souza et al., 2021).

289 Considering the DRBC medium, *Trichosporon japonicum* (8.52 log CFU/g), *Candida*
290 *catenulata* (8.36 log CFU/g), *Trichosporon coremiiforme* (7.81 log CFU/g), *Geotrichum*
291 *candidum* (7.61 log CFU/g), and *Kluyveromyces lactis* (7.58 log CFU/g) were the most
292 identified fungi in sample P1. In sample P2, *Candida catenulata* (7.51 log CFU/g), *Geotrichum*
293 *candidum* (7.50 log CFU/g), *Fusarium sp.* (6.72 log CFU/g), and *Acremonium sp.* (6.45 log
294 CFU/g) were predominant. When it comes to sample P3, *Aspergillus versicolor* (7.40 log
295 CFU/g), *Acremonium sp.* (6.56 log CFU/g), and *Candida duobushaemulonii* (6.32 log CFU/g)
296 were the most abundant.

297 In the DG18 medium, these were the species that appeared in higher numbers in sample
298 P1: *Candida catenulata* (7.50 log CFU/g), *Trichosporon coremiiforme* (7.04 log CFU/g), and
299 *Trichosporon japonicum* (7.03 log CFU/g). *Geotrichum candidum* (7.58 log CFU/g), *Fusarium*
300 *sp.* (6.91 log CFU/g), *Candida duobushaemulonii* (6.84 log CFU/g), and *Penicillium*
301 *brevicompactum* (6.70 log CFU/g) were the most predominant in P2, whereas a predominance
302 of *Aspergillus versicolor* (6.69 log CFU/g), *Acremonium sp.* (6.53 log CFU/g), and *Penicillium*
303 *glabrum* (6.29 log CFU/g) was observed in P3.

304 Fungi belonging to the genera *Penicillium* (7 species) and *Aspergillus* (8 species) were
305 present on the DG18 medium (*Penicillium glabrum*, *Penicillium sp. 10*, *Penicillium sp. 1*,
306 *Penicillium sp. 4*, *Penicillium brevicompactum*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus versicolor*,

307 *Aspergillus sydowii*, *Aspergillus* sp. 1 section Circundati, *Aspergillus melleus*, *Aspergillus*
308 *ochraceus*, *Aspergillus niger*). Only one species of *Penicillium* (*P. glabrum*) and two species
309 of *Aspergillus* (*A. versicolor* and *A. sydowii*) grew on DRBC. DG18 is a dehydrated culture
310 medium which allows the growth of fungi that are able to grow under reduced water activity
311 conditions, due to its composition (18% glycerol), also the medium enables the observation of
312 a wide range of characteristics. In this way, the DG18 medium is commonly used as an
313 additional medium in the isolation and identification of the genus *Aspergillus* and *Penicillium*
314 (Samson et al., 2014). It proved the efficiency through the results in the present study with most
315 abundance of species from *Aspergillus* and *Penicillium* genera.

316 The species *A. versicolor* often dominates conidia found in air and ripening room
317 environments, but rarely develops in cheese (Lund et al., 1995). The occurrence of this species
318 is common in ripening rooms, and it was already identified in Minas do Serro cheese ripening
319 rooms (Kandasamy et al., 2020; Souza et al., 2021). However, in this study, *A. versicolor* was
320 found in all analyzed samples and was predominant in sample P3. A study carried out in Italy
321 also reported *A. versicolor*'s growth in traditional Fossa cheese samples (De Santi et al., 2010).

322 Species *P. brevicompactum* (P2), *A. sydowii* (P1 and P3), *Scopulariopsis* sp. (P3), and
323 *Alternaria* sp. (P1) have been reported as common contaminants in cheese production
324 environments and in traditional cheeses (Anelli et al., 2019; De Santi et al., 2010; Decontardi
325 et al., 2017; Metin, 2018). Moreover, the species *A. niger* (P1, P2, and P3), *A. ochraceus* (P1
326 and P3), *A. melleus* (P1 and P3), and *A. fumigatus* (P2) were found in the samples. These species
327 are known to produce a wide range of mycotoxins, commonly associated with foods. However,
328 future studies must be carried out so that there is better knowledge of the role played by these
329 species in Minas cheese and to understand whether or not they produce mycotoxins when found
330 in cheese.

331 A number of studies have shown that yeasts and filamentous fungi inhabit the most
332 diverse substrates and are easily found in milk and cheeses, contributing to the special cheeses'
333 ripening process (Anelli et al., 2019; Cardoso et al., 2015; Kirtil et al., 2021; Penland et al.,
334 2021; Souza et al., 2021). Potential sources that may act as vectors include ambient air,
335 handlers, ingredients, and cheese-making equipment (Borelli et al., 2006; Souza et al., 2021).
336 Most of the yeasts identified in this work are commonly reported in studies carried out with
337 milk and dairy products (Atanassova et al., 2016; Fadda et al., 2004; Panelli et al., 2013; Souza
338 et al., 2021), including Canastra cheeses (Andrade et al., 2017; Borelli et al., 2006). Even
339 though yeasts could not be identified through phenotypic methods, their identification at the
340 species level was made possible by MALDI-TOF.

341 Yeasts are often associated with the cheese-making process and can be found in
342 equipment, brine solution, and starter culture. These microorganisms are capable of
343 assimilating lactose, favoring their development in cheese. Several studies have shown the
344 presence of yeasts in different types of cheese (Andrade et al., 2017; Lavoie et al., 2012;
345 Moubasher et al., 2018; Souza et al., 2021).

346 Five species of *Candida* spp. were identified, which makes it the genus with the highest
347 number of representatives among the yeasts and corroborates with what was reported by Panelli
348 et al. (2013). *Candida catenulata* was the only yeast species common to all samples. It has been
349 reported in several types of cheeses (Lavoie et al., 2012; Panelli et al., 2013), including
350 Canastra's (Borelli *et al.*, 2006). This yeast plays an important role in the cheese ripening stage
351 due to its proteolytic and lipolytic enzymes, in addition to metabolizing lactic acid and
352 increasing the pH of cheeses (El-Sharoud et al., 2009). *Candida duobushaemulonii* was isolated
353 from samples P2 and P3. This is the first report of this yeast associated with cheese production.
354 It was also possible to observe *C. paraugosa*'s incidence in sample P3 (4.82 log CFU/g), a
355 microorganism found in the environment and that has been reported in raw milk in Italy (Panelli

356 et al., 2013) and in traditional Serpa cheese from Portugal (Santos et al., 2017). The presence
357 of this microorganism is a fact of concern, given that it is clinically classified as a rare yeast
358 and is associated with human pathologies of difficult control due to limited clinical experience,
359 lack of susceptibility data, and high frequency of therapeutic failure (Pérez-Hansen et al., 2019).

360 The occurrence of *Candida duobushaemulonii* in Canastra cheese samples is
361 remarkable. It is a species of the *Candida haemulonii* complex described as an emerging
362 invasive pathogen strongly resistant to commonly used antifungal agents, such as amphotericin
363 B and flucibazole (Jurado-Martín et al., 2020). This yeast is being reported in food for the first
364 time, since it had only been clinically reported as of now (Jurado-Martín et al., 2020; Montoya
365 et al., 2021). In the present study, *C. duobushaemulonii* was isolated in considerable amounts
366 from two samples: P2 (DG18: 6.84 log CFU/g) and P3 (DRBC: 6.32 log CFU/g; DG18: 5.22
367 log CFU/g). This result suggests that this yeast is a natural part of the mycobiota from different
368 farms in Serra da Canastra. The role played by this species in Canastra cheeses still needs to be
369 determined. Ramos et al. (2014) identified strains of *C. duobushaemulonii* isolated from
370 hospitalized patients in Brazil and studied their susceptibility to the main antifungal agents.

371 *Candida intermedia*, *Candida guilliermondii*, *Kodamaea ohmeri*, and *Tolulaposra*
372 *delbrueckii* were isolated from sample P2 only. Andrade et al. (2017) also reported the presence
373 of *C. intermedia* in Canastra cheese samples. This yeast's capacity to ferment lactose is
374 variable, which interferes with the presence or not of lactose-rich substrates and may explain
375 its absence in the other samples (Andrade et al., 2017). Goerges et al. (2006) described that *C.*
376 *intermedia* strains isolated from cheeses have strong antilisterial activity, an important
377 characteristic in food processing. The yeast *K. ohmeri* is often isolated from fermented products
378 such as pickles and has already been reported in artisanal ripened cheeses (Borelli et al., 2006;
379 Cardoso et al., 2015; Chombo-Morales et al., 2016; El-Sharoud et al., 2009). Cardoso et al.
380 (2005) identified *K. ohmeri* as the most relevant species during Serro cheeses' ripening, having

381 protease, lipase, and β -galactosidase activities. Furthermore, Borelli et al. (2006) reported this
382 species as the fourth most relevant in Canastra cheeses samples. The predominance of this
383 species in artisanal Minas cheeses from different regions suggests that it is part of the fungal
384 diversity of artisanal Minas cheeses. *T. delbrueckii* (anamorph: *Candida colliculosa*) is
385 associated with several food processes, such as the production of traditional cheeses, bread, and
386 wines, in addition to presenting probiotic potential (Fadda et al., 2004; Hernandez-Lopez et al.,
387 2003; Lavoie et al., 2012; Panelli et al., 2013). This species was also previously identified in
388 artisanal cheeses from Canastra and Serro, suggesting its natural relationship with the fungal
389 diversity of artisanal cheeses (Borelli et al., 2006; Cardoso et al., 2015). *T. delbrueckii* has β -
390 galactosidase activity and does not demonstrate proteolytic and lipolytic capacities in cheese
391 processing (Cardoso et al., 2015; Welthagen and Viljoen, 1998). *Candida guilliermondii* is part
392 of the human microbiota and is occasionally associated with clinical cases. It is a poorly studied
393 species compared to other *Candida* species due to its lower incidence as a pathogen
394 (Pasqualotto et al., 2006). It is able to convert xylose into xylitol and is studied for the
395 conversion of agricultural industry residues into vilitol (Saravanan et al., 2021). The role of *C.*
396 *guilliermondii* in cheese remains unknown, since reports of this species in food cannot be found.

397 *Geotrichum candidum* was one of the predominant fungi in samples P1 (DG18: 5.67 log
398 CFU/g; DRBC: 7.61 log CFU/g) and P2 (DG18: 7.58 log CFU/g; DRBC: 7.50 log CFU/g).
399 This species is associated with early ripening stages, which explains its absence in sample P3
400 (Fadda et al., 2004). *G. candidum* is a dimorphic fungus, often characterized as an intermediate
401 between yeast and filamentous fungus. It grows best in moist substrates, has low salt tolerance,
402 and its optimal growth pH is between 5.0 and 5.5, as can be seen in sample P1 and P2 (Fadda
403 et al., 2004; Penland et al., 2021). *G. candidum*'s characteristics explain its non-identification
404 in sample P3 by culture-dependent methods. The use of culture-independent techniques would
405 be an alternative to identify strains of this species that were possibly active in the early ripening

406 stages of sample P3. This fungus is found in moist and nutrient-rich substrates, being commonly
407 reported in dairy products and associated with cheese production (Eliskases-Lechner et al.,
408 2011). This specie has been often reported in cheeses (Fadda et al., 2004; Flórez and Mayo,
409 2006; Penland et al., 2021; Rychlik et al., 2017), including in Serro's (Souza *et al.*, 2021). The
410 lipolytic and proteolytic activities presented by *G. candidum* make this fungus an ally in cheese
411 production. The amino acid catabolism generates important volatile flavor and aroma
412 compounds in cheese, such as 2-methylpropanol, 3-methylbutanol, and sulfur compounds
413 (Eliskases-Lechner et al., 2011; Jollivet et al., 1994). Furthermore, this fungus can produce
414 volatile compounds or precursors of aromatic compounds such as 2-pentanone, 2-heptanone,
415 2-nonanone, and 2-undecanone from fatty acids (Eliskases-Lechner et al., 2011).

416 *Kluyveromyces lactis* was isolated from samples P1 and P2 and is often reported in
417 cheeses (Andrade et al., 2017; Atanassova et al., 2016; Borelli et al., 2006; Souza et al., 2021).
418 It contributes to the sensory quality and typicality of cheeses through the deacidification and
419 formation of flavor compounds. *K. lactis* is capable of producing acetaldehyde, ethanol,
420 branched-chain aldehydes and alcohols, and acetic acid esters which contribute with alcoholic,
421 fruity, and acetic notes (Atanassova et al., 2016). Furthermore, this microorganism manages to
422 develop inside cheeses, where other yeasts are scarce (Atanassova et al., 2016). It has
423 proteolytic activity over casein (Fadda et al., 2004) and directly influences the cheese's interior
424 texture.

425 Representatives of the *Trichosporon* genus are frequently isolated from cheese samples
426 (Panelli et al., 2013; Rychlik et al., 2017). In this study, the species *Trichosporon japonicum*
427 (P1) and *Trichosporon coremiiforme* (P1 and P2) were found in considerable quantities. Souza
428 et al. (2021) isolated *Trichosporon japonicum* in the cheese samples from Serro, the
429 environment, and the air of cheese factories. Cardoso et al. (2015) isolated representatives of

430 the *Trichosporon* genus in Canastra cheeses and attributed to them the protease, lipase, and β -
431 galactosidase activities (Szabó et al., 2018).

432

433 3.3. Volatile compounds

434

435 Using headspace GC-MS, 66 volatile compounds were identified and distributed mainly
436 among 5 different chemical classes: alcohols, acids, esters, aldehydes, and ketones. The relative
437 area (%), chemical class, and sensory perception attributed to these compounds are listed in
438 Table 2.

439 **Table 2**
 440 Odor description and relative content of the identified volatiles in Minas artisanal Canastra cheese.

	Chemical Class	Volatile compounds	IR	Sensory Perception*	Sample (Relative content**(%)		
					P1	P2	P3
1.	Alcohol (12)	1-Heptanol	988		0.297	0	0
2.		1-Hepten-3-ol	993		0	0.111	0
3.		1-Octen-3-ol	994	Fatty, fruity, grass, mushroom, perfumy, sweet	0	0.306	0
4.		2,3-Butanediol	814		0.205	0.482	0
5.		2-Heptanol	938	Arcticbramble, melon, mushroom	0.181	0.945	0.423
6.		2-Nonanol	1060	Coconut	2.673	4.355	0.145
7.		2-Pentanol	nd	Alcoholic, ethery, fruity, nutty, raspberry	0	0.028	0.103
8.		3-Ethyl-2-pentanol	1133		0	0.06	0
9.		3-Methyl-1-butanol	nd	Whiskey, malt, burnt	2.624	1.798	0
10.		5-Methyl-2-heptanol	1061		0	0	0.306
11.		Benzeneethanol	1066	Perfumy, rose	0.858	1.260	0.043
12.		α -Aminoisopropyl alcohol	nd		3.665	0	0
13.	Acid (15)	Acetic acid	nd	Acetic, acidic, vinegar	2.258	0.575	0
14.		Benzeneacetic acid	1135	Honey, sweet	0	0.093	0.252
15.		Butanoic acid, 2-methyl-	946		2.514	0.491	0.607
16.		Butanoic acid	882	Butter, butyric, cheese, green, musty, oily	4.771	11.338	1.590
17.		Decanoic acid	1197	Caprylic, tallow	8.829	6.130	24.655

18.		Dodecanoic acid	1315	Caprylic, soapy, tallow	1.103	0.815	2.964
19.		Heptanoic acid	1053		0	0.259	0.248
20.		Hexanoic acid	1023	Caprylic, sweaty, sweaty dirty socks, vegetable oil	15.697	38.087	23.586
21.		Isovaleric acid	939	Cheese, old hop, old socks, sweaty	0.769	0	0.428
22.		Myristic acid	1440		0	0	0.214
23.		Nonanoic acid	1146	Green, fat	0	0.120	0.205
24.		Octanoic acid	1202	Caprilic, oily	15.369	16.931	21.499
25.		Pentanoic acid	950	Dirty socks, parmesan cheese, sweaty	0	0	0.103
26.		Propanoic acid	nd	Pungent, rancid, soy	0	0.074	2.456
27.		Tridecanoic acid	1144		0.109	0	0
28.		1-Butanol, 3-methyl-, acetate	914	Banana, ester, solvent, sweet	0	0.107	0
29.		Delta-Octalactone	1273	Lactone, sweet	0	0.232	0.043
30.		Acetic acid, 1- methylpropyl ester	nd	Fruity	0	0.056	0
31.		Acetic acid, 2- phenylethyl ester	1138		0.112	0	0
32.		Butanoic acid, 1- ethenylhexyl ester	1146		0.073	0	0
33.	Esters (23)	Butanoic acid, ethyl ester (Ethyl butanoate)	823	Apple, butter, fruity, papaya, perfumy, sweet	2.870	1.149	0.436
34.		Butanoic acid, propyl ester (Propyl butanoate)	931		0.071	0	0
35.		Octanoic acid, butyl ester (Butyl octanoate)	1175	Fruity	0	0	0.253
36.		Decanoic acid, ethyl ester (Ethyl decanoate)	1213	Appel, caprylic, fruity, solvent	0.166	0.500	2.060

37.		Delta-Nonalactone	1155		0.219	0.153	0.103
38.		Dodecanoic acid, ethyl ester (Ethyl dodecanoate)	1335	Caprylic, ester	0	0.167	0.616
39.		Hexadecanoic acid, ethyl ester (Ethyl hexadecanoate)	1461		0	0.046	0.111
40.		Hexanoic acid, 2-hydroxy-, methyl ester	969		0	0.176	0
41.		Hexanoic acid, 2-methylpropyl ester	1074		0	0.186	0.402
42.		Hexanoic acid, ethyl ester (Ethyl hexanoate)	1005	Aniseed, apple, fruity, green, sweet, unripe	1.718	1.492	1.270
43.		Isobutyl decanoate	1290		0	0	0.140
44.		Isopentyl hexanoate	1135	Caprylic, fruity, perfumy, solvent	0	0.056	0
45.		Nonanoic acid, ethyl ester (Ethyl nonanoate)	1209	Sickly sweet			
46.		Octanoic acid, ethyl ester (Ethyl octanoate)	1105	Apple, fruity, sweet	0	0	8.993
47.		Propanoic acid, 2-methyl-, 2-methylpropyl ester	963	Fruity	0	0.051	0.059
48.		Propanoic acid, 2-methyl-, pentyl ester	1036		0.284	0.185	0
49.		Propyl hexanoate	1056	Fruity	0	0.071	0.040
50.		Tetradecanoic acid, ethyl ester (Ethyl tetradecanoate)	1464	Caprylic, vegeable oil	0	0	0.051
51.	Aldehydes (3)	3-Methylbutanal	nd	Apple, burnt, caramel, cheese, cherry, cocoa, malt, green, sickly	0.489	0.463	0

52.		Benzeneacetaldehyde	1028	Honey, sweet	0.628	0.352	0.113
53.		Nonanal	1062	Aldehyde, citrus, fatty, floral, green, soapy, slightly pungent, tallow, wax	0.316	0.278	0
54.		2-Dodecanone	1157	Fruity, musty	0	0	0.166
55.		2-Heptanone	923	Blue cheese, fruity, musty, peardrops, soapy	1.531	1.946	0.886
56.		2-Nonanone	1054	Blue cheese, fatty, fruity, green, ketone, musty, varnish	7.148	3.864	2.837
57.		2-Pentanone	nd	Acetone, sweet fruity ketone	0	0.097	0.079
58.	Ketones (9)	2-Tridecanone	1158	Fruity, green, rancid, tallow	0.097	0	0
59.		2-Undecanone	1156	Dusty, floral, fruity, green, ketone, musty, rose, tallow	2.834	0.269	0.659
60.		3-Octanone	996	Earthy, ethereal, ketone, mushroom, resinou	0	0.454	0
61.		8-Nonen-2-one	1049		1.466	0.398	0.488
62.		Acetoin	nd	Butter, cream	1.198	0.672	0.061
63.		3-methylphenol	1047	Dry, leather, medicinal, phenolic, tarry	0.208	0	0
64.	Miscellaneous (4)	1,7-octadiene	1147		0	0	0.061
65.		Methoxy phenyl oxime	968		7.293	0	0
66.		Delta-Decalactone	1271	Coconut	0.425	0	0

441 *Odor description found in the literature with database (Flavornet; The LRI and Odour Database)

442 **Determination based on the percentage of each component relative to the total peak area.

443 Nd = IR lower than the lowest hydrocarbon rated.

444 The the greatest diversity of compounds was observed in sample P2, with hexanoic acid
445 (38.08%) and octanoic acid (16.93%) being the most prevalent compounds. A total of 36 and
446 41 volatile compounds was detected in samples P1 and P3, respectively. The compounds that
447 predominated in sample P1 were hexanoic acid (15.70%), and octanoic acid (15.37%). P3 had
448 the lowest diversity, with decanoic acid (24.66%), hexanoic acid (23.59%), and octanoic acid
449 (21.50%) being the predominant ones.

450 **Esters:** this was one of the most important categories and had the largest number of
451 representative compounds (23). The relevance of these compounds for cheeses is due to their
452 low perception threshold and the contribution of fruity and floral notes to aroma and flavor
453 (Molimard and Spinnler, 1996; Singh et al., 2003). Table 2 shows that fruity, sweet, fragrant,
454 and caprylic are the most used terms to describe esters' sensory perception. Because of their
455 sensory characteristics, esters contribute to flavor and aroma development in ripened cheeses,
456 reducing the sharpness produced by fatty acids and the bitterness of amines (Pinho et al., 2003).
457 The following ethyl esters were observed in all samples: decanoic acid ethyl ester (Ethyl
458 decanoate), hexanoic acid, ethyl ester (Ethyl hexanoate), butanoic acid, ethyl ester (Ethyl
459 butanoate). Hayaloglu et al. (2013) and Boltar et al. (2015) reported that ethyl esters were the
460 first esters to be found in Gokceada and Nanos ripened cheeses. A wide variety of ethyl esters
461 is commonly identified in ripened cheeses. Their concentrations tend to increase during the
462 ripening stage due to the enzymatic activity of microbial-origin esterases (Hayaloglu et al.,
463 2013).

464 **Acids:** carboxylic acids were the dominant group in relative content (Table 2). Several
465 short-chain fatty acids were detected in all samples, and butanoic acid, decanoic acid, hexanoic
466 acid, and octanoic acid were the compounds with the largest relative areas (%) among all peaks.
467 These contribute to the development of cheese aroma due to the strong odor, low threshold, and
468 because they are precursors of other highly aromatic compounds such as methyl ketones,

469 alcohols, lactones, and esters (Collins et al., 2003; Molimard and Spinnler, 1996). Most free
470 fatty acids with 4 to 20 carbon atoms in cheese come from the lipolysis of triglycerides by
471 filamentous fungi (Molimard and Spinnler, 1996). Large amounts of fatty acids in the samples
472 are characterized by lipolysis reactions at the beginning of cheese production. These reactions
473 are related to the fermentative activity of microorganisms and the action of microbial lipases
474 released during the ripening stage (Aminifar et al., 2014; Collins et al., 2003). The presence of
475 ethyl butanoate (butanoic acid, ethyl ester) was observed in all samples. Furthermore, its
476 precursor (butanoic acid) was also observed in all samples. It can be explained by the formation
477 of esters in the esterification of free fatty acids and alcohols (Boltar et al., 2015).

478 **Alcohols:** 12 different alcohols were identified in the samples. Sample P3 had the lowest
479 diversity on this class, with only five compounds. Not only 2-heptanol, 2-nonanol and
480 benzeneethanol were identified in all samples, but they were also the most abundant.
481 Compounds 2-heptanol, 3-methyl-1-butanol, 2-pentanol, 2-nonanol, and benzene ethanol,
482 found in the samples, are commonly identified in ripened cheeses. The presence of some
483 compounds is due to their precursor's role for other compounds. For instance, 2-heptanone acts
484 as a precursor of 2-heptanol (Boltar et al., 2015; McSweeney and Sousa, 2000).

485 **Ketones:** the most identified ketones were 2-nonanol, 2-pentanone, 2-heptanone, 8-
486 nonen-2-one, and 3-hydroxy-2-butanone (acetoin). These were observed in all samples with a
487 considerable relative area. Several studies have been carried out with ripened cheeses and
488 detected these compounds, which corroborates the findings on this paper (Boltar et al., 2015;
489 Hayaloglu et al., 2013; Penland et al., 2021; Suzuki-Iwashima et al., 2020). Methyl ketones are
490 commonly found in cheeses and are formed through the enzymatic oxidation of fatty acids.
491 Therefore, significant amounts of methyl ketones are expected in ripened cheeses (Boltar et al.,
492 2015; McSweeney and Sousa, 2000). *G. candidum* produces several of the volatile compounds

493 or precursors of aromatic compounds found in this study, such as 2-nonanone, 2-undercanone,
494 2-pentanone, and 2-heptanone (Carmichael, 1957).

495 **Aldehydes:** these are not the most found volatile compounds in cheeses, as they are
496 transient, non-accumulative and rapidly transform into alcohols or their corresponding acids
497 (Hayaloglu et al., 2013; Molimard and Spinnler, 1996). Aldehydes originate from the
498 catabolism of fatty acids or amino acids from decarboxylation or deamination (McSweeney;
499 Sousa, 2000). These results corroborate those found in the literature. Only four compounds of
500 this class were observed, and they had small relative areas. Aldehyde concentrations are
501 influenced by the ripening period, with low concentrations being linked to good ripening
502 (Hayaloglu et al., 2013). Sample P3 had only one compound of this class
503 (benzeneacetaldehyde), proving the long ripening stage underwent by the sample.

504

505 *3.4. Fungal contribution to volatile profile*

506

507 As it is known, fungi produce a wide variety of volatile organic compounds, which play
508 central roles in the sensory characteristics of ripened cheese. As can be seen in Table 3, the
509 fungi isolated from the Canastra cheeses contribute with several volatile compounds, mainly
510 esters, fatty acids, methyl ketones, and alcohols due to their enzymatic activity (Andrade et al.,
511 2019; Atanassova et al., 2016; Azzolini et al., 2012; Graham et al., 2011; Jollivet et al., 1994;
512 Larsen and Frisvad, 1995; Pasanen et al., 1997; Polizzi et al., 2012; Roostita and Fleet, 1996).

513 **Table 3**
 514 Identified fungi in Canastra cheese and their volatile compound contribution

Fungi	Associated Volatile Compound*
<i>Aspergillus sydowii</i>	1-Octen-3-ol; 3-Octanone
<i>Aspergillus versicolor</i>	1-Octen-3-ol; 2-Heptanone; 2-Pentanone; 3-Octanone
<i>Candida catenulata</i>	Butanoic acid; Decanoic acid; Dodecanoic acid; Hexanoic acid; Myristic acid; Octanoic acid
<i>Candida guilliermondii</i>	2-Heptanol; 3-Methyl-1-butanol; 3-Methylbutanal; 2- Nonanone; 2-Pentanone
<i>Geotrichum candidum</i>	2-Heptanol; 2-Nonanol; Butanoic acid; Hexanoic acid; Octanoic acid; Pentanoic acid; 3-methylbutanal; 2-Heptanone; 2-Nonanone; 2-Pentanone, 2- Undecanone
<i>Kluyveromyces lactis</i>	2,3-Butanediol; 3-Methyl-1-butanol; Butanoic acid; Decanoic acid; Hexanoic acid; Ethyl butanoate; Ethyl decanoate; Ethyl hexanoate; Ethyl octanoate; 3- Methylbutanal; Nonanal; 2-Nonanone; 2-Pentanone; Acetoin
<i>Kodamaea ohmeri</i>	2,3-Butanediol; Ethyl decanoate; Ethyl dodecanoate; Ethyl hexanoate; Ethyl nonanoate
<i>Penicillium glabrum</i>	3-Methylbutanal
<i>Tolulaposra delbrueckii</i>	1-Octen-3-ol; Acetic acid; Butanoic acid; Decanoic acid; Hexanoic acid; Octanoic acid; Ethyl decanoate; Ethyl hexanoate; Ethyl octanoate

515 Source: Andrade et al. (2019); Atanassova et al. (2016); Azzolini et al. (2012); Graham et al.
 516 (2011); Jollivet et al. (1994); Larsen and Frisvad (1995); Pasanen et al. (1997); Polizzi et al.
 517 (2012); Roostita and Fleet (1996).

518

519 Most of the volatile compounds' production can be assigned to *G. candidum*, *K. lactis*,
 520 *T. delbrueckii*, *C. catenulate*, and *K. ohmeri*. *G. candidum* produces methyl ketones (55, 56, 57,
 521 59), fatty acids (16, 20, 24, 25), and alcohols (5, 6) which contribute with fruity, floral, sweaty,
 522 musty, cheesy, oily, and buttery notes. Moreover, *K. lactis* produces alcohols (4, 9), fatty acids
 523 (16, 17, 20), esters (33, 36, 42, 46), aldehydes, and ketones (51, 53, 56, 57, 62), responsible for

524 the following aromatics notes: whiskey, malt, burnt, oily, cheesy, buttery, sweet, fruity,
525 caramel, green, floral, waxy, and creamy. In addition, *T. delbrueckii*, *C. catenulata*, and *K.*
526 *ohmeri* contribute to the cheese's aromatic complexity enrichment with alcohols, fatty acids,
527 and esters given a wide range of sensory notes.

528

529 3.5. Principal Component Analysis

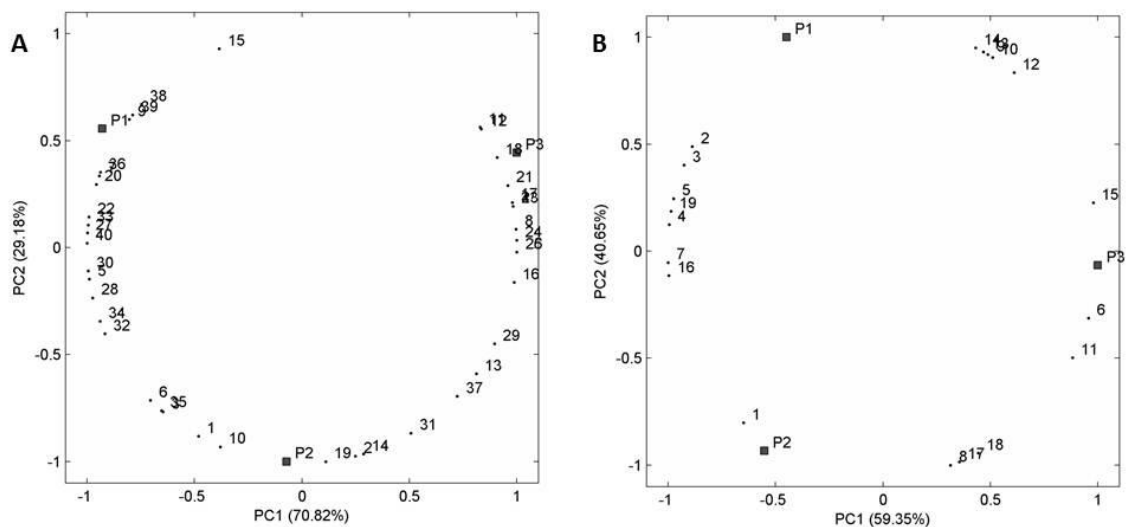
530

531 Principal component analysis was performed to simplify data from volatile profile (Fig.
532 4a) and fungal community (Fig. 4b) of Canastra cheeses from three different farmhouses. The
533 results made it possible to precisely distinguish each sample, as can be seen in Figure 3. The
534 analysis shows all three samples differ among themselves for the two parameters available. PC1
535 described 70.82% and 59.35% of the variation in Fig. 3a and Fig. 3b, respectively.

536 In P1, a great occurrence of the following volatile compounds Acetic acid, 2-methyl-
537 butanoic acid, ethyl butanoate, 2-nonanone, 2-undecanone, 8-Nonen-2-one was observed. In
538 addition, the species *C. catenulata*, *C. cladosporioides* (complex), *Trichothecium sp.*, *T.*
539 *coremiiforme*, and *Kluyveromyces lactis* were more abundant in P1. *Fusarium sp.*, *Geotrichum*
540 *candidum* and *Gibellulopsis sp.* were observed most frequently in sample P2. The same
541 happened with the compounds 2,3-butanediol, 2-heptanol, butanoic acid, hexanoic acid and δ -
542 octalactone, which were associated with sample P2. Additionally, decanoic acid, dodecanoic
543 acid, octanoic acid, propanoic acid, decanoic acid ethyl ester, dodecanoic acid ethyl ester,
544 *Aspergillus niger*, *Aspergillus versicolor* and *Acremonium sp.* were more abundant in P3.

545 Although they are not presented in the PCA, some volatile and species were identified
546 only in one sample. For instance, 1-heptanol, α -aminoisopropyl alcohol, tridecanoic acid, 1-
547 methylpropyl ester acetic acid, 2-phenylethyl ester acetic acid, 1-ethenylhexyl ester butanoic
548 acid, propyl ester butanoic acid, 2-tridecanone, 3-methylphenol, methoxy phenyl oxime, delta-

549 decalactone, *Trichosporon japonicum*, and *Alternaria sp.* were identified only in sample P1.
 550 However, 1-Hepten-3-ol, 1-Octen-3-ol, 3-Ethyl-2-pentanol, 1-Butanol-3-methyl-acetate,
 551 Isopentyl hexanoate, 3-Octanone, *Kodamaea ohmeri*, *Penicillium brevicompactum*, *Aspergillus*
 552 *fumigatus*, *Torulasporea delbrueckii*, *Candida guilliermondii* and *Candida intermedia* were only
 553 evidenced in P2. Finally, 5-Methyl-2-heptanol, myristic acid, pentanoic acid, butyl octanoate,
 554 isobutyl decanoate, octanoic acid ethyl ester, tetradecanoic acid ethyl ester, 2-dodecanone, 1,7-
 555 octadiene, *Scopulariopsis sp.* *Candida pararugosa* were identified only in sample P3.
 556



557

558 **Fig. 4.** Principal component analysis: (A) the volatile compounds and (B) the fungal diversity of
 559 P1, P2 and P3 samples of Artisanal Minas Cheese.

560 (A) 1. 2,3-Butanediol; 2. 2-Heptanol; 3. 2-Nonanol; 4. 2-Pentanol; 5. 3-Methyl-1-butanol; 6.
 561 Benzene ethanol; 7. Acetic acid; 8. Benzeneacetic acid; 9. Butanoic acid, 2-methyl-; 10.
 562 Butanoic acid; 11. Decanoic acid; 12. Dodecanoic acid; 13. Heptanoic acid; 14. Hexanoic acid;
 563 15. Isovaleric acid; 16. Nonanoic acid; 17. Octanoic acid; 18. Propanoic acid; 19. δ -
 564 Octalactone; 20. Ethyl butanoate; 21. Ethyl decanoate; 22. Delta-Nonalactone; 23. Ethyl
 565 dodecanoate; 24. Ethyl hexadecanoate; 25. Hexanoic acid, 2-hydroxy-, methyl ester; 26.
 566 Hexanoic acid, 2-methylpropyl ester; 27. Ethyl hexanoate; 28. Ethyl nonanoate; 29. Propanoic
 567 acid, 2-methyl-, 2-methylpropyl ester; 30. Propanoic acid, 2-methyl-, pentyl ester; 31. Propyl
 568 hexanoate; 32. 3-Methyl-1-butanal; 33. Benzeneacetaldehyde; 34. Nonanal; 35. 2-Heptanone;
 569 36. 2-Nonanone; 37. 2-Pentanone; 38. 2-Undecanone; 39. 8-Nonen-2-one; 40. Acetoin. (B) 1.
 570 *Fusarium sp.*; 2. *C. catenulata*; 3. *C. cladosporioides* (complex); 4. *Trichothecium sp.*; 5. *T.*
 571 *coremiiforme*; 6. *Acremonium sp.*; 7. *G. candidum*; 8. *Candida duobushaemulonii*; 9. *P.*
 572 *glabrum*; 10. *Penicillium sp. I*; 11. *Aspergillus versicolor*; 12. *Aspergillus sydowii*; 13.
 573 *Aspergillus melleus*; 14. *Aspergillus ochraceus*; 15. *Aspergillus niger*; 16. *Gibellulopsis sp.*;
 574 17. Morphotype 1; 18. Morphotype 2; 19. *Kluyveromyces lactis*.

575 **4. Conclusion**

576

577 The fungal community present in artisanal Minas cheese from Canastra is diverse and its
578 importance is underestimated. The present study provided a clear picture of the fungal diversity
579 of Canastra cheeses. It confirmed that the composition can vary from farm to farm and that the
580 relative proportions of yeasts and molds can change considerably. The most abundant acids
581 detected were hexanoic acid, octanoic acid, and decanoic acid; the most abundant ester
582 compounds were ethyl hexanoate, ethyl decanoate, and ethyl butanoate, and the most prevalent
583 ketones were 2-Nonanone, 2-Heptanone, and 2-Undecanone. Those compounds can be mainly
584 associated with the presence of *G. candidum*, *K. lactis*, *T. delbrueckii*, *C. catenulate*, and *K.*
585 *ohmerim*, which are responsible for the sensory notes of musty, oily, fruity, malt, burnt cheesy,
586 buttery, sweet, green, floral, waxy, among others. However, further studies should be
587 performed to identify the specific contribution and role of each species on Canastra cheese.

588

589 **Declaration of Competing Interest**

590

591 The authors declare that they have no known competing financial interests or personal
592 relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

593

594 **Acknowledgments**

595

596 This study was partly financed by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível
597 Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001. The authors also thank Conselho Nacional de
598 Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Brasil (CNPq) and Fundação de Amparo à
599 Pesquisa de MG (FAPEMIG) for the financial support.

600 **References**

601

602 Aminifar, M., Hamedi, M., Emam-Djomeh, Z., Mehdinia, A., 2014. Investigation on
603 proteolysis and formation of volatile compounds of Lighvan cheese during ripening. J.
604 Food Sci. Technol. 51, 2454–2462. <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0755-3>

605 Andrade, R.P., Melo, C.N., Genisheva, Z., Schwan, R.F., Duarte, W.F., 2017. Yeasts from
606 Canastra cheese production process: Isolation and evaluation of their potential for cheese
607 whey fermentation. Food Res. Int. 91, 72–79.
608 <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.11.032>

609 Andrade, R.P., Oliveira, D.R., Lopes, A.C.A., de Abreu, L.R., Duarte, W.F., 2019. Survival of
610 *Kluyveromyces lactis* and *Torulaspora delbrueckii* to simulated gastrointestinal conditions
611 and their use as single and mixed inoculum for cheese production. Food Res. Int. 125.
612 <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108620>

613 Anelli, P., Haidukowski, M., Epifani, F., Cimmarusti, M.T., Moretti, A., Logrieco, A., Susca,
614 A., 2019. Fungal mycobiota and mycotoxin risk for traditional artisan Italian cave cheese.
615 Food Microbiol. 78, 62–72. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.09.014>

616 Atanassova, M.R., Fernández-Otero, C., Rodríguez-Alonso, P., Fernández-No, I.C., Garabal,
617 J.I., Centeno, J.A., 2016. Characterization of yeasts isolated from artisanal short-ripened
618 cows' cheeses produced in Galicia (NW Spain). Food Microbiol. 53, 172–181.
619 <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.09.012>

620 Azzolini, M., Fedrizzi, B., Tosi, E., Finato, F., Vagnoli, P., Scrinzi, C., Zapparoli, G., 2012.
621 Effects of *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* mixed cultures on
622 fermentation and aroma of Amarone wine. Eur. Food Res. Technol. 235, 303–313.
623 <https://doi.org/10.1007/s00217-012-1762-3>

624 Baur, F.J., Ensminger, L.G., 1977. The Association of Official Analytical Chemists (AOAC).

- 625 J. Am. Oil Chem. Soc. 54, 171-172. <https://doi.org/10.3109/15563657608988149>
- 626 Boltar, I., Čanžek Majhenič, A., Jarni, K., Jug, T., Bavcon Kralj, M., 2015. Volatile compounds
627 in Nanos cheese: their formation during ripening and seasonal variation. J. Food Sci.
628 Technol. 52, 608–623. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1565-6>
- 629 Borelli, B.M., Ferreira, E.G., Lacerda, I.C.A., Franco, G.R., Rosa, C.A., 2006. Yeast
630 populations associated with the artisanal cheese produced in the region of Serra da
631 Canastra, Brazil. World J. Microbiol. Biotechnol. 22, 1115–1119.
632 <https://doi.org/10.1007/s11274-006-9151-3>
- 633 Brasil, 1996. Portaria MAPA - 146, de 07 de março de 1996. URL.
634 [https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/legislacoes/portaria-mapa-146-de-07-03-](https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/legislacoes/portaria-mapa-146-de-07-03-1996,669.html)
635 [1996,669.html](https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/legislacoes/portaria-mapa-146-de-07-03-1996,669.html)
- 636 Cardoso, V.M., Borelli, B.M., Lara, C.A., Soares, M.A., Pataro, C., Bodevan, E.C., Rosa, C.A.,
637 2015. The influence of seasons and ripening time on yeast communities of a traditional
638 Brazilian cheese. Food Res. Int. 69, 331–340.
639 <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.12.040>
- 640 Carmichael, J.W., 1957. *Geotrichum candidum*. Mycol. 49, 820-830.
641 <https://doi.org/10.2307/3755804>
- 642 Chombo-Morales, P., Kirchmayr, M., Gschaedler, A., Lugo-Cervantes, E., Villanueva-
643 Rodríguez, S., 2016. Effects of controlling ripening conditions on the dynamics of the
644 native microbial population of Mexican artisanal Cotija cheese assessed by PCR-DGGE.
645 LWT - Food Sci. Technol. 65, 1153–1161. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.09.044>
- 646 Collins, Y.F., McSweeney, P.L.H., Wilkinson, M.G., 2003. Lipolysis and free fatty acid
647 catabolism in cheese: A review of current knowledge. Int. Dairy J. 13, 841–866.
648 [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(03\)00109-2](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(03)00109-2)
- 649 De Santi, M., Sisti, M., Barbieri, E., Piccoli, G., Brandi, G., Stocchi, V., 2010. A combined

- 650 morphologic and molecular approach for characterizing fungal microflora from a
651 traditional Italian cheese (Fossa cheese). *Int. Dairy J.* 20, 465–471.
652 <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2010.02.004>
- 653 Decontardi, S., Mauro, A., Lima, N., Battilani, P., 2017. Survey of *Penicillia* associated with
654 Italian grana cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 246, 25–31.
655 <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.01.019>
- 656 Drake, M.A., Delahunty, C.M., 2017. Cheese: Chemistry, physics and microbiology. Chapter
657 20: Sensory character of cheese and its evaluation, fourth ed. Elsevier Ltd, United States,
658 pp. 517-545.
- 659 El-Sharoud, W.M., Belloch, C., Peris, D., Querol, A., 2009. Molecular identification of yeasts
660 associated with traditional egyptian dairy products. *J. Food Sci.* 74, p. M341-M346.
661 <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01258.x>
- 662 Eliskases-Lechner, F., Guéguen, M., Panoff, J.M., 2011. Yeasts and Molds: *Geotrichum*
663 *candidum*. *Encycl. Dairy Sci.* 765–771. [https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00365-4)
664 [4.00365-4](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00365-4)
- 665 EMATER, 2021. Programa Queijo Minas Artesanal. URL.
666 https://www.emater.mg.gov.br/portal.do?flagweb=site_tpl_queijo&id=3301
- 667 Fadda, M.E., Mossa, V., Pisano, M.B., Deplano, M., Cosentino, S., 2004. Occurrence and
668 characterization of yeasts isolated from artisanal Fiore Sardo cheese. *Int. J. Food*
669 *Microbiol.* 95, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.02.001>
- 670 Ferreira, D.F., 2014. Sisvar: um guia dos seus procedimentos de comparações múltiplas
671 *Bootstrap*. *Ciênc. Agrotec.* 2, 109-112.
- 672 Flórez, A.B., Mayo, B., 2006. Microbial diversity and succession during the manufacture and
673 ripening of traditional, Spanish, blue-veined Cabrales cheese, as determined by PCR-
674 DGGE. *Int. J. Food Microbiol.* 110, 165–171. <https://doi.org/10.1016/j>

- 675 Goerges S., Aigner U., Silakowski B., Scherer S., 2006. Inhibition of *Listeria monocytogenes*
676 by food-borne yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 313-318.
677 <https://10.1128/AEM.72.1.313-318.2006>
- 678 Globo Rural, 2019. Conheça os queijos brasileiros premiados na França. URL.
679 [https://revistagloborural.globo.com/Noticias/Criacao/Leite/noticia/2019/06/conheca-os-](https://revistagloborural.globo.com/Noticias/Criacao/Leite/noticia/2019/06/conheca-os-queijos-brasileiros-premiados-na-franca.html)
680 [queijos-brasileiros-premiados-na-franca.html](https://revistagloborural.globo.com/Noticias/Criacao/Leite/noticia/2019/06/conheca-os-queijos-brasileiros-premiados-na-franca.html)
- 681 Graham, J.R., Ellis, J.D., Benda, N.D., Kurtzman, C.P., Boucias, D.G., 2011. *Kodamaea ohmeri*
682 (Ascomycota: Saccharomycotin presence in commercial *Bombus impatiens* Cresson and
683 feral *Bombus pensylvanicus* DeGeer (Hymenoptera: Apidae) colonies. *J. Apic. Res.* 50,
684 218–226. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.50.3.06>
- 685 Hayaloglu, A.A., Tolu, C., Yasar, K., Sahingil, D., 2013. Volatiles and sensory evaluation of
686 goat milk cheese Gokceada as affected by goat breeds (Gokceada and Turkish Saanen)
687 and starter culture systems during ripening. *J. Dairy Sci.* 96, 2765–2780.
688 <https://doi.org/10.3168/jds.2012-6170>
- 689 Hernandez-Lopez, M.J., Prieto, J.A., Randez-Gil, F., 2003. Osmotolerance and leavening
690 ability in sweet and frozen sweet dough. Comparative analysis between *Torulaspota*
691 *delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeast strains. *Antonie Van*
692 *Leeuwenhoek*, 84, 125–134. <https://doi.org/10.1023/A:1025413520192>
- 693 Hymery, N., Vasseur, V., Coton, M., Mounier, J., Jany, J.L., Barbier, G., Coton, E., 2014.
694 Filamentous fungi and mycotoxins in Cheese: A review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*
695 13, 437–456. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12069>
- 696 IMA, 2020. Portaria IMA nº 1969 26 de março de 2020. Dispõe sobre a produção de Queuijo
697 Minas Artesanal. URL. <https://www.legisweb.com.br/legislacao/?id=391762>
- 698 INMET, 2021. Banco de dados meteorológicos do INMET. URL. <https://bdmep.inmet.gov.br/>
- 699 Jollivet, N., Chataud, J., Vayssier, Y., Bensoussan, M., Belin, J.M., 1994. Production of volatile

- 700 compounds in model milk and cheese media by eight strains of *Geotrichum candidum*
701 Link. J. Dairy Res. 61, 241–248. <https://doi.org/10.1017/S0022029900028259>
- 702 Jurado-Martín, I., Marcos-Arias, C., Tamayo, E., Guridi, A., de Groot, P.W.J., Quindós, G.,
703 Eraso, E., 2020. *Candida duobushaemulonii*: An old but unreported pathogen. J. Fungi 6,
704 1–11. <https://doi.org/10.3390/jof6040374>
- 705 Kandasamy, S., Park, W.S., Yoo, J., Yun, J., Kang, H.B., Seol, K.H., Oh, M.H., Ham, J.S.,
706 2020. Characterisation of fungal contamination sources for use in quality management of
707 cheese production farms in Korea. Asian-Australasian J. Anim. Sci. 33, 1002–1011.
708 <https://doi.org/10.5713/ajas.19.0553>
- 709 Kirtil, H.E., Metin, B., Arici, M., 2021. Identification of filamentous fungi in Turkish mold-
710 ripened cheeses and screening of mycotoxin genes of *Penicillium roqueforti* isolates. J.
711 Microbiol. Biotechnol. Food Sci. 10, 657–662.
712 <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2021.10.4.657-662>
- 713 Klich, M.A., 2002. Identification of common Aspergillus species, first ed. Centraalbureau voor
714 Schimmelcultures, Utrecht.
- 715 Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T., 2011. The yeasts, a taxonomic study, fourth ed.
716 Elsevier, Amsterdam.
- 717 Larsen, T.O., Frisvad, J.C., 1995. Characterization of volatile metabolites from 47 *Penicillium*
718 taxa. Mycol. Res. 99, 1153–1166. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80271-2](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80271-2)
- 719 Lavoie, K., Touchette, M., St-Gelais, D., Labrie, S., 2012. Characterization of the fungal
720 microflora in raw milk and specialty cheeses of the province of Quebec. Dairy Sci.
721 Technol. 92, 455–468. <https://doi.org/10.1007/s13594-011-0051-4>
- 722 Lund, F., Filtenborg, O., Frisvad, J.C., 1995. Associated mycoflora of cheese. Food Microbiol.
723 12, 173–180. [https://doi.org/10.1016/S0740-0020\(95\)80094-8](https://doi.org/10.1016/S0740-0020(95)80094-8)
- 724 McSweeney, P.L.H, 2004. Biochemistry of cheese ripening. Int. J. Dairy Technol. 57, 127–144.

- 725 <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2004.00147.x>
- 726 McSweeney, P.L.H., Sousa, M.J., 2000. Biochemical pathways for the production of flavour
727 compounds in cheeses during ripening: A review. *Lait* 80, 293–324.
728 <https://doi.org/10.1051/lait:2000127>
- 729 Metin, B., 2018. Filamentous fungi in cheese production. *Microb. Cult. Enzym. Dairy Technol.*
730 257–275. <https://doi.org/10.4018/978-1-5225-5363-2.ch014>
- 731 Molimard, P., Spinnler, H.E., 1996. Compounds involved in the flavor of surface mold-ripened
732 cheeses: Origins and properties. *J. Dairy Sci.* 79, 169–184.
733 [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(96\)76348-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(96)76348-8)
- 734 Montoya, A.M., Luna-Rodríguez, C.E., Bonifaz, A., Treviño-Rangel, R. de J., Rojas, O.C.,
735 González, G.M., 2021. Physiological characterization and molecular identification of
736 some rare yeast species causing onychomycosis. *J. Med. Mycol.* 31.
737 <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2021.101121>
- 738 Moubasher, A.A.H., Abdel-Sater, M.A., Soliman, Z.S.M., 2018. Yeasts and filamentous fungi
739 associated with some dairy products in Egypt. *J. Mycol. Med.* 28, 76–86.
740 <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2017.12.003>
- 741 Ni, Q., Gasperi, F., Aprea, E., Betta, E., Bergamaschi, M., Tagliapietra, F., Schiavon, S.,
742 Bittante, G., 2020. The volatile organic compound profile of ripened cheese is influenced
743 by crude protein shortage and conjugated linoleic acid supplementation in the cow's diet.
744 *J. Dairy Sci.* 103, 1377–1390. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16495>
- 745 Oliveira, D.F.de, Porto, M.A.C., Bravo, C.E.C., Tonial, I.B., 2013. Caracterização físico-
746 química de queijos Minas artesanal produzidos em diferentes microrregiões de Minas
747 Gerais. *R. Bras. Econ. Domest.* 24, 185-196.
748 <https://periodicos.ufv.br/oikos/article/viewFile/3679/1951>
- 749 Panelli, S., Brambati, E., Bonacina, C., Feligini, M., 2013. Diversity of fungal flora in raw milk

- 750 from the Italian Alps in relation to pasture altitude. Springerplus 2, 1–9.
751 <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-405>
- 752 Pasanen, P., Korpi, A., Kalliokoski, P., Pasanen, A.L., 1997. Growth and volatile metabolite
753 production of *Aspergillus versicolor* in house dust. Environ. Int. 23, 425–432.
754 [https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(97\)00027-5](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(97)00027-5)
- 755 Pasqualotto, A.C., Antunes, A.G.V., Severo, L.C., 2006. *Candida guilliermondii* as the
756 aetiology of candidosis. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 48, 123–127.
757 <https://doi.org/10.1590/S0036-46652006000300002>
- 758 Penland, M., Falentin, H., Parayre, S., Pawtowski, A., Maillard, M.B., Thierry, A., Mounier, J.,
759 Coton, M., Deutsch, S.M., 2021. Linking Pélardon artisanal goat cheese microbial
760 communities to aroma compounds during cheese-making and ripening. Int. J. Food
761 Microbiol. 345. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109130>
- 762 Pereira, D., 2018. Cultura do mofo no queijo está despertando no Brasil. URL.
763 [https://paladar.estadao.com.br/blogs/so-queijo/cultura-do-mofo-no-queijo-esta-](https://paladar.estadao.com.br/blogs/so-queijo/cultura-do-mofo-no-queijo-esta-despertando-no-brasil/)
764 [despertando-no-brasil/](https://paladar.estadao.com.br/blogs/so-queijo/cultura-do-mofo-no-queijo-esta-despertando-no-brasil/)
- 765 Pérez-Hansen, A., Lass-Flörl, C., Lackner, M., 2019. Antifungal susceptibility profiles of rare
766 ascomycetous yeasts. J. Antimicrob. Chemother. 74, 2649–2656.
767 <https://doi.org/10.1093/jac/dkz231>
- 768 Perin, L.M., Savo Sardaro, M.L., Nero, L.A., Neviani, E., Gatti, M., 2017. Bacterial ecology of
769 artisanal Minas cheeses assessed by culture-dependent and -independent methods. Food
770 Microbiol. 65, 160–169. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.02.005>
- 771 Pillonel, L., Ampuero, S., Tabacchi, R., Bosset, J.O., 2003. Analytical methods for the
772 determination of the geographic origin of Emmental cheese: Volatile compounds by
773 GC/MS-FID and electronic nose. Eur. Food Res. Technol. 216, 179–183.
774 <https://doi.org/10.1007/s00217-002-0629-4>

- 775 Pineda, A.P.A., Campos, G.Z., Pimentel-filho, N.D.J., Franco, B.D.G. de M., Pinto, U.M.,
776 2020. Overview on diversity and microbiological safety of Brazilian artisanal cheeses.
777 Prepr. 1, 1–24. <https://doi.org/10.20944/preprints202009.0123.v1>
- 778 Pinho, O., Pérès, C., Ferreira, I.M.P.L.V.O., 2003. Solid-phase microextraction of volatile
779 compounds in “Terrincho” ewe cheese: Comparison of different fibers. J. Chromatogr. A
780 1011, 1–9. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)01066-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)01066-5)
- 781 Pitt, J.I., Hocking, A.D., 1988. A laboratory guide to common *Penicillium* species. North Ryde,
782 NSW Australia: CSIRO Food Research Laboratory.
- 783 Polizzi, V., Adams, A., Malysheva, S.V., De Saeger, S., Van Peteghem, C., Moretti, A., Picco,
784 A.M., De Kimpe, N., 2012. Identification of volatile markers for indoor fungal growth and
785 chemotaxonomic classification of *Aspergillus* species. Fungal Biol. 116, 941–953.
786 <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2012.06.001>
- 787 Ramos et al (2014) <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25134720/>
- 788 Ramos, L.S., Figueiredo-Carvalho, M.H., Barbedo, L.S., Ziccardi, M., Chaves, A.L., Zancopé-
789 Oliveira, R.M., Pinto, M.R., Sgarbi, D.B., Dornelas-Ribeiro, M., Branquinha, M.H.,
790 Santos, A.L., 2014. *Candida haemulonii* complex: species identification and antifungal
791 susceptibility profiles of clinical isolates from Brazil. J. Antimicrob. Chemother. 70, 111-
792 5. <https://doi.org/10.1093/jac/dku321>
- 793 Resende, L.V., Pinheiro, L.K., Miguel, M.G.D.C.P., Ramos, C.L., Vilela, D.M., Schwan, R.F.,
794 2018. Microbial community and physicochemical dynamics during the production of
795 “Chicha”, a traditional beverage of Indigenous people of Brazil. World J. Microbiol.
796 Biotechnol. 34, 46. <https://doi.org/10.1007/s11274-018-2429-4>
- 797 Resende, M., Costa, H., Andrade, E., Acúrcio, L., Drummond, A.F., Cunha, A.F., Nunes, A.C.,
798 Souza, M.R., 2011. Queijarias nas populações de bactérias acidolácticas. Arq. Bras. Med.
799 Vet. Zootec. 63, 1567–1573. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352011000600039>

- 800 Roostita, R., Fleet, G.H., 1996. Growth of yeasts in milk and associated changes to milk
801 composition. *Int. J. Food Microbiol.* 31, 205–219. [https://doi.org/10.1016/0168-](https://doi.org/10.1016/0168-1605(96)00999-3)
802 1605(96)00999-3
- 803 Rychlik, T., Szwengiel, A., Bednarek, M., Arcuri, E., Montet, D., Mayo, B., Nowak, J.,
804 Czarnecki, Z., 2017. Application of the PCR-DGGE technique to the fungal community
805 of traditional Wielkopolska fried ripened curd cheese to determine its PGI authenticity.
806 *Food Control* 73, 1074–1081. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.10.024>
- 807 Samson, R.A., Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C., Filtenborg, O., 2002. Introduction to food-borne
808 fungi, sixth ed. Centraalbureau Voor Schimmelcultures, Utrecht, pp. 1–282.
- 809 Samson, R.A., Visagie, C.M., Houbraeken, J., Hong, S.B., Hubka, V., Klaassen, C.H.W.,
810 Perrone, G., Seifert, K.A., Susca, A., Tanney, J.B., Varga, J., Kocsubé, S., Szigeti, G.,
811 Yaguchi, T., Frisvad, J.C., 2014. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus
812 *Aspergillus*. *Stud. Mycol.* 78, 141–173. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.07.004>
- 813 Santos, M.T.P.G. dos, Benito, M.J., Córdoba, M. de G., Alvarenga, N., Herrera, S.R.M.S. de,
814 2017. Yeast community in traditional Portuguese Serpa cheese by culture-dependent and
815 -independent DNA approaches. *Int. J. Food Microbiol.* 262, 63–70.
816 <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.09.013>
- 817 Saravanan, P., Ramesh, S., Jaya, N., Jabasingh, S.A., 2021. Prospective evaluation of xylitol
818 production using *Dabaryomyces hansenii var hansenii*, *Pachysolen tannophilus*, and
819 *Candida guilliermondii* with sustainable agricultural residues. *Biomass Convers.*
820 *Biorefinery*. <https://doi.org/10.1007/s13399-020-01221-y>
- 821 SEBRAE, 2012. Indicação Geográfica. URL. <https://datasebrae.com.br/ig-canastra/#:~:text=A>
- 822 Silva, N. da, Junqueira, V.C.A., Silveira, N.F.A., Taniwaki, M.H., Santos, R.F.S., Gomes,
823 R.A.R., 2007. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. Livraria Varela,
824 São Paulo.

- 825 Silva, J.G., Abreu, R.L., Magalhães, F.A.R., Piccoli, R.H., Ferreira, E.B., 2011. Características
826 físico-químicas do queijo Minas artesanal da Canastra. *Rev. Inst. Latic.* "Cândido Tostes".
827 66, 16-22.
- 828 Singh, T.K., Drake, M.A., Cadwallader, K.R., 2003. Flavor of Cheddar Cheese: A chemical
829 and sensory perspective. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2, 166–189.
830 <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2003.tb00021.x>
- 831 Souza, T.P. de, Evangelista, S.R., Passamani, F.R.F., Bertechini, R., de Abreu, L.R., Batista,
832 L.R., 2021. Mycobiota of Minas artisanal cheese: safety and quality. *Int. Dairy J.* 120.
833 <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105085>
- 834 Spinnler, H., Genie, L. de, 2004. Surface Mould-ripened Cheeses. In: *Cheese: Chemistry,*
835 *physics and microbiology*, third ed. Academic Press, United States.
- 836 Suzuki-Iwashima, A., Matsuura, H., Iwasawa, A., Shiota, M., 2020. Metabolomics analyses of
837 the combined effects of lactic acid bacteria and *Penicillium camemberti* on the generation
838 of volatile compounds in model mold-surface-ripened cheeses. *J. Biosci. Bioeng.* 129,
839 333–347. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2019.09.005>
- 840 Szabó, M.P.J., Martins, M.M., de Castro, M.B., Pacheco, R.C., Tolesano-Pascoli, G.V., dos
841 Santos, K.T., Martins, T.F., de Souza, L.G.A., May-Junior, J.A., Yokosawa, J., Labruna,
842 M.B., 2018. Ticks (Acari: Ixodidae) in the Serra da Canastra National Park in Minas
843 Gerais, Brazil: species, abundance, ecological and seasonal aspects with notes on
844 rickettsial infection. *Exp. Appl. Acarol.* 76, 381–397. [https://doi.org/10.1007/s10493-018-](https://doi.org/10.1007/s10493-018-0300-9)
845 [0300-9](https://doi.org/10.1007/s10493-018-0300-9)
- 846 Welthagen, J.J., Viljoen, B.C., 1998. Yeast profile in Gouda cheese during processing and
847 ripening. *Int. J. Food Microbiol.* 41, 185–194. [https://doi.org/10.1016/S0168-](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00042-7)
848 [1605\(98\)00042-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00042-7)