



**JOÃO PEDRO MARINHO GUIMARÃES**

**CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DO QUEIJO  
MINAS ARTESANAL DA CANASTRA COMO FERRAMENTA  
PARA DEFINIÇÃO DA MICROBIOTA *TERROIR***

**LAVRAS - MG  
2022**

**JOÃO PEDRO MARINHO GUIMARÃES**

**CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DO QUEIJO MINAS ARTESANAL DA  
CANASTRA COMO FERRAMENTA PARA DEFINIÇÃO DA MICROBIOTA  
*TERROIR***

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

Prof. Dr. Luís Roberto Batista  
Orientador (a)

**LAVRAS - MG  
2022**

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

Guimarães, João Pedro Marinho.

Caracterização microbiológica do Queijo Minas Artesanal da  
Canastra como ferramenta para definição da microbiota *terroir* /

João Pedro Marinho Guimarães. - 2022.

48 p.

Orientador(a): Luís Roberto Batista.

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

Bibliografia.

1. Queijos Brasileiros. 2. Minas Gerais. 3. Diversidade  
Microbiológica. I. Batista, Luís Roberto. II. Título.

**JOÃO PEDRO MARINHO GUIMARÃES**

**CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DO QUEIJO MINAS ARTESANAL DA  
CANASTRA COMO FERRAMENTA PARA DEFINIÇÃO DA MICROBIOTA  
*TERROIR***

**MICROBIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF MINAS ARTISANAL CHEESE  
AS A TOOL FOR TERROIR MICROBIOTA DEFINITION**

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

APROVADA em 28 de abril de 2022

Dr. Cleube Andrade Boari UFVJM

Dra. Jaqueline de Paula Rezende UFLA

Prof. Dr. Luís Roberto Batista  
Orientador (a)

**LAVRAS - MG  
2022**

*À Deus, pelas infinitas bênçãos.  
À minha família por terem me apoiado  
e incentivado incondicionalmente.  
Dedico*

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, agradeço a Deus pelo dom da vida e pelas infinitas bênçãos.

Agradeço à Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos pelo acolhimento e por me permitir conhecer tantas pessoas que tão fortemente me marcaram.

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ). À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig), pelo suporte financeiro.

Ao meu orientador, professor Dr. Luís Roberto Batista, agradeço pelos ensinamentos, pelo apoio e entendimento.

Aos produtores de Queijo Minas Artesanal da Serra da Canastra, obrigado pela disponibilização das amostras e por se dedicarem a tão poético ofício.

Agradeço aos amigos do Laboratório de Micologia e Micotoxinas de Alimentos pelos incontáveis exemplos de companheirismo, pelos ensinamentos e por terem deixado a caminhada mais leve.

Aos demais amigos da UFLA, obrigado pelos momentos vividos.

Aos meus pais José Fernandes e Flávia, agradeço pelo amor incondicional. Ao meu irmão, agradeço pelo apoio.

À minha esposa Júlia, obrigado por ter sido tão compreensiva e por toda a ajuda ao longo destes anos.

Aos meus filhos, Miguel e Davi, obrigado por darem um novo sentido à minha vida.

**OBRIGADO!**

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito.  
Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Martin Luther King)

## RESUMO

Os produtores de Queijo Minas Artesanal da Serra da Canastra buscam conhecer a microbiota presente neste alimento. Tal conhecimento pode auxiliar inclusive na elaboração de legislações e na obtenção do selo de Indicação Geográfica. Neste trabalho, o sequenciamento amplicon no gene 16S rRNA (bactérias) e na região ITS (fungos) foram utilizados para caracterizar a microbiota presente no queijo Minas artesanal da Canastra, em virtude da influência dos fatores ambientais e do local de produção sobre as características sensoriais do produto. Os resultados das análises bacterianas revelaram que o filo Firmicutes foi predominante, representado pelos gêneros *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* e *Leuconostoc*, mostrando que as bactérias ácido lácticas prevaleceram nas populações bacterianas em todas as amostras. No caso das análises fúngicas, a maioria dos fungos detectados pertenciam ao filo Ascomycota, representado pelos gêneros *Dipodascus*, *Ditutina*, *Deboryomyces* e *Trichosporon*, sendo que as espécies mais abundantes foram *Geotrichum candidum*, *Candida catenulata* e *Debaryomyces prosopidis*. As análises de diversidade obtidas, indicaram uma notável variação da microbiota do queijo Canastra entre as fazendas produtoras, demonstrando que existe uma diferença entre os processos de produção utilizados pelos queijeiros, além da mesma ser afetada também pelos fatores anteriormente mencionados.

Palavras chaves: Queijos Brasileiros. Minas Gerais. Tradição. Diversidade Microbiológica.

## ABSTRACT

Producers of Minas Artisanal Cheese from the Canastra Region are interested in understanding the microbiota of this product. Such knowledge can even help to elaborate legislation and to obtain the Geographical Indication seal. Amplicon sequencing of the 16S rRNA gene (bacteria) and ITS region (fungi) were used in this study to characterize the microbiota present in Minas artisanal cheese from the Canastra region due to the influence that environmental factors and production sites have on the sensory characteristics of this product. Results of bacterial analyzes revealed that the phylum Firmicutes was predominant, represented by the genera *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, and *Leuconostoc*. This fact shows that lactic acid bacteria prevailed in bacterial populations in all samples. When it comes to the fungal analyzes, most of the detected fungi belonged to the phylum Ascomycota, represented by the genera *Dipodascus*, *Ditutina*, *Deboryomyces*, and *Trichosporon*. The most abundant species were *Geotrichum candidum*, *Candida catenulata*, and *Debaryomyces prosopidis*. Diversity analyzes indicated a notable variation in the microbiota of Minas artisanal cheese from Canastra among farms, which demonstrates an existing difference between the practices used by the cheesemakers and reinforces that the factors previously mentioned really affect the products.

Keywords: Brazilian cheese. Minas Gerais. Tradition. Microbiological Diversity.

## LISTA DE FIGURAS

### PRIMEIRA PARTE

Figura 1 – Fermentação láctica.....	18
Figura 2 – Localização da Serra da Canastra no estado de Minas Gerais, Brasil.....	22
Figura 3 – Queijo Minas Artesanal da Canastra.....	23
Figura 4 – Fluxograma do processo de produção do Queijo Minas Artesanal da Canastra.....	24
Figura 5 – Etapas de processamento de uma amostra para uma análise metagenômica.....	25
Figura 6 – Representação esquemática das etapas de uma análise metagenômica direcionada... .....	26
Figura 7 – Representação esquemática das etapas de uma análise metagenômica shot-gun.....	26
Figura 8 – Ribossomo procariótico. A: Estrutura tridimensional de um rRNA 16S com seus domínios; B: Estrutura tridimensional com as proteínas ribossomais (23S; 5S e 16S).....	27

### SEGUNDA PARTE

Figura 1 – Índice de diversidade alfa do sequenciamento amplicon na região 16S.....	40
Figura 2 – Análise da comunidade fúngica dominante de QMA da Canastra em nível de espécie.....	43
Figura 3 – Índice de diversidade alfa do sequenciamento amplicon na região ITS.....	44

## LISTA DE TABELAS

### SEGUNDA PARTE

Tabela 1 – Porcentagem do número total de OTUs no sequenciamento amplicon na região 16S.....	39
Tabela 2 – Porcentagem do número total de OTUs no sequenciamento amplicon na região ITS.....	42

## SUMÁRIO

	<b>PRIMEIRA PARTE – INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>12</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>15</b>
<b>2.1</b>	<i>Terroir</i> .....	<b>15</b>
<b>2.2</b>	Indicação Geográfica Protegida.....	<b>15</b>
<b>2.3</b>	Queijo.....	<b>16</b>
<b>2.4</b>	Produção de queijos artesanais no estado de Minas Gerais.....	<b>21</b>
<b>2.4.1</b>	Queijo Minas Artesanal da Canastra.....	<b>21</b>
<b>2.5</b>	Metagenômica.....	<b>25</b>
<b>3</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>28</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>29</b>
	<b>SEGUNDA PARTE.....</b>	<b>34</b>
	<b>ARTIGO 1 – Caracterização microbiológica do Queijo Minas Artesanal da Canastra como ferramenta para definição da microbiota <i>terroir</i>.....</b>	<b>34</b>
	<b>RESUMO.....</b>	<b>35</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>36</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>37</b>
<b>2.1</b>	Amostras de Queijo.....	<b>37</b>
<b>2.2</b>	Extração do material genético.....	<b>37</b>
<b>2.3</b>	Sequenciamento e preparação da biblioteca.....	<b>38</b>
<b>2.4</b>	Análises de Bioinformática.....	<b>38</b>
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>39</b>
<b>3.1</b>	Sequenciamento amplicon da região 16S rRNA.....	<b>39</b>
<b>3.2</b>	Sequenciamento amplicon da região ITS.....	<b>42</b>
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>45</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>46</b>

## **PRIMEIRA PARTE – INTRODUÇÃO GERAL**

## 1. INTRODUÇÃO

Segundo a Portaria Nº 146 de 7 de março de 1996, o queijo é definido como um produto fresco ou maturado obtido da separação parcial do soro do leite, coagulado pela ação do coalho ou enzimas específicas, com ou sem adição de condimentos. O queijo maturado é aquele que passou por reações bioquímicas, e, por isso, possui características físicas e sensoriais específicas. O queijo fresco por sua vez, é definido como um produto que, logo após a sua fabricação, está adequado para o consumo. É importante ser dito que a denominação “queijo” é reservada aos produtos que não contêm gordura e/ou proteínas de origem não láctea. Para aqueles queijos comercializados como artesanais, a lei nº 13860 de 18 de julho de 2019 declara que, esses produtos devem receber essa denominação caso sejam elaborados por métodos tradicionais e com o emprego das Boas Práticas Agropecuárias e de Fabricação (BRASIL, 2019a).

O estado de Minas Gerais é o maior produtor de queijos do Brasil, sendo conhecido inclusive pela diversidade de tipos desse produto (SANT'ANNA *et al.*, 2019). Dentre os queijos mais produzidos nesse estado está o Queijo Minas Artesanal (QMA), o qual teve seu modo de produção considerado como Patrimônio Cultural do Brasil pelo Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional (IPHAN, 2020). A tradição do queijo no estado de Minas Gerais, tem destaque em oito microrregiões, reconhecidas pela Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Minas Gerais (EMATER) como produtoras de QMA (EMATER, 2020 a).

O QMA da Canastra é conhecido entre os queijos artesanais brasileiros. Produzido na região da Serra da Canastra é obtido a partir de leite cru, coagulante e uma cultura *starter* chamada de “pingo”, originada do soro do leite coletado da produção do dia anterior. O QMA da Canastra é comercializado com 14 dias de maturação, e seu processo de fabricação não inclui tratamento térmico. A legislação brasileira exige esse período mínimo de maturação, devido as características do processo de fabricação (IMA, 2021).

O QMA Canastra é considerado um patrimônio cultural brasileiro, com grande importância econômica para a região, onde cerca de 800 produtores rurais estão envolvidos com sua produção. A região produz em torno de seis mil toneladas de queijo por ano e, de acordo com o Anuário do Leite, no ano de 2018 estima-se que foram utilizados diariamente 135 mil litros de leite para fabricação do QMA Canastra, com uma média 170 litros por produtor (EMBRAPA, 2019).

O processo de fabricação dos queijos é significativamente influenciado pelos fatores ambientais do local de produção. Tais fatores alteram, conseqüentemente, as características sensoriais do produto final. De acordo com a Organização Mundial da Propriedade Intelectual, a Indicação Geográfica é um sinal utilizado em itens que tenham uma origem geográfica específica e apresentem características que sejam atribuídas aos seus locais de origem (WIPO, 2020). Bisson *et al.* (2002), afirmam que esse sistema é baseado no termo *terroir*, o qual é usado para descrever todos os aspectos geográficos de um ambiente que podem influenciar a produção de um determinado produto, como queijo, por exemplo.

A Indicação Geográfica assegura que somente produtos fabricados em determinada região recebam certa denominação, conferindo autenticidade a esses produtos e alavancando a economia local (WIPO, 2020). Nesse sentido, estudos que investiguem a relação entre o local de produção de uma região específica e a composição microbiana dos queijos são fundamentais para evitar que consumidores sejam enganados por meio da compra de produtos falsificados.

Algumas pesquisas estão sendo realizadas utilizando métodos independentes de cultivo, para determinar a microbiota presente nos alimentos, inclusive em queijos artesanais (PERIN *et al.*, 2017; MARTINS *et al.*, 2018). Esses métodos permitem maior sensibilidade em comparação aos métodos tradicionais de cultivo, como também, possibilita a identificação de microrganismos não cultiváveis (NDOYE *et al.*, 2011). Diante disso, o objetivo deste trabalho foi caracterizar a microbiota de queijos fabricados em cinco queijarias da microrregião da Canastra, visando contribuir para a definição do *terroir* do QMA da Canastra, por meio do sequenciamento de amplicon no gene 16S (V3-V4) para bactérias e a região ITS (3F+4R) para espécies fúngicas.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 *Terroir*

A Organização das Nações Unidas para a Educação, Ciência e Cultura (UNESCO) define *terroir* como uma área geográfica limitada onde uma comunidade humana gera e acumula, ao longo de sua história, um conjunto de características culturais distintas, conhecimentos e práticas baseados em um sistema de interações entre fatores biofísicos e humanos (UNESCO, 2005). Tal termo é geralmente utilizado quando se refere a produtos com história, que estão envolvidos em conhecimento compartilhado e em saber-fazer local, de forma que os fatores naturais e humanos levam a produtos com características únicas (BARHAM, 2003). A União Europeia utilizou o conceito de *terroir* como base em suas indicações geográficas, as quais são conhecidas como Denominação de Origem Protegida (DOP), que promovem e protegem os nomes dos produtos, tais como Champagne, nome dado ao vinho espumante produzido na região de Champagne na França e Camembert, queijo maturado originário da região de Normandia, Noroeste da França (TURBES *et al.*, 2016).

Estudos realizados em produtos como o vinho, café e azeite mostraram que suas características sensoriais são relacionadas ao território de produção. Nos casos de produtos lácteos, e mais especificamente dos queijos, essa relação com a área de produção se mostrou ainda mais complexa (TURBES *et al.*, 2016). Sabe-se que a superfície dos tetos da vaca é a principal fonte de bactérias úteis à fabricação do queijo que estão presentes no leite (VACHEYROU *et al.*, 2011). Os ambientes de produção e maturação dos queijos também constituem fontes extremamente ricas de microrganismos (IRLINGER *et al.*, 2015). Outro fator capaz de alterar a composição química e a qualidade sensorial do leite e, por consequência, do queijo, é a dieta das vacas. Tal alteração pode ser observada quando diferentes plantas são introduzidas na alimentação dos animais (RAPISARDA *et al.*, 2013). Assim o *terroir* exerce influência na aceitabilidade dos queijos por parte dos consumidores, a qual é dependente de propriedades sensoriais específicas, entre elas o aroma e o sabor (TILOCCA *et al.*, 2020).

### 2.2 Indicação Geográfica Protegida

O Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI), autarquia criada em 1970 no Brasil, é responsável por conceder as Indicações Geográficas no país. O órgão define Indicação Geográfica (IG) como um ativo industrial cuja utilização permite identificar a origem de um

produto ou serviço quando o local se torna conhecido ou quando uma característica/qualidade do produto é devida à sua origem geográfica. A primeira proteção de uma identidade geográfica data do século XVIII, quando o termo “Porto” foi registrado pelo governo português para ser usado em vinhos (INPI, 2019).

A distinção de alimentos a partir de suas características específicas e de suas origens geográficas pode protegê-los de possíveis falsificações e, conseqüentemente, de uma possível concorrência desleal (RYCHLIK *et al.*, 2017). Portanto, ao especificarem os locais de origem dos produtos registrados, as indicações geográficas geram oportunidades de negócios que estão diretas ou indiretamente relacionadas a eles, podendo também se tornarem ferramentas de preservação do patrimônio cultural e natural (SAUTIER; BIÉNABE; CERDAN, 2011).

Uma indicação geográfica pode ser constituída de uma Indicação de Procedência ou de uma Denominação de Origem. Considerando-se todas as Indicações Geográficas concedidas no Brasil até o ano de 2018, aproximadamente 72% se referem a Indicação de Procedência e 28% a Denominação de Origem (INPI, 2018).

A indicação de procedência é estabelecida de acordo com o nome geográfico do território (país, cidade ou região) desde que ele seja conhecido como centro da extração, produção ou fabricação do produto ou da prestação de um serviço (INPI, 2018). Esse conceito não está relacionado a fatores locais ou a características geológicas, fisiográficas ou humanas. A denominação de origem, por sua vez, é inserida quando as características de um produto são influenciadas essencialmente ou exclusivamente pelo local de origem, seja ele país, cidade ou região, incluindo seus fatores naturais e humanos. Nesse caso, a Instrução Normativa Nº 95, de 28 de dezembro de 2018 do INPI define que os fatores naturais são aqueles pertencentes ao próprio meio geográfico e relacionados ao meio ambiente, tais como: solo, relevo, clima e flora. A instrução define ainda que os fatores humanos são aqueles pertencentes à comunidade produtora ou prestadora dos serviços. Um exemplo de fator humano é o saber-fazer local, o qual inclui o desenvolvimento, adaptação ou aperfeiçoamento de técnicas próprias.

### **2.3 Queijo**

O queijo é um alimento fermentado a base de leite, que teve sua produção iniciada há cerca de 8000 anos no Oriente Médio. Suas formulações foram adaptadas ao longo do tempo, de forma a se adequarem às condições técnicas, sociais e econômicas de diferentes partes do mundo. São conhecidos mais de 1000 tipos de queijos, a maioria artesanal, com diferentes variedades de texturas, aspectos visuais, aromas e sabores. Isso ocorre, pois, diferentes

combinações dos ingredientes e variações nos parâmetros de produção levam a produtos diferenciados e com propriedades únicas (FOX *et al.*, 2000; MONTEL *et al.*, 2014).

O processo de fabricação do queijo convencional é iniciado pelo tratamento térmico de pasteurização do leite, que visa a inativação dos microrganismos patogênicos. Após o resfriamento (~ 36 °C) do leite, é adicionado a quimosina, enzima responsável pela coagulação do leite (coalho). A coagulação enzimática é o processo de formação de um gel firme a partir da interação das proteínas do leite. As proteínas do leite podem ser divididas em dois grandes grupos, as proteínas do soro e as caseínas. As caseínas correspondem à cerca de 80% das proteínas lácteas e são as proteínas formadoras do coágulo após a adição do coalho. Existem 4 tipos de caseínas:  $\alpha$ S1-,  $\alpha$ S2-,  $\beta$ - e  $\kappa$ -caseína, que são conhecidas como frações de caseína. Essas frações interagem entre si e estão presentes no leite em forma de diversos agregados proteicos conhecidos como micelas de caseína. As frações de  $\kappa$ -caseínas apresentam cadeias polipeptídicas (169 aminoácidos) com uma região mais hidrofóbica e outra região mais hidrofílica que se encontra próxima à interface das micelas de caseína. Quando o coalho é adicionado ao leite, a quimosina cliva a ligação peptídica na posição 105-106 liberando o segmento mais hidrofílico (106-169), conhecido como glicomacropéptido (GMP), no soro. Enquanto o outro segmento hidrofóbico (1-105), chamado de para-caseína  $\kappa$ , permanece na estrutura das micelas de caseína. A liberação do GMP reduz a repulsão estérica que existia entre as estruturas micelares, favorecendo a agregação das proteínas para a formação do gel. A presença de cálcio também contribui para a formação do gel porque ele diminui a repulsão eletrostática entre as micelas. Assim, a agregação das caseínas (para-caseína  $\kappa$ ,  $\alpha$ S1-,  $\alpha$ S2- e  $\beta$ -caseínas) através dos grupos fosfatos da serina juntamente com o cálcio dão origem ao coágulo (paracaseinato de cálcio). Após a coagulação, o soro é removido na etapa de dessoragem. Depois, a massa formada é prensada para liberar a umidade e os produtos obtidos após a prensa são encaminhados para a maturação (FOX *et al.*, 2015). A maturação é considerada uma etapa crucial na fabricação do queijo, visto que, os eventos bioquímicos e microbiológicos que ocorrem nessa fase, conferem os atributos sensoriais do produto (KHATTAB *et al.*, 2019).

A etapa de fermentação é responsável pelo desenvolvimento do sabor dos queijos. Neste processo, as bactérias lácticas metabolizam a lactose, principal carboidrato do leite, transformando-a em lactato, por meio do processo de glicólise (Figura 1) (KHATTAB *et al.*, 2019). As bactérias lácticas são microrganismos Gram-positivos que podem ser classificadas em homofermentativas, quando apenas o lactato é originado como produto da fermentação, e heterofermentativas que produzem lactato, etanol e CO<sub>2</sub> (MADIGAN *et al.*, 2016).

Figura 1 – Fermentação láctica (Continua).

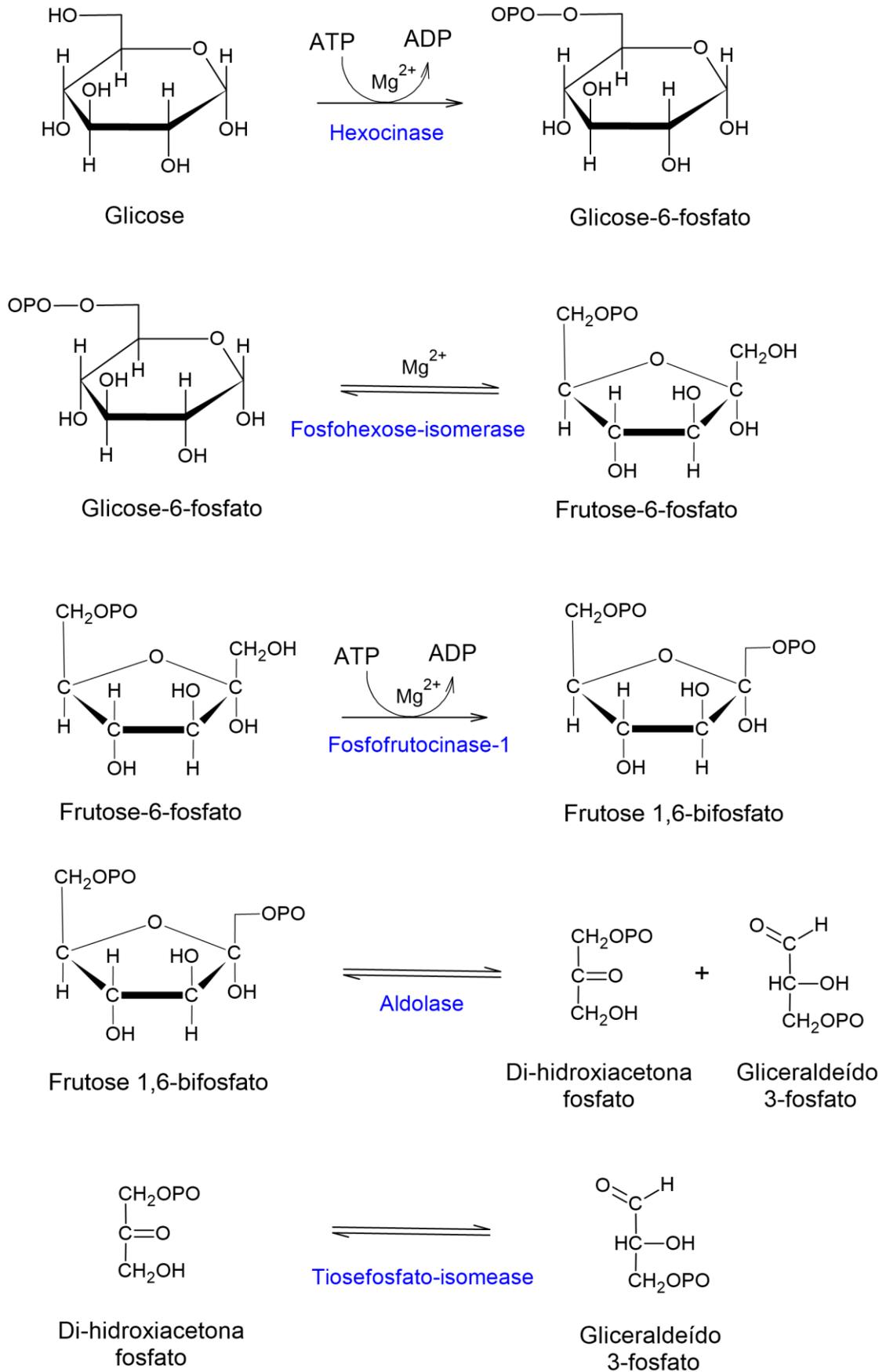
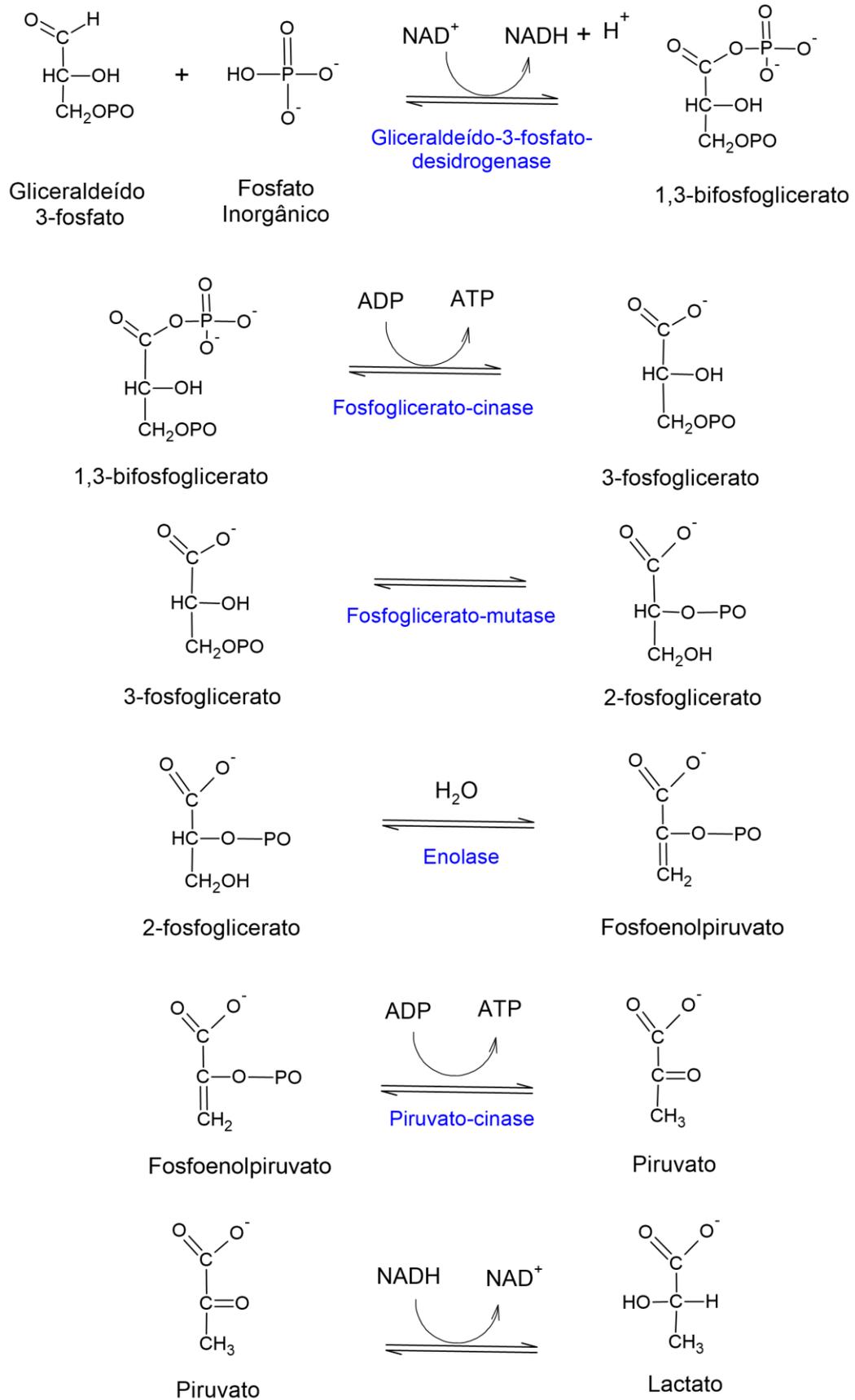


Figura 1 – Fermentação láctica (Conclusão).



Fonte: Cox; Nelson (2014).

As diferenças entre as bactérias lácticas podem ser determinadas pela presença ou ausência da enzima aldolase. Verifica-se que as bactérias lácticas homofermentativas possuem essa enzima e, por esta razão, produzem dois lactatos por molécula de glicose fermentada, isto é, duas moléculas iguais do produto final. Diferentemente das heterofermentativas, que devido à ausência da enzima aldolase, são incapazes de clivar a frutose 1,6-bifosfato em gliceraldeído 3-fosfato e di-hidroxiacetona fosfato. As etapas do catabolismo desses microrganismos são pela via das pentoses fosfato. Por esse motivo, a glicose 6-fosfato é oxidada a 6-fosfogluconio e em seguida ocorre a descarboxilação, originando a pentose fosfato. A enzima fosfoctolase é responsável por converter a pentose fosfato em gliceraldeído 3-fosfato e acetil fosfato. Sendo assim, diferentes moléculas são formadas como produtos finais (MADIGAN *et al.*, 2016).

Além do metabolismo da lactose, outras reações bioquímicas, como a proteólise e a lipólise, contribuem para as características sensoriais dos queijos maturados. A proteólise é o processo de hidrólise da caseína em peptídeos hidrofóbicos, realizada por enzimas proteolíticas, induzindo desta forma, as mudanças na textura do queijo. As degradações enzimáticas das proteínas e dos peptídeos, durante a maturação, contribuem para a formação de compostos orgânicos voláteis, os quais causam um efeito no sabor (GAN *et al.*, 2016).

A proteólise é considerada a reação bioquímica mais complexa que ocorre durante a maturação, sendo catalisada inicialmente pela ação de enzimas presentes nos coagulantes e também pela enzima plasmina, naturalmente encontrada no leite, e pelas proteinases e peptidases, originárias das bactérias do ácido láctico e de outros microrganismos que crescem no queijo (ARAGÃO, 2018). Essa etapa é responsável por intensificar o sabor, e por isso é considerada um bom parâmetro para avaliar o grau de maturação, sendo avaliado por meio da determinação do conteúdo de proteína total e proteína solúvel. Com o avanço do tempo de maturação estes índices tendem a aumentar devido ao aumento no conteúdo de proteína solúvel (MILKPOINT, 2021). Por isso, à medida que aumenta o tempo de maturação, também há o aumento no grau de proteólise, como observado no estudo de Joyner *et al.*, (2018).

A lipólise é caracterizada pela hidrólise dos triacilglicerídeos com a liberação de ácidos graxos livres de cadeia curta, formados pela segunda via da lipólise. Apesar desses compostos conferirem sabores característicos dos queijos, o excesso é indesejável em alguns tipos de queijos, como Cheddar e Gouda. Entretanto, para queijos do tipo azul e italianos duros, a lipólise favorece a formação do sabor característico do produto (COLLINS; MCSWEENEY; WILKINSON, 2003; XIA *et al.*, 2020). Dentre alguns ácidos graxos de cadeia curta que são relatados na literatura estão: ácidos hexanóico, octanóico e decanóico (GAN *et al.*, 2016; SALUM *et al.*, 2018). Os ácidos graxos livres, por sua vez, são precursores de vários compostos

orgânicos voláteis, formados pelas reações com os álcoois. O principal álcool formado é o etanol, e por essa razão, os ésteres etílicos, que são predominantes no queijo são butanoato de etila, hexanoato de etila, acetato de etila, octanoato de etila, decanoato de etila e hexanoato de metila (McSWEENEY, 2011).

## **2.4 Produção de queijos artesanais no estado de Minas Gerais**

No Brasil alguns queijos artesanais são nomeados de acordo com a região ou estado em que são produzidos, devido a conotação histórica e alta relevância econômica (BEMFEITO *et al.*, 2016). O estado de Minas Gerais é o maior produtor de queijos do Brasil, sendo conhecido inclusive pela diversidade de tipos desse produto (SANT'ANNA *et al.*, 2019). Dentre os queijos mais produzidos nesse estado está o Queijo Minas Artesanal (QMA), o qual teve seu modo de fazer considerado como Patrimônio Cultural do Brasil pelo Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional (IPHAN, 2020). A tradição do queijo no estado de Minas Gerais, com destaque para oito microrregiões (Araxá, Campo das Vertentes, Canastra, Cerrado, Serra do Salitre, Serro, Triângulo Mineiro e Serra de Ibitipoca) reconhecidas pela Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Minas Gerais (EMATER) como produtoras de Queijo Minas Artesanal (EMATER, 2020a).

### **2.4.1 Queijo Minas Artesanal da Canastra**

O Queijo Minas Artesanal da Canastra é um produto artesanal produzido na região da Serra da Canastra no estado de Minas Gerais, Sudeste do Brasil (Figura 2). É obtido a partir de leite cru, coalho e uma cultura starter chamada de “pingo” (originada do soro do leite coletado da produção do dia anterior). O QMA da Canastra é comercializado com 14 dias de maturação e seu processo de fabricação não inclui processamento térmico. A legislação brasileira exige esse período mínimo de maturação, devido as características do processo de fabricação (IMA, 2021). É importante ser dito que além de conferir os atributos sensoriais do produto, a maturação também desempenha um papel relevante para a segurança alimentar, visto que, os microrganismos endógenos e aqueles responsáveis pela fermentação, são produtores de substâncias orgânicas que inibem o crescimento de patógenos (McSWEENEY *et al.*, 2017).

Figura 2 – Localização da Serra da Canastra no estado de Minas Gerais, Brasil.



Fonte: Adaptado de Kamimura *et al.* (2019).

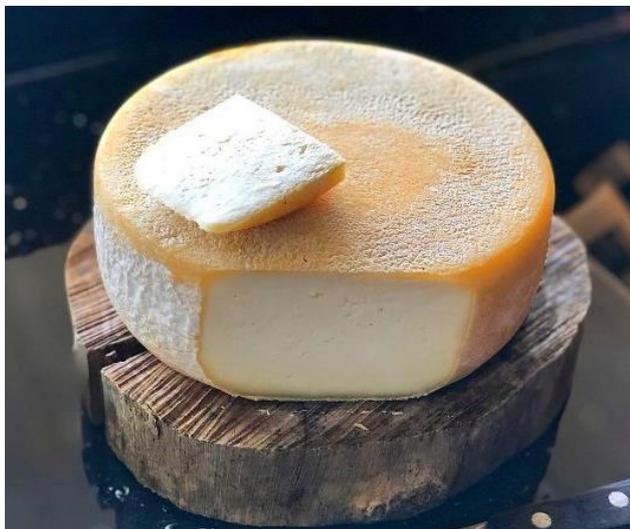
Visando a padronização do processo de fabricação de queijos artesanais, como também a comercialização, em 2002, o Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) e a Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Minas Gerais (EMATER-MG) criou o Programa Queijo Minas Artesanal (PQMA) (EMATER, 2020b). O registro do PQMA permite utilizar a denominação “Queijo Minas Artesanal Canastra”, somente para os queijos que são produzidos na região da Serra da Canastra. Apesar disso, apenas em 2011, o INPI concedeu o selo de Indicação Geográfica ao queijo Canastra (APROCAN, 2011).

É importante ser dito, que os produtores cadastrados na PQMA podiam comercializar os queijos somente no estado de Minas Gerais. Houve, entretanto, uma mudança nesta restrição em 2018, quando a Lei N° 13.680 de 14 de junho de 2018, permitiu a comercialização interestadual dos produtos artesanais de origem animal, desde que estes produtos possuíssem o selo ARTE, certificado que comprova que o produto foi elaborado de forma artesanal (BRASIL, 2018).

O queijo Canastra é considerado um patrimônio cultural brasileiro, com grande importância econômica para a região, com cerca de 800 produtores rurais envolvidos na sua produção. A região produz em torno seis mil toneladas de queijo por ano, e de acordo com o Anuário do Leite, no ano de 2018, estima-se que foram utilizados diariamente 135 mil litros de

leite para fabricação do queijo, com uma média 170 litros por produtor (EMBRAPA, 2019). O QMA da Canastra é considerado um dos queijos brasileiros mais antigos e tradicionais feitos com leite cru (DORES; NÓBREGA, FERREIRA, 2013). Entre seus aspectos sensoriais podem destacar: crosta fina com coloração amarela e sem rachaduras, massa branco amarelada, consistência semi-dura e sabor levemente ácido (Figura 3). Essas características estão presentes neste queijo devido ao clima da região, caracterizado com dias quentes e noites frias. Em relação a composição química, Amarante (2015) relata que o QMA da Canastra possui em torno de 45% de umidade; 0,5% de acidez titulável; 19% de proteína; 24% de gordura e 2% de cloreto de sódio.

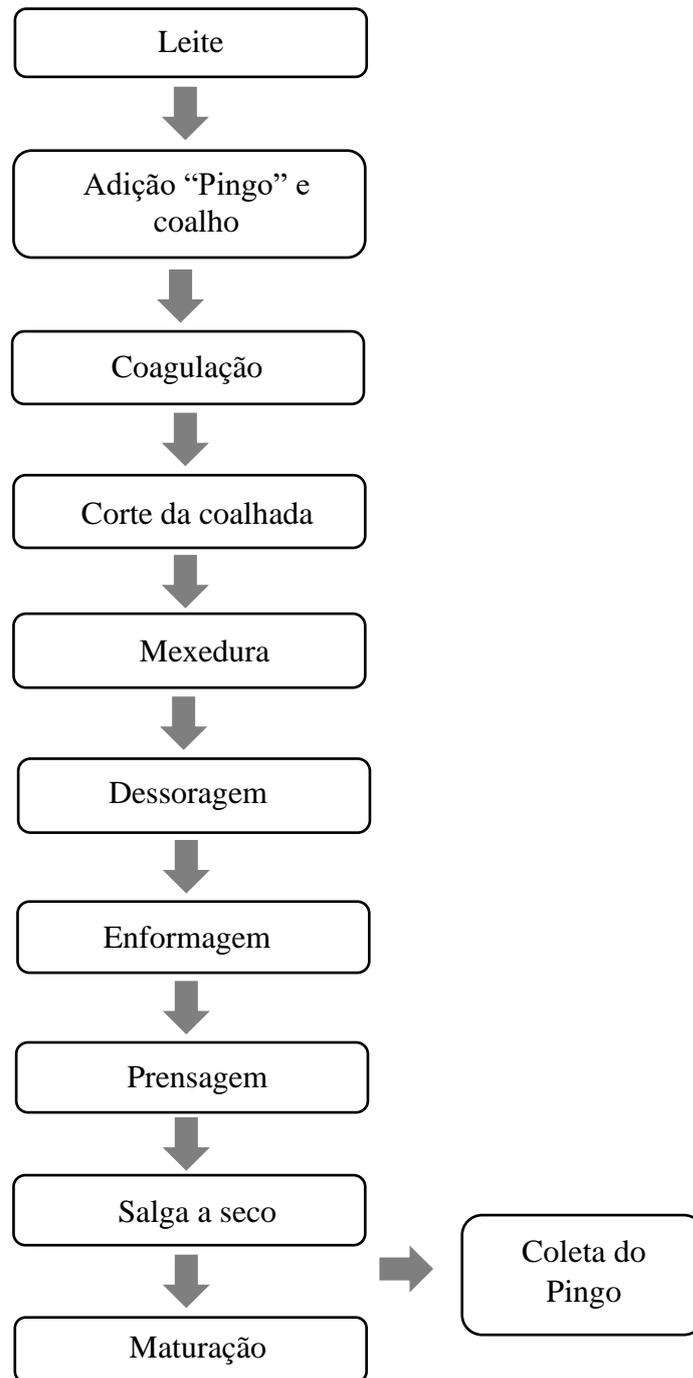
Figura 3 – Queijo Minas Artesanal da Canastra



Fonte: Fazenda São Roque (2022).

Como supracitado, existem oito microrregiões produtoras de queijo artesanal em Minas Gerais. Essa divisão é baseada nas condições ambientais (vegetação, altitude, temperatura e umidade relativa), bem como, pelas características tradicionais do processo de fabricação. São esses fatores que conferem os atributos sensoriais e físico-químicos aos produtos. Apesar das etapas do processo serem semelhantes entre as microrregiões, os fatores climáticos influenciam o crescimento de determinados microrganismos, principalmente durante o período de maturação, resultando em um produto com uma composição microbiana específica. Desta forma, o saber-fazer de cada região associado com as condições ambientais, contribui para a identidade de cada queijo artesanal (KAMIMURA *et al.*, 2019). Na Figura 4, estão ilustradas as etapas do processo de fabricação do queijo Canastra.

Figura 4 – Fluxograma do processo de produção do Queijo Minas Artesanal Canastra

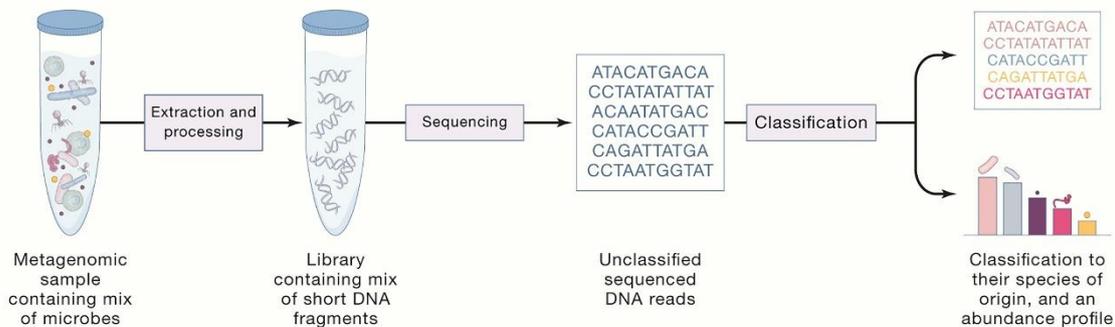


Fonte: Adaptado de Kamimura *et al.* (2019).

## 2.5 Metagenômica

A metagenômica é uma tecnologia baseada na biologia molecular, que possibilita determinar as sequências gênicas de uma comunidade microbiana, pertencente a um ambiente específico. O termo metagenômica foi definido pela primeira vez por Handelsman *et al.* (1998), e, ao contrário dos métodos dependentes de cultivo, a metagenômica identifica a diversidade e a genética microbiana, devido a extração de vários fragmentos de nucleotídeos que são analisados através da bioinformática (Figura 5) (CHEN *et al.*, 2022; HANDELSMAN *et al.*, 1998).

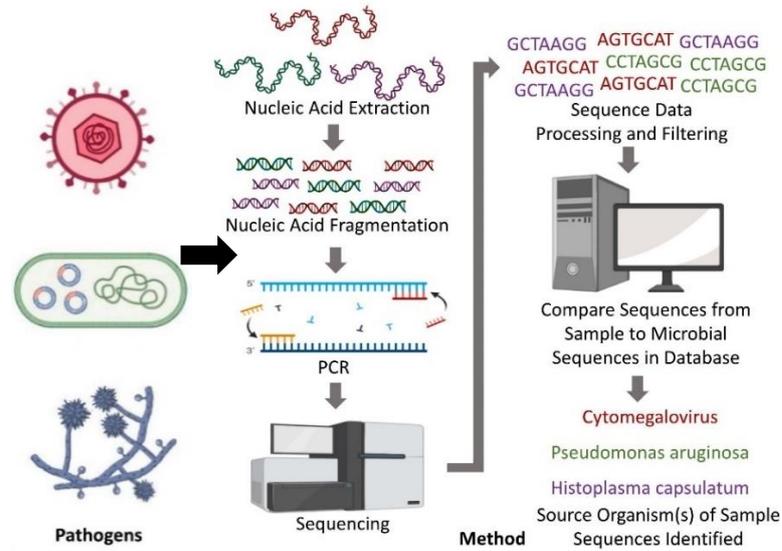
Figura 5 – Etapas de processamento de uma amostra para uma análise metagenômica.



Fonte: Ye *et al.* (2019).

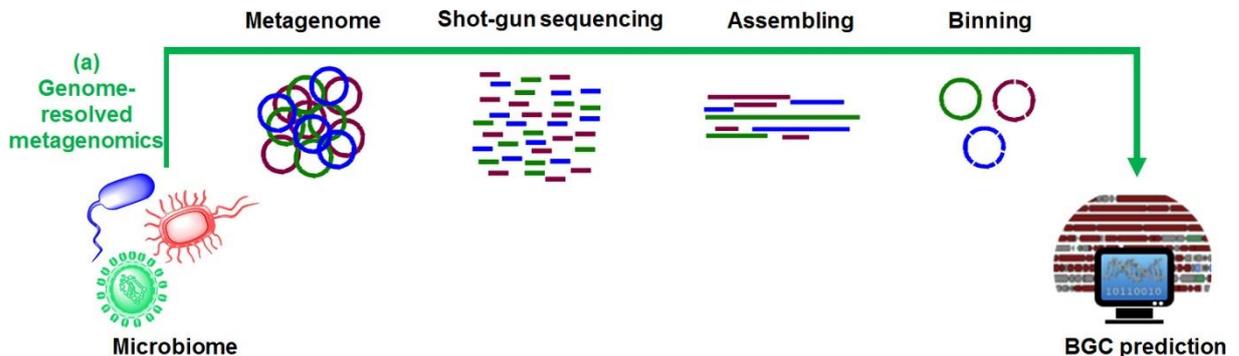
As análises metagenômicas tornaram-se mais conhecidas com o surgimento do Sequenciamento de Próxima Geração – Next Generation Sequencing (NGS). Essa tecnologia é classificada em duas abordagens, divididas conforme o alvo e o tipo de informação obtida, sendo elas: a metagenômica direcionada, a qual é baseada na amplificação da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em uma região específica, como rRNA 16S (Figura 6). Esse procedimento fornece a classificação taxonômica de uma variedade de microrganismos. Diferentemente, a metagenômica *shot-gun* determina todas as características genômicas, inclusive os genes de resistência e fatores de virulência. Na Figura 7, encontra-se a representação esquemática das etapas de uma análise de metagenômica *shot-gun* (AMRANE; LAGIER, 2018; JOBIN; VEERARAGHAVAN; VASUDEVAN, 2019).

Figura 6 – Representação esquemática das etapas de uma análise metagenômica direcionada.



Fonte: Adaptado de Casto; Fredricks; Hill (2021).

Figura 7 – Representação esquemática das etapas de uma análise metagenômica shot-gun



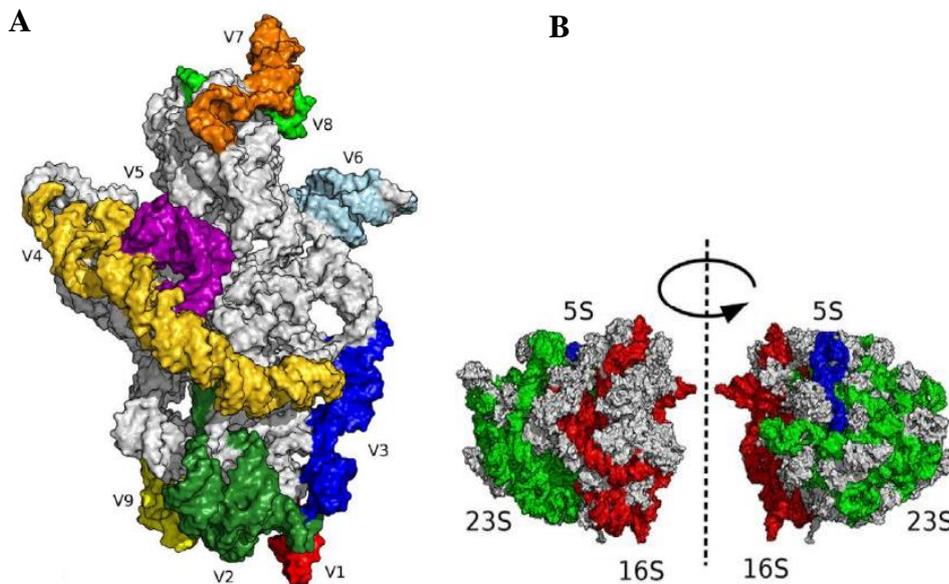
Fonte: Adaptado de Wu *et al.* (2021).

Todas as análises metagenômicas são iniciadas com o controle de qualidade das leituras de sequência, removendo todas as de baixa qualidade e aquelas que não são do ambiente. Essas sequências são alinhadas com as sequências dos genes que são conhecidas nas ferramentas. Entre as vantagens conhecidas desta técnica, podem destacar a rapidez e a sensibilidade, no entanto, são necessários recursos computacionais e treinamento especializado. Apesar de ser uma análise relativamente onerosa, o avanço da tecnologia permitiu que a metagenômica tornasse mais acessível, possibilitando um maior conhecimento em diferentes áreas, entre elas, a ecologia microbiana, taxonomia, bioquímica e biologia evolutiva (TAŞ *et al.*, 2021).

O ribossomo é considerado a peça chave dos processos celulares. Por esse motivo, o rRNA16S é considerado um padrão filogenético para o estudo da filogenia procariótica. O ribossomo procariótico é composto por 65% rRNA e 35% de proteína. Sua estrutura é formada

por duas subunidades (maior e menor) que se associam para formar um ribossomo completo. Os rRNAs são enovelados em estruturas que contêm alguns domínios (Figura 8A), e são responsáveis por posicionar tRNAs sobre o mRNA, iniciando desta forma, o processo de tradução. Além dessa função, os ribossomos também atuam como catalisadores, e por essa razão, são considerados como ribozima. É importante ser dito que os ribossomos eucarióticos e procarióticos possuem estruturas e funções similares, sendo que a subunidade menor fornece uma região adequada para o pareamento dos tRNAs com os códons do mRNA, enquanto a subunidade maior, catalisa a formação das ligações peptídicas que unem os aminoácidos, formando a cadeia polipeptídica. No caso dos ribossomos procarióticos, a subunidade maior (50S) contém duas moléculas de rRNA (5S e 23S), ao passo que a subunidade menor (30S) contém apenas uma molécula de rRNA (16S) (Figura 8B). Este último, é considerado o principal marcador molecular devido especialmente a três características básicas, sendo elas: estar presente em todos os microrganismos conhecidos; é pouco submetido a transferência lateral de genes e apresenta regiões extremamente conservadas e variáveis (ALBERTS *et al.*, 2017; RAMAZZOTTI; BACCI, 2018). No caso das espécies fúngicas, a região de interesse para o sequenciamento, é a Espaçador Transcrito Interno (ITS), considerado a região ideal para capturar a diversidade fúngica (LIU *et al.*, 2015).

Figura 8 – Ribossomo procariótico. A: Estrutura tridimensional de um rRNA 16S com os seus domínios; B: Estrutura tridimensional com as proteínas ribossomais (23S; 5S e 16S).



Fonte: Adaptado de Ramazzotti; Bacci (2018).

### 3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Os gêneros bacterianos predominantes identificados foram: *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* e *Leuconostoc*, mostrando que as bactérias ácido lácticas prevaleceram em todas as amostras;
- Os gêneros fúngicos dominantes foram *Dipodascus*, *Ditutina*, *Deboryomyces* e *Trichosporon*, sendo que as espécies mais abundantes foram *Geotrichum candidum*, *Candida catenulata* e *Debaryomyces prosopidis*;
- Os resultados mostraram uma notável variação da microbiota do queijo Canastra entre as fazendas produtoras.
- A determinação da microbiota *terroir* do QMA da Canastra se faz importante uma vez que as características deste produto são diretamente influenciadas por esses microrganismos, além do fato do produto em questão ser importante para a economia de forma geral. Ainda, a metagenômica é uma ferramenta independente de cultivo de grande valia na busca pela determinação desta microbiota por permitir a identificação de um amplo espectro de microrganismos, muitos deles não identificáveis por técnicas cultivo-dependentes.

## REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B. *et al.* *Biologia molecular da célula*. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.
- AMARANTE, J. O. A. **Queijos do Brasil e do mundo para iniciantes e apreciadores**. Mescla Editorial, 2015.
- AMRANE, S.; LAGIER, J. C. Metagenomic and clinical microbiology. **Human Microbiome Journal**, v. 9, p. 1-6, 2018.
- ARAGÃO, M.O.P. **Diversidade de fungos filamentosos e leveduras em Queijo Minas Artesanal das Microrregiões do Serro e Serra da Canastra**. 2018. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2018.
- ASSOCIAÇÃO DE PRODUTORES DE QUEIJO CANASTRA. **APROCAN**. 2011. Disponível em: <<http://www.sertaobras.org.br/blog/2011/12/20/nota-da-aprocan-sobre-certificacao-de-registro-de-indicacao-geografica/>>. Acesso em 11 de março de 2022.
- BARHAM, E. Translating terroir: the global challenge of French AOC labeling. **Journal of Rural Studies**, 19, n. 1, p. 127-138, 2003.
- BEMFEITO, R. M. *et al.* Temporal dominance of sensations sensory profile and drivers of liking of artisanal Minas cheese produced in the region of Serra da Canastra, Brazil. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 10, p. 7886-7897, 2016.
- BISSON, L. F. *et al.* The present and future of the international wine industry. **Nature**, 418, p. 696-699, 2002.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria Nº 146 de 07 de março 1996**. Brasília, DF.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Lei Nº 13680, de 14 de junho de 2018**. Brasília, DF.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Lei Nº 13860, de 18 de julho de 2019**. Brasília, DF. 2019a.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Decreto nº 9.918, de 18 de julho de 2019**. Brasília, DF. 2019b.
- CASTO, A. M.; FREDRICKS, D. N.; HILL, J. A. Diagnosis of infectious diseases in immunocompromised hosts using metagenomic next generation sequencing-based diagnostics. **Blood Reviews**, 2021.
- CHEN, G. *et al.* Application of metagenomics to biological wastewater treatment. **Science of The Total Environment**, v. 807, 2022.

COLLINS, Y. F; MCSWEENEY, P. L. H; WILKINSON, M. G. Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. **International Dairy Journal**, v. 13, n. 11, p. 841-866, 2003.

DORES, M. T.; NOBREGA, J. E.; FERREIRA, C. L. L. F. Room temperature aging to guarantee microbiological safety of Brazilian artisan Canastra cheese. **Food Science and Technology**, v. 33, p. 180-185, 2013.

EMPRESA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL DO ESTADO DE MINAS GERAIS – EMATER. 2020 a. **Serras da Ibitipoca é identificada como a 8ª região produtora de queijo minas artesanal**. Disponível em:

<[https://www.emater.mg.gov.br/portal.do?flagweb=novosite\\_pagina\\_interna&id=25333](https://www.emater.mg.gov.br/portal.do?flagweb=novosite_pagina_interna&id=25333)>. Acesso em 27 de março de 2022.

EMPRESA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL DO ESTADO DE MINAS GERAIS. **O Programa**. 2020 b. Disponível em:

<[http://www.emater.mg.gov.br/portal.cgi?flagweb=site\\_tpl\\_queijo&id=3299](http://www.emater.mg.gov.br/portal.cgi?flagweb=site_tpl_queijo&id=3299)>. Acesso em 11 de março de 2022.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Anuário Leite 2019**.

Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1109959>>. Acesso em 09 de março de 2022.

FAZENDA SÃO ROQUE. 2022. **A Canastra online**. Disponível em:

<<https://www.acanastraonline.com.br/queijocanastrareal>>. Acesso em 27 de março de 2022.

FOX, P. F. *et al.* Chemistry and biochemistry of cheese. In: Dairy chemistry and biochemistry. Springer, Cham, 2015. p. 499-546.

FOX, P.F. *et al.* Fundamentals of cheese science. Gaithersburg, MD, United States of America: Aspen Publications, 2000.

GAN, H. H. *et al.* Development and validation of an APCI-MS/GC-MS approach for the classification and prediction of Cheddar cheese maturity. **Food Chemistry**, v. 190, p. 442–447.

INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. Governo do estado de Minas Gerais. **Portaria Nº 2051, de 07 de abril de 2021**. Belo Horizonte, MG.

INSTITUTO DO PATRIMÔNIO HISTÓRICO E ARTÍSTICO NACIONAL DE MINAS.

**Identidade Mineira**. 2020. Disponível em: <<http://portal.iphan.gov.br/pagina/detalhes/612>> Acesso em: 20 de janeiro de 2020.

INSTITUTO NACIONAL DE PROPRIEDADE INDUSTRIAL. Ministério da Indústria, Comércio Exterior e Serviços. **Instrução Normativa Nº 095, 28 de dezembro de 2018**. Brasília, DF.

INSTITUTO NACIONAL DE PROPRIEDADE INDUSTRIAL. **Guia básico de Indicação Geográfica**. 2019. Disponível em: <<http://www.inpi.gov.br/menu-servicos/indicacao-geografica>>. Acesso em: 10 fev. 2020.

IRLINGER, F. *et al.* Cheese rind microbial communities: diversity, composition and origin. **FEMS Microbiology Letters**, 362, n. 2, 2015.

JOBIN, J.; VEERARAGHAVAN, B.; VASUDEVAN, K. Metagenomic next-generation sequencing in clinical microbiology. **Indian journal of medical microbiology**, v. 37, n. 2, p. 133-140, 2019.

JOYNER, H. S. *et al.* The effect of storage temperature on blue cheese mechanical properties. **Journal of texture studies**, v. 49, n. 3, p. 309-319, 2018.

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

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

KHATTAB, A. R. *et al.* Cheese ripening: A review on modern technologies towards flavor enhancement, process acceleration and improved quality assessment. **Trends in Food Science & Technology**, v. 88, p. 343-360, 2019.

LIU, J. *et al.* Comparison of ITS and 18S rDNA for estimating fungal diversity using PCR–DGGE. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 9, p. 1387-1395, 2015.

MADIGAN, M.Y. *et al.* Microbiologia Brock. 14 Ed., Editora: Artmed, 2016, 1032p.

MARTINS, M. C. F. *et al.* Bacterial diversity of artisanal cheese from the Amazonian region of Brazil during the dry and rainy seasons. **Food Research International**, v. 108, p. 295-300, 2018.

McSWEENEY, P. L. H. Cheese: Biochemistry of cheese ripening. Encyclopedia of dairy sciences, p. 667–674.

McSWEENEY P.L.H. Queijo: Química, física e microbiologia (4<sup>a</sup> ed.), Academic Press (2017).

MILKPOINT. **Boas práticas de fabricação em queijarias artesanais**. Disponível em: <<https://www.milkpoint.com.br/colunas/lipaufv/boas-praticas-de-fabricacao-em-queijarias-artesanais-227631/>> Acesso em: 11 de fevereiro de 2022.

MONTEL, M. C. *et al.* Traditional cheeses: Rich and diverse microbiota with associated benefits. **International Journal of Food Microbiology**, v. 177, p. 136-154, 2014.

NELSON, D.L; COX, M.M. Princípios de bioquímica de Lehninger. 6 ed., Editora: Artmed, 2014, 1250 p.

NDOYE, B. *et al.* A review of the molecular approaches to investigate the diversity and activity of cheese microbiota. **Dairy Science & Technology**, v. 91, n. 5, p. 495-524, 2011.

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

RAMAZZOTTI, M.; BACCI, G. 16S rRNA-based taxonomy profiling in the metagenomics era. In: **Metagenomics**. Academic Press, 2018. p. 103-119.

RAPISARDA, T. *et al.* Variability of volatile profiles in milk from the PDO Ragusano cheese production zone. **Dairy Science & Technology**, 93, n. 2, p. 117-134, 2013.

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**, 73, p. 1074-1081, 2017.

SALUM, P. *et al.* Composition, proteolysis, lipolysis, volatile compound profile and sensory characteristics of ripened white cheeses manufactured in different geographical regions of Turkey. **International dairy journal**, v. 87, p. 26-36, 2018.

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

SAUTIER, D.; BIÉNABE, E.; CERDAN, C. Geographical indications in developing countries. **Labels of Origin for Food: Local Development, Global Recognition**, p. 138-153, 2011.

TAŞ, N. *et al.* Metagenomic tools in microbial ecology research. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 67, p. 184-191, 2021.

TILOCCA, B. *et al.* Milk microbiota: Characterization methods and role in cheese production. **Journal of Proteomics**, v. 210, 2020.

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

UNESCO. Organização das Nações Unidas para Educação, Ciência e Cultura. **The Future Needs Terroirs**. 2005. Disponível em: <[http://www.unesco.org/new/fileadmin/MULTIMEDIA/HQ/SC/pdf/sc\\_mab\\_terroirs\\_EN.pdf](http://www.unesco.org/new/fileadmin/MULTIMEDIA/HQ/SC/pdf/sc_mab_terroirs_EN.pdf)> Acessado em: 12 de junho de 2020.

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

WIPO. World Intellectual Property Organization. **Geographical Indications**. Disponível em: <[https://www.wipo.int/geo\\_indications/en/](https://www.wipo.int/geo_indications/en/)> Acesso em: 18 de janeiro de 2020.

WU, C. *et al.* Metagenomic sequencing-driven multidisciplinary approaches to shed light on the untapped microbial natural products. **Drug discovery today**, v. 27, n.3, p. 730-742, 2021.

XIA, Y. *et al.* Proteolysis, lipolysis, texture and sensory properties of cheese ripened by *Monascus fumeus*. **Food Research International**, v. 137, 2020.

YE, S. H. *et al.* Benchmarking metagenomics tools for taxonomic classification. **Cell**, v. 178, n. 4, p. 779-794, 2019.

## SEGUNDA PARTE

**ARTIGO 1** – Caracterização microbiológica do Queijo Minas Artesanal da Canastra como ferramenta para definição da microbiota *terroir*

João Pedro Marinho Guimarães<sup>1</sup>, Luís Roberto Batista<sup>1\*</sup>

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

\*Autor correspondente:

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

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

E-mail: luisrb@dca.ufla.br

## RESUMO

Neste trabalho, os sequenciamentos amplicon no gene 16S rRNA (bactérias) e na região ITS (fungos) foram utilizados para caracterizar a microbiota presente no queijo Canastra, em virtude da influência que os fatores ambientais e do local de produção têm sobre as características sensoriais do produto. Os resultados das análises bacterianas revelaram 75.005 OTUs (*Operational Taxonomic Units*), pertencentes à 4 filos e 12 gêneros. O filo Firmicutes foi predominante, representados majoritariamente pelos gêneros *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* e *Leuconostoc*, mostrando que as bactérias ácido lácticas prevaleceram nas populações bacterianas em todas as amostras. No caso das análises fúngicas, 357.736 OTUs foram encontradas pertencentes a 2 filos e a 13 gêneros. A maioria dos fungos detectados pertenciam ao filo Ascomycota, representados pelos gêneros *Dipodascus*, *Ditutina*, *Deboryomyces* e *Trichosporon*, sendo que as espécies mais abundantes foram *Geotrichum candidum*, *Candida catenulata* e *Debaryomyces prosopidis*. As análises de diversidade obtidas, indicaram uma notável variação da microbiota do queijo Canastra entre as fazendas produtoras, demonstrando que existe uma diferença entre os processos de produção utilizados pelos queijeiros, além da mesma ser afetada também pelos fatores anteriormente mencionados.

Palavras chaves: Queijos Brasileiros. Minas Gerais. Tradição. Diversidade Microbiológica.

## ABSTRACT

Amplicon sequencing of the 16S rRNA gene (bacteria) and ITS region (fungi) were used in this study to characterize the microbiota present in Minas artisanal cheese from the Canastra region due to the influence that environmental factors and production sites have on the sensory characteristics of this product. Results of bacterial analyzes revealed that the phylum Firmicutes was predominant, represented by the genera *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, and *Leuconostoc*. This fact shows that lactic acid bacteria prevailed in bacterial populations in all samples. When it comes to the fungal analyzes, most of the detected fungi belonged to the phylum Ascomycota, represented by the genera *Dipodascus*, *Ditutina*, *Deboryomyces*, and *Trichosporon*. The most abundant species were *Geotrichum candidum*, *Candida catenulata*, and *Debaryomyces prosopidis*. Diversity analyzes indicated a notable variation in the microbiota of Minas artisanal cheese from Canastra among farms, which demonstrates an

existing difference between the practices used by the cheesemakers and reinforces that the factors previously mentioned really affect the products.

Keywords: Brazilian cheese. Minas Gerais. Tradition. Microbiological Diversity.

## 1. INTRODUÇÃO

O estado de Minas Gerais é o maior produtor de queijos do Brasil, sendo conhecido inclusive pela diversidade de tipos desse produto (SANT'ANNA *et al.*, 2019). Dentre os queijos mais produzidos nesse estado está o Queijo Minas Artesanal (QMA), o qual teve seu modo de fazer considerado como Patrimônio Cultural do Brasil pelo Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional (IPHAN, 2020).

O queijo Canastra é conhecido entre os queijos artesanais brasileiros, produzido na Serra da Canastra e obtido a partir de leite cru, coagulante e uma cultura *starter* chamada de “pingo”, originada do soro do leite coletado da produção do dia anterior. O queijo Canastra é comercializado com 22 dias de maturação e seu processo de fabricação não inclui tratamento térmico. A legislação brasileira exige esse período mínimo de maturação, devido as características do processo de fabricação (IMA, 2021). Como supracitado, o queijo Canastra é considerado um patrimônio cultural brasileiro, e possui grande importância econômica para a região com cerca de 800 produtores rurais envolvidos numa produção de aproximadamente seis mil toneladas por ano (EMBRAPA, 2019).

O processo de fabricação dos queijos artesanais é influenciado diretamente pelos fatores ambientais do local de produção, tais como temperatura e altitude. Tais fatores alteram as características físico-químicas e sensoriais do produto final, atuando sobretudo no crescimento de determinados microrganismos (KAMIMURA *et al.*, 2019a). De acordo com a Organização Mundial da Propriedade Intelectual, a Indicação Geográfica é um sinal utilizado em itens que tenham uma origem geográfica específica e apresentem características que sejam atribuídas aos seus locais de origem (WIPO, 2020). Bisson *et al.* (2002), afirmam que esse sistema é baseado no termo *terroir*, o qual é usado para descrever todos os aspectos geográficos de um ambiente que podem influenciar a produção de um determinado produto.

A Indicação Geográfica permite que os produtores de determinada região possam assegurar que somente os produtos ali produzidos recebam certa denominação, conferindo autenticidade a esses produtos e alavancando a economia local (WIPO, 2020). Estudos que avaliem a ligação entre o local de produção de uma região específica e a composição microbiana

dos queijos, são necessários para evitar que consumidores sejam enganados por meio da compra de produtos falsificados. Em vista disso, algumas pesquisas estão sendo realizadas utilizando métodos independentes de cultivo, para determinar a microbiota presente nos alimentos, inclusive em queijos artesanais (PERIN *et al.*, 2017; MARTINS *et al.*, 2018). Esses métodos permitem maior sensibilidade em comparação aos métodos tradicionais de cultivo, como também, possibilita a identificação de microrganismos não cultiváveis (NDOYE *et al.*, 2011). Diante disso, o objetivo deste trabalho foi caracterizar a microbiota de queijos produzidos em cinco queijarias da região da Serra da Canastra, visando contribuir para a definição do *terroir* do queijo Canastra, por meio do sequenciamento de amplicon na região 16S (V3-V4) para bactérias e a região ITS (3F+4R) para as espécies fúngicas.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Amostras de Queijo**

Os queijos foram produzidos e maturados no último trimestre de 2020, época das águas, por um período superior a 14 dias, em cinco queijarias produtoras certificadas, localizadas nas cidades de São Roque de Minas e Medeiros, na microrregião da Canastra, Minas Gerais, Brasil. Foram coletadas uma amostra de cada produtor e codificadas como: QC1 (20°15'31.4"S 46°22'39.9"W, 883m de altitude), QC2 (20°06'44.3"S 46°15'13.2"W, 887m de altitude), QC3 (20°12'30"S 46°21'35"W, 860m de altitude), QC4 (20°12'47.8"S 46°21'22.8"W, 809m de altitude) e QC5 (20°13'38.8"S 46°21'07.1"W, 887m de altitude).

As amostras de QMA da Canastra foram enviadas pelos produtores, acondicionadas em sacos estéreis, para o Laboratório de Micologia e Micotoxinas do Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras, onde foram posteriormente analisadas.

### **2.2 Extração do material genético**

Para a extração do DNA, utilizou-se amostras da casca e do centro do queijo (amostras compostas) e encaminhadas para o laboratório BPI Biotecnologia EPP, Botucatu, São Paulo, Brasil, através do kit ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™ (Zymo Research), de acordo com as instruções do fabricante.

### 2.3 Sequenciamento e preparação da biblioteca

A diversidade bacteriana foi identificada pelo sequenciamento da região amplificada V3-V4 do gene 16S rRNA. A amplificação da região foi feita utilizando os primers F (5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG-3') e R (5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC-3') com amplicon de 600 bp. Para as espécies fúngicas, a região ITS foi sequenciada com os primers 3-F (5'-(TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGCATCGATGAAGAACGCAGC-3') e 4R (5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), com amplicon de 400 bp. As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador Veriti™ Thermal Cycler (Applied Biosystems) e a comprovação da amplificação foi realizada através de eletroforese em gel de agarose 2% corado com UniSafe Dye 0,03% (v/v).

As bibliotecas geradas foram submetidas às etapas de purificação, utilizando bead magnética Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter). A quantificação foi realizada pela PCR Tempo Real utilizando Kit KAPA-KK4824 (Library Quantification Kit - Illumina/Universal). Foi gerado um Pool equimolar de DNA, através da normalização de todas as amostras a 4nM, para realização do sequenciamento, o qual foi conduzido utilizando-se o sistema Illumina HiSeq de sequenciamento de nova geração (Illumina® Sequencing) e kit MiSeq Reagent V2 500 ciclos – leitura de 2 x 250pb.

### 2.4 Análises de Bioinformática

As sequências gênicas foram processadas utilizando o software Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME 2) versão 2021.11. Os dados da sequência bruta foram filtrados usando o plugin q2-demux seguido por limpeza final com DADA2 (CALLAHAN *et al.*, 2016) (via q2-dada2). Todas as variantes de sequência de amplicon (ASVs) foram alinhadas com mafft (KATOHI *et al.*, 2002) e utilizadas para construir a árvore filogenética com fasttree2. Métricas de diversidade alfa e beta (UniFrac ponderado (LOZUPONE; KNIGHT, 2007), distância de Jaccard e de similaridade de Bray-Curtis), e Análise de Coordenadas de Princípio (PCoA) foram estimados usando diversidade q2 depois que as amostras foram rarefeitas usando 10000 sequências para bactérias e 5000 para fungos por amostra. A taxonomia foi atribuída aos

ASVs usando o classificador de características q2, (BOLYEN *et al.*, 2018) classificador de taxonomia de *Bayes naïve classify-sklearn* para as sequências de bactéria (QUAST *et al.*, 2013; YILMAZ *et al.*, 2014) e Unite-ver8-99% para fungos (NILSSON *et al.*, 2018).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Sequenciamento amplicon da região 16S rRNA

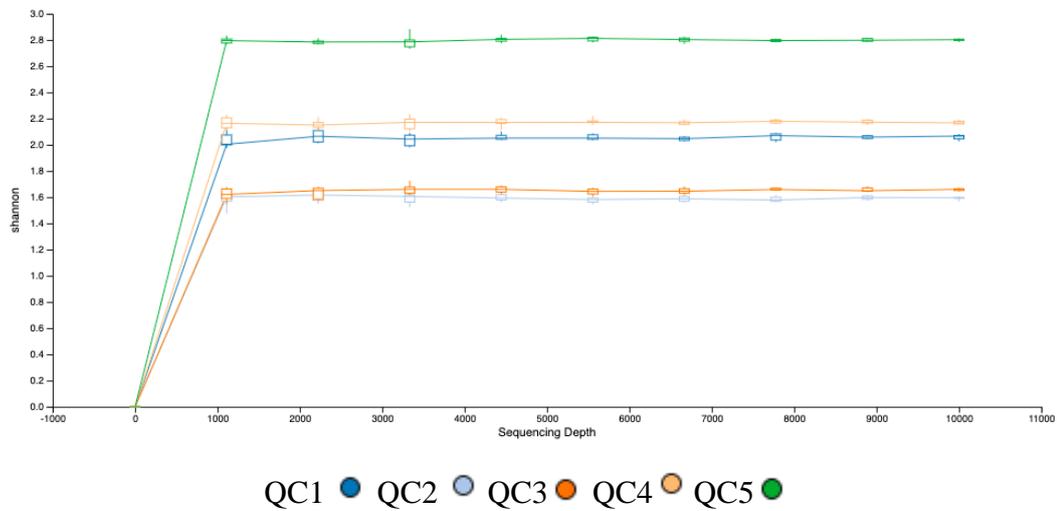
Os resultados da porcentagem do número total de OTUs (Unidades Taxonômicas Operacionais) são exibidos na Tabela 1. No total, 75.005 leituras foram produzidas a partir do sequenciamento do gene 16S rRNA. Observa-se que o filo Firmicutes foi predominante em todas as amostras. Firmicutes são bactérias Gram-positivas consideradas as principais bactérias presentes no leite (QUIGLEY *et al.*, 2013). Isso pode explicar o porquê de outros tipos de queijos artesanais produzidos em países diferentes apresentarem o filo Firmicutes como um dos dominantes (DIMOV *et al.*, 2021; ESCOBAR-ZEPEDA; SANCHEZ-FLORES; BARUCH, 2016; FUKA *et al.*, 2013; RIQUELME *et al.*, 2015). Outros filios encontrados, embora pouco prevalentes foram Cyanobacteria (amostras QC1, QC2 e QC5), Actinobacteriota (amostras QC2, QC3, QC4 e QC5) e Proteobacteria (apenas amostra QC2).

Tabela 1 – Porcentagem do número total de OTUs no sequenciamento amplicon na região 16S.

Filo	QC1	QC2	QC3	QC4	QC5
Firmicutes	99,81	99,15	99,44	94,88	64,06
Cyanobacteria	0,13	0,04	-	-	0,13
Actinobacteriota	-	0,73	0,51	5,1	35,74
Proteobacteria	-	0,05	-	-	-

Valores consideráveis do índice de Shannon foram encontrados, indicando a presença de muitas espécies nas amostras (Figura 1). Os queijos que revelaram maior diversidade microbiana foram da QC5 (2,801), QC4 (2,170) e da QC1 (2,058). Os menores valores do índice de Shannon observados nas amostras QC3 (1,657) e QC2 (1,593), destacam que menos espécies estão presentes nestas amostras. Visto que, o índice de Shannon refere-se a riqueza das espécies, sendo que o valor aumenta à medida que o número de espécies aumenta (KIM *et al.*, 2017).

Figura 1 – Índice de diversidade alfa do sequenciamento amplicon na região 16S.



Dentro do filo Firmicutes, os quatro principais gêneros encontrados foram *Streptococcus* (), *Lactococcus*, *Lactobacillus* e *Leuconostoc*. É importante ser dito que a contagem da população bacteriana não foi uniforme entre as amostras, sendo que 32% dos *Streptococcus* estavam presentes na amostra QC1, 72% dos *Lactococcus* na QC5, 86% dos *Leuconostoc* na QC2 e 52% dos *Lactobacillus* na QC4, demonstrando que a diversidade microbiana depende também da queijaria produtora. Essa variação também foi observada no estudo de Perin et al., (2017). Outros gêneros foram identificados, embora em menor prevalência, como pertencentes ao filo Firmicutes presente nas amostras, exceto na QC2. São eles *Staphylococcus* (amostras QC1, QC3, QC4 e QC5), *Weissella* (QC1), *Enterococcus* (QC3) e *Bavariicoccus* (QC3), somando juntos 8,16%. Importante mencionar que o gênero *Staphylococcus*, que compreende espécies patogênicas, faz parte da microbiota natural do leite, embora também possa ser transmitido na manipulação do queijo pelos produtores (GOBBETTI et al., 2018; CASTELLANOS-ROZO et al., 2020).

As bactérias de ácido lático (BAL) compõem a população dominante do leite de bovinos, caprinos, ovinos e de búfalos, sendo responsáveis por fermentar a lactose em lactato (QUIGLEY et al., 2013). Os quatro gêneros predominantes encontrados nas amostras e comentados anteriormente, constituem o grupo das BAL, as quais são consideradas as principais espécies bacterianas, encontradas em queijos artesanais de leite cru, como o QMA da Canastra (PERIN et al., 2017). As BAL produzem uma diversidade de compostos aromáticos (ácidos, aldeídos, álcoois, ésteres e compostos de enxofre) responsáveis pelo desenvolvimento do sabor do produto. Portanto, as características sensoriais típicas dos queijos artesanais são geradas a partir do metabolismo desses microrganismos (MONTEL et al., 2014). No entanto,

as reações bioquímicas envolvidas no desenvolvimento do sabor dos queijos maturados são afetadas por alguns fatores, sendo eles: a composição do leite, as condições de processamento e os microrganismos e enzimas presentes no queijo (STEELE; BROADBENT; KOK, 2013).

No estudo de Kamimura *et al.* (2020), os autores utilizaram o sequenciamento amplicon na região 16S rRNA para avaliar a microbiota presente em todas as fases de produção do QMA da Canastra, desde o leite cru até o queijo maturado, em três fazendas da região. Além disso, a microbiota do ambiente de processamento também foi monitorada. Segundo esta pesquisa, a cultura starter (pingo) e o QMA da Canastra apresentaram uma microbiota semelhante, independente da fazenda. Os autores também inferiram que os microrganismos existentes na cultura starter contribuem para a formação da microbiota característica do queijo, que em sua grande maioria é formada por *Streptococcus* e *Lactococcus*. A alta abundância destes dois gêneros indica que existe uma competição em relação aos outros gêneros, ao longo da maturação. Apesar disso, estudos anteriores comprovaram que há uma variação na microbiota do queijo entre as fazendas (RAFAEL *et al.*, 2017; NÓBREGA, 2007). Sugere-se que essa variação ocorre sobretudo pelas práticas e os ingredientes utilizados pelos queijeiros (REZENDE *et al.*, 2011).

As espécies bacterianas encontradas neste trabalho referentes ao filo Firmicutes foram: *Streptococcus salivarius*, *Bavariicoccus seileri*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus parabuchneri* e *Weissella jogaejeotgali*. Diferentes espécies foram identificadas em amostras de QMA da Canastra. Isso pode ser explicado pois a microbiota deste tipo de queijo é influenciada por diferentes fatores, incluindo a altitude da região (KAMIMURA *et al.*, 2019a). Rezende *et al.* (2011) registraram maiores contagens de BAL em amostras de queijos coletados entre 600 a 900 m de altitude, sendo *Lactobacillus rhamnosus*, a espécie predominante, seguida da espécie *L. brevis*. No estudo de Kamimura *et al.* (2019b) os autores também encontraram a prevalência do gênero *Lactobacillus*. Segundo Perin *et al.* (2017), a abundância de *Lactobacillus* spp em QMA, inclusive naqueles produzidos na microrregião da Canastra, está associada com sua capacidade de crescimento sob certas condições seletivas (pH baixo e elevadas concentrações de sal) que existem no queijo. Além disso, outras bactérias também foram encontradas, como *Enterococcus faecalis* e *Weissella paramesenteroides* (BORELLI *et al.*, 2007; PERIN *et al.*, 2017).

Como representantes do filo Actinobacteriota encontrou-se os gêneros *Bifidobacterium*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, representando juntos 35,74% do total de OTUs da amostra QC5 e, em menor prevalência, representaram 5,1%, 0,51% e 0,73% das amostras QC4, QC3 e QC2, respectivamente. Espécies do gênero *Bifidobacterium* são conhecidos por seu potencial

probiótico e por sobreviverem no queijo durante um tempo prolongado de maturação e armazenamento. Os representantes do gênero *Corynebacterium* e *Brevibacterium* são colonizadores da casca sendo, este último, um indicador do grau de maturação, devido a produção de pigmentos por algumas espécies (GÉRARD *et al.*, 2021).

Além disso, também foram identificadas espécies pertencentes ao filo Actinobacteriota, sendo elas: *Corynebacterium variabile*, *Corynebacterium flavescens*, ambas espécies encontradas em queijos de leite cru e maturados (MONNET *et al.*, 2015); além de *Bifidobacterium mongoliense*. Delcenserie *et al.* (2013) também identificaram *Bifidobacterium mongoliense* em queijos franceses maturados.

Pertencendo ao filo Proteobacteria foi identificado o gênero *Klebsiella*. A presença deste gênero pode indicar más condições de higiene ou contaminação por fontes ambientais, sendo considerado um importante patógeno (GELBÍČOVÁ *et al.*, 2021). Cabe ressaltar que este filo foi identificado apenas na amostra QC2 e com uma prevalência muito baixa, representando 0,05% das OTUs. Para o filo Cyanobacteria não foi possível identificar nenhum gênero ou espécie.

### 3.2 Sequenciamento amplicon da região ITS

No total, 357.736 leituras foram produzidas a partir do sequenciamento da região ITS. A classificação taxonômica das OTUs revelou que Ascomycota foi o filo predominante em todas as amostras (>99%). O filo Basidiomycota também estava presente, mas em abundâncias significativamente menores (Tabela 2). Em um nível taxonômico menor as OTUs revelaram a presença de onze famílias, sendo quatro as mais abundantes: Dipodascaceae, Debaryomycetaceae, Trichomonascaceae e os membros da ordem Saccharomycetales que não puderam ser classificados em nível de família (Saccharomycetales\_fam\_Incertae\_sedis).

Tabela 2 – Porcentagem do número total de OTUs no sequenciamento amplicon na região ITS.

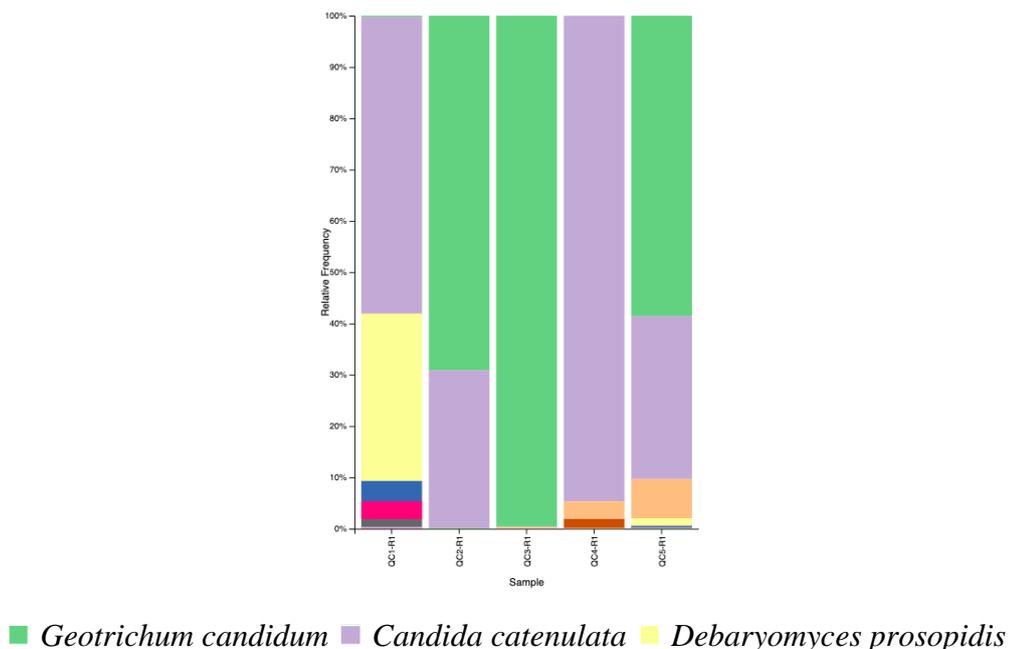
Filo	QC1	QC2	QC3	QC4	QC5
Ascomycota	99,69	100,00	99,97	99,90	99,99
Basidiomycota	0,31	-	0,02	0,09	0,002

*Dipodascus*, *Ditutina*, *Deboryomyces* e *Trichosporon* foram os gêneros de fungos dominantes das amostras de QMA da Canastra analisadas, mas houve variações entre as amostras. Essa variabilidade também foi verificada nos gêneros bacterianos. Outros gêneros

encontrados em menor prevalência foram as leveduras *Candida*, *Kluyveromyces*, *Kodamaea*, *Debaryomyces*, *Saturnispora*, *Toluraspota*, *Kazachstania*, *Sopobolomyces* e *Trichosporon*; e os fungos filamentosos *Cladosporium*, *Alternaria*, *Aureobasidium* e *Moniliella*. Em estudo realizado por Aragão (2018), observou-se maior prevalência dos gêneros *Torulaspota*, *Debaryomyces*, *Kodamaea*, *Geotrichum*, *Trichosporon* e *Candida* em QMA da Canastra.

Em relação as espécies, as mais abundantes foram *Geotrichum candidum*, *Candida catenulata* e *Debaryomyces prosopidis*. De acordo com a Figura 2, a espécie *Geotrichum candidum* foi predominante na amostra QC2 (69,11%), QC3 (99,60%) e QC5 (58,55%), apesar disso, a levedura *Candida catenulata* foi identificada em todas as amostras, com exceção da QC3. Diferentemente da espécie *Debaryomyces prosopidis*, encontrada apenas na amostra QC1 com 32,42%. Diferentemente das espécies de leveduras *Candida intermedia* (QC3 e QC5), *C. parapsilopsis* (QC5), *Kluyveromyces lactis* (em todas as amostras), *Kodamaea ohmeri* (QC1 e QC5), *Torulaspota delbrueckii* (QC5), *Kazachstania unispota* (QC1), *Sporobolomyces patagonicus* (QC1), *Trichosporon ovoides* (QC5). Diferentes resultados foram encontrados por Borelli *et al.* (2006), que identificaram *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis*, *Kodamaea ohmeri* e *Torulaspota delbrueckii* como as espécies de leveduras mais frequentes em QMA da Canastra.

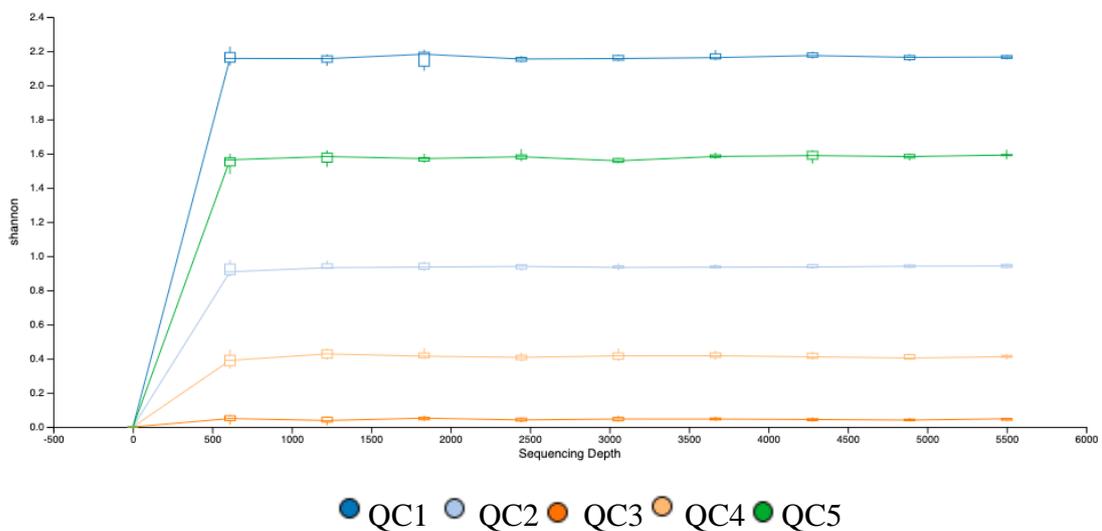
Figura 2 – Análise da comunidade fúngica dominante de QMA da Canastra em nível de espécie.



Considerando as espécies pouco dominantes de fungos filamentosos identificadas, observou-se a presença das espécies *Cladosporium cladosporioides* (QC1, QC4, QC5), *Alternaria alternata* (QC1) e *Aureobasidium pullulans* (QC1).

A análise métrica do índice de diversidade alfa é apresentada na Figura 3. Observa-se que diferentemente das espécies bacterianas, o Índice de Shannon demonstrou que apenas as amostras QC1 (2,2) e QC5 (1,6) apresentaram valores consideráveis. As demais amostras relevaram valores menores que 1,0, indicando uma baixa diversidade fúngica nos queijos destas fazendas. Como supracitado, o Índice de Shannon leva em consideração a riqueza entre as espécies, logo, as amostras QC2, QC3 e QC4 apresentaram um queijo com menor diversidade de microrganismos. Isso pode ser verificado analisando a Figura 3, uma vez que, a amostra QC3 conteve 99% de abundância apenas para a espécie *Geotrichum candidum*; QC2, por sua vez, foi caracterizada com a presença das espécies *Geotrichum candidum* (69,11%) e *Candida catenulata* (30,75%), e QC4 com 94,64% da levedura *Candida catenulata*.

Figura 3 – Índice de diversidade alfa do sequenciamento amplicon na região ITS.



Os microrganismos que estão presentes nos queijos artesanais são provenientes de várias fontes, que vão desde a matéria-prima até o ambiente de maturação (KANDASAMY *et al.*, 2020; MOUBASHER; ABDEL-SATER; SOLIMAN, 2018). De acordo com a literatura, dependendo do tipo do queijo e do local de produção, há uma variação entre as leveduras existentes no queijo. Pesquisas de Biolcati *et al.* (2020) identificaram *Geotrichum candidum* e *Yarrowia lipolytica* em queijo italiano “Robiola di Roccaverano”. No estudo de Zheng *et al.* (2018), os autores detectaram os fungos *Penicillium kudriavzevii*, *Kluyveromyces marxianus* e *Kluyveromyces lactis* em queijo Kazak na China. No Brasil, Cardoso *et al.* (2015), citaram a

prevalência das leveduras *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces ohmeri* e *Kluyveromyces marxianus* em queijo artesanal do Serro. Souza *et al.* (2021) que também avaliaram a microbiota presente no queijo do Serro relataram a presença das espécies fúngicas *Debaryomyces hansenii*, *Yarrowia lipolytica*, *Candida zeylanoides*, *Kluyveromyces lactis*, *Cladosporium cladosporioides* e *Penicillium roqueforti*.

Ao avaliar a contaminação fúngica no ambiente de queijaria artesanal, Masotti *et al.* (2019) encontraram os gêneros *Alternaria*, *Cladosporium* e *Sporobolomyces*, que são considerados deteriorantes, embora comuns em queijos e ambientes de queijarias.

Em alguns tipos de queijos a presença de fungos é aceitável, e é considerado essencial para o desenvolvimento dos atributos sensoriais dos queijos artesanais produzidos com leite cru (LEGGIERI; PIETRI; BATTILANI, 2020; CASQUETE *et al.*, 2018). Essas características são geradas principalmente pelo catabolismo de lipídios e proteínas, produzindo uma variedade de compostos orgânicos voláteis (PRACHAROVA *et al.*, 2019; ZHENG *et al.*, 2018). A espécie de levedura *K. lactis* por exemplo, é capaz de produzir acetaldeído, etanol, aldeídos e álcoois (ATANASSOVA *et al.*, 2016). *G. candidum* por sua vez, produz cetonas, ácidos graxos, ésteres e álcool primários (JOLLIVET *et al.*, 1994). Dependendo do metabólito produzido, os queijos irão apresentar um sabor característico. Pesquisas de Padilla *et al.* (2014), relatam que o sabor do queijo é atribuído ao equilíbrio entre os compostos voláteis e não voláteis.

#### 4. CONCLUSÃO

Os gêneros bacterianos predominantes identificados foram *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* e *Leuconostoc*, mostrando que as bactérias ácido lácticas prevaleceram em todas as amostras, enquanto para gêneros fúngicos, prevaleceram as espécies *Dipodascus*, *Ditutina*, *Deboryomyces* e *Trichosporon*, sendo as espécies mais abundantes *Geotrichum candidum*, *Candida catenulata* e *Debaryomyces prosopidis*.

Os achados deste estudo destacam a diversidade da microbiota presente no QMA da Canastra entre as cinco queijarias analisadas e somam-se aos trabalhos já realizados pelo mesmo grupo de pesquisas. Portanto, pode-se concluir que cada fazenda analisada possui seu próprio *terroir*.

## REFERÊNCIAS

- ATANASSOVA, M. R. *et al.* Characterization of yeasts isolated from artisanal short-ripened cows' cheeses produced in Galicia (NW Spain). **Food microbiology**, v. 53, p. 172-181, 2016.
- BISSON, L. F. *et al.* The present and future of the international wine industry. **Nature**, 418, p. 696-699, 2002.
- BIOLCATI, F. *et al.* Microbial characterization of an artisanal production of Robiola di Roccaverano cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 5, p. 4056-4067, 2020.
- BOLYEN, E. *et al.* QIIME 2: Reproducible, interactive, scalable, and extensible microbiome data science. **PeerJ Preprints**, 2018.
- 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**, v. 22, n. 11, p. 1115-1119, 2006.
- CALLAHAN, B. J. *et al.* DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. **Nature methods**, v. 13, n. 7, p. 581-583, 2016.
- CARDOSO, V. M. *et al.* The influence of seasons and ripening time on yeast communities of a traditional Brazilian cheese. **Food Research International**, v. 69, p. 331-340, 2015.
- CASQUETE, R. *et al.* Physicochemical factors affecting the growth and mycotoxin production of *Penicillium* strains in a synthetic cheese medium. **LWT**, v. 89, p. 179-185, 2018.
- CASTELLANOS-ROZO, J. *et al.* Analysis of the bacterial diversity of Paipa cheese (a traditional raw cow's milk cheese from Colombia) by high-throughput sequencing. **Microorganisms**, v. 8, n. 2, p. 218, 2020.
- DELCENSERIE, V. *et al.* Detection and characterization of *Bifidobacterium crudilactis* and *B. mongoliense* able to grow during the manufacturing process of French raw milk cheeses. **BMC microbiology**, v. 13, n. 1, p. 1-13, 2013.
- DIMOV, S. G. *et al.* NGS-Based Metagenomic Study of Four Traditional Bulgarian Green Cheeses from Tcherni Vit. **LWT**, v. 152, 2021.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Anuário Leite 2019**. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1109959>>. Acesso em 09 de março de 2022.
- EMPRESA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL DO ESTADO DE MINAS GERAIS – EMATER. 2020 a. **Serras da Ibitipoca é identificada como a 8ª região produtora de queijo minas artesanal**. Disponível em: <[https://www.emater.mg.gov.br/portal.do?flagweb=novosite\\_pagina\\_interna&id=25333](https://www.emater.mg.gov.br/portal.do?flagweb=novosite_pagina_interna&id=25333)>. Acesso em 27 de março de 2022.

ESCOBAR-ZEPEDA, A.; SANCHEZ-FLORES, A.; BARUCH, M. Q. Metagenomic analysis of a Mexican ripened cheese reveals a unique complex microbiota. **Food microbiology**, v. 57, p. 116-127, 2016.

FUKA, M. M. *et al.* Dynamics of bacterial communities during the ripening process of different Croatian cheese types derived from raw ewe's milk cheeses. **PLoS One**, v. 8, n. 11, 2013.

GELBÍČOVÁ, T. *et al.* Dissemination and characteristics of *Klebsiella* spp. at the processed cheese plant. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 39, n. 2, p. 113-121, 2021.

GÉRARD, A. *et al.* Study of the microbial diversity of a panel of Belgian artisanal cheeses associated with challenge studies for *Listeria monocytogenes*. **Food Microbiology**, v. 100, p. 103861, 2021.

GOBBETTI, M. *et al.* Drivers that establish and assembly the lactic acid bacteria biota in cheeses. **Trends in Food Science & Technology**, v. 78, p. 244-254, 2018.

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

INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. Governo do estado de Minas Gerais. **Portaria Nº 2051, de 07 de abril de 2021**. Belo Horizonte, MG.

JOLLIVET, N. *et al.* Production of volatile compounds in model milk and cheese media by eight strains of *Geotrichum candidum* Link. **Journal of Dairy Research**, v. 61, n. 2, p. 241-248, 1994.

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

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

KAMIMURA, B. A. *et al.* Large-scale mapping of microbial diversity in artisanal Brazilian cheeses. **Food microbiology**, v. 80, p. 40-49, 2019b.

KANDASAMY, S. *et al.* Characterisation of fungal contamination sources for use in quality management of cheese production farms in Korea. **Asian-Australasian journal of animal sciences**, v. 33, n. 6, 2020.

KATOH, K. *et al.* MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. **Nucleic acids research**, v. 30, n. 14, p. 3059-3066, 2002.

KIM, B-R. *et al.* Deciphering diversity indices for a better understanding of microbial communities. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 12, p. 2089-2093, 2017.

LEGGIERI, M. C.; PIETRI, A.; BATTILANI, P. Modelling fungal growth, mycotoxin production and release in grana cheese. **Microorganisms**, v. 8, n. 1, 2020.

LOZUPONE, C.; KNIGHT, R. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 12, p. 8228-8235, 2005.

MARTINS, M. C. F. *et al.* Bacterial diversity of artisanal cheese from the Amazonian region of Brazil during the dry and rainy seasons. **Food Research International**, v. 108, p. 295-300, 2018.

MASOTTI, F. *et al.* Effectiveness of air disinfection by ozonation or hydrogen peroxide aerosolization in dairy environments. **Food Control**, v. 97, p. 32-38, 2019.

MONNET, C. *et al.* Growth and adaptation of microorganisms on the cheese surface. **FEMS microbiology letters**, v. 362, n. 1, p. 1-9, 2015.

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

MOUBASHER, A.A.H; ABDEL-SATER, M. A.; SOLIMAN, Z. S. M. Yeasts and filamentous fungi associated with some dairy products in Egypt. **Journal de mycologie medicale**, v. 28, n. 1, p. 76-86, 2018.

NDOYE, B. *et al.* A review of the molecular approaches to investigate the diversity and activity of cheese microbiota. **Dairy Science & Technology**, v. 91, n. 5, p. 495-524, 2011.

NILSSON, R. H. *et al.* Taxonomic annotation of public fungal ITS sequences from the built environment—a report from an April 10–11, 2017 workshop (Aberdeen, UK). **MycoKeys**, n. 28, p. 65, 2018.

NÓBREGA, J. E. **Caracterização do fermento endógeno utilizado na fabricação do queijo Canastra no município de Medeiros, Minas Gerais, com ênfase em leveduras.** 2007. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

PADILLA, B. *et al.* Potential impact of dairy yeasts on the typical flavour of traditional ewes' and goats' cheeses. **International Dairy Journal**, v. 35, n. 2, p. 122-129, 2014.

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

PRACHAROVA, P. *et al.* Geotrichum candidum gene expression and metabolite accumulation inside the cells reflect the strain oxidative stress sensitivity and ability to produce flavour compounds. **FEMS yeast research**, v. 19, n. 1, 2019.

QUAST, C. *et al.* The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic acids research**, v. 41, n. D1, p. 590-596, 2012.

QUIGLEY, L. *et al.* The complex microbiota of raw milk. **FEMS microbiology reviews**, v. 37, n. 5, p. 664-698, 2013.

RAFAEL, V. C. **Fenótipos da microbiota predominante do fermento endógeno (pingo) relevantes para as características e segurança microbiológica do queijo Minas artesanal da Serra da Canastra.** 2017. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2017.

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

RIQUELME, C. *et al.* Characterization of the bacterial biodiversity in Pico cheese (an artisanal Azorean food). **International Journal of Food Microbiology**, v. 192, p. 86-94, 2015.

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

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

STEELE, J.; BROADBENT, J.; KOK, J. Perspectives on the contribution of lactic acid bacteria to cheese flavor development. **Current opinion in biotechnology**, v. 24, n. 2, p. 135-141, 2013.

WIPO. World Intellectual Property Organization. **Geographical Indications.** Disponível em: <[https://www.wipo.int/geo\\_indications/en/](https://www.wipo.int/geo_indications/en/)> Acesso em: 18 de janeiro de 2020.

YILMAZ, P. *et al.* The SILVA and “all-species living tree project (LTP)” taxonomic frameworks. **Nucleic acids research**, v. 42, n. D1, p. 643-648, 2014.

ZHENG, X. *et al.* Potential characterization of yeasts isolated from Kazak artisanal cheese to produce flavoring compounds. **Microbiology Open**, v. 7, n. 1, 2018.