

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA**

**LETÍCIA ROCHA FERREIRA**

**CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA LÁTICA DO QUEIJO MINAS  
ARTESANAL PRODUZIDO NA REGIÃO DO SERRO, MINAS GERAIS, POR  
MÉTODOS CULTURA DEPENDENTE E INDEPENDENTE**

**VIÇOSA – MINAS GERAIS  
2021**

**LETÍCIA ROCHA FERREIRA**

**CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA LÁTICA DO QUEIJO MINAS  
ARTESANAL PRODUZIDO NA REGIÃO DO SERRO, MINAS GERAIS, POR  
MÉTODOS CULTURA DEPENDENTE E INDEPENDENTE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientador: Luís Augusto Nero

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2021**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

F383c  
2021  
Ferreira, Letícia Rocha, 1989-  
Caracterização da microbiota láctica do queijo minas  
artesanal produzido na região do Serro, Minas Gerais, por  
métodos cultura dependente e independente / Letícia Rocha  
Ferreira. – Viçosa, MG, 2021.  
98 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Luís Augusto Nero.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f. 81-98.

1. Queijo-de-minas - Microbiologia. 2. Microbiota.  
3. Bacteriocinas . I. Universidade Federal de Viçosa.  
Departamento de Tecnologia de Alimentos. Programa de  
Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos.  
II. Título.

CDD 22. ed. 637.3

Bibliotecário(a) responsável: Alice Regina Pinto Pires CRB6 2523

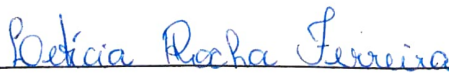
LETÍCIA ROCHA FERREIRA

**CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA LÁTICA DO QUEIJO MINAS  
ARTESANAL PRODUZIDO NA REGIÃO DO SERRO, MINAS GERAIS, POR  
MÉTODOS CULTURA DEPENDENTE E INDEPENDENTE**

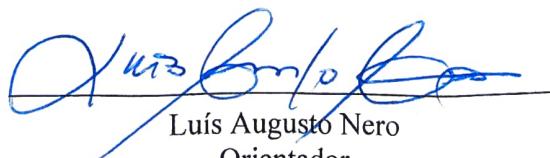
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 30 de julho de 2021.

Assentimento:



Letícia Rocha Ferreira  
Autora



Luís Augusto Nero  
Orientador

“Turn your face toward the sun  
and the shadows will face  
behind you.”

Maori proverb

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela companhia em todos os caminhos percorridos pela força para superar desafios, por todas as experiências adquiridas e ensinamentos que pude compartilhar.

Aos meus pais Scheilla e Sebastião, minha irmã Mariana, minha madrinha Shirley e a minha avó Wecy por todo apoio, compreensão, companheirismo e força à distância.

Ao Nero pela oportunidade de ser sua orientada, por todos os ensinamentos, por ter acreditado em mim e por sua compreensão e paciência.

Ao Ricardo por todos os ensinamentos, paciência e momentos de descontração.

Ao Antônio Fernandes por todas sugestões para o enriquecimento desse trabalho.

Ao Anderson por todos ensinamentos e companheirismo nas análises.

Ao Luciano e a Valéria por gentilmente aceitarem o convite de participação da banca. As críticas e sugestões certamente enriqueceram esse trabalho. Agradeço também a Valéria pela amizade e pela ajuda fundamental com o BioNumerics.

À professora Catarina pela disponibilidade de utilizar as instalações de seu laboratório para realizar experimento e por me adotar como uma de suas orientadas.

À Marliane por toda dedicação, amizade, ensinamentos e por confiar em mim.

Ao Paulo por todo ensinamento, disponibilidade e amizade.

À professora Monique pela compreensão e amizade.

Ao Iago, por sua amizade e companheirismo durante vários momentos dos experimentos e por me fazer lembrar que os momentos de desespero como os do Hakuna passam.

Às queridas Manu, Karen e Camila por toda ajuda e amizade.

À Bianca pela amizade e troca de ideia e experiências e materiais sobre queijos artesanais.

Aos amigos da Micro-Genética que tanto me ajudaram Edy, Felipe, Lucas, Muri, Patrícia e Jéssica pela companhia em cafés e ru. Em especial Osiel, Leandro e Giarlã que tiravam dúvidas tão prontamente.

Aos amigos da Micro desde o mestrado Mayara, Deisy, Léo, Leandro, Cléo e Bruna pela amizade e por toda companhia. Agradeço em especial ao Gabriel pela amizade, companhia dentro e fora da UFV, delícias e noites maravilhosas com e sem “let it happen”.

Ao Lomanto por sua amizade desde a graduação, por ser meu companheiro nos momentos de alegria e desespero, sempre me ajudando e elaborando todos os mapas que solicitei tão prontamente.

Aos amigos de graduação que são companheiros desde sempre Denes, Maraysa, Milton, Luiz, Carol e Raquel.

Aos amigos de departamento e riqueza Alê, Richard, Lucas, Carini, Dandara, Nayara e Luana.

Ao Coral da UFV pelos momentos de descontração e aos grandes amigos que fiz e agregados, também grandes companheiros de ru, Ana Luiza, Amanda, Andso, Danilo, Déa Bastos, Deric, Eugênio, Fred, Gabi, Hermano, Igor, Jur, Luiza, Miller, Vanessa, Vitória, Patrick, Wendelo, Wesley, Will e tantos outros.

Ao Genilson que me ajudou no final do mestrado e início do doutorado.

Um agradecimento especial aos meus amigos Leonan e Weskley que tanto me ajudaram nos estudos para a disciplina Engenharia Bioquímica.

Aos funcionários do DVT Dagô, Seu Luiz, Nívea, Alex e Rosi, sempre prestativos e atenciosos.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Inspeção principalmente Reges, Luana, Thaisa e Mili e a todos os estagiários que contribuíram com esse trabalho agradeço por tudo.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo financiamento do projeto.

A todos os professores e funcionários do DTA, DVT, DMB e de outros departamentos, que direta ou indiretamente contribuíram para minha caminhada até o doutorado e para a realização desse trabalho, meu muito obrigada!

## RESUMO

FERREIRA, Letícia Rocha, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2021. **Caracterização da microbiota láctica do Queijo Minas Artesanal produzido na região do Serro, Minas Gerais, por métodos cultura dependente e independente.** Orientador: Luís Augusto Nero.

Queijos Minas artesanais (QMA) possuem importância social, econômica e cultural para inúmeras famílias de produtores rurais. QMA são tradicionalmente produzidos em várias regiões de Minas Gerais com leite cru e fermento endógeno, “pingo”, derivado de sua dessoragem. Além da produção tradicional, alguns produtores da região do Serro utilizam “rala” como fermento endógeno, obtida pela raspagem do QMA após 3-5 dias de fabricação. A alteração do fermento endógeno pode levar a alterações da microbiota do QMA, incluindo a microbiota láctica que exerce papel fundamental na produção, maturação, desenvolvimento de características sensoriais, bioconservação e inocuidade. O conhecimento da microbiota láctica autóctone do QMA auxilia na caracterização de sua identidade, permitindo sua consolidação como símbolo regional. O estudo da microbiota de alimentos fermentados usualmente é realizado por métodos cultura-dependentes, limitados pela microbiota complexa e pelo cultivo de parte da microbiota. Como alternativa, métodos cultura-independentes têm sido cada vez mais utilizados; esses métodos também possuem algumas limitações, como dificuldade de diferenciação entre microrganismos viáveis e não viáveis. A abordagem ideal para a caracterização da microbiota de queijos artesanais é a associação de métodos cultura-dependentes e -independentes de cultivo. Esse estudo teve como objetivo caracterizar a microbiota láctica autóctone do QMA do Serro com diferentes características de produção por métodos cultura-dependentes e -independentes de cultivo. Amostras de QMA do Serro (n = 55) foram obtidas na Cooperativa dos Produtores Rurais do Serro (CooperSerro) e caracterizadas quanto ao fermento endógeno (“pingo” e “rala”), cidade produtora (Alvorada de Minas, Sabinópolis, Santo Antônio do Imbé, Serra Azul de Minas e Serro), tamanho da fazenda produtora (produção diária de leite) e tempo de produção (dias). As amostras foram submetidas a enumeração de bactérias ácido lácticas (BAL) em ágar MRS, pH 5,7 e obtenção de isolados (n = 176) que foram caracterizados por Repetitive extragenic palindromic-PCR (Rep-PCR) e identificados por sequenciamento da região V1-V3 do 16S rRNA. Em paralelo, as amostras foram submetidas a extração de DNA total para caracterização da diversidade microbiana por Rep-PCR, Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) e sequenciamento da região V3-V4 do 16S rRNA. A contagem de BAL em amostras e QMA do Serro variaram

entre 5,4 e 8,4 log UFC/g com um valor médio de 6,9 log UFC/g, e os principais grupos/gêneros identificados foram lactobacilos, *Lactococcus lactis* e *Enterococcus* sp.; não foram identificadas tendências nas contagens e distribuição de BAL considerando as características das amostras. Rep-PCR identificou semelhanças intraespécies superiores a 75%. O sequenciamento das bandas de DGGE identificou a prevalência de *L. lactis* em todas as amostras, além de *Streptococcus salivarius*. Considerando o DNA total das amostras, *L. lactis* foi identificado como espécie dominante em todas as amostras. Rep-PCR e DGGE provaram ser ferramentas úteis para estudar a microbiota láctica de queijos artesanais. A abordagem integrada dos métodos cultura- dependente e -independente forneceu uma descrição mais detalhada da diversidade láctica presente no QMA do Serro. A microbiota láctica do QMA do Serro possui uma composição estável, sem variações evidentes considerando as características de produção avaliadas.

Palavras-chave: Bactérias ácido lácticas. Pingo. Rala. Cultura-dependente. Cultura-independente. Sequenciamento.

## ABSTRACT

FERREIRA, Letícia Rocha, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2021. **Characterization of the lactic microbiota of Minas Artisanal Cheese produced in the region of Serro, Minas Gerais, by dependent and independent culture methods.** Adviser: Luís Augusto Nero.

Minas artisanal cheeses (MAC) have social, economic and cultural importance for countless rural producer families. MAC are traditionally produced in several regions of Minas Gerais with raw milk and endogenous starter, “pingo”, derived from its desorption. In addition to traditional production, some producers in the Serro region use “rala” as endogenous starter, obtained by grating the MAC after 3-5 days of manufacture. The change of endogenous starter can lead to changes in the MAC microbiota, including the lactic microbiota that plays a fundamental role in production, ripening, development of sensory characteristics, bioconservation and safety. Knowledge of the MAC's autochthonous lactic microbiota helps to characterize its identity, allowing its consolidation as a regional symbol. The study of the microbiota of fermented foods is usually carried out by culture-dependent methods, limited by the complex microbiota and by the cultivation of part of the microbiota. As an alternative, culture-independent methods have been increasingly used; these methods also have some limitations, such as difficulty in differentiating between viable and non-viable microorganisms. The ideal approach to characterize the microbiota of artisanal cheeses is the association of culture-dependent and -independent methods. This study aimed to characterize the autochthonous lactic microbiota of the QMA do Serro with different production characteristics by culture-dependent and culture-independent methods. Samples of MAC do Serro (n = 55) were obtained from the Cooperativa de Produtores Rurais do Serro (CooperSerro) and characterized for endogenous starter (“pingo” and “rala”), producer city (Alvorada de Minas, Sabinópolis, Santo Antônio do Imbé, Serra Azul de Minas and Serro), farm size (daily milk production) and time of production (days). The samples were subjected to enumeration of lactic acid bacteria (LAB) in MRS Agar, pH 5.7 and obtaining isolates (n = 176) that were characterized by Repetitive extragenic palindromic-PCR (Rep-PCR) and identified by region sequencing V1-V3 of the 16S rRNA. In parallel, the samples were submitted to total DNA extraction for characterization of microbial diversity by Rep-PCR, Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) and sequencing of the V3-V4 region of the 16S rRNA. LAB counts in samples and MAC of Serro ranged between 5.4 and 8.4 log CFU/g with a mean value of 6.9 log CFU/g, and the main groups/genus identified were lactobacilli, *Lactococcus lactis* and

*Enterococcus* sp.; trends in LAB counts and distribution were not identified considering the characteristics of the samples. Rep-PCR identified intraspecies similarities greater than 75%. The sequencing of DGGE bands identified the prevalence of *L. lactis* in all samples, in addition to *Streptococcus salivarius*. Considering the total DNA of the samples, *L. lactis* was identified as the dominant species in all samples. Rep-PCR and DGGE have proven to be useful tools for studying the lactic microbiota of artisanal cheeses. The integrated approach of the culture-dependent and -independent methods provided a more detailed description of the lactic diversity present in the MAC of Serro. The lactic microbiota of MAC of Serro has a stable composition, with no evident variations considering the evaluated production characteristics.

Keywords: Lactic acid bacteria. Pingo. Rala. Culture-dependent. Culture-independent. Sequencing.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1:</b> Participação por categorias de produtos lácteos no valor de venda em 2016. Fonte: EMBRAPA (2019).....	17
<b>Figura 2:</b> Mapa com as sete regiões produtoras de queijo Minas artesanal (QMA). Fonte: EMATER (2020).....	21
<b>Figura 3:</b> Fluxograma de fabricação do queijo Minas artesanal. Fonte: EMATER (2009) e IMA (2020).....	26
<b>Figura 4:</b> Municípios que compõem a região produtora do Serro em Minas Gerais. Fonte: IEPHA-MG (2018).....	30
<b>Figura 5:</b> Diagrama de fluxo dos métodos cultura-dependentes e -independentes para estudo da diversidade microbiana do queijo (diversidade e atividade, ecologia e filogenia). Adaptado de Ndoye et al. (2011), Cocolin et al. (2018) e Randazzo et al. (2017). ....	45
<b>Figura 6:</b> Princípio da técnica de Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). Adaptado de Strathdee; Free (2013). ....	57
<b>Figura 7:</b> Princípio da técnica de Repetitive element palindromic (Rep-PCR). Adaptado de Riethmuller (2013). ....	58
<b>Figura 8:</b> <b>A.</b> Localização do Estado de Minas gerais no Brasil (área em cinza escuro) e região do Serro no estado de Minas Gerais (área em preto). <b>B.</b> Identificação das cidades onde os queijos analisados nesse estudo foram produzidos (área cinza) na região do Serro. ....	64
<b>Figura 9:</b> Análise de cluster de <i>fingerprinting</i> por Rep-PCR obtidas de 176 cepas de bactérias ácido lácticas isoladas de queijos Minas artesanais da região do Serro (QMA do Serro) com diferentes características de produção.....	72
<b>Figura 10:</b> Análise de agrupamento de <i>fingerprints</i> por Rep-PCR obtidos do DNA total dos 55 queijos Minas artesanais da região do Serro (QMA do Serro) com diferentes características de produção.....	74
<b>Figura 11:</b> Perfis de DGGE da região V3 do gene 16S rRNA dos 55 queijos Minas artesanais da região do Serro (QMA do Serro) com diferentes características de produção. ....	77

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Regulamentações sobre produção de queijo Minas artesanal. Fonte: Adaptado de Araújo et al. (2020).....	22
<b>Tabela 2:</b> Principais métodos cultura-dependentes utilizados no estudo da microbiota autóctone de queijos.....	46
<b>Tabela 3:</b> Principais métodos cultura-independentes utilizados no estudo da microbiota autóctone de queijos. ....	49
<b>Tabela 4:</b> Características dos queijos Minas artesanal do Serro (QMA do Serro).....	68
<b>Tabela 5:</b> Identificação de espécies bacterianas presentes em queijos Minas artesanais da região do Serro (QMA do Serro) a partir do sequenciamento de bandas de DGGE com base na comparação das sequências por BLAST no GenBank. ....	78

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>15</b>
2.1. Produção e consumo de leite e derivados em Minas Gerais .....	15
2.2. Produção do queijo Minas artesanal (QMA) .....	18
2.3. Legislação do queijo Minas artesanal (QMA).....	21
2.4. Queijo Minas artesanal do Serro (QMA do Serro) .....	28
2.5. Microbiota do queijo Minas artesanal (QMA).....	35
2.5.1. Microbiota benéfica.....	36
2.5.2. Microbiota contaminante.....	39
2.5.2.1. Microbiota deteriorante .....	40
2.5.2.2. Microbiota patogênica .....	41
2.6. Monitoramento da qualidade e inocuidade de queijos artesanais.....	42
2.6.1. Métodos cultura-dependentes.....	53
2.6.2. Métodos cultura-independentes.....	54
2.6.2.1. Polymerase Chain Reaction Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (PCR-DGGE).....	56
2.6.2.2. Repetitive element palindromic - Polimerase Chain Reaction (Rep-PCR).....	58
2.7. Aplicação da tecnologia NGS para avaliação da qualidade e inocuidade de queijos artesanais.....	59
<b>3. JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>62</b>
<b>4. OBJETIVOS .....</b>	<b>63</b>
4.1. Objetivo geral .....	63
4.2. Objetivos específicos .....	63
<b>5. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>64</b>
5.1. Amostragem.....	64
5.2.1. Enumeração e identificação dos isolados.....	64
5.2.2. Rep-PCR dos isolados de BAL .....	65
5.2.3. Sequenciamento 16S rRNA dos isolados.....	66
5.3. Métodos cultura-independentes .....	66
5.3.1. Extração do DNA total das amostras de QMA do Serro.....	66
5.3.2. Rep-PCR do DNA total.....	66
5.3.3. PCR-DGGE.....	67
<b>6. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>68</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>80</b>
<b>8. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>81</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Queijos Minas artesanais (QMA) são tradicionalmente produzidos com de leite cru, “pingo” (fermento endógeno resultante da dessoragem dos queijos já salgados e coletados de um dia para o outro) e coalho, e se destacam por suas características sensoriais e pela importância social, cultural e econômica, gerando emprego e renda para várias famílias de pequenos produtores que mantêm a tradição familiar, difundindo o saber-fazer de geração em geração. As variedades de QMA são nomeadas de acordo com a sua origem geográfica, sendo atualmente consideradas sete: Araxá, Canastra, Campo das Vertentes, Cerrado, Serra do Salitre, Serro e Triângulo Mineiro. QMA produzidos em cada uma dessas regiões apresentam algumas particularidades de produção que resultam em características específicas típicas, influenciadas pelo *terroir* (clima, água, relevo, solo, pastagens nativas) e pela microbiota também presente no fermento endógeno. Bactérias ácido lácticas (BAL), são os principais componentes desse fermento endógeno, com um papel fundamental na produção dos QMA, responsáveis por importantes características sensoriais e na sua bioconservação devido a produção de compostos antimicrobianos.

A produção dos QMA tem sido alvo de uma série de modificações visando a adequação à legislação brasileira principalmente em relação a equipamentos utilizados com a substituição de materiais de madeira por outros, como fibra de vidro, polipropileno e aço inox, que apresentam fácil higienização. Essas modificações têm contribuído para reduzir falhas higiênicas no processo de produção, porém podem modificar a composição de sua microbiota determinar falhas de produção, principalmente na etapa de dessoragem. Para corrigir problemas de fabricação, os produtores do QMA do Serro têm utilizado “rala” (parte ralada do próprio queijo artesanal com 3 a 5 dias de fabricação) como fermento endógeno, o que também pode alterar a microbiota do QMA do Serro.

O estudo dos microrganismos autóctones é de extrema importância para avaliação da qualidade desses produtos. Por serem produzidos com leite cru e submetidos a alta manipulação durante a produção, QMA são altamente susceptíveis a contaminação por microrganismos deteriorantes e patogênicos. Além disso, a alteração do fermento endógeno, pode levar a alterações na microbiota do QMA. Devido a importância da microbiota láctica e a crescente preferência dos consumidores por queijos artesanais, o estudo da microbiota presente QMA por técnicas confiáveis permite a definição de sua identidade e garante a qualidade e inocuidade desse símbolo regional.

O estudo da microbiota presente em queijos pode ser realizado por métodos cultura-dependentes ou por métodos cultura-independentes; ambos possuem vantagens e desvantagens e sua associação é fundamental para uma caracterização ampla da microbiota desses produtos. A associação dos métodos cultura-dependentes e -independentes nos estudos da população microbiana visa compensar possíveis limitações que as técnicas individualmente possam apresentar e contribuir com uma caracterização mais completa e detalhada da microbiota autóctone presente nos QMA analisados. Os resultados gerados podem fornecer informações relevantes a respeito de segurança, qualidade e interferência das características de produção dos queijos analisados.

Assim, nesse trabalho foram utilizadas abordagens combinadas de métodos cultura-dependentes e -independentes para fornecer uma descrição detalhada sobre a microbiota láctica presente em QMA produzido na região do Serro, verificando a influência de diferentes fatores de produção, como fermento endógeno, cidade produtora, tamanho da produção, tamanho da fazenda produtora e tempo de produção sobre a microbiota presente.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Produção e consumo de leite e derivados em Minas Gerais

Leite é um alimento de grande importância nutricional utilizado por humanos há milênios e o consumo está associado com uma alimentação saudável e de qualidade (O'SULLIVAN; COTTER, 2017; RAZA; KIM, 2018). Dentro do úbere, o leite de uma vaca saudável permanece estéril, mas durante a ordenha, esse produto inevitavelmente se contamina ao entrar em contato com o ar e superfícies de equipamentos. A composição centesimal do leite o torna um excelente meio para a multiplicação de vários microrganismos. Fatores relacionados com os animais (sanidade, estágio de lactação e alimentação), ambientais (local de alojamento e ordenha), fatores de contato (superfície da teta, com outros animais, equipamentos de ordenha e humanos) e fatores operacionais (higienização do úbere, dos equipamentos, manuseio, armazenamento e transporte do leite) influenciam na microbiota contaminante (O'SULLIVAN; COTTER, 2017; GOBBETTI et al., 2018).

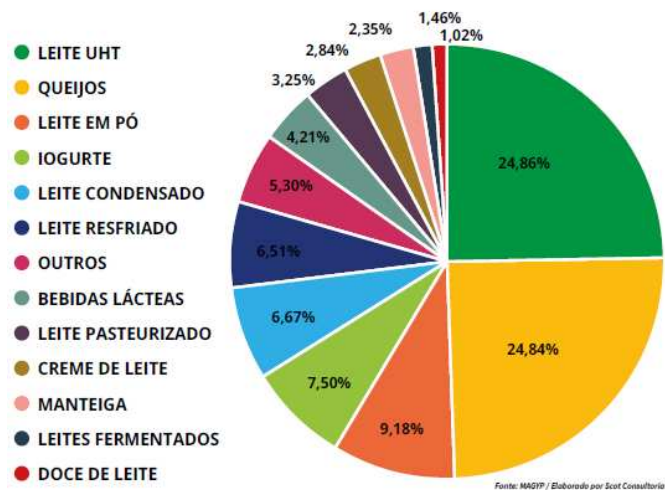
A qualidade e inocuidade do leite cru e de seus derivados é diretamente influenciada pela microbiota presente. A comunidade microbiana presente no leite é complexa e desempenha inúmeras funções, tanto prejudiciais por ação de microrganismos deteriorantes e patogênicos, como benéficas e de interesse industrial como probióticos, culturas *starter* e não *starter*, principalmente bactérias ácido lácticas - BAL. Esses grupos microbianos podem contaminar o leite em diferentes etapas de produção e são relevantes para a cadeia leiteira (GAGLIO et al., 2019; PERIN et al., 2019). O controle da contaminação microbiana no leite pode ser considerado como ponto-chave no controle de qualidade e segurança dos laticínios (GALIMBERTI et al., 2015; FOX et al., 2017; PANTHI et al., 2017).

O Brasil possui o maior rebanho de bovinos do mundo, com cerca de 225 milhões de cabeças, e mais de 24 milhões de vacas leiteira e configura-se como o quarto maior produtor mundial de leite, atrás da Índia, Estados Unidos e Paquistão, sendo responsável por 3,7% da produção mundial (EMBRAPA GADO DE LEITE, 2019, 2020). Desde a década de 1990, o setor leiteiro no Brasil tem discutido alternativas para o desenvolvimento dessa cadeia produtiva, com o estabelecimento inicial do Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite (PNMQL), que resultou na elaboração de normas e novos parâmetros de qualidade e inocuidade nunca antes estabelecidos oficialmente no país. De maneira geral, as normas definidas desde esse período determinaram os critérios e procedimentos para a obtenção, acondicionamento, conservação, transporte, seleção e recepção do leite cru em estabelecimentos registrados no serviço de inspeção oficial (MAPA, 2018; LIMA et al., 2020). Com a finalidade de obter leite

de qualidade e seguro ao consumidor, as boas práticas agropecuárias englobam desde a organização da propriedade, suas instalações e equipamentos, bem como formação e capacitação dos responsáveis pelas tarefas cotidianas realizadas, além adoção das boas práticas de manejo racional e de bem-estar animal. A sanidade do rebanho leiteiro deve ser acompanhada por um veterinário e os animais devem ser controlados para parasitoses, mastite e livres de brucelose e tuberculose em conformidade com o Regulamento Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (EMATER, 2009; MAPA, 2018; BRASIL, 2019).

A produção nacional de leite em 2017 foi de 33,5 bilhões de litros, sendo o estado de Minas Gerais o maior produtor, produzindo 8,9 bilhões de litros no mesmo ano, com produtividade de 5 litros/vaca/dia (EMBRAPA GADO DE LEITE, 2019, 2020). O tamanho das fazendas brasileiras é menor quando comparado com as de outros países e, ainda assim é crescente o volume individual de produção e de leite inspecionado, tornando as adaptações às mudanças tecnológicas e de mercado indispensáveis à inserção no mercado internacional. Os valores mostram a relevância da atividade leiteira para a economia brasileira, tanto no cenário interno como no externo, principalmente para o Estado de Minas Gerais. Como consequência, a produção leiteira no Brasil vem crescendo nos últimos anos em conjunto com a exportação, revelando seu grande potencial de desenvolvimento e consolidação como produto de importância na economia nacional. Em Minas Gerais, além da expressividade econômica, a pecuária bovina também tem importância social, pois gera trabalho e renda no campo, além de disponibilizar para o mercado, alimentos de alto valor nutritivo, contribuindo para a segurança alimentar. A expansão da oferta de leite e o aumento de sua qualidade estão relacionados com o aumento da renda *per capita* e às mudanças de hábitos e conscientização dos consumidores (PEROBELLI; ARAÚJO JUNIOR; CASTRO, 2018; EMATER - MG, 2019).

Em todo mundo são produzidas 816 milhões de toneladas de leite por ano e, em média são consumidos por habitante 116,5 equivalentes kg de leite e esses valores têm aumentado a cada ano (EMBRAPA, 2019). De acordo com EMBRAPA (2019), na Pesquisa Anual do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em 2016 o leite longa vida foi o derivado lácteo que apresentou mais vendas no setor, seguido de perto pelos queijos (Figura 1). Queijos são apreciados por seu sabor e possuem maior valor agregado. Sua produção é uma maneira natural de preservar o leite convertendo-o em um alimento saboroso e nutritivo, conservando seus componentes como proteína, gordura, cálcio, fósforo e vitaminas.



**Figura 1:** Participação por categorias de produtos lácteos no valor de venda em 2016. Fonte: EMBRAPA (2019).

Em todo o mundo são produzidos inúmeros tipos diferentes de queijos, alguns são elaborados industrialmente com leite pasteurizado, outros são produzidos com leite cru e se assemelham às formas tradicionais de preparo, preservando tradições socioculturais seculares. Esses últimos são denominados queijos artesanais (MARTINS et al., 2018; KAMIMURA et al., 2019b, 2019a). O aumento da produção e consumo de queijos artesanais está relacionado com uma classe de poder aquisitivo mais elevado e com maior conhecimento sobre produtos singulares, com qualidade, valor social, cultural e econômico (OLIVEIRA et al., 2018b). A produção de queijos artesanais é importante para milhares de famílias da zona rural, pois contribui com a economia local, para a geração de empregos e é fonte de renda para muitas famílias (PINEDA et al., 2020). O aumento da divulgação desses produtos em programas de diversos meios de comunicação também tem auxiliado no aumento do interesse dos consumidores (CRMV-MG, 2019).

No Brasil, a produção de queijos artesanais tem ganhado força, com rápido crescimento da produção de queijos variados, capazes de atender expectativas e demanda de consumidores em diferentes faixas de poder aquisitivo em Minas Gerais, maior estado produtor de queijos no Brasil (PINEDA et al., 2020).

## 2.2. Produção do queijo Minas artesanal (QMA)

O modo original de fazer queijo em Minas Gerais remonta aos séculos XVII e XVIII, período em que o Brasil era colônia de Portugal. A Coroa Portuguesa promoveu transporte marítimo do gado bovino para as Américas principalmente para tração animal, alimentação e transporte de pessoas e cargas, auxiliando na expansão e interiorização do território brasileiro e na alimentação da população, que aumentava com o descobrimento de ouro no interior da então colônia (IEPHA-MG, 2018). Para aproveitamento e conservação do leite, os colonizadores introduziram técnicas de produção de queijo e esses permaneciam na região pois o escoamento da produção era um obstáculo pela dificuldade de acesso devido à geografia e condições das estradas. Os queijos mineiros se adaptaram à realidade local, aos costumes e cultura, com técnicas, instrumentos e fazeres que lhe são próprios, utilizavam leite do gado trazido pelos colonizadores, coagulante desenvolvido a partir do estômago de bezerro (coalho) e “pingo”, fermento natural desenvolvido ao longo dos tempos, obtido a partir do soro drenado do próprio queijo produzido anteriormente. O “pingo” contém alta concentração de cloreto de sódio e BAL endógenas, que conferem características sensoriais típicas do queijo de cada produtor. Alguns historiadores indicam que o modo de fazer foi adaptado das técnicas utilizadas na Serra da Estrela, em Portugal. Contudo, os queijos Serra da Estrela são elaborados com leite cru de ovelha e coalho vegetal do extrato de flores e brotos do cardo e os QMA não se assemelham aos queijos produzidos em Portugal (IEPHA-MG, 2002; IPHAN, 2014, 2018; KAMIMURA et al., 2019b; CARNEIRO et al., 2020).

QMA apresentam características semelhantes ao queijo São Jorge, produzido na Ilha de São Jorge, nos Açores. O queijo São Jorge é produzido com leite de vaca, utiliza coalho animal para coagulação e é maturado. Outros relatos históricos aumentam o debate sobre a origem dos QMA como os que os portugueses trouxeram açorianos no período de colonização para o Brasil e esses se deslocaram para Minas Gerais. O uso do “pingo”, que confere características microbiológicas específicas na produção dos QMA são indicativos de que os QMA podem ser derivados do queijo do Pico e São Jorge, produzidos especialmente por habitantes do arquipélago de Açores no oceano Atlântico, pertencente a Portugal. Outra semelhança é que nessa região havia cultura de criação de bovinos leiteiros pelos povoados das regiões holandesas que ali se estabeleceram. Esses fatores indicam que há uma grande similaridade entre os queijos historicamente produzidos no arquipélago dos Açores em comparação com o queijo da Serra da Estrela e QMA (NETTO, 2011; CRMV-MG, 2019; KAMIMURA et al., 2019b).

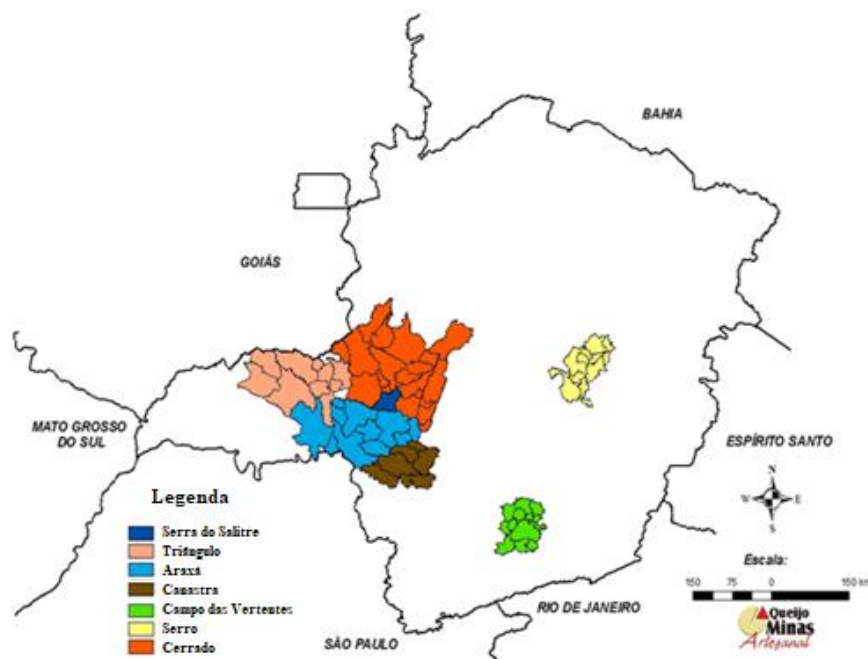
Segundo a Lei nº 13.860, de 18 de julho de 2019, é considerado queijo artesanal aquele elaborado por métodos tradicionais, com vinculação e valorização territorial, regional ou cultural, conforme protocolo de elaboração específico estabelecido para cada tipo e variedade, e com emprego de boas práticas agropecuárias e de fabricação (BRASIL, 2019). QMA é considerado um dos queijos mais antigos e mais conhecidos no Brasil e até mesmo internacionalmente. QMA é considerado como 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 (MINAS GERAIS, 2020). QMA possui formato cilíndrico e textura semidura de pasta crua com crosta de cor branco-amarelada e sabor ácido, pesando entre 1 a 1,2 kg e teor de umidade máximo de 45,9%, sendo caracterizado como um queijo com teor de umidade médio (LUIZ et al., 2016a).

As características sensoriais únicas do QMA são provenientes da microbiota diversa presente, proveniente do leite cru e do fermento endógeno utilizado e que constantemente modifica durante a fermentação e maturação (BRUMANO, 2016). O desenvolvimento de espécies microbianas específicas durante a produção do queijo e maturação que se multiplicam em cada um desses microclimas, além de conferir aos queijos a aparência e sabor específicos, resultam na assinatura microbiana desses produtos devido a fatores como vegetação predominante local, água, relevo, umidade relativa do ar, alta altitude, solo, relevo, temperatura média e peculiaridades do processo de produção. Esses fatores condicionaram condições propícias para criação do gado leiteiro e para a produção de queijos com *terroir* característico da localidade (IPHAN, 2006; PAXSON, 2010; PRADO JUNIOR, 2018; KAMIMURA et al., 2019b).

A palavra francesa *terroir* não possui nenhuma tradução direta para o português e refere-se ao sabor e aroma de um alimento artesanal e sua ligação íntima com o determinado espaço geográfico e todas as peculiaridades edafoclimáticas em que é produzido. Essas condições permitem o desenvolvimento de microrganismos benéficos que atuarão sobre a matéria-prima conferindo aroma e sabor característicos. Minas Gerais possui a maioria da produção de queijo realizada em áreas rurais. Mesmo com modo de fazer semelhantes, cada região produtora de queijo produz queijos diferentes em sabor e aroma. Cada produção carrega consigo o *terroir* de onde o queijo é produzido, que confere características singulares ao queijo artesanal produzido. Alguns produtores do Serro tem utilizado o termo “tremruá”, termo para o “mineirês” equivalente, para explicar os elementos que particularizam essa região, o caráter sensorial dos queijos e a realidade sociocultural distinta (PRADO JUNIOR, 2018).

O processo de produção de QMA envolve a arte de combinar a dosagem de leite, coagulantes, sal, utensílios, peso das mãos e tempo. Sua produção é caracterizada pela produção de mão de obra familiar, de baixa escala e pelo uso de leite cru. A cadeia produtiva de QMA é responsável por geração de renda de grande número de pequenos produtores rurais. Cada região caracterizada como produtora de QMA possui seu "saber-fazer" característico, que são transmitidos de geração em geração, e que conferem aos queijos uma identidade própria, de acordo com o local onde é fabricado. As regiões são reconhecidas pela Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Minas Gerais (EMATER) e cadastrados no Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) (EMATER, 2019; EMBRAPA GADO DE LEITE, 2019).

O estado de Minas Gerais, maior produtor de leite do país, preserva a cultura e a tradição de produtos artesanais, dentre esses, os queijos destacam-se nas diversas regiões do estado, algumas já com denominação de origem e outras ainda carecendo de reconhecimento (EMATER, 2019). De acordo com EMATER (2020), Minas Gerais atualmente possui sete regiões tradicionais produtoras de QMA: Araxá, Campo das Vertentes, Canastra, Cerrado, Serra do Salitre, Serro e Triângulo Mineiro (Figura 2). A divisão dessas regiões é baseada em fatores abióticos como altitude, temperatura média, vegetação predominante, umidade relativa do ar e peculiaridades do processo de fabricação dos queijos que conferem características sensoriais, físico-químicas e microbiológicas dos queijos artesanais (KAMIMURA et al., 2019b). Embora as etapas do processo de fabricação dos queijos sejam semelhantes, dentro dessas regiões podem existir pequenas variações nas técnicas de elaboração do QMA. As sete regiões, que se estendem por 75 municípios, responsáveis pela produção de aproximadamente 50 mil toneladas de QMA por ano, contando com 9 mil produtores, legalizados ou não. Apenas 245 produtores são cadastrados no IMA e 36 produtores possuem o registro do Selo ARTE (EMATER, 2020).



**Figura 2:** Mapa com as sete regiões produtoras de queijo Minas artesanal (QMA).  
Fonte: EMATER (2020).

### 2.3. Legislação do queijo Minas artesanal (QMA)

O modo artesanal de produção dos queijos Minas artesanais constitui importante forma imaterial do patrimônio cultural brasileiro e como produtos alimentícios, devem atender à normas específicas para que possam ser comercializados. A principal finalidade das normas é salvaguardar a saúde pública. Entretanto, as legislações federais e estaduais que disciplinam a produção, comércio e fiscalização sanitária dos queijos artesanais é restritiva e por muitas vezes conflituosa (PEREIRA, 2012). O Estado de Minas Gerais foi o primeiro no Brasil a desenvolver legislação própria para produção de queijos artesanais produzidos com leite cru. Uma série de regulamentações na forma de decretos, leis, instruções normativas, portarias e resoluções foram desenvolvidas e implementadas para caracterizar, padronizar e regulamentar processos de produção e comercialização do QMA em virtude da utilização de leite cru para sua produção (ARAÚJO et al., 2020). Essas regulamentações sofreram modificações para se adequar às diversas alterações que ocorreram ao longo dos anos, muitas vezes descaracterizando o QMA quanto ao processo produtivo, pela imposição da submissão de longos períodos de maturação aos queijos, tornando-os duros e secos e alterando o padrão tradicional regulamente obtido pelos produtores. As principais regulamentações brasileiras relacionadas com a produção de queijos Minas artesanais estão apresentadas na Tabela 1.

**Tabela 1:** Regulamentações sobre produção de queijo Minas artesanal.

<b>Regulamentação</b>	<b>Órgão</b>	<b>Data</b>	<b>Ementa</b>	<b>Referência</b>
<b>Lei n° 1.283</b>	MAPA	18 de dezembro de 1950	Dispõe sobre a inspeção industrial dos produtos de origem animal e dá outras providências	BRASIL (1950)
<b>Lei n° 30.691</b>	MAPA	29 de março de 1952	Aprova o novo Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal - RIISPOA	BRASIL (1952)
<b>Decreto n° 1.255</b>	MAPA	25 de junho de 1962	Altera o Decreto n° 30.691, de 29 de março de 1952, que aprovou o regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal	BRASIL (1962)
<b>Portaria n° 146</b>	MAPA	07 de março de 1996	Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Produtos Lácteos	BRASIL (1996)
<b>Lei n° 14.185</b>	IMA	13 de janeiro de 2002	Dispõe sobre o processo de produção do queijo Minas artesanal	MINAS GERAIS (2002a)
<b>Portaria n° 518</b>	IMA	14 de junho de 2002	Dispõe sobre requisitos básicos das instalações, materiais e equipamentos para a fabricação do queijo Minas artesanal	MINAS GERAIS (2002b)
<b>Portaria n° 546</b>	IMA	29 de outubro de 2002	Identifica a região do Serro	MINAS GERAIS (2002c)
<b>Instrução Normativa n° 57</b>	MAPA	15 de dezembro de 2011	Dispõe sobre o período de maturação dos queijos artesanais tradicionalmente elaborados a partir de leite cru	BRASIL (2011)
<b>Instrução Normativa n° 30</b>	MAPA	07 de agosto de 2013	Revoga a Instrução Normativa n° 57	BRASIL (2013)
<b>Portaria n° 1.305</b>	IMA	30 de abril de 2013	Estabelece diretrizes para a produção do queijo Minas artesanal	MINAS GERAIS (2013)
<b>Decreto n° 9.013</b>	MAPA	29 de março de 2017	Regulamenta a Lei n° 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei n° 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal	BRASIL (2017)
<b>Lei n° 13.680</b>	MAPA	14 de junho de 2018	Altera a Lei n° 1.283, de 18 de dezembro de 1950, para dispor sobre o processo de fiscalização de produtos alimentícios de origem animal produzidos de forma artesanal	BRASIL (2018)
<b>Lei n° 23.157</b>	IMA	18 de dezembro de 2018	Dispõe sobre a produção de queijos artesanais de Minas Gerais	MINAS GERAIS (2018)
<b>Portaria n° 1.937</b>	IMA	14 de agosto de 2019	Dispõe sobre a habilitação sanitária dos queijos artesanais e da concessão do selo Arte às queijarias com habilitação sanitária no IMA	MINAS GERAIS (2019)
<b>Portaria n° 1.969</b>	IMA	26 de março de 2020	Dispõe sobre a produção de Queijo Minas Artesanal em queijarias e entrepostos localizados dentro de microrregiões definidas e para as demais regiões do Estado, caracterizadas ou não como produtora de Queijo Minas Artesanal	MINAS GERAIS (2020)
<b>Portaria n° 2.033</b>	IMA	23 de janeiro de 2021	Dispõe sobre os parâmetros e padrões físico-químicos e microbiológicos de alimentos de origem animal e água de abastecimento	MINAS GERAIS (2021)

Fonte: Adaptado de Araújo et al. (2020).

O decreto n° 30.691 de 29 de março de 1952 (BRASIL, 1952) aprovou o regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA). Essa legislação federal contemplava o queijo Minas artesanal, mas agrupava todas as variedades em um único tipo, “queijo Minas”, juntamente com queijos frescos, Minas comum, pasteurizados, curados e queijo de coalho, rotulados sem especificação da variedade. O decreto n° 1.255 promulgado em 1962 (BRASIL, 1962) permitiu legalmente a comercialização municipal ou intermunicipal de QMA desde que com período mínimo de maturação de 10 dias. Como não havia queijarias formalizadas e não havia detalhamento de como os queijos deveriam ser maturados, foi inviabilizado o acesso dos pequenos produtores a mercados formais. A deficiência nas legislações levou a impactos negativos na qualidade e inocuidade desses produtos, que eram vendidos no mercado informal. Visando a produção de queijos artesanais com qualidade e inocuidade e a comercialização desses produtos, o governo federal e diferentes estados brasileiros começaram a revisar as leis vigentes e criar novas normas na década de 1990 (ARAÚJO et al., 2020).

Em 1996, o Ministério da Agricultura publicou a Portaria n° 146 de 7 de março de 1996 (BRASIL, 1996), aprovando os regulamentos técnicos para identificação e qualidade de produtos lácteos, incluindo queijos. Nessa portaria fica excluída a obrigação da pasteurização ou de outro tratamento térmico do leite destinado à produção de queijos submetidos a processo de maturação a uma temperatura superior a 5 °C, durante um tempo não inferior a 60 dias. A maturação obrigatória dos queijos, além de ser um obstáculo para sua comercialização, também comprometia tanto os aspectos históricos e sociais da fabricação do QMA quanto suas características sensoriais e microbiológicas, pois após os 60 dias de maturação, os queijos muitas vezes se tornavam duros e com sabor amargo, levando a uma menor aceitação pelo consumidor e descaracterização do produto (KAMIMURA et al., 2019b). Essa regulamentação sobre o período de maturação dos QMA só foi alterada em 2013 pela IN n° 30 (BRASIL, 2013).

Em 13 de janeiro de 2002 foi promulgada a lei 14.185 que dispõe sobre o processo de produção do QMA (MINAS GERAIS, 2002a), regulamentando sua produção. De acordo com essa lei, para obtenção do certificado que permite a comercialização do queijo de leite cru dentro do Estado, o proprietário e a propriedade deveriam estar cadastrados no Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), que fiscalizaria as condições de produção. Essa lei foi regulamentada no mesmo ano pelo Decreto n° 42.645. Em 14 de junho de 2002, foi promulgada a Portaria n° 518 que dispõe sobre os requisitos básicos para instalações, materiais e equipamentos para a fabricação de QMA. E em outubro do mesmo ano foi identificada a região do Serro como produtora de QMA pela Portaria n° 546, de 29 de outubro de 2002.

Em 13 de dezembro de 2011, a indicação geográfica do Serro (I.G. n° 201001) foi reconhecida pelo Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI). Um dos pré-requisitos era a organização dos produtores em associações e cooperativas (IPHAN, 2014). No mesmo ano, a Instrução Normativa n° 57, de 15 de dezembro, permitiu a redução do período de maturação dos queijos artesanais tradicionalmente elaborados com leite cru para um período inferior a 60 dias, desde que estudos técnico-científicos comprovassem que a redução do período de maturação não compromete a qualidade e a inocuidade do produto. A produção fica restrita à queijaria situada em região de indicação geográfica certificada ou tradicionalmente reconhecida e o rebanho deve passar por vigilância higiênico-sanitária, devendo a propriedade ser oficialmente livre de brucelose e tuberculose e implementar o Programa de Controle da Mastite com a realização mensal de exames para detecção da doença e do Programa de Boas Práticas de Ordenha e Fabricação, incluindo o controle de operadores, pragas e transporte adequado do produto ao entreposto (BRASIL, 2011).

E em 2013 foram promulgados, a Instrução Normativa n° 30 de 07 de agosto de 2013 (BRASIL, 2013), que revogou a Instrução normativa n° 27 de 15 de dezembro de 2011 e a Portaria n° 1.305, de 30 de abril que estabeleceram as diretrizes para o tempo de maturação dos QMA (MINAS GERAIS, 2013) e oficializou o período mínimo de maturação em 17 dias para o QMA do Serro.

A atualização do RIISPOA em 2017 estabeleceu que o período de maturação pode ser modificado mediante realização obrigatória de estudos científicos que comprovem a qualidade e inocuidade do produto maturado nessas condições. A redução do tempo de maturação é um tema considerado controverso, pois não há especificações de quais metodologias e procedimentos devem ser adotados. Essas controvérsias permitem diferentes interpretações para estudos conduzidos com diferentes critérios de avaliação (BRASIL, 2017; ARAÚJO et al., 2020).

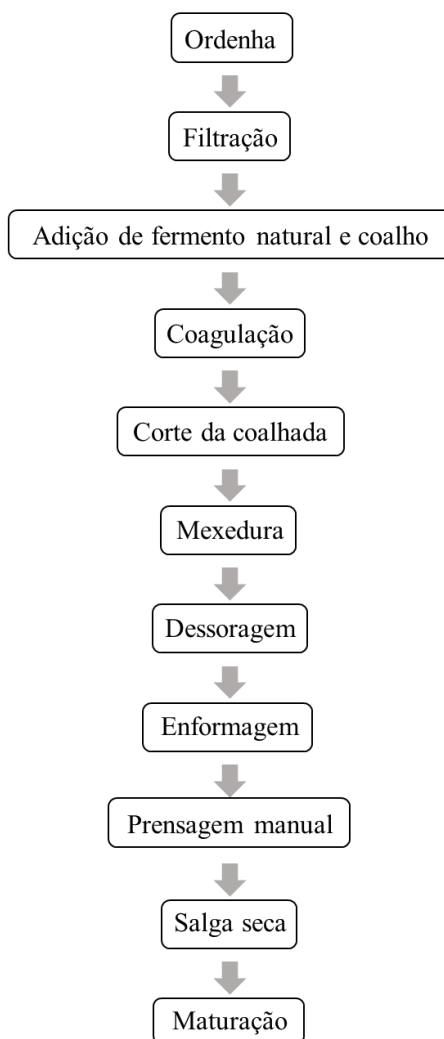
Em 2018, a lei n° 13.680 de 14 de junho (BRASIL, 2018), que altera a lei n° 1.283 de 18 de dezembro de 1950 e cria o selo estadual chamado ARTE (artesanal), esse selo identifica produtos de origem artesanal que podem ser comercializados em todo o país e permite a fiscalização de produtos artesanais por órgãos públicos estaduais de saúde e a substituição do selo do Serviço de Inspeção Federal pelo Selo ARTE, simplificando as exigências de catalogação dos produtores. A fabricação dos queijos deve seguir as regras relativas à maturação previstas na Instrução Normativa n° 57, de 15 de dezembro de 2011. Em 2018, a lei n° 23.157 foi promulgada em 18 de dezembro, revogando a lei n° 20.549, de 18 de dezembro de 2012.

Em 2019 o IMA publicou a portaria que dispõe sobre a habilitação sanitária dos queijos artesanais e da concessão do Selo Arte às queijarias com habilitação sanitária no IMA (MINAS GERAIS, 2019) e em 2021 pela Portaria nº 2.033, de 23 de janeiro o IMA indicou os padrões físico-químicos e microbiológicos dos QMA (MINAS GERAIS, 2021).

A produção e comercialização dos queijos artesanais de Minas Gerais foram posteriormente regulados pela lei nº 23.157 de 18 de dezembro de 2018. Segundo essa norma, esses queijos são caracterizados pela produção exclusivamente com leite de vaca, integral, fresco e cru e com características de identidade e qualidade específicas. O leite empregado na produção dos queijos artesanais deve ser produzido na propriedade ou posse rural em que está a queijaria (MINAS GERAIS, 2018). Considera-se a data de fabricação do QMA, a data do término do período de maturação, que deve ser realizada a temperatura ambiente ou em ambiente climatizado, sob temperatura de 12 a 18 °C pelo período de 60 (sessenta) dias ou inferior, quando estudos técnicos-científicos comprovarem que a redução do período de maturação não compromete a inocuidade do produto (BRASIL, 2013; MINAS GERAIS, 2020).

De acordo com a Portaria do IMA nº 1.969, de 26 de março de 2020 (MINAS GERAIS, 2020), o processo de fabricação de QMA é realizado com as fases apresentadas na Figura 3. O processo produtivo de QMA é semelhante entre as regiões, com adaptações relacionadas à tradição, expressas na forma de manipulação do leite, quantidade ingredientes, coalho, massas, prensagem e no tempo e condições de maturação.

Todo processo produtivo deve ser iniciado com leite que não tenha sofrido tratamento térmico em uma queijaria anexa à sala de ordenha em até 90 (noventa) minutos após o começo da ordenha, que pode ser manual ou mecânica. A filtração do leite ordenhado é realizada em filtros de fibra sintética (PINEDA et al., 2020). Como pode-se verificar no fluxograma (Figura 3), os principais ingredientes são o leite cru, fermento endógeno, “pingo” (que contém culturas lácticas naturais), coalho e sal. O “pingo”, ou cultura endógena é obtido a partir do soro do queijo que é produzido no dia anterior, a partir da expulsão do soro no queijo após ser colocado na forma. A quantidade de “pingo” adicionada ao leite cru varia com as queijarias e com a estação do ano, sendo as concentrações adicionadas entre 0,1 a 2% (LUIZ et al., 2016a).



**Figura 3:** Fluxograma de fabricação do queijo Minas artesanal. Fonte: EMATER (2009) e IMA (2020).

A adição do “pingo” obtido na dessoragem, e na coagulação da massa, além de conferir sabor característico ao QMA e na inibição de microrganismos indesejáveis. A quantidade de “pingo” a ser adicionado depende da quantidade do leite, na época do ano e no modo de fabricação, que é variável entre as regiões. No “pingo” há um conjunto de BAL que são específicas de cada região, sendo resultado do *terroir*, que é influenciado pela água, solo, relevo, clima e pastagens naturais (IPHAN, 2014; PRADO JUNIOR, 2018). BAL presentes no “pingo” apresentam importante papel na segurança microbiológica dos QMA por contribuírem para uma rápida redução do pH e no acúmulo de substâncias antimicrobianas como ácidos orgânicos, diacetil e bacteriocinas (BRUMANO, 2016).

O coalho, ou coagulante, natural, feito de estômago seco e salgado de bezerro, ou industrial (pó ou líquido), possui duas enzimas (pepsina e renina) que proporcionam a coagulação do leite e a formação de uma massa. Essa etapa é chamada coagulação e acontece

no período de até 90 minutos. A coagulação pode ser diferente entre as regiões produtoras e até mesmo entre produtores de uma mesma região, pois cada queijaria pode utilizar uma marca de coalho diferente, que pode influenciar nas características finais do produto.

Após a coagulação, é realizado o corte da massa obtida para separação do soro. A coalhada é cortada obtendo-se grãos de tamanhos característicos de cada região, sendo essa mais uma etapa variável entre as regiões. Para auxiliar na separação do soro é realizada a mexedura de forma lenta e por poucos minutos. Essa etapa também pode variar entre as regiões em função do tempo e velocidade. A decantação lenta e flutuação dos grãos indica falha no processamento e, portanto, deve-se eliminar a massa com problema, pois houve uma falha no processamento.

Na dessoragem, o excesso de soro é retirado. A quantidade de soro a ser retirada é uma característica de cada região. Após essa etapa é realizada a enformagem, inicialmente colocando a massa em moldes, formas de plástico redondas, higienizadas para o queijo adquirir a sua forma característica. Essa etapa também é característica de cada região, pois nas regiões da Canastra e Serra do Salitre costumam usar pano e na região do Serro essa etapa é realizada apenas com o uso das mãos

A prensagem, a principal diferença tecnológica entre os queijos Minas artesanais produzidos em diferentes regiões, é característica de cada região. Nas regiões da Canastra e do Cerrado costuma-se utilizar pano e no Serro esta etapa é realizada sem o pano. Essa etapa tem como objetivo retirar o excesso de soro dos grãos, pela aproximação deixando o produto mais compacto e liso. A prensagem é realizada manualmente usando luvas plásticas, descartáveis estéreis ou as próprias tampas das formas. A diferença na etapa de prensagem está diretamente relacionada com o tempo de maturação dos QMA.

Salga-se ambos os lados do queijo com sal marinho grosso destinado ao consumo humano. A primeira salga é realizada após a prensagem, aproximadamente 3 horas a partir do início da produção (PINEDA et al., 2020). O sal permanece geralmente por 6 a 12 horas, quando o queijo é virado e é realizada a segunda salga por 12 horas. A variação dessa etapa em função do tempo de salga e da quantidade de sal utilizado que são definidos por cada produtor. Posteriormente, durante a noite é recolhido o “pingo”, num volume mínimo de 4 litros por 100 litros de leite.

Após a etapa de prensagem e salga, o queijo é retirado da forma para maturar. Maturação é a última etapa da produção do queijo e objetiva desenvolver características sensoriais como sabor, textura, cor, aparência, desidratar e estabilizar o produto para adquirir consistência desejada. Essa fase possui duração específica para cada região, definida pela Portaria do IMA

nº 1.969, de 26 de março de 2020. De acordo com essa portaria, fica definido o período de maturação do queijo Minas Artesanal como mínimo de 14 (quatorze) dias para a região de Araxá, mínimo de 17 (dezesete) dias para a região do Serro, e para as demais regiões geralmente apresentam um período mínimo de maturação será de 22 (vinte e dois) dias ou pelo maior período especificado em estudos científicos.

Existe ainda a etapa de acabamento, também chamada de grosagem ou “rala”, para dar acabamento estético para remoção de imperfeições e favorecer sua comercialização. Essa etapa não é obrigatória e cada região pode fazer de maneiras diferentes. No Serro é realizada uma ralagem, com ralos artesanais ou industriais. Na Canastra e Serra do Salitre o acabamento é feito com lixas. Na região do Serro, alguns produtores fazem uso da “rala”, parte ralada do QMA, com 3 a 5 dias de fabricação na produção de novos QMA. A “rala” é adicionada ao leite em substituição ao “pingo” (VALE; RODRIGUES; MARTINS, 2018).

Todas as etapas devem ser realizadas rapidamente e com critérios rigorosos de higiene para excluir toda a possibilidade de contaminação, deterioração e proliferação de microrganismos patogênicos, obtendo alimentos que não oferecem risco à saúde dos consumidores. Após o término da fabricação, todos os utensílios devem ser adequadamente higienizados com solução detergente seguindo-se de higienização com solução desinfetante. Recomenda-se colocar os utensílios e expor os equipamentos a solução de hipoclorito de sódio com 100 a 200 mg/L de cloro livre por trinta minutos. Todos os registros de controle relacionados à produção deverão ser mantidos por um período mínimo estipulado pelo IMA (EMATER, 2009; CRMV-MG, 2019). Os padrões físico-químicos e microbiológicos dos QMA estão indicados na Portaria nº 2.033, de 23 de janeiro de 2021 (MINAS GERAIS, 2021).

#### **2.4. Queijo Minas artesanal do Serro (QMA do Serro)**

O queijo Minas artesanal do Serro (QMA do Serro), o “ouro branco” desde os tempo de mineração ainda possui importância econômica e sociocultural para o Estado de Minas Gerais e para o Brasil por gerar empregos, renda, fortalecer a agropecuária familiar de várias famílias de pequenos produtores e o turismo local (BRANT; FONSECA; SILVA, 2007; ALVARENGA, 2015; BRUMANO, 2016; OLIVEIRA et al., 2018a). O reconhecimento do QMA do Serro veio garantir a qualidade, proteção, tradição e valor ao produto da região. O modo de fazer o queijo artesanal da região do Serro foi o primeiro bem registrado como Patrimônio Cultural Imaterial do estado de Minas Gerais pelo Instituto Estadual do Patrimônio Histórico Artístico de Minas Gerais em 7 agosto de 2002 (IEPHA-MG, 2002). O modo artesanal de fazer queijo Minas na

região do Serro, da Serra da Canastra e Salitre/Alto Paranaíba está inscrito no Livro de Registro dos Saberes (Inscr. nº 13) em 13 de junho de 2008 (IPHAN, 2018), o reconhecendo como patrimônio cultural do Brasil e em 13 de dezembro de 2011; o QMA do Serro foi o primeiro queijo brasileiro a receber a Indicação Geográfica (IG) do Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI), que aprovou a IG para o tipo de queijo artesanal fabricado na área do estado, delimitando a região produtora (IPHAN, 2014; ALVARENGA, 2015), o diferenciando de outros queijos e protegendo o produto de eventuais falsificações em sua composição, garantindo procedência e qualidade.

Visando preservar pesquisas, divulgar o passado histórico, a cultura imaterial e incentivar o turismo na região do Serro e o QMA do Serro, a região conta com dois museus, o Museu Regional da casa dos Ottoni, inaugurado em 1991, que conta com acervo inventariado de mais de 500 objetos que contam a história desde a extração do minério e da manufatura do QMA do Serro e o Salão do Queijo Artesanal do Serro, inaugurado em 12 outubro de 2019 contando com espaço multiuso para visita de turistas e encontro de produtores rurais. O salão está inserido em um trabalho de desenvolvimento de uma rota gastronômica (OLIVEIRA et al., 2018a; PEREIRA, 2019). Os dois museus estão situados na cidade do Serro.

Na cidade do Serro irradiou a produção de queijo, que leva seu nome para as cidades vizinhas. Os onze municípios produtores de queijo Minas fazem parte do território cultural e região do Serro: Alvorada de Minas, Conceição do Mato Dentro, Dom Joaquim, Materlândia, Paulistas, Rio Vermelho, Sabinópolis, Santo Antônio do Itambé, Serra Azul de Minas, Serra da Mantiqueira e Serro (Figura 4). Esses municípios estão situados na região centro-nordeste de Minas Gerais, na região central da Serra do Espinhaço, a região é montanhosa, com altitudes que variam entre 600 e 1200 metros. Uma característica peculiar à essa região é o fato de estar localizada em um bioma de transição entre o Cerrado e a Mata Atlântica, que influencia no clima, tipo de solo e vegetação da região. O clima da região é tropical de altitude, com chuvas bem distribuídas entre os meses de setembro a março (IPHAN, 2014; ALVARENGA, 2015; APAQS, 2015; PRADO JUNIOR, 2018). O rebanho da região é composto majoritariamente por animais mestiços destinados à produção leiteira, as principais raças de vacas leiteiras da região são europeias como Holandesa, Jersey e Pardo-Suíço. A produção média é de 110 litros de leite por dia. A vegetação para alimentar o gado nessa região é composta por *Brachiaria* spp., *Panicums*, capim Jaraguá (*Hyparrhenia rufa*), capim Meloso (*Melinis multiflora*) e plantas leguminosas como Carrapicho (*Cenchrus echinatus* L.), Beijo de boi (*Desmodium* sp.), Calopogônio (*Calopogonium mucunoides*), entre outras (PINEDA et al., 2020).

A fabricação de queijos Minas artesanais representa um número expressivo na região do Serro. As 2.581 propriedades, em sua maioria de pequenos pecuaristas, possuem em média 50 bovinos, totalizando 124 mil cabeças nessa região. Dessas propriedades, 1.050 são produtoras de queijo Minas artesanal com produção média de 2.645 toneladas de QMA por ano, gerando uma renda total de produção em torno de 5,87 milhões de reais por ano. Estima-se que apenas 765 propriedades estão cadastradas para nessa atividade (IPHAN, 2006, 2014; PINEDA et al., 2020).



**Figura 4:** Municípios que compõem a região produtora do Serro em Minas Gerais. Fonte: IEPHA-MG (2018).

Para preservar e valorizar a tradição produtiva e comercializar o QMA do Serro, em 29 de janeiro de 1964 foi fundada a Cooperativa dos Produtores Rurais do Serro (CooperSerro) que atualmente, é a maior cooperativa de Minas Gerais, agregando 145 produtores de queijo artesanal e de leite, sendo responsável por análises laboratoriais, classificação, embalagem e comercialização de cerca de 60 toneladas de QMA do Serro por mês, mantendo mercado local e um entreposto de distribuição no CEASA de Belo Horizonte, capital do Estado (PINTO, 2004; PEREIRA, 2019; COOPERSERRO, 2021).

Como principais características, o QMA do Serro apresenta consistência semidura, textura espessa, cor branco-amarelada e sabor típico e marcadamente mais ácido que os demais queijos Minas artesanais. Possui formato cilíndrico com 13 a 15 cm de diâmetro e 4 a 9 cm de

altura. Sua casca é normalmente esbranquiçada, tendendo a se transformar numa crosta fina e amarelada. Internamente, a massa é branca e consistente, às vezes ligeiramente quebradiça (IEPHA-MG, 2011; KAMIMURA et al., 2019b). QMA do Serro possui peculiaridades como período de maturação mínimo de 17 dias à temperatura ambiente e lavagem da casca (enxague da superfície dos queijos com água) a cada dois ou três dias, dependendo das condições ambientais (MONTEIRO; DA MATTA, 2018; MINAS GERAIS, 2020).

A fabricação tradicional de QMA tem a utilização do “pingo” como parte do saber fazer. O “pingo” possui BAL que apresentam importante papel na segurança dos queijos artesanais, pois agem inibindo microrganismos indesejáveis como deteriorantes e patogênicos, direcionando a fermentação e a maturação dos queijos e conferindo ao produto final características típicas pela microbiota diversificada. Em alguns casos, muitos produtores têm substituído o “pingo” por “rala” (parte ralada do queijo artesanal, com 3 a 5 dias de fabricação produzido no lote anterior) como fermento endógeno. A utilização de “rala” foi justificada pelo possível benefício no aspecto sensorial final do produto: após a substituição de equipamentos e utensílios de madeira por matérias de fácil limpeza como propileno, aço inox e plástico, exigidos pela legislação (MINAS GERAIS, 2002b), os queijos passaram a ter problema na etapa na etapa de dessoragem, com apresentação de uma textura mais macia e passaram a não ser aceitos pelos consumidores. Assim, para direcionar a fermentação dos queijos e obter um produto com dessoramento adequado e textura mais firme alguns produtores de queijo do Serro passaram a utilizar a “rala” como fermento endógeno. A utilização de “rala”, embora tenha resolvido o problema de fabricação, é um fermento que não faz parte do saber-fazer tradicional do QMA e pode levar a alterações na qualidade final dos produtos (BRUMANO, 2016; VALE; RODRIGUES; MARTINS, 2018). Não existe uma regulamentação para a utilização de “rala” na produção de QMA e produtores e consumidores afirmam, empiricamente, que há diferença entre os dois tipos de fermento (VALE, 2018). Os principais estudos que avaliaram e caracterizaram o QMA do Serro serão descritos a seguir.

Machado et al. (2004) avaliaram as características físico-químicas e a aceitação sensorial de QMA do Serro de vinte amostras (10 de pequenos e 10 de grandes produtores), todos produzidas com “pingo”. Os autores verificaram que não houve diferença ( $p > 0,05$ ) tanto para os parâmetros físico-químicos quanto para a análise sensorial (teste de aceitação) entre os QMA do Serro produzidos por pequenos e grandes produtores da região, indicando que a quantidade produzida não é influenciada pelas características de produção. Os QMA do Serro analisados apresentaram teor de umidade (média de 50,84 g/100 g) que os caracterizaram como queijos de alta umidade e que não os adequavam à Resolução que caracteriza queijo Minas

artesanais como queijos de média umidade com até 45,9 g/100 g de umidade. Na avaliação sensorial, os autores consideraram que a pontuação média da aceitação dos queijos, definida por escala hedônica igual a 6, que atribuiu a classificação “gostei ligeiramente” como baixo, pois o QMA do Serro é conhecido por sua boa aceitação sensorial.

A avaliação da qualidade microbiológica de 40 amostras de QMA do Serro (20 frescas, imediatamente após a coleta e 20 após 30 dias em estocagem a 10 °C em câmara fria) não identificou presença de *Salmonella* spp. ou *Listeria monocytogenes*, no entanto, 37 amostras (92,5%) apresentaram-se impróprias para consumo humano, sendo 80% com contagem de coliformes a 35 °C acima de  $5 \times 10^3$  NMP/g, o mesmo valor foi encontrado na contagem de coliformes a 45 °C em 60% das amostras. Trinta e três amostras (82,5%) apresentaram contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva acima de  $10^3$  UFC/g, com contagens mais altas em queijos frescos. Esse microrganismo foi um contaminante frequente, com contagem média superior a  $1,2 \times 10^6$  UFC/g, podendo oferecer risco à saúde do consumidor pela potencial produção de enterotoxinas (BRANT; FONSECA; SILVA, 2007). Os autores explicam que fatores como condições sanitárias dos rebanhos, qualidade do leite, condições higiênico-sanitárias de fabricação (manipulação), transporte e comercialização e o tempo e temperatura de estocagem são fatores que podem explicar a variabilidade dos percentuais de amostras impróprias para consumo.

A influência do período de maturação e das estações (seca e chuvosa) nos parâmetros microbiológicos de 100 amostras de QMA do Serro foram avaliados durante 60 dias por Cardoso et al. (2013), quando a legislação ainda não permitia período inferior de maturação. Não foi detectado *Salmonella*, no entanto, foram identificadas altas contagens de coliformes termotolerantes no terceiro dia de maturação, que diminuiu com os 60 dias de maturação. A contagem de estafilococos coagulase positiva também foi reduzida durante o período de maturação, contudo, foram detectadas enterotoxinas estafilocócicas B e C em queijos após 30 dias de maturação, indicando que o processo de maturação não foi eficaz para impedir a produção dessas substâncias. No entanto, nenhuma cepa de *Staphylococcus* spp. isolada dos QMA do Serro produziu enterotoxinas A, B C ou D. Os autores sugerem que os elevados níveis de patógenos no início do processo de maturação indicam necessidade de melhoria da sanidade do rebanho e higiene nas condições de fabricação.

Galinari et al. (2014) ao avaliarem os aspectos microbiológicos do leite cru, fermento endógeno, QMA do Serro e de biofilmes formados em utensílios de madeira (formas, mesas e prateleiras) utilizados para produção de QMA do Serro, foi verificado que o biofilme era composto por uma diversa microbiota composta principalmente por mesófilos aeróbios, BAL

mesofílicas (lactobacilos e *Lactococcus* spp.) e baixa contagem dos contaminantes avaliados (*S. aureus*, *E. coli* e coliformes) em mesas, no entanto em uma prateleira foi identificado contagem acima do limite para coliformes, enquanto as outras não apresentaram esse microrganismo. Algumas amostras de leite cru continham altas contagens de *S. aureus*, mas todas as amostras de QMA do Serro apresentaram baixas contagens desse microrganismo. O QMA do Serro apresentou contagens seguras para indicadores microbianos de higiene, como *E. coli* e coliformes, além de ausência de patógenos, como *Salmonella* e *Listeria monocytogenes*. Os autores indicam que a qualidade dos queijos está diretamente relacionada com a melhoria da qualidade microbiológica do leite, implantação e manutenção das boas práticas de fabricação e limpeza dos utensílios utilizados.

Martins et al. (2015) determinaram o tempo mínimo de maturação do QMA do Serro de acordo com os limites microbiológicos seguros de acordo com a legislação brasileira pelo monitoramento das alterações das características físicas, físico-químicas e microbiológicas de 256 amostras de 8 produtores durante 64 dias de maturação em diferentes estações (seca e chuvosa) e em diferentes temperaturas de maturação (ambiente e de refrigeração). Entre os patógenos pesquisados, *L. monocytogenes* foi detectado em diferentes etapas de produção, mas *Salmonella* foi detectado somente em um dos queijos refrigerados nos 15 primeiros dias de maturação. A condição a temperatura ambiente por 17 dias foi o tempo mínimo para maturação para reduzir em limites seguros a contagem dos contaminantes coliformes totais, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* em ambas as estações. Quando maturados sob refrigeração, o tempo mínimo de maturação foi maior 33 dias na estação seca e 63 dias na estação chuvosa. Os autores indicam que além de atingir a qualidade microbiológica preconizada pela legislação brasileira, os queijos também mantinham as características de aparência e sabor conhecidas pelos produtores e consumidores após os 17 dias de maturação a temperatura ambiente.

Brumano (2016) avaliou o impacto do tipo de fermento endógeno (“pingo” e “rala”) na qualidade e tempo de maturação de QMA do Serro. A utilização de diferentes tipos e fermento endógeno conferiram queijos com diferentes características, as principais foram acidez, umidade, textura, cor e índice de maturação. Durante o estudo de tempo de maturação, no segundo dia, *L. monocytogenes* foi detectado em 11 dos 12 queijos analisados, não estando presente no restante da maturação. Queijos elaborados com “pingo” apresentaram maior número de isolados e atingiram as contagens exigidas pela legislação em 17 dias, enquanto os elaborados com “rala” em 27 dias, indicando que a utilização de “rala” descaracterizou os

queijos e comprometeu a qualidade microbiológica dos QMA do Serro. A autora sugeriu que houvesse desmembramento da legislação para queijos elaborados com “pingo” e “rala”.

Perin et al. (2017) ao avaliarem QMA de diferentes cinco regiões de Minas Gerais (Serro, Serra do Salitre, Araxá, Canastra e Campo das Vertentes) por métodos cultura-dependentes e -independentes verificaram contagem elevada de coliformes em QMA do Serro. Como esses microrganismos são indicadores de potencial contaminação fecal, há indicação de inadequação das práticas de fabricação. A grande variação entre as contagens microbiológicas de queijos produzidos em uma mesma região indica falta de padronização nos procedimentos de ordenha e na fabricação dos queijos entre as queijarias artesanais. Lactobacilos foi o grupo mais prevalente nas cinco variedades de queijos e que esse fato se deve às condições seletivas que existem nos queijos como baixo pH e alta concentração de sal. Outros microrganismos identificados em QMA do Serro pelo sequenciamento da região 16S rRNA dos isolados de BAL foram lactobacilos, *Enterococcus faecalis* e *Weissella*. Leite (1993), ao avaliar isolados bacterianos de amostras de QMA do Serro por métodos bioquímicos identificou como principais espécies *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris*, *Streptococcus milleri* e *E. faecalis*.

Na avaliação da influência do tipo de fermento endógeno (“pingo” ou “rala”) nas características do QMA do Serro de 6 diferentes produtores maturados em condições controladas de umidade relativa do ar e temperatura por Vale, Rodrigues e Martins (2018) durante 31 dias de maturação houve diferença em um único aspecto físico-químico, pH no terceiro dia de maturação. Os autores indicam que condições de altas temperaturas de maturação e umidade relativa do ar não são adequadas para a maturação do QMA do Serro, pois modificam as características físico-químicas e aparência do produto. Já na avaliação microbiológica desses queijos, *Listeria* sp. e *Salmonella* sp. não foram detectados nas amostras; entretanto, nenhuma amostra apresentou baixas contagens de *S. aureus*. Segundo o autor, esses resultados foram associados à elevada umidade relativa do ar na câmara de maturação, que auxilia na multiplicação desses microrganismos que podem ser provenientes de matéria-prima contaminada ou da conduta inadequada de colaboradores durante processamento (VALE, 2018).

Oliveira et al. (2018) avaliaram as características físico-química dos QMA do Serro fabricados com “pingo” e “rala” e não foi evidenciada diferença entre os tratamentos para os parâmetros físico-químicos: acidez, umidade, proteína, gordura e gordura no extrato seco. Já os parâmetros extensão e profundidade de maturação e pH diferiram estatisticamente. No trabalho de Lempk (2018), que avaliou o efeito da adição de “rala” sobre as características físico-

químicas, microbiológicas e sensoriais o QMA do Serro em duas estações do ano (seca e chuvosa) durante o processo de maturação, identificou-se que o uso de “rala” não causou efeito significativo na contagem de coliformes a 30 °C, *E. coli* e *S. aureus*, nem na capacidade de diferenciar os queijos produzidos e que as alterações significativas ocorridas foram devidas as estações do ano e do tempo de maturação, sendo esse último o maior responsável pelas mudanças significativas na textura dos queijos.

A avaliação da diversidade microbiana de queijos artesanais brasileiros, incluindo o QMA do Serro foi realizada por análise metagenômica por Kamimura et al. (2019a). O gênero *Lactococcus* foi observado em todos os QMA analisados, sendo o segundo gênero predominante na região do Serro, e *Streptococcus* o gênero predominante na região, o grupo de lactobacilos e *Leuconostoc* também foram identificados. Os autores associam as discrepâncias entre os resultados obtidos neste e em outros estudos ao baixo número de amostras analisadas anteriormente e pela maior sensibilidade do método utilizado.

Andretta et al. (2019) avaliaram a segurança microbiológica de QMA do Serro produzidos com “pingo” e “rala” e todos os queijos avaliados foram caracterizados como seguros para consumo por não apresentarem patógenos como *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., nenhum dos quatro grupos de *Escherichia coli* diarreio gênica, *Mycobacterium tuberculosis* e *Brucella abortus* e ausência de enterotoxina estafilocócica clássica. No entanto, apesar da relativa segurança microbiana, deve-se melhorar as condições higiênicas dos QMA do Serro, pois a contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva, indicador de condições de higiene durante a produção, estava acima dos limites exigidos pela legislação.

## **2.5. Microbiota do queijo Minas artesanal (QMA)**

A preferência dos consumidores por queijos artesanais elaborados com leite cru, incluindo QMA, tem aumentado substancialmente nos últimos anos. Os atributos sensoriais do QMA (sabor, aroma, textura e aparência) são conferidos pelos microrganismos que fazem parte da microbiota natural do leite cru e do “pingo” (porção do soro fermentado proveniente do processo de drenagem de queijos produzidos no dia anterior e recolhido para ser utilizado como fermento na produção do dia seguinte). As diferentes características dos queijos são relacionadas com a diversidade microbiana existente em cada região produtora (MONTEIRO; DA MATTA, 2018; EPAMIG, 2019; MARGALHO et al., 2020). Além de serem responsáveis pelas características sensoriais e físico-químicas dos produtos finais, a microbiota presente em

queijos fabricados com leite cru desempenha um papel importante durante a maturação na modulação do crescimento de microrganismos patogênicos (PINEDA et al., 2020).

A microbiota presente em queijos elaborados com leite cru pode ser muito diversa, e é influenciada pela microbiota do leite cru, da pele do animal, equipamentos, ambiente de processamento (solo, água e ar), mãos dos queijeiros, práticas de fabricação, ou adicionados intencionalmente durante a fabricação pela cultura endógena (“pingo”). Fatores como clima, estações do ano, raça do animal, alimentação do rebanho, técnicas de produção e condições de maturação influenciam essa microbiota. Os microrganismos presentes possuem importantes funções na qualidade do queijo, associados a características sensoriais, definindo características únicas do produto. No entanto, alguns grupos de microrganismos contaminantes podem causar problemas de deterioração, defeitos e comprometer a inocuidade do produto (PANTHI et al., 2017; MARTINS et al., 2018; MONTEIRO; DA MATTA, 2018). A contaminação é uma grande preocupação para o queijeiro, pois o leite de alta qualidade microbiológica é importante para atingir o rendimento, qualidade e segurança ideais do queijo (D’AMICO, 2014). Revisões sobre queijos artesanais brasileiros, qualidade e segurança microbiológica foram realizadas por Kamimura et al., (2019b), Camargo et al., (2021) e Pineda et al. (2021). Os três principais grupos microbianos que podem contaminar o leite e/ou o queijo artesanal em diferentes etapas de produção são os benéficos (de interesse industrial), deteriorantes e patogênicos e esses possuem relevância para a cadeia leiteira e serão discutidos a seguir.

### **2.5.1. Microbiota benéfica**

BAL desempenham um importante papel na produção de alimentos fermentados, como os queijos artesanais. Os alimentos obtidos com o seu auxílio são caracterizados pela segurança higiênica, estabilidade durante o armazenamento e propriedades sensoriais atrativas. BAL podem produzir metabólitos desejáveis, como compostos antimicrobianos, que variam desde ácidos orgânicos (ácidos láctico, acético e propiônico), que reduzem o pH e diminuem o potencial de oxirredução, e peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, diacetil e bacteriocinas, que levam à inibição de microrganismos indesejáveis em alimentos, deteriorantes e patogênicos. Além do potencial bioconservante, o diacetil também desempenha um papel fundamental no desenvolvimento do sabor em queijos. Muitos desses microrganismos possuem capacidade proteolítica e lipolítica e levam à produção de compostos aromáticos responsáveis pelas características sensoriais dos queijos artesanais (O’SULLIVAN; COTTER, 2017; MARGALHO et al., 2020; PINEDA et al., 2020).

BAL são amplamente distribuídos na natureza e podem ser isolados do trato gastrointestinal e de diversos alimentos de origem vegetal e animal. BAL têm sido identificados como predominantes em alimentos fermentados, devido ao seu metabolismo único em processos fermentativos. Esse grupo desejável está presente de forma natural e adicionados ao leite cru no processo de fabricação de queijos, dominando a microbiota e desempenhando importante papel tecnológico na produção e maturação. Algumas cepas podem produzir substâncias antimicrobianas, principalmente bacteriocinas, que podem inibir ou inativar bactérias deteriorantes e patogênicas como *L. monocytogenes*, cepas enterotoxigênicas de *Staphylococcus* spp. e *Salmonella* spp. (ORTOLANI et al., 2010; PERIN et al., 2012; STEELE; BROADBENT; KOK, 2013; YOON; LEE; CHOI, 2016; CAVICCHIOLI et al., 2017; CAMPAGNOLLO et al., 2018).

BAL constituem um grupo heterogêneo com muitas características fisiológicas compartilhadas. Microrganismos desse grupo possuem como característica básica a capacidade de degradar açúcares, principalmente em ácido lático por meio do metabolismo homo ou heterofermentativo. BAL são capazes de se multiplicar em diferentes habitats (trato gastrointestinal e respiratório humano, plantas, carnes e laticínios) e entre as principais características dessas bactérias estão Gram-positivas, cocos ou bacilos, catalase negativa, tolerantes a ácidos e não são capazes de formar esporos (HOLZAPFEL et al., 2001; XIAO; ZHANG; YANG, 2014).

Os principais gêneros pertencentes a esse grupo são *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Aerococcus*, *Pediococcus*, *Oenococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella*, além do grande grupo lactobacilos, cuja taxonomia foi recentemente atualizada (ZHENG et al., 2020). Esses microrganismos possuem um longo histórico de uso seguro em fermentações de alimentos, sendo geralmente reconhecidos como seguros (GRAS) e seus metabólitos têm sido consumidos em alimentos fermentados por milhares de anos, sem efeitos adversos reconhecidos (SIDOOSKI et al., 2018). Os principais gêneros que desempenham papéis benéficos na industrialização do leite são *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Propionibacterium* e *Leuconostoc*, além de vários gêneros do grupo lactobacilos (O'SULLIVAN; COTTER, 2017; PERIN et al., 2019). A diversidade láctica de queijos artesanais varia de acordo com diversos fatores como o a composição da microbiota autóctone do leite cru (proveniente do ar, solo e pele do animal), composição física e química do queijo, interações microbianas, água, técnicas de produção, estágio de maturação, estação do ano e *terroir* (PELÁEZ; REQUENA, 2005; MARTINS et al., 2018; PRADO JUNIOR, 2018).

Além de contribuírem para a preservação e o valor nutricional dos alimentos, BAL têm sido relatados como benéficos à saúde. Algumas cepas de BAL possuem atividade probiótica, produzindo biomoléculas funcionais (SILVETTI; MORANDI; BRASCA, 2017) no trato gastrointestinal (SZAJEWSKA; MRUKOWICZ, 2001; KLAENHAMMER et al., 2005), melhorando a digestão de nutrientes, sendo relacionadas com a imunidade humana (SHAH, 2007), aliviando os sintomas de intolerância à lactose e alergias (BOYLE; TANG, 2006; NAGPAL et al., 2007; CLAEYS et al., 2014), apresentando propriedades anti-inflamatórias (PLÉ et al., 2016), auxiliando na redução da pressão arterial e colesterol (SHAH, 2007; ZHANG et al., 2013), e mesmo tendo atividade antitumoral (GOMES DA CRUZ et al., 2009; SETTANNI; MOSCHETTI, 2010; XIAO; ZHANG; YANG, 2014).

Segundo pesquisas de marketing dos últimos anos, queijos são um veículo alternativo aos probióticos em relação aos iogurtes e leites fermentados. Esse alimento possui um pH mais elevado e tem a capacidade de criar um tampão contra o ambiente altamente ácido do trato gastrointestinal, criando um ambiente favorável para a sobrevivência dos probióticos (KARIMI; MORTAZAVIAN; KARAMI, 2012; ROLIM et al., 2020).

Na fabricação do QMA, BAL são adicionadas como fermento endógeno na forma de “pingo” e, de acordo com o produto final de sua fermentação, podem ser divididas em dois grupos distintos, isto é, *starter* (SLAB) e não-*starter* (NSLAB). BAL homofermentativos são o componente dominante e mais importante da microbiota de produtos lácteos fermentados, pois agem como culturas *starter* (iniciadora), causando acidificação rápida do leite pela produção de ácido lático e também contribuem para a maturação do queijo. NSLAB não contribuem para a produção de ácido durante a fabricação do queijo, mas desempenham importante papel na formação de sabor e aroma pela produção de compostos como diacetil, e na inocuidade dos queijos maturados pela produção de compostos antimicrobianos como dióxido de carbono e peróxido de hidrogênio (GALIMBERTI et al., 2015).

Durante a produção de queijo, SLAB (*Lactococcus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* e *Lactobacillus helveticus*) são principalmente responsáveis pela redução do pH do leite pela produção de ácido lático, enquanto NSLAB (lactobacilos, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Leuconoccus*), bactérias propiônicas, leveduras e fungos filamentosos são bem conhecidos por conferir atributos sensoriais. Tanto a SLAB quanto a NSLAB desempenham um papel importante na fabricação de queijos (COTTER; BERESFORD, 2017).

LAB podem estar associadas à ocorrência de defeitos. A importância relativa da cultura *starter* e de outros microrganismos adicionados varia de produto para produto, bem como a

composição microbiana em diferentes partes de um produto maturado (por exemplo, parte interna, a massa do queijo e a externa, a casca). Um controle preciso das cepas microbianas e de suas proporções é fundamental para minimizar os defeitos do queijo e melhorar sua qualidade (GALIMBERTI et al., 2015).

### 2.5.2. Microbiota contaminante

QMA são comumente produzidos em regiões específicas usando métodos de produção artesanais com leite cru devido à tradição (GONZALES-BARRON et al., 2017; MARTINS et al., 2018). Esses queijos distinguem-se pelo aroma e sabor típicos. No entanto, essas características podem variar entre os laticínios devido a diversos fatores que influenciam o *terroir*, propriedades do leite, condições específicas de produção, incluindo o tipo de coagulante e até mesmo as ferramentas tradicionais utilizadas durante a fabricação, podem influenciar as propriedades do queijo (DE LA ROSA-ALCARAZ et al., 2020). A contaminação dos queijos pode ocorrer se não houver boas práticas de fabricação e outras medidas para evitar a recontaminação na planta de processamento (GONZALES-BARRON et al., 2017). Além disso, alguns microrganismos como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Clostridium botulinum* produzem toxinas estáveis à pasteurização (respectivamente enterotoxinas estafilococais, cereulida e toxina botulínica) e bactérias formadoras de esporos das espécies *Bacillus* e *Clostridium* que são deteriorantes (e também são patogênicas) podem sobreviver à pasteurização e contaminar o queijo, junto com outros microrganismos que são introduzidos por meio de contaminação pós-pasteurização (GIBBS, 2009; SPANU et al., 2016; COTTER; BERESFORD, 2017; RAFIE et al., 2017; ROUZEAU-SZYNALSKI et al., 2020).

Os efeitos nocivos de bactérias formadoras de esporos em produtos lácteos, relativos à inocuidade alimentar e à qualidade do produto, podem ser tanto por produção de toxinas, quanto por produção de enzimas de deterioração, enzimas extracelulares (como lipases, proteases e lecitinases) que interferem na fabricação dos queijos (DE JONGHE et al., 2010).

A presença de microrganismos deteriorantes pode ter efeitos negativos consideráveis na qualidade do queijo, enquanto a presença de patógenos pode ter um sério impacto na inocuidade alimentar (GONZALES-BARRON et al., 2017).

Higiene desempenha um papel fundamental em toda a fabricação de queijos para manter os produtos lácteos seguros e livres de deterioração indesejada e bactérias patogênicas do leite, que quando presentes no leite cru, podem muitas vezes sobreviver durante o processo de

fabricação, permanecendo viáveis no queijo mesmo quando são maturados por vários dias (GONZALES-BARRON et al., 2017; TILOCCA et al., 2020).

### 2.5.2.1. Microbiota deteriorante

Muitos microrganismos deteriorantes são capazes de produzir mudanças negativas nos atributos sensoriais dos queijos por meio de alterações enzimáticas dos componentes do leite durante fabricação e maturação, resultando em defeitos e questões de segurança (D'AMICO, 2014). Alguns grupos ou espécies de microrganismos são considerados indicadores universais de práticas higiênicas inadequadas de obtenção, conservação e/ou processamento de alimentos quando presentes em altas concentrações. Os grupos de microrganismos comumente mais usados como indicadores de higiene no leite são coliformes, mesófilos aeróbios e psicrotóxicos (PERIN et al., 2019).

Coliformes são um grupo de bastonetes Gram-negativos, microrganismos aeróbios e facultativamente anaeróbios, mesófilos que possuem a capacidade de fermentar lactose, produzindo ácido e gás de 32 a 35 °C em 48 h, que tradicionalmente têm sido usados para indicar sobre as condições higiênicas que determinado produto foi fabricado (associadas à água e à equipamentos inadequadamente limpos e higienizados). Coliformes estão presentes no solo, água não tratada, superfícies de equipamentos e fezes. *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella* pertencem ao grupo dos coliformes, entretanto, apenas *E. coli* está presente no trato intestinal de humanos e animais como *habitat* primário. Se os coliformes estiverem presentes no queijo e em altas contagens, podem persistir durante maior parte do período de maturação, contribuindo para o defeito do produto, muitas vezes associado à produção de sabores estranhos “pútridos”, “fermentados”, “gasosos” e “impuros” como bem como a produção excessiva de dióxido de carbono e gás hidrogênio associada ao estufamento precoce de queijos. Esses defeitos são mais prevalentes em queijos moles e semiduros, nos quais a atividade de água e o pH são mais elevados (D'AMICO, 2014; TRMČÍČ et al., 2016; METZ; SHEEHAN; FENG, 2020).

A presença de bactérias mesófilas no leite é inevitável, uma vez que a maioria desses gêneros está presente na água, no úbere dos animais, nas mãos dos ordenhadores e nas superfícies dos equipamentos. Assim, as contagens mesófilas são diretamente influenciadas pelas condições a que o leite é submetido após a ordenha. Os principais gêneros de bactérias mesófilas que podem estar presentes no leite são *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Serratia*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Bacillus*, *Lactococcus*, lactobacilos, entre outros (PERIN et al., 2019).

Algumas bactérias são importantes na indústria de laticínios pela manutenção de atividades metabólicas indesejáveis, como lipólise e proteólise, levando à deterioração do leite e derivados. Esses microrganismos são chamados de deteriorantes de alimentos e estão relacionados com perdas econômicas em todo o mundo. Dentre os microrganismos deteriorantes, os psicotróficos, mesmo em baixa contagem, são muito importantes para a manutenção da qualidade do leite e derivados (RIBEIRO JÚNIOR et al., 2018).

A microbiota psicotrófica do leite cru é composta por organismos predominantemente Gram-negativos (por exemplo, espécies dos gêneros *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Chromobacterium*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Serratia* e *Yersinia*), embora bactérias Gram-positivas também sejam encontradas (por exemplo, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Clostridium*, lactobacilos, *Listeria*, *Microbacterium*, *Micrococcus* e *Streptococcus*). A maioria desses microrganismos no leite cru são provenientes do solo, água, vegetação e fezes (D'AMICO, 2014). Esses microrganismos são capazes de se multiplicar em temperaturas de refrigeração e contagens bacterianas relativamente altas podem competir com outras bactérias, incluindo bactérias benéficas, ao longo do processo de fabricação do queijo (YOON; LEE; CHOI, 2016; O'SULLIVAN; COTTER, 2017). Essas bactérias estão ligadas a níveis aumentados de proteases e lipases exógenas estáveis ao calor. Embora pequenas quantidades dessas enzimas sejam desejáveis na indústria do queijo para o desenvolvimento de um sabor característico, quantidades excessivas levam à deterioração do leite e numerosos defeitos no queijo, incluindo desenvolvimento de sabores estranhos (amargo, rançoso) e descoloração da superfície, mesmo após o tratamento com leite cru (pasteurização) (D'AMICO, 2014; TILOCCA et al., 2020).

#### **2.5.2.2. Microbiota patogênica**

Embora queijos sejam caracterizados como seguros para consumo devido à fermentação pela redução do pH (produção de ácido) e potencial redox e pela produção de metabólitos antagonistas (ORTOLANI et al., 2010; MONTEL et al., 2014; ANDRETTA et al., 2019), a literatura relata surtos graves de intoxicação alimentar associada à vários tipos de queijos (KOUSTA et al., 2010; D'AMICO, 2014; VAN ASSELT et al., 2017; PINEDA et al., 2020). Contaminação dos queijos com microrganismos patogênicos pode ocorrer em várias etapas de sua produção e sua presença pode ser proveniente de animais infectados, dos ambientes da fazenda, ração e ordenha e onde o queijo é produzido, além de contaminação pós processamento, sendo uma grade preocupação para queijeiros. Deve-se sempre manter as boas

práticas agrícolas e boas práticas de fabricação em toda a cadeia para prevenir a contaminação por bactérias patogênicas (D'AMICO, 2014).

Esses microrganismos são provenientes da excreção direta do úbere de animais infectados, do leite cru contaminado, que contamina as plantas leiteiras e de contaminações pós-processamento. Se o saneamento e outras medidas de higiene na planta de beneficiamento não forem suficientes, não há como evitar a recontaminação do leite cru e posterior contaminação durante o processo de fabricação do queijo. Outras importantes fontes de contaminação durante o manuseio e processamento são utensílios e colaboradores (KOUSTA et al., 2010; J. D'AMICO; DONNELLY, 2017).

Patogenicidade é a capacidade de um organismo de induzir a resposta imune no hospedeiro e invadir esse sistema imune, causando doenças, como infecção ou intoxicação. Bactérias patogênicas utilizam vários mecanismos para causar infecção no hospedeiro e usam mecanismo para aderir, invadir células ou tecidos e sobreviver à defesa do hospedeiro e estabelecer infecção no hospedeiro humano (CHATTERJEE; RAVAL, 2019; VASAVADA, 1988). Patógenos bacterianos como *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Salmonella enterica*, *E. coli* patogênica, *B. cereus*, *Campylobacter* spp., *Helicobacter pylori*, *C. botulinum*, *Brucella* spp., *M. bovis* e *Leptospira* representam riscos para a inocuidade dos queijos, afetando a saúde dos consumidores (J. D'AMICO; DONNELLY, 2017).

O trabalho de Martins et al. (2015), que avaliou o período mínimo de maturação do QMA do Serro a temperatura de refrigeração e ambiente, e encontraram patógenos como *L. monocytogenes*, *Salmonella*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* e identificaram que a maturação por 17 dias a temperatura ambiente é o tempo mínimo de maturação, condições que levaram a redução na contagem de contaminantes, garantindo a qualidade microbiológica que se enquadra nos parâmetros de segurança exigidos pela legislação, além de manter as características sensoriais apreciadas pelos consumidores.

QMA do Serro já teve identificada a presença de *Brucella* spp. por Silva et al. (2018). Já no trabalho mais recente de Andretta et al. (2019), o QMA do Serro não apresentou *Listeria*, *Brucella*, *E. coli* e *Salmonella*, mas detectou *Staphylococcus* coagulase positiva com contagem acima dos limites permitidos pela legislação, mas sem produção da enterotoxina estafilocócica nos queijos.

## **2.6. Monitoramento da qualidade e inocuidade de queijos artesanais**

A diversidade de bactérias presentes no leite cru, e em queijos produzidos com essa matéria-prima é de importância fundamental para a manutenção de produtos de qualidade,

sendo um dos principais fatores responsáveis pelas características sensoriais, propriedades físico-químicas, manutenção da qualidade, além da garantia da inocuidade do alimento (COCOLIN; ERCOLINI, 2008; CARRARO et al., 2011; MASOUD et al., 2011; YELURI JONNALA et al., 2018). A identificação e a caracterização de BAL em alimentos fermentados devem ser realizadas com métodos precisos e confiáveis, porém, não existe uma técnica universal que possa ser aplicada a todos os produtos e microrganismo de interesse. Métodos tradicionais de identificação possuem desvantagens como baixo poder discriminatório e a incapacidade de detectar células não cultiváveis. No geral, técnicas moleculares são mais sensíveis, específicas e precisas que os métodos tradicionais, contudo, possuem algumas limitações que devem ser consideradas antes de escolher a metodologia de identificação de uma espécie ou cepa em um queijo (SHEIKHA; LEVIN; XU, 2018).

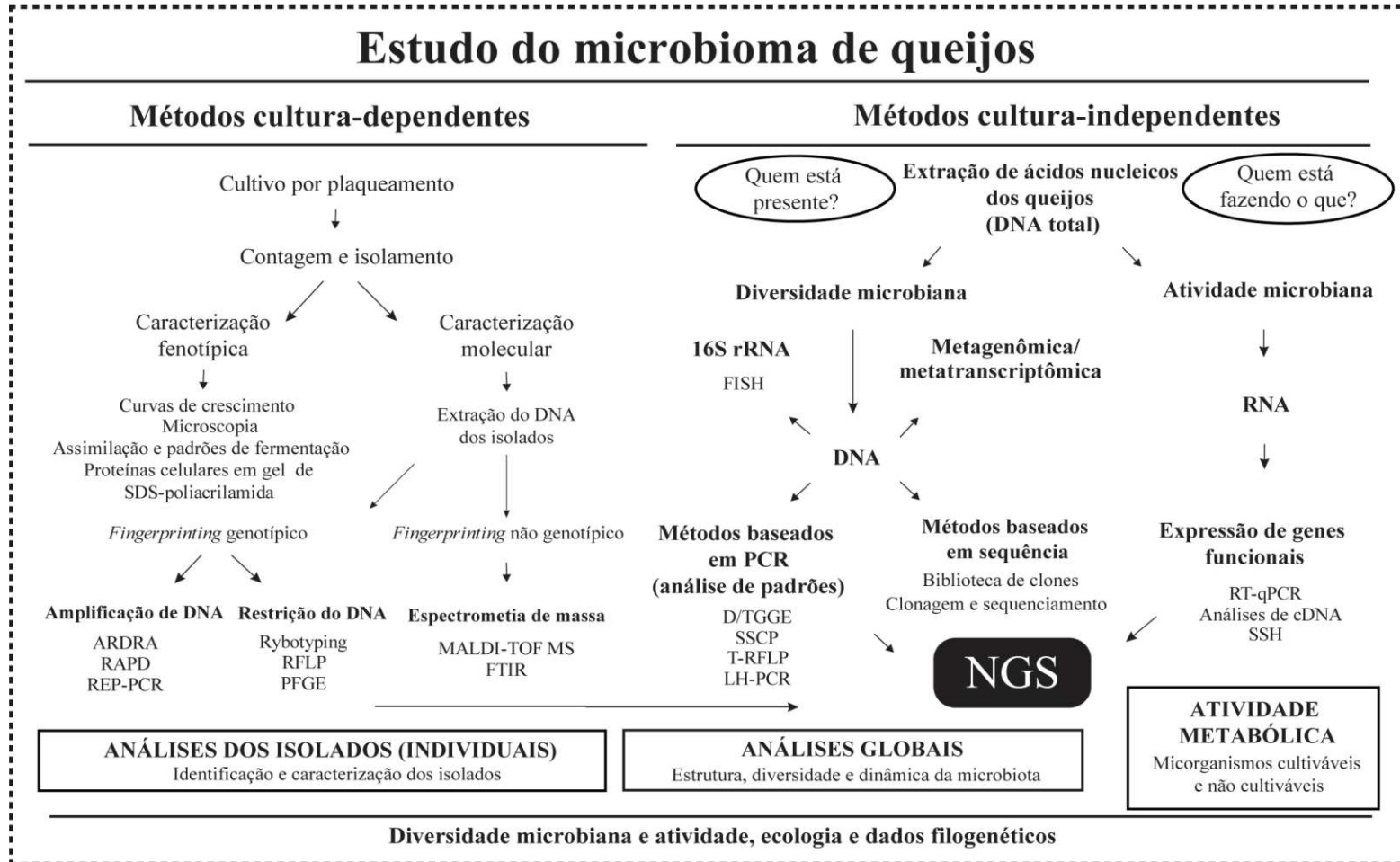
A utilização de métodos cultura-dependente para identificação e seleção de cepas bacterianas é importante na tecnologia de fabricação de queijos, visando explorar o potencial benéfico e biotecnológico de cepas naturalmente presentes nesses produtos. Muitas características e propriedades são compartilhadas em uma mesma espécie bacteriana como morfologia, temperatura ótima de multiplicação e mesma capacidade de utilizar nutrientes específicos, e que podem variar para funções acessórias como sensibilidade a sal, pH e redução de vitaminas específicas. Os métodos específicos são utilizados para identificação de cepas bacterianas e estabelecer um “cartão de identificação”, que além da identificação garante a rastreabilidade é um elemento chave para pesquisa de culturas *starter* na tecnologia de queijos. A identificação de cepas bacterianas pode ser realizada por métodos fenotípicos ou moleculares. Os fenotípicos são baseados em características físicas expressas e fracamente útil na discriminação de espécies, mas podem ser úteis na caracterização de inocuidade e propriedades tecnológicas específicas como a capacidade da cepa na produção de compostos específicos, validação do status GRAS, resistência a antibióticos e produção de amins biogênicas. Já os métodos moleculares discriminam as cepas com base no seu conteúdo genético, identificando as impressões digitais únicas (*fingerprinting*), uma espécie de código de barras do microrganismo. Esses são classificados em três categorias: padrões de banda de DNA, métodos baseados em hibridização de DNA e sequenciamento de DNA (DONNELLY, 2017).

A utilização de métodos cultura-independente permite uma mais rápida identificação, caracterização e monitoramento da diversidade microbiana presente em queijos durante a produção e nos estágios de maturação, promovendo compreensão de como as características dos queijos variam com relação ao crescimento do número de células e metabolismo microbiano (COCOLIN; DOLCI; RANTSIOU, 2011; NDOYE et al., 2011), das contribuições

negativas ou positivas conferida pelos microrganismos presentes (YELURI JONNALA et al., 2018), determinação da origem do queijo (ARCURI et al., 2013) e previsões em termos de aceitabilidade, qualidade e segurança que são esperadas durante a fabricação dos queijo (COPPOLA; BLAIOTTA; ERCOLINI, 2008; YELURI JONNALA et al., 2018).

A avaliação da diversidade microbiana pode ser realizada por métodos cultura-dependentes e -independentes. A abordagem metodológica diz respeito principalmente à escolha da técnica de enumeração bacteriana, identificação e caracterização metabólica. A compreensão de como os ecossistemas microbianos funcionam aumenta o conhecimento sobre alguns microrganismos mais importantes, além de ajudar na descoberta maneiras de eliminar ou manipular essas comunidades em nosso benefício (DONNELLY, 2014). Uma visão geral das principais técnicas utilizadas para a avaliação do ecossistema microbiano do queijo por métodos cultura-dependentes e -independentes é apresentada na Figura 5 e Tabelas 2 e 3. Cada uma dessas técnicas possui suas próprias vantagens e desvantagens e a escolha da técnica mais viável para a identificação de microrganismos depende da aplicação específica e de fatores como o custo da realização, a disponibilidade de equipamento e o treinamento de pessoal (BRUNO, 2011; RATHNAYAKA; DEVAPPA; RAKSHIT, 2018). A utilização das duas abordagens foi melhorada com a aplicação de técnicas moleculares, facilitando a capacidade de identificar e classificar as bactérias, particularmente por métodos genotípicos direcionados a moléculas de DNA ou RNA.

O estudo da diversidade funcional dos microrganismos presentes nos queijos usando métodos cultura-dependentes fornece informações completas sobre o papel desempenhado por um microrganismo no ecossistema e muitas vezes realizada por métodos de tipagem de base molecular baseados principalmente na análise de restrição do DNA bacteriano, reação em cadeia da polimerase (PCR), amplificação de alvos genéticos específicos e identificação de polimorfismo de sequência de DNA. Contudo, com a diminuição dos custos de sequenciamento, tecnologias “ômicas” como metagenômica, metaproteômica, metatranscriptômica e proteogenômica estão sendo cada vez mais usadas extensivamente para avaliar a diversidade funcional dos microrganismos não cultiváveis. As técnicas moleculares fornecem detalhes sobre a diversidade funcional (na presença ou ausência de identidade taxonômica), enquanto os métodos convencionais fornecem o perfil do produto (além da identidade taxonômica), que, por sua vez, descreve o papel dos microrganismos em um determinado queijo (NAZIR et al., 2019; SRIVASTAVA et al., 2019).



**Figura 5:** Diagrama de fluxo dos métodos cultura-dependentes e -independentes para estudo da diversidade microbiana do queijo (diversidade e atividade, ecologia e filogenia). Adaptado de Ndoye et al. (2011), Cocolin et al. (2018) e Randazzo et al. (2017). ARDRA: Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis; cDNA: Complementary DNA; DGGE: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis; FISH: Fluorescence In Situ Hybridization; FTIR: Fourier Transform Infra-Red; LH-PCR: Length Heterogeneity Polymerase Chain Reaction; MALDI-TOF MS: Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry; PFGE: Pulsed-Field Gel Electrophoresis; RAPD: Random amplified polymorphic DNA; RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism; REP-PCR Repetitive Extragenic Palindromic PCR; RT-qPCR: Reverse Transcriptomic Quantitative PCR; SSCP: Single-Strand Conformation Polymorphism; SSH: Suppression Subtractive Hybridization; TGGE: Temperature Gradient Gel Electrophoresis; T-RFLP: Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism.

**Tabela 2:** Principais métodos cultura-dependentes utilizados no estudo da microbiota autóctone de queijos.

Métodos cultura-dependentes					
Tipo de <i>fingerprinting</i>	Nome	Sigla	Princípio da técnica	Aplicações/Observações	Referências
Genotípico/ Amplificação de DNA	Amplified Ribossomal DNA Restriction Analysis	ARDRA	Amplificação com primers direcionados às regiões conservadas nas extremidades do gene 16S, seguido por digestão dos produtos da PCR (~1500 pb) por enzimas de restrição selecionadas que conferem padrões de restrição enzimática (250-550 pb). Os padrões dos fragmentos de restrição obtidos são utilizados para determinar a diversidade ou similaridade entre bactérias com base na proporção dos fragmentos que são compartilhados entre os microrganismos analisados.	Pode ser utilizada tanto para identificação do organismo em culturas puras quanto em comunidades microbianas. Útil para diferenciação de gênero e espécies, mas não para discriminação intra-espécie de diferentes isolados bacterianos. É considerada extensão do RFLP, para o gene que codifica o 16S rRNA de bactérias. Caracterização filogenética de isolados de forma rápida e pode ser usada para avaliar a diversidade microbiana em resposta às mudanças nas condições ambientais. Uma das principais limitações da técnica é a análise de comunidades microbianas complexas pela dificuldade de resolução dos perfis de restrição gerados por eletroforese em gel de agarose. Mais rápido e fácil que ribotipagem, mas com menor poder discriminatório devido à menor região do rRNA alvo.	HOPPE-SEYLER et al. (2007); RESENDE et al. (2011); KASHYAP; MAHERCHANDANI; KUMAR (2014); DASH; DAS (2018); NAZIR et al. (2019); PANIGRAHI; VELRAJ; SUBBA RAO (2019)
Não genotípico	Fourier Transform InfraRed	FTIR	Determinação do espectro de absorção no infra vermelho médio (4000 a 666 cm <sup>-1</sup> ) de um composto químico específico a partir vibrações de grupos funcionais com atribuições específicas existentes na molécula em espectrofotômetro de transformada de Fourier (Avaliado como interferograma)	Fornecem “assinaturas” da composição química bacteriana pela determinação das estruturas químicas (perfil de proteínas, composição de ácidos graxos, polissacarídeos e ácidos nucleicos) que apresentam padrões comuns para gêneros, espécies e subespécies. Os espectros vibracionais fornecem <i>fingerprinting</i> fenotípico altamente específico de microrganismos, sendo utilizado para fins taxonômicos Técnica simples e rápida também pode ser utilizada para monitorar mudanças moleculares de vários compostos, verificar possíveis fraudes, identificar o tempo de maturação de queijos e avaliação de biofilmes em superfícies	KOCA et al. (2007); OULAHAL et al., (2009); SAMELIS et al. (2011); FODA et al. (2013); MOHAMED et al. (2017); LEITE et al. (2019); DE JESUS et al. (2020)

Métodos cultura-dependentes					
Tipo de <i>fingerprinting</i>	Nome	Sigla	Princípio da técnica	Aplicações/Observações	Referências
Não genotípico	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry	MALDI-TOF MS	Espectro de massa é composto por uma fonte de íons para amostras sólidas acopladas a um analisador de massa, que classifica os íons de acordo com tempo de voo para percorrer uma dada distância em um ambiente de campo livre. <b>Abordagem proteômica:</b> Avaliação de massas moleculares de peptídeos e pequenas proteínas; <b>Abordagem <i>fingerprinting</i>:</b> Avaliação baseada em biblioteca contendo espectros de tipos conhecidos de bactérias de referência	Identificação taxonômica de isolados a nível de gênero à espécie em relação à referência de espectros (razão m/z). Composição do meio e presença de inibidores são menos importantes. Não pode ser utilizado para amostras nas quais muitas espécies estão presentes, pois gera perfis não claros.	RANDAZZO et al., (2017a); GANTZIAS et al. (2020); LEWIS et al. (2020)
Genotípico/ Restrição de DNA	Pulsed-Field Gel Electrophoresis	PFGE	Digestão de DNA genômico com enzimas de restrição estatisticamente rara. Os fragmentos de DNA são separados dentro de matriz de gel, aplicando campos elétricos alternados, com pulsos que mudam periodicamente de direção	Método de subtipagem, padrão ouro para determinação de perfis genéticos de isolados. Verifica-se se isolados de mesma espécie são cepas semelhantes ou diferentes. Método altamente discriminatório. Utilizado para seleção de cepas que podem ser utilizadas na produção de alimentos e determinar cepas de patógenos persistentes em instalações de processamento de alimentos, fontes de contaminação e transmissão de rotas.	SCHWARTZ; CANTOR (1984); BLAIOTTA et al., (2001); CAVICCHIOLI et al., (2015); RANDAZZO et al. (2017a); BARRÍA et al. (2020)
Genotípico/ Amplificação de DNA	Random amplified polymorphic DNA	RAPD	Amplificação arbitrária do DNA genômico com único ou múltiplos primers curtos (geralmente 10 nucleotídeos) que se emparelham aleatoriamente em vários lugares do DNA sob baixa temperatura de anelamento (geralmente 35 °C). RAPD gera amplicons de PCR de vários comprimentos. Números e localização dos primers aleatórios variam para diferentes cepas bacterianas	Amplamente utilizado para verificar o <i>fingerprinting</i> da estrutura geral da comunidade microbiana e de espécies bacterianas intimamente relacionadas. Verifica a tipagem genética de diferentes cepas de bactérias ácido lácticas. É considerado um método confiável para discernir entre espécies starters e não starters em queijo e monitorar mudanças na comunidade de LAB durante a fermentação do queijo	RANDAZZO; CAGGIA; NEVIANI, 2009; BHARAGAVA et al. (2019); BIOLCATI et al., (2020)

Métodos cultura-dependentes					
Tipo de <i>fingerprinting</i>	Nome	Sigla	Princípio da técnica	Aplicações/Observações	Referências
Genotípico/ Amplificação de DNA	Repetitive Extragenic Palindromic PCR	Rep- PCR	Amplificação de sequências repetitivas intercaladas que ocupa regiões intergênicas em locais dispersos em todo o genoma para produzir padrão de banda que serve como identificador único dos microrganismos presentes (código de barras ou impressões digitais, <i>fingerprinting</i> )	A ampla distribuição dos elementos repetitivos de DNA nos genomas dos microrganismos identifica e diferencia isolados em espécie, subespécie e potencialmente a nível de cepa, sendo útil para análise de genoma de procariotos. Também pode ser utilizado como método -independente a partir do DNA total extraído diretamente da amostra de queijo, fornecendo informações sobre a microbiota presente, evidências sobre similaridade ou diferenças e interações de fatores <i>in situ</i> .	VERSALOVIC; KOEUTH; LUPSKI, 1991; GEVERS; HUYS; SWINGS (2001); PERIN et al., (2015, 2017)
Genotípico/ Restrição de DNA	Restriction Fragment Length Polymorphism	RFLP	Diferencia pequenas variações de sequência ou polimorfismos de nucleotídeos em fragmentos homólogos de DNA pela ação de enzimas de restrição, que produzem comprimentos variáveis de moléculas de DNA homólogo	Uma das técnicas mais fáceis de estudar a diversidade microbiana. Detecta diferenças de sequência em um amplicon de PCR. Caracteriza isolados e populações de bactérias, identificando bactérias em nível de espécie e cepa.	MITTAL; CHATURVEDI; TULSYAN (2013); SÄDE; BJÖRKROTH (2014); NAZIR et al. (2019); HAJIGHOLIZADEH et al. (2020)
Genotípico/ Restrição de DNA	Ribotyping		Baseada na determinação de homologia em sequências de 16S rRNA por detecção de polimorfismo com enzimas de restrição e hibridização em suporte membranoso.	Variação da análise de RFLP que combina a análise de fragmentos de restrição com hibridização, usando primers específicos para rRNA e refletem variações dentro e ao redor das sequências da sonda. Identifica e classifica bactérias com base no polimorfismo em “assinaturas” de moléculas de RNA ribossômico universal e altamente conservadas ou seus genes. Baixo limite discriminatório comparado com outras técnicas, pois o DNA que codifica o rRNA é altamente conservado entre bactérias intimamente relacionadas.	MEUGNIER et al. (1996); AUSTIN; PAGOTTO, 2003; DE CESARE et al. (2007); KONGO et al. (2007); KASHYAP; MAHERCHANDANI; KUMAR, (2014)

**Tabela 3:** Principais métodos cultura-independentes utilizados no estudo da microbiota autóctone de queijos.

Métodos cultura-independentes				
Nome	Sigla	Princípio da técnica	Aplicações/Observações	Referências
Complementary DNA	cDNA	O DNA complementar é sintetizado a partir do RNA mensageiro utilizando a enzima transcriptase reversa.	Uma preparação de cDNA representa os genes que estavam sendo ativamente expressos em uma célula, um órgão ou um organismo inteiro no momento da coleta e é chamada de biblioteca de cDNA. A obtenção de cDNA não é fácil pela ausência da cauda poliA (estrutura localizada na extremidade 3' na maioria dos eucariotos que serve para ligações de proteínas específicas, as quais possivelmente conferem proteção do mRNA contra degradação enzimática) em procaríotos.	CARRARO et al. (2011); NDOYE et al. (2011); PELLELY, (2012)
Denaturing Gradient Gel Electrophoresis	DGGE	Separa fragmentos de DNA de fita dupla de mesmo tamanho com base em sua mobilidade eletroforética em condições desnaturantes por agentes químicos (ureia e formamida) em gel de poliacrilamida. Diferentes migrações ocorrem pela diferença de conteúdo GC do DNA	Um dos métodos de <i>fingerprinting</i> mais comumente aplicado para descrever a estrutura de comunidades microbianas em ecossistemas microbianos complexos, sua diversidade e dinâmica com base na diversidade dos genes 16S rRNA. Utiliza um primer forward 5'-GC anexado (30–50 nucleotídeos) durante a etapa de PCR para evitar a dissociação completa das duas fitas de DNA. A eletroforese de amplicons mistos de uma comunidade complexa por meio de gradientes desnaturantes resulta em uma impressão digital que consiste em bandas em diferentes distâncias de migração no gel. As bandas individuais podem ser excisadas do gel, reamplificadas e sequenciadas.	MYERS et al. (1985); MUYZER; WAAL; UITIERLINDEN, (1993); FUKA et al. (2012); ARCURI et al. (2013); SOFU; EKINCI (2016); PANIGRAHI; VELRAJ; SUBBA RAO (2019)
Fluorescence In Situ Hybridization	FISH	Analisa por sondas oligonucleotídicas marcadas com fluorescência a estrutura da comunidade microbiana pela visualização de ácido nucléico e outras moléculas dentro da célula em sua conformação nativa	Ferramenta molecular não baseada em PCR que permite a conhecer a composição, detecção e quantificação <i>in situ</i> de microrganismos em amostras de queijo por microscopia de fluorescência, microscopia confocal a laser ou citometria de fluxo. Também utilizada para estudo de filogenia de amostras ambientais e dinâmica espaço-temporal de populações microbianas individuais em diferentes ecossistemas.	ERCOLINI; HILL; DODD (2003); BABOT et al. (2011); NDOYE et al. (2011); NAZIR et al. (2019)

<b>Métodos cultura-independentes</b>				
<b>Nome</b>	<b>Sigla</b>	<b>Princípio da técnica</b>	<b>Aplicações/Observações</b>	<b>Referências</b>
Length Heterogeneity Polymerase Chain Reaction	LH-PCR	<p>Um oligonucleotídeo marcado com fluorescência é usado como primer forward é acoplado a um primer reverso não marcado para amplificar regiões hiper variáveis do gene 16S rRNA, localizadas na extremidade 5' do gene bacteriano.</p> <p>Os fragmentos marcados são separados por eletroforese em gel e detectados por fluorescência induzida por laser com um sequenciador de genes automatizado</p>	<p>Método de PCR baseado em fluorescência que distingue diferentes microrganismos com base em polimorfismos de comprimento natural que ocorrem devido à mutação dentro dos genes.</p> <p>Técnica semelhante ao T-RFLP.</p> <p>Amplamente utilizada para estudar o perfil da microbiota, monitorando mudanças na comunidade microbiana.</p> <p>A intensidade (altura) ou área sob o pico no eletroferograma é proporcional à abundância relativa do amplicon específico.</p> <p>A técnica é incapaz de resolver picos de amplicons complexos e pode subestimar a diversidade, pois táxons filogeneticamente distintos podem produzir amplicons do mesmo comprimento.</p> <p>Outra dificuldade da técnica é que um amplicon pode representar mais de um táxon filogeneticamente distinto que produz amplicon do mesmo comprimento.</p>	<p>COCOLIN; ERCOLINI (2008); POGAČIĆ et al. (2013); GAROFALO et al. (2017); PERIN et al. (2017); PANIGRAHI; VELRAJ; SUBBA RAO (2019)</p>
Metagenomics		<p>Refere-se especificamente à construção de bibliotecas metagenômicas que compreendem à:</p> <p>Geração de fragmentos de DNA de tamanho apropriado e ligação dos fragmentos em um vetor de clonagem apropriado (por exemplo cosmídeo ou vetores cromossômicos artificiais bacterianos);</p> <p>Introdução dos vetores recombinantes em um hospedeiro de clonagem bacteriana adequado e</p> <p>Triagem de clones que abrigam atividades particulares, ou contendo sequências específicas</p>	<p>Análise de informações de sequências de genomas coletivos de todos os membros da comunidade microbiana.</p> <p>Abordagem comumente utilizada para estudar de forma abrangente a estrutura, composição e função da microbiota.</p> <p>Identifica contribuições, funções e papéis biológicos da microbiota.</p> <p>As principais desvantagens da metagenômica incluem que ela é limitada à previsão de funções potenciais e é difícil distinguir o DNA de células vivas das mortas.</p>	<p>SHEIKHA; LEVIN; XU (2018); PANIGRAHI; VELRAJ; SUBBA RAO (2019)</p>

<b>Métodos cultura-independentes</b>				
<b>Nome</b>	<b>Sigla</b>	<b>Princípio da técnica</b>	<b>Aplicações/Observações</b>	<b>Referências</b>
Reverse Transcriptomic Quantitative PCR	RT-qPCR	Usado para obter DNA complementar (cDNA) de um modelo de RNA, e o cDNA resultante pode ser quantificado usando PCR quantitativo (qPCR)	Utilizado para estudar a dinâmica de multiplicação e atividade metabólica de espécies microbianas, detecta microrganismos viáveis, quantifica virulência, produção de toxinas ou transcrição de genes de resposta ao estresse e quantifica a multiplicação microbiana em matrizes alimentares. Permite a quantificação absoluta de células e a quantificação relativa de uma expressão de gene alvo (ou transcrição) comparada com a expressão de um gene de referência.	RUGGIRELLO; COCOLIN; DOLCI (2016); WIEDMANN; CARROLL (2018)
Single-Strand Conformation Polymorphism	SSCP	Analisa padrões de bandas e alterações na migração de ssDNA em eletroforese não desnaturante para verificar alterações de nucleídeos na sequência	Técnica eletroforética desenvolvida para detectar mutações em genes e é utilizada para acompanhar a dinâmica da população microbiana global em ecossistemas complexos no nível de gênero. Técnica de genotipagem é semelhante ao PCR DGGE/TGGE, pois permite separação eletroforética de diferentes fragmentos de PCR de DNA de comprimento semelhante Triagem de diferentes DNAs genômicos em grande número de amostras. ssDNA possui conformação específica e alterações na sequência alteram sua conformação e padrão de migração. Pode detectar diferença em único nucleotídeo pela utilização de primers marcados.	RANDAZZO; CAGGIA; NEVIANI (2009); SOFU; EKINCI (2016); NAZIR et al., (2019)
Suppression Subtractive Hybridization	SSH	Baseado em um efeito PCR de supressão e combina normalização (equaliza a abundância de fragmentos de DNA dentro da população alvo) e subtração (exclui sequências que são comuns às populações que estão sendo comparadas) em um único procedimento.	Um dos métodos mais poderosos e populares para gerar cDNA subtraído ou bibliotecas de DNA genômico. Um perfil SSCP típico consiste em dois fragmentos de DNA de fita simples e um fragmento de DNA de fita dupla, embora diferentes conformações de uma fita também sejam possíveis. A mobilidade de um fragmento de DNA de fita simples que depende da estrutura secundária do fragmento, determinada pela sequência de nucleotídeos e o ambiente fisiológico (por exemplo, temperatura, pH e força iônica).	REBRIKOV et al. (2004); NDOYE et al. (2010)

<b>Métodos cultura-independentes</b>				
<b>Nome</b>	<b>Sigla</b>	<b>Princípio da técnica</b>	<b>Aplicações/Observações</b>	<b>Referências</b>
Temperature Gradient Gel Electrophoresis	TGGE	<p>Separa fragmentos de DNA fita dupla de mesmo tamanho com base em sua mobilidade eletroforética em condições desnaturantes por temperatura. Diferentes migrações ocorrem pela diferença de conteúdo GC do DNA.</p>	<p>Fornece uma visão ecológica das espécies predominantes em comunidades microbianas complexas.</p> <p>Utiliza um gradiente de temperatura em vez de um desnaturante químico e um primer forward 5'-GC anexado (30–50 nucleotídeos) durante a etapa de PCR para evitar a dissociação completa das duas fitas de DNA.</p> <p>A eletroforese de amplicons mistos de uma comunidade complexa por meio de gradientes desnaturantes resulta em uma impressão digital que consiste em bandas em diferentes distâncias de migração no gel. As bandas individuais podem ser excisadas do gel, reamplificadas e sequenciadas.</p> <p>A técnica possui baixa resolução em espécies com genoma de alto teor de GC.</p>	<p>MUYZER; SMALLA (1998); NDOYE et al. (2011); LONDOÑO-ZAPATA et al. (2017); RANDAZZO et al. (2017b)</p>
Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism	T-RFLP	<p>Amplificação do DNA total com primers universais marcados por fluorescência.</p> <p>Fragmentos amplificados são digeridos por enzima de restrição terminais e avaliados por eletroforese capilar ou sequenciador de DNA automatizado, fornecendo um padrão de picos em um eletroferograma.</p> <p>A identificação dos picos de T-RFLP pode ser obtida diretamente comparando-os com banco de dados</p>	<p>Determina o perfil da comunidade microbiana, sua estrutura e a diversidade.</p> <p>Separa fragmentos obtidos por restrição enzimática de amplicons de PCR de acordo com seu tamanho.</p> <p>Detecta variações de comprimento do amplicon que são produzidas após digestão de restrição.</p> <p>Semelhante a ARDRA, mas usa primer 5' marcado com fluorescência durante PCR.</p> <p>O uso de primers marcados com fluorescência permite uma detecção rápida, automatizada e de alto rendimento de fragmentos terminais polimórficos.</p> <p>Duas sequências distintas que compartilham um local de restrição terminal resultarão em apenas um pico no eletroferograma e não serão distinguidas.</p>	<p>NAZIR et al. (2019); PANIGRAHI; VELRAJ; SUBBA RAO (2019)</p>

### 2.6.1. Métodos cultura-dependentes

Métodos cultura-dependente foram os primeiros utilizados para caracterização de microrganismos e ainda possuem grande importância para a indústria de alimentos na seleção de novos isolados, principalmente na seleção de novas SLAB e NSLAB a partir de alimentos com características de possuírem vantagem competitiva e propriedades metabólicas desejáveis. Esses métodos possuem abordagem clássicas e são mais trabalhosos, consomem muito tempo devido ao longo tempo de preparo do material e de cultura e isolamento dos microrganismos, consistindo na homogeneização da amostra, seguida de diluição e no plaqueamento em um conjunto de meios, seguida de seleção e isolamento de colônias e caracterização morfológica, fenotípica e genotípica (BERESFORD et al., 2001; JANY; BARBIER, 2008; NDOYE et al., 2011; DOLCI et al., 2015).

Essa técnica possui muitas desvantagens, principalmente em relação à quantificação dos microrganismos, pela dificuldade de simular os nutrientes necessários e as condições de cultura de muitas bactérias *in vitro*, permitindo, muitas vezes, o desenvolvimento de apenas uma pequena fração dos microrganismos, suprimindo o crescimento de outra fração cultivável, problemas com testes bioquímicos devido à grande dificuldade de perfis de fermentação de açúcares pelos microrganismos e das condições de multiplicação, que podem interferir na morfologia bacteriana, levando à erros de interpretação (MARTÍN-PLATERO et al., 2008; KUANG et al., 2009; AL-AWADHI et al., 2013).

Como exemplo pode-se citar as BAL, grupo de microrganismos que possuem diversas aplicações na produção de alimentos fermentados e probióticos devido à sua atividade metabólica. Esses microrganismos se multiplicam rapidamente, no entanto, são fastidiosos e o requerimento nutricional pode variar entre as espécies e cepas, dificultando a elaboração de um meio químico definido (HAYEK; IBRAHIM, 2013). A complexa microbiota presente em queijos artesanais interfere na performance de enumeração das BAL e de outros microrganismos (ALMEIDA et al., 2020).

Durante a produção e maturação dos queijos ocorrem interações complexas da comunidade microbiana e a identificação dos microrganismos envolvidos fornece informações essenciais para compreensão de seu papel em cada etapa (BERESFORD et al., 2001; MARTÍN-PLATERO et al., 2008). Na etapa de maturação, algumas cepas podem ficar estressadas e entrar no estado viável não cultivável (VNC) pelas condições ambientais. Assim, esse tipo de análise pode não conseguir reproduzir os nichos ecológicos e as relações simbióticas encontradas em

ambientes naturais complexos, como nos queijos, necessários para apresentar toda a diversidade microbiana (COCOLIN; ERCOLINI, 2008; CARRARO et al., 2011).

O método cultura-dependente ainda deve ser utilizado, pois permite o estudo de isolados para explorar seu potencial efeito benéfico e biotecnológico na produção de produtos fermentados. Contudo, como apenas uma pequena proporção de microrganismos é cultivável, as técnicas cultura-dependentes não refletem essas comunidades. Conseqüentemente, como alternativa para a identificação e classificação mais precisa dos microrganismos presentes em alimentos fermentados e produtos lácteos, têm-se utilizado diferentes métodos cultura-independentes e sequenciamento (MARTÍN-PLATERO et al., 2008).

### **2.6.2. Métodos cultura-independentes**

Atualmente, com as abordagens baseadas em técnicas moleculares, o estudo da diversidade microbiana sofreu uma mudança profunda, passando a ter uma descrição mais rápida e de alta resolução das comunidades microbianas, do que a fornecida pela abordagem tradicional de isolamento de microrganismos. Esses são baseados na análise direta do DNA extraído diretamente do queijo, seguido da amplificação dos genes codificados na região 16S do rRNA e análise dos produtos amplificados na reação em cadeia da polimerase (PCR) usando técnicas de *fingerprint*. O conjunto de produto da PCR pode ser clonado e sequenciado e submetido a uma variedade crescente de métodos de identificação de perfis genéticos. Esses possuem vantagens de diferenciar entre espécies com características fenotípicas similares (PELÁEZ; REQUENA, 2005; CARRARO et al., 2011; AL-AWADHI et al., 2013). Dentre as técnicas moleculares utilizadas para identificar espécies de bactérias estão as PCR específicas para espécies, o polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição e sequenciamento do gene 16S rRNA, sendo essa última mais amplamente utilizada para identificar espécies (MARTÍN-PLATERO et al., 2008).

Técnicas moleculares independentes de cultura (cultura-independentes) caracterizam diretamente os microrganismos presentes, sem a necessidade de enriquecimento ou isolamento, utilizam o DNA total dos queijos (mistura contendo DNA de todos os microrganismos presentes na amostra) e apresentam um quadro mais preciso da distribuição da diversidade microbiana nas diferentes etapas da produção de alimentos fermentados (COCOLIN; ERCOLINI, 2008). Para estudar a diversidade microbiana não cultivável em amostras complexas, várias técnicas são aplicadas. Essas técnicas foram baseadas na amplificação de uma sequência alvo e resolução em gel de amplicons usando gradientes de desnaturação ou enzimas de restrição. Métodos amplamente usados incluem Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE),

Temperature Gel Gradient Electrophoresis (TGGE), Single Stranded Conformation Polymorphism (SSCP), Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (tRFLP), Length Heterogeneity-PCR (LH-PCR) (Afshari et al., 2018; Ercolini, 2018; Almeida; De Martinis, 2019). Essas técnicas moleculares de identificação da diversidade microbiana têm as vantagens de serem reproduzíveis, ter alto poder discriminatório e baixo custo (COCOLIN; ERCOLINI, 2008), além de poderem analisar grande número de amostras simultaneamente (LAWSON; TSALTAS, 2014). No entanto, essas técnicas não permitem a discriminação entre microrganismos vivos e mortos (BIOLCATI et al., 2020).

Técnicas moleculares cultura-independentes fornecem informações mais precisas sobre a população bacteriana predominante em dado momento da produção do queijo, o que seria mais difícil por técnicas cultura-dependentes. As técnicas moleculares de identificação da diversidade microbiana, de impressão digital ou *fingerprint*, apresentam um padrão ou perfil da diversidade genética em uma comunidade microbiana. As técnicas moleculares de identificação da diversidade microbiana Rep-PCR e DGGE possuem as vantagens de ser reproduzíveis, possuírem alto poder de discriminação e baixo custo e como principal limitação a identificação de filotipos em bandas, sendo necessário analisar comparativamente as sequências de fragmentos de DNA pela excisão e re-amplificação das sequências gênicas, sendo necessário o sequenciamento dos excisados das bandas para a informação da identidade dos membros da comunidade seguido de comparação posterior da sequências com bancos de dados disponíveis (COCOLIN; ERCOLINI, 2008).

Embora existam limitações para esses métodos, eles podem, no entanto, ser muito úteis, uma vez que essas limitações sejam levadas em consideração. Essas limitações incluem problemas técnicos, como a obtenção de DNA genômico representativo de amostras de alimentos (COCOLIN; ERCOLINI, 2008), o limite de detecção das técnicas de espécies não dominantes, que representam < 1% da microbiota total e muitas vezes não são detectadas (a sensibilidade da técnica de DGGE para análises de queijos é estimada em  $10^4$  UFC/g) e a incapacidade de elucidar totalmente as estruturas metabólicas e funções das comunidades microbianas (NDOYE et al., 2011; ESCOBAR-ZEPEDA; DE LEÓN; SANCHEZ-FLORES, 2015), pois os microrganismos identificados podem nunca ser recuperados, embora sua identidade taxonômica possa ser reconhecida até certo ponto e seu papel e funcionalidade possam ser identificados (SRIVASTAVA et al., 2019).

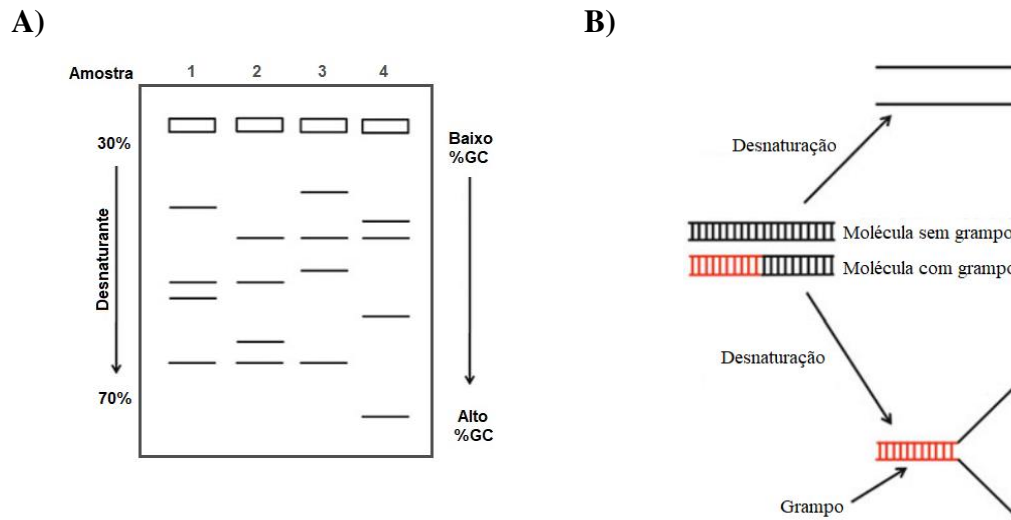
### 2.6.2.1. Polymerase Chain Reaction Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (PCR-DGGE)

PCR-DGGE é uma técnica de *fingerprint* muito utilizada para avaliar comunidades microbianas de alimentos fermentados sem cultivo, determina sua estrutura dinâmica e evolução em repostas às variações ambientais. No estudo da microbiota presente de queijos, além de apresentar uma imagem da comunidade microbiota presente, auxilia na identificação de microrganismos e avalia a evolução da diversidade microbiana durante a maturação (ERCOLINI, 2004; COCOLIN et al., 2013).

Como princípio da técnica, ocorre a separação eletroforética de produtos de PCR (do DNA total extraído do queijo) de mesmo comprimento (até 500 pb) pela diminuição da mobilidade eletroforética dos fragmentos de DNA de fita dupla devido a desnaturação parcial em um gel de poliacrilamida com gradiente linear químico desnaturante de DNA (normalmente de 30 a 70%) composto por ureia e formamida a 60 °C. A desnaturação parcial da molécula de DNA de cadeia dupla e parada da corrida eletroforética em um ponto do gradiente ocorre devido a região “grampo”, rica em GC, permanece emparelhada para evitar a desnaturação total das fitas de DNA. Uma molécula sem grampo desnatura completamente a dupla fita e não forma banda no gel.

Quando ocorre a desnaturação da dupla fita de DNA, há um aumento da interação dos nucleotídeos não ligados a molécula de fita simples com a matriz do gel. A separação ocorre com base na distribuição e conteúdo de %GC e na sequência de DNA e não no tamanho do fragmento. Sequências com variação no conteúdo do %GC são separadas, ficando na parte inferior do gel as bandas que correspondem às maiores sequências de %GC (MUYZER; WAAL; UITIERLINDEN, 1993; MUYZER; SMALLA, 1998; STRATHDEE; FREE, 2013). O princípio da técnica de DGGE está representado na Figura 6.

Moléculas com sequências diferentes podem ter diferentes comportamentos de desnaturação e param de migrar em diferentes posições ao longo do gel, gerando padrões que podem fornecer informações preliminares sobre a diversidade microbiana. Por meio da adição da sequência de DNA rica em GC (*GC clamp*, ou grampo GC de 30 até 50 nucleotídeos (Figura 6B)), o fragmento é desnaturado e há o impedimento da completa separação das duas fitas da molécula. O padrão de bandas gerado nessa análise é considerado uma imagem de todas as principais espécies da população. Uma banda individual refere-se a um tipo de sequência único ou filotipo (MUYZER; WAAL; UITIERLINDEN, 1993; MUYZER; SMALLA, 1998; COCOLIN; ERCOLINI, 2008; LE NGUYEN et al., 2008).



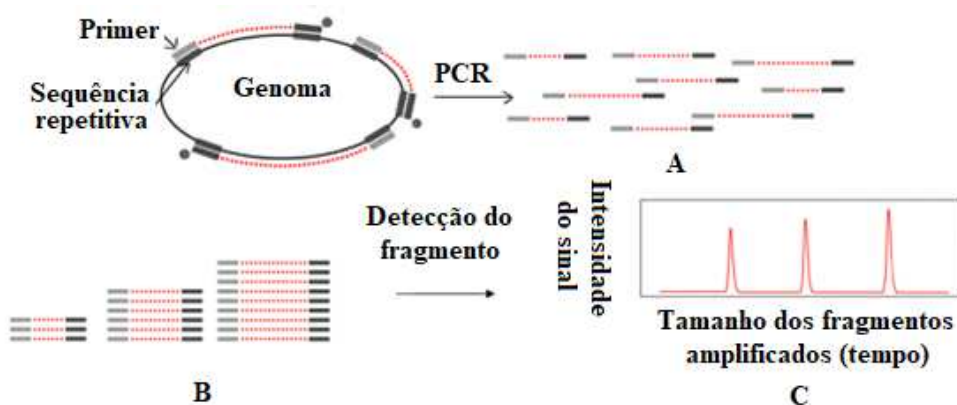
**Figura 6:** Princípio da técnica de Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). **A)** Representação do gel com gradiente desnatitante (normalmente de 30 a 70%) paralelo à direção da eletroforese. São observadas bandas nas posições no gradiente em que as moléculas individuais desnaturam parcialmente e, portanto, param de migrar. Sequências com variação no conteúdo do %GC são separadas, ficando na parte inferior do gel as bandas que correspondem às maiores sequências de %GC. **B)** Ocorre desnaturação parcial da molécula de DNA de cadeia dupla em um ponto do gradiente, a região “grampo”, rica em GC, permanece emparelhada para evitar a desnaturação total das fitas de DNA. Uma molécula sem grampo desnatura completamente a dupla fita e não forma banda no gel. Adaptado de Strathdee; Free (2013).

DGGE é uma técnica confiável para estudar a variação de populações complexas, pois, além de fornecer um padrão de bandas considerado com a “imagem” direta da diversidade bacteriana da amostra pelo uso do gene 16S rRNA, que é universalmente conservado e possui estrutura com regiões altamente conservadas separadas por regiões com sequências variadas. Os primers se ligam as regiões conservadas e amplificam as regiões variáveis do DNA da comunidade, que são separados por DGGE. Também permite a recuperação de informações de sequências de informações de sequências de DNA de bandas do gel (BONETTA et al., 2008; KUANG et al., 2009; STRATHDEE; FREE, 2013).

Cada banda visível no gel de DGGE representa um componente da microbiota, quanto mais faixas visíveis, mais complexo é o ecossistema. As bandas podem ser excisadas dos géis, amplificadas e sequenciadas para obter espécies microbianas correspondentes (COCOLIN; DOLCI; RANTSIOU, 2011).

### 2.6.2.2. Repetitive element palindromic - Polimerase Chain Reaction (Rep-PCR)

Cromossomos bacterianos contêm até 5% de várias sequências repetitivas intercaladas que ocupam regiões intergênicas em locais dispersos do genoma. Esses blocos de sequências repetitivas e não codificantes servem como alvos genéticos múltiplos permitindo a geração de perfis únicos de DNA ou *fingerprinting* de cepas bacterianas individuais (VERSALOVIC; DE BRUIJN; LUPSKI, 1998; ISHII; SADOWSKY, 2009). Três plataformas específicas denominadas BOX, ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) e REP (Repetitive Element Palindromic), que foram projetadas para as sequências conservadas distribuídas em diversos genomas bacterianos. Os primers se ligam às partes repetitivas do cromossomo e a amplificação ocorre quando a distância entre os locais da ligação do primer é curta o suficiente. Suas aplicações são cada vez maiores. As amplificações produzem fragmentos de DNA de tamanhos variados, que são separados por eletroforese em gel de agarose (Figura 7) (COCOLIN; ERCOLINI, 2008; RAMPADARATH; PUCHOOA; BAL, 2015).



**Figura 7:** Princípio da técnica de Repetitive element palindromic (Rep-PCR). **A.** Vários fragmentos de vários comprimentos são amplificados. **B.** Os fragmentos são separados por massa e carga por eletroforese. **C.** Geração de perfil de *fingerprint* único de Rep-PCR criado com múltiplas bandas de intensidade variada. Adaptado de Riethmuller (2013).

A técnica Repetitive element palindromic - PCR (Rep-PCR, reação em cadeia da polimerase (PCR) baseada em elemento repetitivo) é uma técnica de PCR se baseia na amplificação da sequência de elementos repetitivos dos cromossômicos, que estão randomicamente distribuídos nos genomas bacterianos. Foi criada para caracterização de bactérias e é amplamente utilizada para distinguir espécies, sorotipos, cepas, entre outros atualmente tem-se mostrado extremamente útil no estudo da diversidade microbiana (RAMPADARATH; PUCHOOA; BAL, 2015). Rep-PCR é caracterizada como uma técnica simples e uma ferramenta confiável para classificar bactérias Gram-negativas e Gram-positivas,

baseada na PCR, possui baixo custo e alto poder discriminatório (GEVERS; HUYS; SWINGS, 2001).

Como técnica de *fingerprinting* possui muitas aplicações devido à habilidade da técnica de distinguir espécies e cepas bacterianas, pelo agrupamento de isolados bacterianos como triagem prévia e posterior identificação por sequenciamento. Essa técnica tem demonstrado útil na identificação da variabilidade genética entre espécies de BAL (GEVERS; HUYS; SWINGS, 2001; DAL BELLO et al., 2010; PERIN et al., 2017).

## **2.7. Aplicação da tecnologia NGS para avaliação da qualidade e inocuidade de queijos artesanais**

O estudo da diversidade microbiana foi revolucionado por meio do sequenciamento de próxima geração (Next-Generation Sequencing, NGS) obtido pelo uso de sistemas e plataformas de sequenciamento de alto rendimento (High-Throughput Sequencing, HTS) após extração direta do ácido nucleico diretamente da matriz (ERCOLINI, 2013). NGS passou a ter aplicações de rotina em vários campos, incluindo diagnósticos, investigações de surtos e resistência antimicrobiana e autenticidade de alimentos. Essa tecnologia vem se desenvolvendo rapidamente, com melhoria contínua na qualidade e redução dos custos com grande influência na microbiologia de alimentos (JAGADEESAN et al., 2019), como estudos detalhados de genômica funcional e metagenômica, com aplicações que vão desde o levantamento de comunidades microbianas envolvidas no processamento de alimentos até a rápida caracterização de isolados bacterianos de surtos de origem alimentar. Esta tecnologia demonstrou a diversidade microbiana de um grande variedade de queijos (WIEDMANN; CARROLL, 2018; YELURI JONNALA et al., 2018; PAVLOVIC et al., 2020).

A tecnologia HTS, considerada NGS teve como primeiro sistema o pirosequenciamento lançado em 2005 pela 454 Life Sciences (atualmente parte da Roche). Essa tecnologia permitiu a partir da detecção em tempo real das bases nitrogenadas a partir de dNTPs fluorescentes marcados, a geração de milhares de leituras curtas em uma única máquina, e desde então surgiram novas tecnologias NGS e o sequenciamento por tecnologia de síntese evoluiu com o Solexa da Illumina (MiSeq, HiSeq, NextSeq) em 2006 e até 2011 outros três sistemas: SOLiD, PacBio (caracterizados pelo uso de sensores óticos para a detecção de final luminescente gerados durante a incorporação da base) e Ion Torrent (caracterizado pelo monitoramento do sequenciamento pela avaliação do pH por um sensor químico, uma vez que a incorporação de bases leva a alteração de pH) passaram a pertencer ao sistema NGS (CARDINALI; CORTE;

ROBERT, 2017; VINCENT et al., 2017; ALMEIDA; DE MARTINIS, 2019; FRAZILIO et al., 2019).

As tecnologias NGS mudaram a maneira de analisar o DNA combinando o sequenciamento e a quantificação do DNA em uma única etapa. Essas abordagens são consideradas comuns em diferentes estudos que requerem a produção e análise de um grande número de sequências de DNA (RIBANI et al., 2018). NGS tornou-se mais acessível pelo preço mais barato e atualmente é utilizada para resolver os mais diversos problemas biológicos, incluindo a detecção de populações microbianas subdominantes e dominantes em alimentos e de microrganismos de importância para a qualidade e segurança alimentar (CARDINALI; CORTE; ROBERT, 2017; WIEDMANN; CARROLL, 2018).

O sistema é baseado no conceito de sequenciamento de muitas cadeias de DNA em paralelo, pois produz grande número de leituras relativamente pequenas com uso de detectores de alta resolução. Cada leitura relata a real composição de nucleotídeos de pequenas cadeias de DNA. Quando comparado com o sequenciamento Sanger, que produz uma única sequência de nucleotídeos, produz simultaneamente o mesmo nucleotídeo de todas as sequências de DNA e enquanto as o comprimento de leitura das plataformas NGS é restrito a menos de 200 nucleotídeos, as sequências Sanger podem facilmente atingir várias centenas de nucleotídeos de comprimento de leitura, demonstrando que o comprimento de leitura é um fator limitante da maioria das plataformas NGS (CARDINALI; CORTE; ROBERT, 2017).

Técnicas de metagenômica foram inicialmente utilizadas para caracterização de ambientes complexos como oceanos e solo. Estudos de metagenômica são possíveis pelas tecnologias de sequenciamento de próxima geração e têm sido cada vez mais utilizada na pesquisa de alimento, principalmente para identificar microrganismos em ecossistemas de alimentos fermentados (DONNELLY, 2017). Ainda essas técnicas auxiliam na caracterização precisa do microbioma de alimentos artesanais, principalmente aqueles que possuem Denominação de Origem Protegida (Protection Denomination Origin, PDO) que é documentada através de ligações entre as áreas de origem, os procedimentos e os produtos finais, além de contribuir para a compreensão da “evolução” bioquímica destes produtos. Esses estudos fornecem informações sobre sua identidade (para fins de PDO, rastreabilidade, prevenção de fraudes comerciais e casos de adulteração e desenvolvimento tecnológico (LAWSON; TSALTAS, 2014; GALIMBERTI et al., 2015). Além de revelar a diversidade microbiana dos queijos, técnicas metagenômica também fornecem informações sobre a dinâmica microbiana durante a maturação e armazenamento e sua associação com práticas de processamento e regiões produtoras (KAMIMURA et al., 2019b).

O estudo do microbioma de queijos artesanais por meio da tecnologia de NGS, além de potencialmente fornecer uma visão da comunidade microbiana total do queijo, facilita a identificação precisa dos microrganismos presentes e auxilia no entendimento das contribuições negativas e positivas na produção. Esse conhecimento pode auxiliar na promoção de características desejáveis e na identificação de suas propriedades funcionais, além de compreender a dinâmica da microbiota leiteira para que os produtores de queijo otimizem a segurança, a qualidade e o valor comercial de seus produtos (YELURI JONNALA et al., 2018).

O campo da ecologia microbiana está em constante evolução e as técnicas predecessoras foram vitais para o entendimento da microbiologia do leite por muito tempo. Os últimos anos viram a introdução de tecnologias de sequenciamento de próxima geração, como NGS, que estão substituindo outros métodos cultura-independentes. Essas tecnologias fornecem os benefícios de tempo de trabalho reduzido, número estendido de leituras de sequência, volumes de reação mais baixos, bem como amostragem de alto rendimento. Isso tem se mostrado extremamente bem sucedido em traçar o perfil da microbiota de vários ambientes e essas tecnologias têm sido utilizadas para investigar a composição microbiana de alimentos, incluindo queijo (QUIGLEY et al., 2011).

A possibilidade de analisar simultaneamente muitas amostras sem prévio conhecimento da diversidade microbiana torna técnicas de determinação de *fingerprinting* úteis para o monitoramento da diversidade e da dinâmica de ecossistemas microbianos complexos (VAN HOORDE et al., 2008). A combinação dos métodos cultura-dependente e -independente para a avaliação da diversidade microbiana pode contribuir para seleção de melhores estirpes, com melhor desempenho tecnológico e melhores características sensoriais a fim de assegurar a qualidade e inocuidade dos queijos artesanais (NDOYE et al., 2011).

### 3. JUSTIFICATIVA

Queijo Minas artesanal da região do Serro (QMA do Serro) é um patrimônio do estado de Minas Gerais e do Brasil apresenta importância social, cultural e econômica, sendo altamente apreciado por suas características sensoriais e representa a tradição e o saber-fazer da cultura mineira nacional e internacionalmente. Tradicionalmente é produzido com leite cru e fermento endógeno natural “pingo” (soro da produção anterior). A alteração do fermento endógeno tradicionalmente utilizado por “rala” (parte ralada do queijo com 3 a 5 dias de fabricação) para resolver o problema de dessoragem durante a produção, pode alterar a microbiota presente e, por se tratar de um alimento elaborado com leite cru, o QMA do Serro pode se tornar uma via de transmissão de patógenos. Assim, faz-se necessária a caracterização da microbiota desse produto artesanal afim de avaliar possíveis alterações na microbiota láctica, microrganismos responsáveis pelo sabor, qualidade e segurança do QMA do Serro.

A apresentação do QMA do Serro como um produto seguro para consumo e inócuo para o consumidor valoriza e aumenta a visibilidade dos queijos Minas artesanais. Seu reconhecimento valoriza e fortalece o trabalho de pequenos produtores, que movimentam a economia, o turismo e perpetuam a identidade e a cultura do saber-fazer desse patrimônio que representa e divulga o estado de Minas Gerais no Brasil e internacionalmente.

A avaliação da microbiota láctica do QMA do Serro por métodos cultura-dependentes e -independentes também enriquece o banco de dados com informações importantes sobre quais microrganismos estão presentes em queijos da região do Serro, permite verificar a influência de diferentes características de produção do QMA além de explorar o potencial tecnológico dos isolados e prevenir a extinção da biodiversidade local, pode auxiliar os órgãos de fiscalização, extensão e assistência técnica ao produtor na tomada de decisão para melhorar a qualidade e segurança do QMA do Serro.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivo geral**

Analisar o perfil da microbiota láctica de queijos Minas artesanais da região do Serro (QMA do Serro) com diferentes características de produção: fermento endógeno (“pingo” ou “rala”), cidade produtora, tamanho da fazenda produtora e tempo de produção por meio de uma abordagem combinada de métodos dependentes e independentes de cultura.

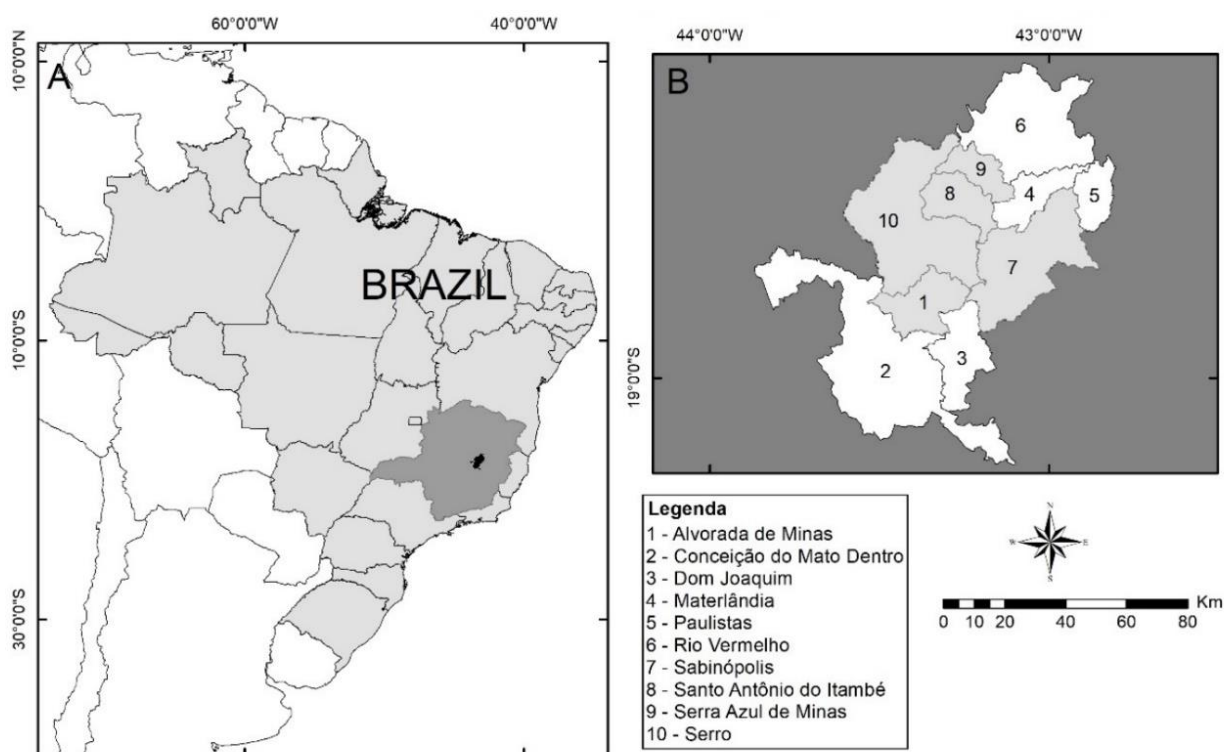
### **4.2. Objetivos específicos**

1. Isolar, caracterizar e quantificar bactérias ácido lácticas (BAL) presentes em QMA do Serro pelo método cultura-dependente;
2. Verificar a variabilidade genética entre as espécies dos isolados de BAL por Rep-PCR;
3. Extrair o DNA total dos QMA do Serro e identificar o perfil das BAL presentes pelos métodos cultura-independentes Rep-PCR e PCR-DGGE;
4. Analisar o perfil da microbiota láctica dos QMA do Serro com diferentes características de produção a partir das abordagens combinadas dos métodos cultura-dependentes e -independentes.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1. Amostragem

Amostras de queijos Minas artesanais da região do Serro (QMA do Serro) ( $n = 55$ ) de diferentes produtores foram adquiridas do CooperSerro (Cooperativa dos Produtores Rurais do Serro, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil) em embalagens originais. As amostras foram mantidas sob refrigeração durante o transporte e análises microbiológicas. As localizações da região do Serro e das cidades produtoras estão apresentadas na Figura 8.



**Figura 8:** A. Localização do Estado de Minas gerais no Brasil (área em cinza escuro) e região do Serro no estado de Minas Gerais (área em preto). B. Identificação das cidades onde os queijos analisados nesse estudo foram produzidos (área cinza) na região do Serro.

### 5.2. Métodos cultura-dependentes

#### 5.2.1. Enumeração e identificação dos isolados

Porções (25g) da casca e da massa de cada QMA do Serro foram obtidas assepticamente, transferidas para sacos plásticos esterilizados (Nasco, Whirl-Pak<sup>®</sup>, Madison, WI, USA) com solução de citrato de sódio (225 mL, 2% m/v), homogeneizadas e diluídas em sequências decimais em solução salina (NaCl, 0,85% m/v) e então plaqueadas em duplicata pela técnica *pour plate* em ágar Man, Rosa e Shape (MRS) (Difco<sup>™</sup>, Becton, Dickinson and Company,

Franklin Lake, NJ, USA) acidificado (pH 5,7) e incubadas em aerobiose a 30 °C por 72 h (ISO 15214, 1998). Após o período de incubação, as colônias formadas nas placas foram enumeradas e os resultados expressos em Unidades Formadoras de Colônias por grama de QMA do Serro (UFC/g).

Baseado na morfologia macroscópica das colônias (cor, tamanho e forma), colônias representativas de cada amostra (cerca de 10% da contagem observada) foram selecionadas, purificadas por estrias para isolamento em ágar MRS e caracterizadas como BAL baseado na morfologia das colônias (bacilos ou cocos Gram-positivos) e pela ausência da produção de catalase (ISO 15214, 1998). Os isolados identificados como BAL foram armazenados a -20 °C em caldo MRS (Difco™, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lake, NJ, USA) contendo 15% (v/v) de glicerol até extração de DNA, avaliação do *fingerprinting* e identificação como descrito na seção a seguir.

### 5.2.2. Rep-PCR dos isolados de BAL

Isolados caracterizados como BAL foram inoculados em caldo MRS e incubados a 30 °C *overnight*. Um mililitro (1 mL) da cultura de cada isolado foi centrifugado 10.000 x g por 5 min e o pellet formado foi submetido a extração de DNA usando o kit Genomic Wizard DNA Purification (Promega Corp., Madison, WI, USA).

Rep-PCR foi realizado com o DNA extraído dos isolados de BAL. As reações de PCR foram realizadas de acordo com metodologia descrita por Gevers; Huys; Swings (2001) com modificações, usando único primer GTG<sub>5</sub> (5'-GTG GTG GTG GTG GTG-3'). As reações de PCR continham 12,5 µl de GoTaq Master Mix 2X (Promega), 1 µl de cada primer 50 pMol, 2 µl de DNA e água ultra pura (Promega) a um volume final de reação igual a 25 µL. As condições de PCR foram: 95 °C por 5 min, 30 ciclos a 95 °C por 30 s, 40 °C por 45 s, 65 °C por 8 min e extensão final a 65 °C por 16 min. Os produtos da PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose (1,5%, m/v) em tampão 0,5X tris/borato/EDTA (TBE) a voltagem constante (90 V) por 3 h. DNA *ladder* de 1 kb (Sigma-Aldrich) foi utilizado como marcador de peso molecular. Os perfis de *fingerprinting* obtidos foram analisados usando o software BioNumerics 6.6 (Applied Maths, Gand, Bélgica) considerando coeficiente de correlação Dice com otimização de 5%, tolerância de 1% e índice de similaridade de 100%. O dendrograma foi construído por análise de cluster pelo método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean).

### 5.2.3. Sequenciamento 16S rRNA dos isolados

Baseados no perfil genéticos obtidos por Rep-PCR com taxa de similaridades de 80%, isolados foram selecionados e subsequentemente identificados pelo sequenciamento do 16S rRNA usando os primers P1V1 (5'-GCG GCG TGC CTA ATA CAT GC-3') e P4V3 (5'-ATC TAC GCA TTT CAC CGC TAC-3') (KLIJN; WEERKAMP; DE VOS, 1991). As reações de PCR continham 25 µL de Go Taq Green Master Mix 2x (Promega), 1 µL de cada primer 10 pMol/µL, 2 µL de DNA e água ultra pura (Promega) a um volume final de reação igual a 50 µL. Os produtos adquiridos foram submetidos a eletroforese em um gel de agarose a 2% em tampão TBE 0.5x, corados utilizando GelRed (Biotium) e analisados quanto a presença de um produto de PCR com 1000 pb. Em seguida, os produtos da PCR foram armazenados em placas de 96 poços, sequenciados (Macrogen Inc.), e as sequências obtidas analisadas pelo NCBI utilizando o software BLAST para identificação dos isolados.

## 5.3. Métodos cultura-independentes

### 5.3.1. Extração do DNA total das amostras de QMA do Serro

Porções (25g) da casca e da massa de cada QMA do Serro foram obtidas assepticamente, transferidas para sacos plásticos esterilizados (Nasco, Whirl-Pak®, Madison, WI, USA) e homogeneizadas. O DNA total foi extraído de 2 g da amostra homogeneizada usando kit QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha) de acordo com o protocolo do fabricante para isolamento de DNA de fezes para detecção de patógenos e bactérias Gram-positivas. O DNA total extraído das amostras foi quantificado por espectrofotometria (Thermo NanoDrop 2000, Thermo Scientific™, Waltham, MA, USA) e armazenados a -20 °C até análises posteriores.

### 5.3.2. Rep-PCR do DNA total

Análises de Rep-PCR foram realizadas com o DNA total extraído diretamente das amostras de QMA do Serro de acordo com Gevers et al. (2001), com modificações, como descrito na seção de 5.2.2. Os *fingerprints* obtidos foram analisados pelo Bio.Numerics 6.6. (Applied Maths). As semelhanças entre os perfis foram calculadas usando o coeficiente Dice e os dendrogramas foram construídos usando o método UPGMA considerando tolerância de 1,5% e otimização de 5%.

### 5.3.3. PCR-DGGE

A identificação das bactérias dominantes nas amostras de QMA do Serro também foi realizada pela amplificação da região V3 do gene 16S rRNA de acordo com Ampe et al. (1999). Os primers utilizados foram 338F (5'-AC TCC TAC GGG AGG CAG CAG-3') e 518R (5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3'). Um grampo GC de 40 pares de base (5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGGG-3') foi acoplado ao à extremidade 5' do primer *forward* a fim de garantir que o fragmento de DNA permanecesse com fita parcialmente dupla e que a região rastreada estivesse na região de desnaturação mais baixa, originando amplicons com tamanho de aproximadamente 236 pb (ARCURI et al., 2013).

Reações de PCR foram realizadas com o volume final de 50 µL contendo 1 x de tampão de reação GoTaq<sup>®</sup> Flexi (Promega), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de deoxinucleotídeos trifosfatos (dNTPs), 0,2 µM de cada primer, 1,25 U de enzima Taq Pol DNA polimerase (Cellco), 2 µL do DNA total e água ultra pura para PCR. As condições de PCR foram: 10 min a 95 °C, 35 ciclos a 1 min a 95 °C, 1 min a 42 °C, 2 min a 72 °C e extensão final 72 °C por 7 min. O DNA ladder de 100 pb (Sigma-Aldrich) foi utilizado como marcador de peso molecular. A confirmação dos produtos amplificados foi determinada por eletroforese de 5 µL da reação de PCR em gel de agarose de 1,5% (m/v), corado com brometo de etídeo, por 3 h a voltagem constante de 80 V em tampão tris/borato/EDTA (TBE). As imagens foram registradas usando transiluminador por visualização sob luz ultravioleta no sistema de imagem de fotodocumentação (Loccus Biotecnologic L-Pix Chemi).

A análise de DGGE foi utilizada pelo sistema de detecção de mutação universal DCode<sup>™</sup> (Bio-Rad Laboratories, California, USA). A eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida e 0,8 mm de espessura (8%, m/v) acrilamida:bisacrilamida (37,5:1) com gradiente de desnaturação de ureia e formamida variando entre 25 e 60% em tampão TAE 1X (40 mM de Tris base, 20 mM de ácido acético e 1 mM de EDTA, pH 8) (AMPE et al., 1999). A eletroforese foi realizada a voltagem constante a 120 V por 6 h a 60 °C em TAE 1X. Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de TAE 1X contendo 1X SYBR GOLD (Sigma-Aldrich) e posteriormente analisado e fotografado em fotodocumentador sob luz UV usando sistema do fotodocumentador (Loccus Biotecnologic L-Pix Chemi).

Bandas bem definidas e com boa intensidade dos géis de poliacrilamida foram selecionadas e coletadas usando pontas de pipetas esterilizadas e depositadas em microtubos de 200 µL contendo 30 µL de água ultra pura e armazenados a 4 °C *overnight*. Cinco microlitros do DNA eluído foram reamplificados em uma reação de PCR de 50 µL, realizada com primers

sem o grampo GC usando as condições descritas anteriormente. Os produtos de PCR (amplicons) foram purificados usando QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) e sequenciados no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (Bioagro UFV) em um sequenciador da Applied Biosystems™ 3500. Os reagentes e equipamentos utilizados para o sequenciamento de DNA foram da Applied Biosystems. As sequências foram comparadas com as do NCBI utilizando o software BLAST para determinar espécies conhecidas mais próximas.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nero et al., (2021) desenvolveram um estudo para caracterização da microbiota láctica das mesmas amostras de QMA Serro utilizadas nesse estudo, considerando o sequenciamento da região V3-V4 do gene 16S rRNA do DNA total extraído das amostras, além de identificação molecular de isolados obtidos após a enumeração de BAL, conforme descrito a seguir. As características de produção dos queijos Minas artesanais da região do Serro (QMA do Serro) avaliados nesse estudo com relação ao fermento endógeno adicionado, cidade produtora, tamanho da fazenda produtora e tempo de produção estão apresentadas na Tabela 4.

**Tabela 4:** Características dos queijos Minas artesanal do Serro (QMA do Serro)

Cidade produtora	n	Fermento endógeno		Tamanho da fazenda produtora*			Tempo de produção (dias)		
		“Pingo”	“Rala”	Pequena	Média	Grande	< 10	10 a 20	> 20
Alvorada de Minas	8	0	8	2	6	0	7	1	0
Sabinópolis	6	1	5	1	1	4	3	2	1
Santo Antônio do Itambé	9	2	7	1	3	5	4	4	1
Serra Azul de Minas	5	0	5	0	0	5	2	2	1
Serro	27	4	23	8	17	2	21	4	2
Total	55	7	48	12	27	16	37	13	5

\*Relativo à produção diária de leite (em litros). Pequena: menor que 150; Média: de 150 a 200 e Grande: maior que 200.

Do total de 541 isolados dos 55 QMA do Serro em ágar MRS acidificado a pH 5,7 incubados em condições aeróbias, 396 colônias (73,2%) foram caracterizadas como possuindo características típicas de BAL, cocos ou bastonetes, Gram-positivos e catalase negativa. Não foram observadas diferenças entre os perfis das características morfológicas dos isolados com relação as características de produção do QMA do Serro (NERO et al., 2021).

As contagens médias para BAL obtidas em MRS pH 5,7 no presente estudo variaram de 5,4 a 8,4 log UFC/g, com valor médio de 6,9 log UFC/g ( $\pm 0,8$ ) e, no geral, não foram observadas tendências particulares considerando as diferentes características de produção do

QMA do Serro (fermento endógeno adicionado, cidade produtora, tamanho da fazenda produtora e tempo de produção) (NERO et al., 2021). QMA de outras regiões apresentaram contagem de LAB semelhante como das regiões de Araxá (LUIZ et al., 2016a; PERIN et al., 2017), Campo das Vertentes (CASTRO et al., 2016; PERIN et al., 2017), Serra da Canastra (Resende et al., 2011) e Serro (FIGUEIREDO et al., 2015) e de acordo com Martins et al. (2018), esses valores são frequentemente reportados como valores médios de contagem de BAL de outros queijos artesanais e esses resultados evidenciam a riqueza e a importância dessa microbiota presente em queijos artesanais. Os produtos das vias metabólicas de BAL são determinantes para o *terroir* e para as propriedades tecnológicas dos queijos artesanais. Os principais são compostos responsáveis pelas características sensoriais e compostos com características antimicrobianas, que lhes confere potencial bioconservante (ORTOLANI et al., 2010; MONTEL et al., 2014; LUIZ et al., 2016a; CAVICCHIOLI et al., 2017; PERIN et al., 2017; CAMPAGNOLLO et al., 2018). A diversidade láctica dos queijos artesanais varia de acordo com diversos fatores como a composição da microbiota endógena do leite cru (do ar, solo e pele do animal), composição física e química do queijo, interações microbianas, técnicas de produção, entre outros (BLAYA; BARZIDEH; LAPOINTE, 2018; MARTINS et al., 2018).

Quando comparada a quantidade de queijos produzidos com “rala” (87,27%) com queijos produzidos com “pingo” (12,73%), pode-se verificar que muitos produtores ainda utilizam “rala” como fermento endógeno, que não faz parte do saber fazer do QMA. Rozental et al. (2020) retratam que, de acordo com autorrelatos de produtores, 63% das agroindústrias estudadas utilizam “rala” como fermento endógeno e que a média de dias de maturação dos queijos vendidos era de 4 dias, indicando que alguns produtores não respeitam o tempo de maturação estabelecido pela Portaria nº 1.305, de 30 de abril de 2013 que é de 17 dias para a região do Serro (MINAS GERAIS, 2013). Tempos de maturação inferiores ao estabelecidos pela legislação, determinados por meio de pesquisas científicas, podem não ser seguros para consumo.

No trabalho de Andretta et al. (2019), em que foram analisadas 53 amostras de QMA do Serro após o período de maturação mínimo de 17 dias, adicionados de “pingo” e “rala” como fermento endógeno quanto a presença de *Salmonella* spp., *L. monocytogenes*, *Staphylococcus* coagulase positiva e presença de enterotoxinas e *E. coli*, *Brucella abortus* e *Mycobacterium tuberculosis* por PCR, todos os queijos analisados foram caracterizados como seguros para consumo. Como a utilização de “rala” não faz parte do saber fazer do QMA do Serro e dos regulamentos, faz-se necessário o estudo da microbiota presente nesses queijos para verificar alterações da microbiota pela modificação do fermento tradicional.

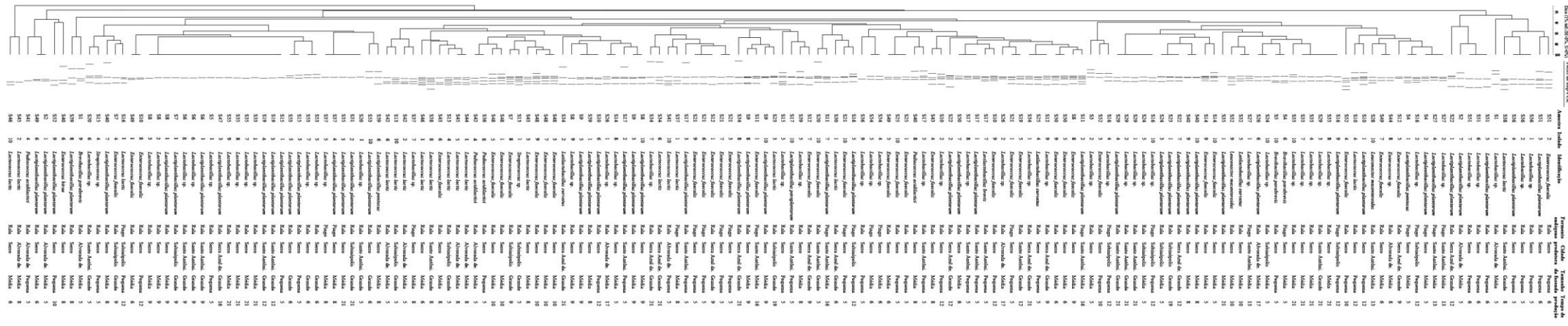
Na análise pelo método cultura-dependente, todos os isolados obtidos das 55 amostras de QMA do Serro em MRS pH 5,7 e caracterizados como possuindo características típicas de BAL: cocos ou bastonetes Gram-positivos e catalase negativa foram submetidos à extração de DNA, e submetidos a Rep-PCR. Considerando os perfis de amplificação observados por Rep-PCR e a origem, 176 isolados foram selecionados e submetidos à amplificação do gene 16S rRNA para sequenciamento e identificação (NERO et al., 2021). O dendrograma obtido pelo agrupamento Rep-PCR das cepas LAB isoladas do QMA do Serro selecionadas para sequenciamento está apresentado na Figura 9. A identificação desses isolados foi descrita por Nero et al. (2021), em um estudo que avaliou a diversidade microbiana de QMA com diferentes características de produção por meio de sequenciamento 16S rRNA de alto rendimento do DNA das amostras.

De acordo com a nova taxonomia e nomenclatura do gênero *Lactobacillus*, adotamos o termo genérico “lactobacilos” para designar os isolados identificados como *Lactobacillus* sp. antes da reclassificação (POT et al., 2019; ZHENG et al., 2020). O sequenciamento do 16S rRNA dos isolados identificou nove gêneros e onze espécies, alguns isolados foram identificados o gênero e alguns isolados foram identificados como lactobacilos. Houve prevalência das espécies pertencentes ao grupo lactobacilos, principalmente *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lactococcus lactis* e *Enterococcus* sp. também foram identificados. O agrupamento dos isolados por Rep-PCR indica que alguns isolados analisados estão amplamente distribuídos na região do Serro, uma vez que alguns agrupamentos mostraram que alguns isolados apresentaram 100% de similaridade, mesmo produzidos em diferentes cidades produtoras e com diferentes características de produção. O perfil dos gêneros e espécies identificados de BAL não diferiu com as diferentes características de produção do QMA do Serro (NERO et al., 2021).

Nas avaliações da microbiota láctica pelo método cultura-dependente nos estudos de Resende et al. (2011), que avaliaram a influência das altitudes dos queijeiros sobre a população de BAL em QMA da Canastra, Luiz et al. (2016) que avaliaram o QMA de Araxá nos períodos de estações seca e chuvosa durante o período de maturação, e Perin et al. (2017) que avaliaram QMA das regiões do Serro, Araxá, Canastra e Serra do Salitre o grupo dos lactobacilos também foi predominante. O grupo dos lactobacilos é capaz de se multiplicar nas condições altamente seletivas existentes nos queijos, como baixo pH e altas concentrações de sal, e desempenham um papel importante durante a maturação dos queijos artesanais, pois produzem compostos de sabor voláteis que contribuem para o seu perfil sensorial (LUIZ et al., 2016b; PERIN et al., 2017).

O grupo dos lactobacilos também foi o predominante nas amostras de água, silagem, leite cru, fermento endógeno e QMA por 60 dias de maturação de fazendas leiteiras da região de Campo das Vertentes analisadas por Sant Anna; Arcucio (2018). *Lactiplantibacillus plantarum* foi a espécie dominante na região, exceto queijo com 28 dias de maturação e silagem, também foram identificados *Levilactobacillus brevis*, *Lacticaseibacillus rhamnosus*, *Lacticaseibacillus paracasei* e *Pediococcus acidilactici*. Os autores enfatizam a importância de fatores como água, alimentação do gado e fermento endógeno que podem atuar como agentes disseminadores de BAL no meio ambiente e no queijo. A composição do leite cru, as características ambientais da região (*terroir*) e as boas práticas de produção também podem influenciar a diversidade e a dinâmica da comunidade microbiana associada aos queijos artesanais. A atividade das BAL é fundamental na influência das características sensoriais e físico-químicas, peculiaridades, autenticidade e qualidade dos queijos.

No estudo de Castro et al., (2016), que também analisaram amostras de água, leite cru, fermento endógeno e QMA frescos (coletados no dia seguinte à produção) da região de Campos das Vertentes durante as estações seca e chuvosa, foi identificado pelo sequenciamento 16S rRNA que *Enterococcus faecalis* foi isolado com maior frequência em amostras de leite cru, fermento endógeno e queijos frescos. Nos queijos frescos também foram identificados *Lactococcus lactis* e *L. plantarum* e microrganismos indesejáveis e patogênicos (coliformes termotolerantes, *Staphylococcus* coagulase-positivos e *Salmonella* spp.) em ambas as estações estudadas. A qualidade microbiológica das amostras estudadas, incluindo queijos frescos, foi influenciada pela estação do ano. Os autores destacam a importância da comercialização de queijos somente após maturação, uma vez que BAL estão presentes em altas contagens, e podem inibir a microbiota indesejável e patogênica e contribuir para características sensoriais desejáveis como o sabor dos queijos artesanais.

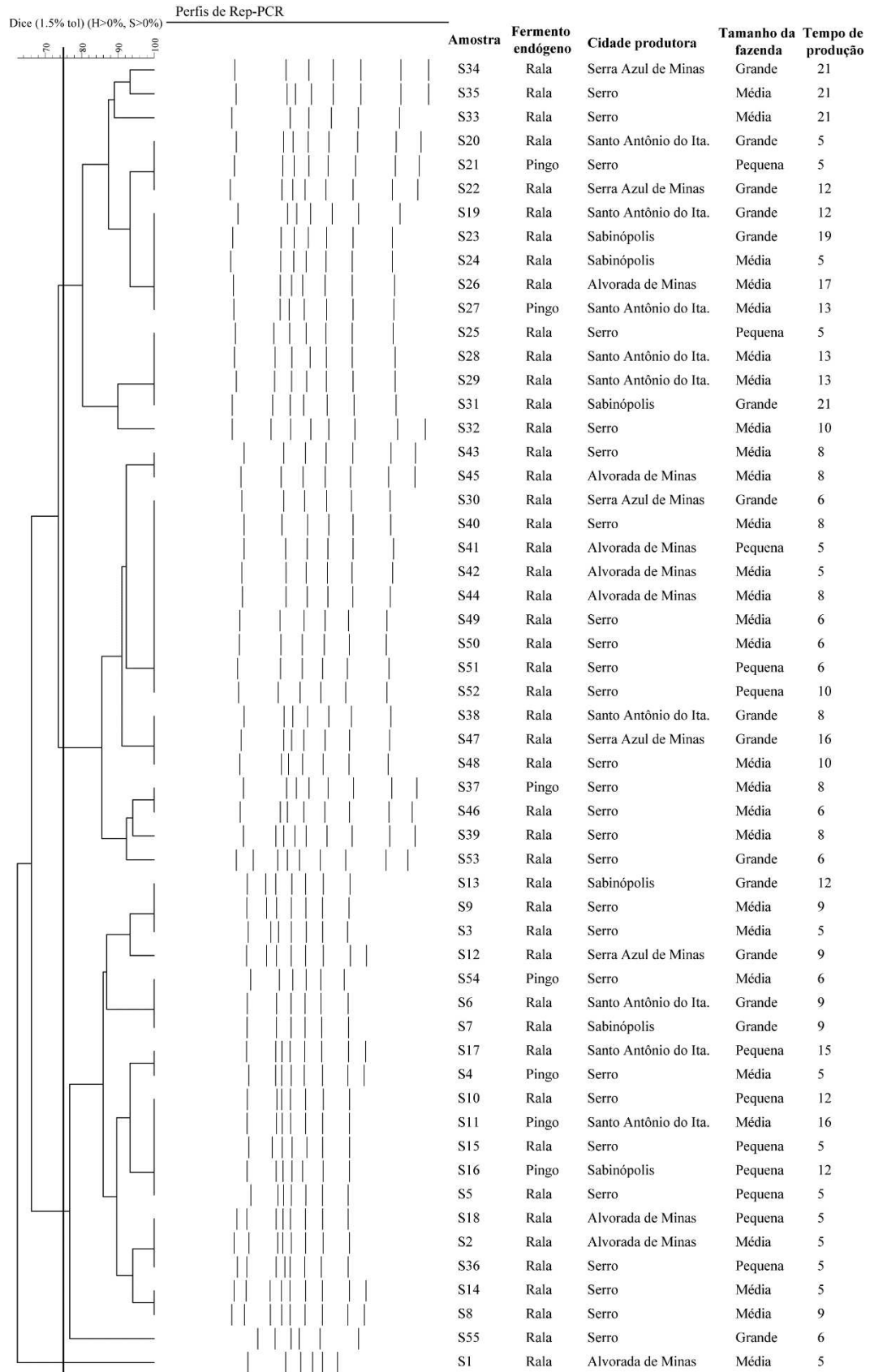


**Figura 9:** Análise de cluster de *fingerprinting* por Rep-PCR obtidas de 176 cepas de bactérias ácido lácticas isoladas de queijos Minas artesanais da região do Serro (QMA do Serro) com diferentes características de produção. As semelhanças entre os perfis foram calculadas usando a correlação de Dice e os dendrogramas foram construídos usando Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA).

Uma vez que o sequenciamento do gene 16S rRNA por si só não é capaz de identificar a variabilidade genética dos isolados, foi utilizada a técnica Rep-PCR (ferramenta útil para a análise da variabilidade genética entre as espécies) para agrupar isolados bacterianos como triagem prévia para posterior identificação por sequenciamento. Nesse estudo, a técnica Rep-PCR também foi considerada método cultura-independente no estudo da diversidade genética da microbiota láctica dominante em QMA do Serro para fornecer informações sobre as interações e influências das características de produção do QMA do Serro pela amplificação do região palindrômica repetitiva do 16S rRNA por PCR convencional usando um único primer (GTG<sub>5</sub>) do DNA total extraído das amostras de QMA do Serro (GEVERS; HUYS; SWINGS, 2001; DAL BELLO et al., 2010; COCOLIN; DOLCI; RANTSIOU, 2011; PERIN et al., 2015, 2017).

O dendrograma obtido pela técnica Rep-PCR, agrupando QMA do Serro com diferentes características de produção, está apresentado na Figura 10, considerando o coeficiente de similaridade de 75%, foram obtidos 3 grupos principais. Os principais agrupamentos compreendem, em sua maioria, QMA do Serro com uma ou mais características de produção diferentes. Ao comparar QMA produzidos com “pingo” como fermento endógeno, apenas 2 são agrupados com 100% de similaridade (S11 e S16) e estes possuem apenas essa característica de produção semelhante, além disso, estes também apresentam 100% de similaridade com QMA do Serro com outras características de produção distintas, incluindo outros 3 produzidos com “rala” como starter. Ao analisar os demais grupos, avaliando outras características de produção do QMA do Serro, percebe-se que em todos eles os QMA do Serro presentes apresentavam características de produção completamente distintas. Este resultado indica que a diversidade láctica dos queijos apresenta semelhanças entre os QMA do Serro com base em seus perfis moleculares.

Mesmo sem identificar quais grupos microbianos estão presentes em cada amostra, o Rep-PCR como método cultura-independente proporcionou a evidência de que os fatores relacionados à produção do QMA do Serro não interferiram na microbiota dos QMA do Serro analisados. A similaridade entre os grupos microbianos presentes nos QMA do Serro com diferentes características de produção foi corroborada pelos resultados do sequenciamento e da análise da variabilidade genética de Rep-PCR dos isolados.



**Figura 10:** Análise de agrupamento de *fingerprints* por Rep-PCR obtidos do DNA total dos 55 queijos Minas artesanais da região do Serro (QMA do Serro) com diferentes características de produção. As semelhanças entre os perfis foram calculadas por meio de correlação de Dice e os dendrogramas foram construídos usando UPGMA.

No estudo de Perin et al. (2017), que analisaram a ecologia de QMA produzidos em diferentes regiões por Rep-PCR, identificaram que os queijos produzidos na região do Serro foram agrupados em um cluster com similaridade inferior a 65% entre si. Os queijos avaliados também apresentaram diferença entre as contagens de BAL e os autores indicam que a falta de padronização nos procedimentos de ordenha e produção entre as fazendas produtoras pode explicar a diversidade microbiana.

No entanto, a abordagem cultura-dependente possui algumas limitações em relação à taxa de recuperação dos isolados e muitas vezes não refletem verdadeiramente a composição do queijo analisado. Isso acontece porque é difícil simular as condições em que todas as bactérias se multiplicam naturalmente nos queijos, portanto, esse método não representa totalmente a comunidade e a real diversidade microbiana presente. Como resultado, um baixo número de espécies é frequentemente identificado. Além disso, a microbiota complexa presente no queijo interfere no desempenho dos protocolos de enumeração de BAL. Por isso, acredita-se que supere os problemas associados ao cultivo seletivo, utilizando métodos cultura-independentes (DOLCI et al., 2015; ALMEIDA et al., 2020).

A diversidade láctica dos queijos artesanais varia de acordo com inúmeros fatores como a composição da microbiota autóctone do leite cru (do ar, solo e pele do animal), composição física e química do queijo, interações microbianas, técnicas de produção, entre outros (MARTINS et al., 2018). A identificação e caracterização de BAL em queijos artesanais para compreender a diversidade é importante e os métodos dependentes da cultura permanecem e continuarão a ser fundamentais para a identificação e caracterização de cepas de BAL com propriedades tecnológicas, potencial bioconservante e diversidade de características sensoriais (DAL BELLO et al., 2010; ORTOLANI et al., 2010; PERIN et al., 2012; MONTEL et al., 2014; CAVICCHIOLI et al., 2017; CAMPAGNOLLO et al., 2018).

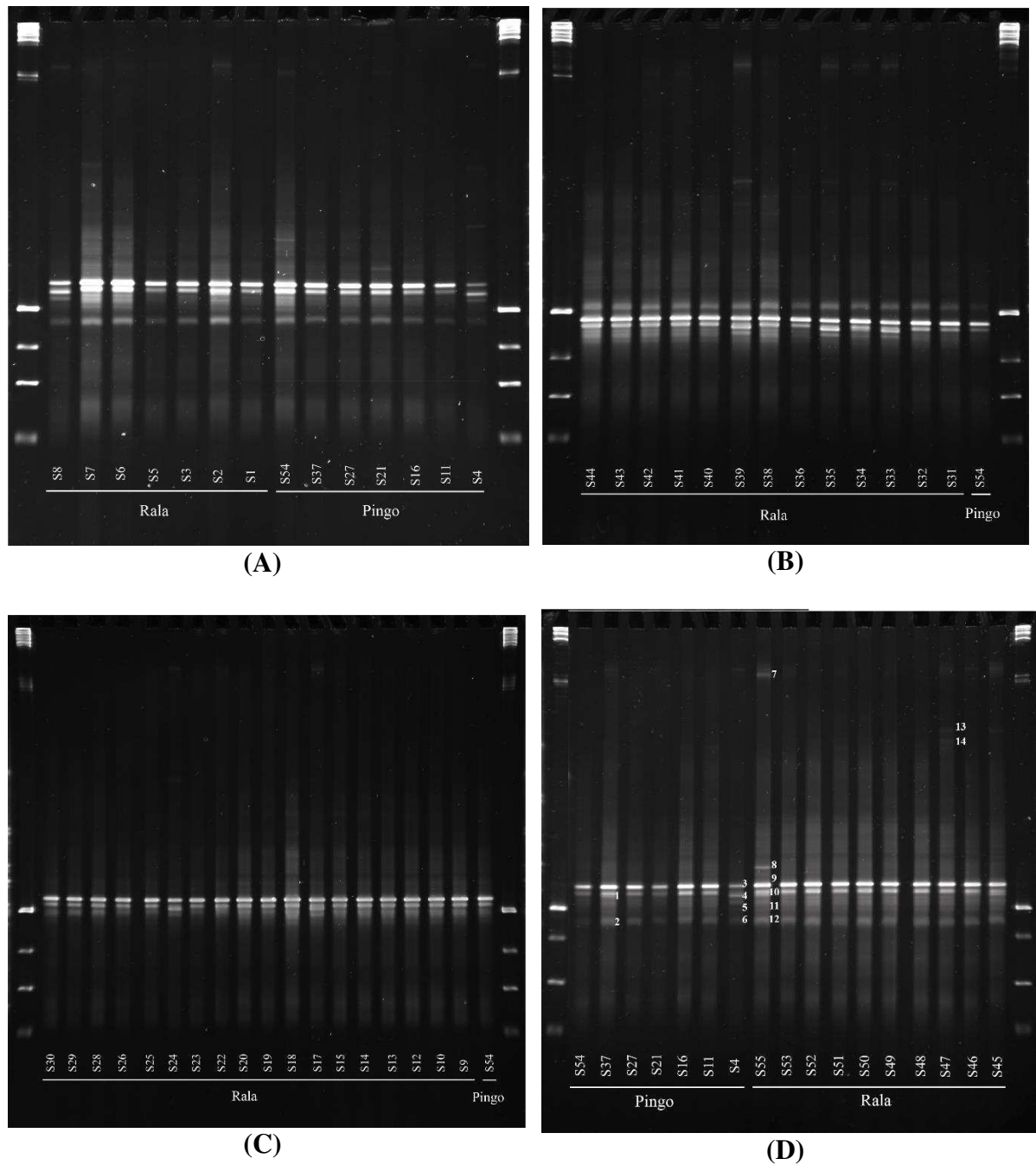
QMA do Serro já se mostraram seguros, mesmo com a adição de “rala” como cultura *starter* e não apresentaram diferenças nas características físico-químicas e de segurança após o período de maturação (VALE; RODRIGUES; MARTINS, 2018; ANDRETTA et al., 2019).

O estudo da diversidade láctica dominante no QMA do Serro foi também realizado pela amplificação da região V3 do 16S rRNA por PCR convencional com primers universais seguido pela análise DGGE dos amplicons resultantes e sequenciamento das bandas purificadas de DGGE. O perfil das bandas pela análise DGGE revelou que a diversidade de BAL foi semelhante entre os QMA do Serro, independentemente das características de produção, com 3 a 6 bandas como específicas para todas as amostras (Figura 11) e de acordo com os perfis de desnaturação das bandas, 14 bandas (Figura 11, D) foram selecionados para sequenciamento e

identificação. O sequenciamento das bandas (Tabela 5) indicou a prevalência de *Lactococcus lactis* em todas as amostras analisadas e também foram identificados *L. lactis* subsp *lactis*, *L. lactis* sp, *Streptococcus salivarius* e *Streptococcus* sp. Nas bandas 4 e 6, mais de um gênero foi identificado e na análise das bandas 5 e 11, duas bandas comigrantes, que possuem o mesmo perfil de desnaturação. No estudo de Arcuri et al. (2013), as amostras de QMA do Serro analisadas de uma mesma região, incluindo o Serro, também se apresentaram como intimamente relacionadas, com baixa diversidade microbiana. Assim como observado por DGGE, Nero et al., (2021) identificou *L. lactis* como espécie predominante na microbiota láctica das amostras de QMA do Serro, após sequenciamento do gene 16S rRNA do DNA total.

*L. lactis* é uma BAL altamente relevante para a indústria de laticínios, com a capacidade de acidificar e se multiplicar em diferentes concentrações de NaCl. Essa espécie possui a capacidade de colonizar e se adaptar a diferentes biótipos, sendo encontrado naturalmente nos mais diversos ambientes, como vegetais (gramíneas e silagens) e animais, principalmente no leite cru de diversos animais e em seus produtos como os queijos artesanais (MARTINS et al., 2020).

Arcuri et al. (2013) analisaram amostras de queijo Minas artesanal das regiões do Serro, Araxá, Cerrado e Serra da Canastra por meio de PCR-DGGE. As amostras de QMA do Serro analisadas apresentaram 4 ou 5 bandas como específicas para queijo da região. Uma banda presente em todos os queijos mineiros artesanais foi a mais proeminente e foi identificada como *Streptococcus thermophilus*. Uma banda específica da região de Serro foi identificada como sequência de grupo de lactobacilos, outras bandas presentes no perfil QMA do Serro apresentaram perfil de microrganismos semelhante a desse estudo e foram identificadas como *Streptococcus* sp, *S. salivarius* e *L. lactis*, também foram identificados *S. thermophilus* e *L. plantarum*. Uma banda tênue não foi identificada porque não produziu bons resultados de sequenciamento, provavelmente devido à sua baixa quantidade. O limite de detecção do PCR-DGGE depende da espécie ou talvez até mesmo da cepa considerada, e tem sido indicado para algumas espécies, variando de  $10^4$  a  $10^8$  UFC/mL (ERCOLINI, 2004).



**Figura 11:** Perfis de DGGE da região V3 do gene 16S rRNA dos 55 queijos Minas artesanais da região do Serro (QMA do Serro) com diferentes características de produção. As informações iniciadas em “S” identificam a amostra. Os números em “D” indicam as bandas sequenciadas para identificação molecular. Os resultados estão presentes na Tabela 5.

**Tabela 5:** Identificação de espécies bacterianas presentes em queijos Minas artesanais da região do Serro (QMA do Serro) a partir do sequenciamento de bandas de DGGE com base na comparação das sequências por BLAST no GenBank.

Banda <sup>a</sup>	Mais próximo relativo à sequência	% de identidade <sup>b</sup>	Nº de acesso do GenBank
1	<i>Lactococcus lactis</i>	99	MT645510.1
2	<i>Lactococcus lactis</i>	98	MT645510.1
3	<i>Lactococcus lactis</i>	98	MT645510.1
4	<i>Lactococcus</i> sp.	97	KJ804064.1
	<i>Streptococcus</i> sp.	96	MW045815.1
5	<i>Streptococcus salivarius</i>	96	MT512105.1
6	<i>Streptococcus</i> sp.	96	MW045807.1
	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	94	JQ973604.1
7	<i>Streptococcus</i> sp.	97	MT512026.1
8	<i>Lactococcus lactis</i>	96	MT645510.1
9	<i>Lactococcus lactis</i>	99	MT645510.1
10	<i>Lactococcus lactis</i>	99	MT645510.1
11	<i>Lactococcus lactis</i>	99	MT645510.1
12	<i>Lactococcus lactis</i>	99	MT645510.1
13	<i>Lactococcus lactis</i>	96	JQ754459.1
14	<i>Lactococcus lactis</i>	96	MT115989.1

<sup>a</sup> Os números correspondem aos indicados nas bandas na Figura 11 “D”.

<sup>b</sup> Porcentagem de similaridade entre as sequências obtidas das bandas de DGGE e a sequência da espécie mais próxima na base de dados do GenBank.

PCR-DGGE, inicialmente utilizada como método cultura-dependente foi utilizada como método cultura-independente no estudo de Van Hoorde et al. (2008) ao avaliaram a diversidade de BAL de queijos flamengos artesanais tipo Gouda produzidos com leite cru. Os resultados indicaram que os dois lotes dos queijos analisados também apresentaram semelhanças mesmo com diferentes fermentos endógenos e parâmetros tecnológicos de produção. Pela técnica DGGE como cultura-dependente, lactobacilos foi o grupo predominante e três espécies de alguns isolados não recuperados (*Enterococcus faecalis*, *Lentilactobacillus parabuchneri* e *Lactobacillus gallinarum*) foram detectados, por outro lado, nem todos os isolados foram detectados por PCR-DGGE. No entanto, não foram detectadas diferenças na diversidade microbiana entre os queijos com 8 e 12 semanas de maturação. Como técnica cultura-independente, a banda predominante presente em todos os perfis foi atribuída a *Lactococcus lactis* e algumas bandas também corresponderam a lactobacilos não isolados e detectado pelo método cultura-dependente. Os perfis DGGE dos queijos também demonstraram semelhanças. Os autores enfatizam o uso de uma abordagem integrada entre técnicas

dependentes e independentes de cultura para cobrir o máximo possível o espectro taxonômico de BAL presente em queijos.

Métodos cultura-dependentes são limitados devido a vários fatores relacionados às condições laboratoriais de cultivo, supercrescimento de cepas com multiplicação rápida, seletividade excessiva de alguns meios que podem não inibir o crescimento de algumas populações e a viabilidade de microrganismos conferidos por condições ambientais adversas, efeitos encontrados na fermentação e processamento de queijos. Algumas condições adversas, como depleção de nutrientes, baixas temperaturas ou variação do pH, podem induzir as células microbianas a um estado de estresse caracterizado pela incapacidade de produzir colônias no meio, mesmo que ainda sejam capazes de realizar atividade metabólica. Métodos cultura-independentes consideram o DNA de todos os microrganismos presentes, incluindo bactérias potencialmente mortas, lisadas e bactérias no estado viável não cultivável. Essas bactérias podem ter DNA amplificável, influenciando os resultados de técnicas moleculares independentes de cultura (COCOLIN et al., 2013; FUSCO; QUERO, 2014; PERIN et al., 2017). O estresse causado pelas condições ambientais adversas durante a produção e maturação do queijo pode ter levado *Lactococcus* a uma condição viável não cultivável, sendo identificado em maior proporção pela abordagem cultura-independente, enquanto *L. lactis* pelo método cultura-dependente (DOLCI et al., 2015; RUGGIRELLO; COCOLIN; DOLCI, 2016; RUGGIRELLO et al., 2018).

Esse estudo fornece uma visão da composição da comunidade microbiana láctica em QMA do Serro usando uma abordagem combinando métodos cultura-dependente e -independente. Essa abordagem combinada é importante para obter uma visão do ecossistema microbiano existente devido às variações entre os resultados obtidos pelos dois métodos. Discrepâncias entre microrganismos detectados por métodos cultura-dependente e -independente são comuns entre as amostras de queijo e as condições laboratoriais de cultivo e seletividade de alguns meios, pois os meios de cultura MRS podem não permitir a multiplicação e a identificação de algumas populações. O meio de cultura MRS é recomendado para isolamento, contagem e cultivo do grupo de lactobacilos. Outros LAB podem crescer, mas o pH mais baixo e alguns ingredientes como polissorbato 80, acetato, magnésio e manganês podem inibir o crescimento de alguns microrganismos diferentes daquele grupo (BECTON DICKINSON, 2021). Quanto à falha na detecção de alguns microrganismos pelo método cultura-independente, pode ser devido ao estado não cultivável de bactérias viáveis, ou à presença de DNA amplificável de populações microbianas lisadas, danificadas ou mortas, provavelmente causado por condições de estresse ambiental (MARTÍN-PLATERO et al., 2008;

ALEGRÍA et al., 2009; POGAČIĆ et al., 2013; RYSSEL et al., 2015; PERIN et al., 2017; KARABEY et al., 2018; KAMIMURA et al., 2019a) esses fatores podem explicar por que o grupo lactobacilos foi detectado como predominante pelo método cultura-dependente, em oposição ao resultado da análise DGGE. O uso de abordagens dependentes e independentes de cultura produz informações complementares e fornece uma descrição mais abrangente das populações microbianas em ambientes microbianos complexos.

## 7. CONCLUSÃO

O estudo da microbiota láctica presente no queijo Minas artesanal produzido na região do Serro (QMA do Serro) utilizando diferentes métodos (cultura-dependentes e cultura-independentes) demonstrou que a distribuição das BAL presentes não se alterou conforme as diferentes características de produção (fermento endógeno, cidade produtora, tamanho da fazenda e tempo de produção). Entretanto, diferentes grupos microbianos foram identificados conforme a abordagem considerada: métodos cultura-dependentes ou -independentes. Essas diferenças já eram esperadas devido a diferentes abordagens e alvos desses métodos.

No presente estudo, as principais espécies identificadas pelo sequenciamento do 16S rRNA pelo método cultura-dependente foram as pertencentes ao grupo dos lactobacilos, principalmente *Lactiplantibacillus plantarum*. Rep-PCR e PCR-DGGE demonstraram ser ferramentas úteis para estudar a microbiota láctica em queijos artesanais. Quando a microbiota láctica foi avaliada por DGGE, os perfis genéticos das amostras de queijo foram semelhantes, e no sequenciamento das bandas de DGGE, a principal espécie identificada foi *Lactococcus lactis*. O método cultura-dependente permitiu a obtenção de isolados, que serão explorados em estudos complementares visando a caracterização de seu potencial efeito benéfico e biotecnológico na produção de alimentos fermentados. A associação dos métodos cultura-dependente e -independente fornecem descrições mais detalhadas sobre a diversidade láctica presente nos queijos.

A predominância dos perfis genéticos de BAL no QMA do Serro e sua caracterização como seguros auxiliam na produção desses queijos de alta importância cultural e econômica. Os dados obtidos também podem auxiliar os órgãos competentes na tomada de decisões para autorizar o uso da “rala” na produção de queijo Minas artesanal.

## 8. REFERÊNCIAS

AFSHARI, R. et al. Cheesomics: the future pathway to understanding cheese flavour and quality. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 0, n. 0, p. 1–15, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1512471>>.

AL-AWADHI, H. et al. Bias problems in culture-independent analysis of environmental bacterial communities: A representative study on hydrocarbonoclastic bacteria. **SpringerPlus**, v. 2, n. 1, p. 1–11, 2013.

ALEGRÍA, Á. et al. Diversity and evolution of the microbial populations during manufacture and ripening of Casín, a traditional Spanish, starter-free cheese made from cow's milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 136, n. 1, p. 44–51, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.09.023>>.

ALMEIDA, T. T. de et al. The complex microbiota of artisanal cheeses interferes in the performance of enumeration protocols for lactic acid bacteria and staphylococci. **International Dairy Journal**, v. 109, p. 104791, out. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104791>>.

ALMEIDA, O. G. G.; DE MARTINIS, E. C. P. Bioinformatics tools to assess metagenomic data for applied microbiology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 1, p. 69–82, 2019.

ALVARENGA, A. M. **Indicação Geográfica SerroQueijo com sabor mineiro, uai!** Serro. A Lavoura, 2015.

AMPE, F. et al. Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in Mexican pozol, a fermented maize dough, demonstrates the need for cultivation-independent methods to investigate traditional fermentations. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 12, p. 5464–5473, 1999.

ANDRETTA, M. et al. Microbial safety status of Serro artisanal cheese produced in Brazil. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 12, p. 10790–10798, dez. 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2019-16967>>.

APAQS. (Associação dos Produtores Artesanais do Serro) - **Indicação Geográfica**. Serro, MG. Revista A Lavoura, 2015. Disponível em: <<http://indicacaogeografica.com.br/page/4/?author=0>>.

ARAÚJO, J. P. A. et al. Uma análise histórico-crítica sobre o desenvolvimento das normas brasileiras relacionadas a queijos artesanais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 72, n. 5, p. 1845–1860, set. 2020. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-09352020000501845&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352020000501845&tlng=pt)>.

ARCURI, E. F. et al. Determination of cheese origin by using 16S rDNA fingerprinting of bacteria communities by PCR-DGGE: Preliminary application to traditional Minas cheese. **Food Control**, v. 30, n. 1, p. 1–6, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.07.007>>.

AUSTIN, J. W.; PAGOTTO, F. J. MICROBIOLOGY, Detection of Foodborne Pathogens and their Toxins. In: **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition**. Ottawa, Canada: Elsevier, 2003. p. 3886–3892.

BABOT, J. D. et al. Fluorescence in situ hybridization for detection of classical propionibacteria with specific 16S rRNA-targeted probes and its application to enumeration in Gruyère cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 145, n. 1, p. 221–228, 31 jan. 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.12.024>>.

BARRÍA, C. et al. Tracing *Listeria monocytogenes* contamination in artisanal cheese to the processing environments in cheese producers in southern Chile. **Food Microbiology**, v. 90, n. December 2019, p. 103499, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103499>>.

BECTON DICKINSON. Difco™ Lactobacilli MRS Agar COMPF and Difco™ Lactobacilli MRS Broth. **Difco™ & BBL™ Manual, 2nd Edition**, p. 2, 2021. Disponível em: <[https://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/Difco\\_BBL/288110.pdf](https://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/Difco_BBL/288110.pdf)>.

BERESFORD, T. P. et al. Recent advances in cheese microbiology. **International Dairy Journal**, v. 11, n. 4–7, p. 259–274, jul. 2001. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958694601000565>>.

BHARAGAVA, R. N. et al. Applications of Metagenomics in Microbial Bioremediation of Pollutants. In: **Microbial Diversity in the Genomic Era**. Elsevier, 2019. p. 459–477.

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, maio 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030220301910>>.

BLAIOTTA, G. et al. Monitoring lactic acid bacteria strains during ‘Cacioricotta’ cheese production by restriction endonuclease analysis and pulsed-field gel electrophoresis. **Journal of Dairy Research**, v. 68, n. 1, p. 139–144, 20 fev. 2001. Disponível em: <[https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0022029900004672/type/journal\\_article](https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0022029900004672/type/journal_article)>.

BLAYA, J.; BARZIDEH, Z.; LAPOINTE, G. Symposium review: Interaction of starter cultures and nonstarter lactic acid bacteria in the cheese environment. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 4, p. 3611–3629, abr. 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2017-13345>>.

BONETTA, S. et al. Microbiological characterisation of Robiola di Roccaverano cheese using PCR-DGGE. **Food Microbiology**, v. 25, n. 6, p. 786–792, 2008.

BOYLE, R. J.; TANG, M. L. K. The role of probiotics in the management of allergic disease clinical and experimental allergy. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 36, p. 568–576, 2006.

BRANT, L. M. F.; FONSECA, L. M.; SILVA, M. C. C. Microbiological quality of artisanal minas cheese, manufactured in the region of Serro-MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 6, p. 1570–1574, 2007.

BRASIL. **Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950**. Rio de Janeiro. Dispõe sobre a inspeção industrial dos produtos de origem animal e dá outras providências. Diário Oficial dos Estados Unidos do Brasil, 1950. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/leis/l1283.htm#:~:text=LEI N° 1.283%2C DE 18 DE DEZEMBRO DE 1950.&text=Dispõe sôbre a inspeção industrial e sanitária dos produtos de origem animal.](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l1283.htm#:~:text=LEI%20N%201.283%2C%20DE%2018%20DE%20DEZEMBRO%20DE%201950.&text=Disp%20s%20bre%20a%20inspe%20c%20o%20 industrial%20e%20sanit%20ria%20dos%20produtos%20de%20origem%20animal.)>.

BRASIL. **Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952**. Rio de Janeiro. Aprova o Novo

Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal., 1952. Disponível em: <<https://www2.camara.leg.br/legin/fed/decret/1950-1959/decreto-30691-29-marco-1952-339586-normaatualizada-pe.pdf>>.

BRASIL. **Decreto nº 1.255, de 25 de junho de 1962.** Altera o Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952, que aprovou o regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. Brasília. Diário Oficial dos Estados Unidos do Brasil, 1962.

BRASIL. **Portaria nº 146, de 07 de março de 1996.** Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Produtos Lácteos. Brasília. Diário Oficial da União, 1996. Disponível em: <<https://wp.ufpel.edu.br/inspleite/files/2016/03/Portaria-nº-146-de-7-de-março-de-1996.pdf>>.

BRASIL. **Instrução Normativa nº 57, de 15 dezembro de 2011.** Brasília. Dispõe sobre o período de maturação dos queijos artesanais tradicionalmente elaborados a partir de leite cru, 2011. Disponível em: <[https://members.wto.org/crnattachments/2012/sps/BRA/12\\_0031\\_00\\_x.pdf](https://members.wto.org/crnattachments/2012/sps/BRA/12_0031_00_x.pdf)>.

BRASIL. **Instrução Normativa nº 30, de 07 de agosto de 2013.** Brasília, DF, Brasil. Revoga a Instrução Normativa nº 57. Diário Oficial da União, 2013. Disponível em: <[https://www.in.gov.br/materia/-/asset\\_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/30808894/do1-2013-08-08-instrucao-normativa-n-30-de-7-de-agosto-de-2013-30808890](https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/30808894/do1-2013-08-08-instrucao-normativa-n-30-de-7-de-agosto-de-2013-30808890)>.

BRASIL. **Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017.** Brasília, DF. Regulamenta a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. Diário Oficial da União, 2017.

BRASIL. **Lei nº 13.680, de 14 de junho de 2018.** Brasília, DF. Altera a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, para dispor sobre o processo de fiscalização de produtos alimentícios de origem animal produzidos de forma artesanal, 2018.

BRASIL. **Lei nº 13.860, de 18 de julho de 2019.** Brasília, DF, Brasil. Dispõe sobre a elaboração e a comercialização de queijos artesanais e dá outras providências, jul. 2019. Disponível em: <<https://www.in.gov.br/web/dou/-/lei-n-13.860-de-18-de-julho-de-2019-198615138>>.

BRUMANO, É. C. da C. **Impacto do tipo de fermento endógeno na qualidade e tempo de maturação de queijo Minas artesanal produzido em propriedades cadastradas pelo IMA (Instituto Mineiro de Agropecuária) na região do Serro - MG.** 2016. Universidade Federal de Viçosa, 2016.

BRUNO, L. M. Manual de Curadores de Germoplasma – Micro-organismos: Bactérias Ácido-Láticas. **EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia**, 2011.

CAMARGO, A. C. et al. Microbiological quality and safety of Brazilian artisanal cheeses. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 393–409, 4 mar. 2021. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s42770-020-00416-9>>.

CAMPAGNOLLO, F. B. et al. Selection of indigenous lactic acid bacteria presenting anti-listerial activity, and their role in reducing the maturation period and assuring the safety of traditional Brazilian cheeses. **Food Microbiology**, v. 73, p. 288–297, 2018.

CARDINALI, G.; CORTE, L.; ROBERT, V. Next Generation Sequencing: problems and opportunities for next generation studies of microbial communities in food and food industry.

**Current Opinion in Food Science**, v. 17, p. 62–67, out. 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cofs.2017.09.009>>.

CARDOSO, V. M. et al. The influence of ripening period length and season on the microbiological parameters of a traditional Brazilian cheese. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 743–749, set. 2013. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996914008291>>.

CARNEIRO, J. de O. et al. Artisan minas cheese of Serro: proteolysis during ripening. **Heliyon**, v. 6, n. 7, p. e04446, jul. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04446>>.

CARRARO, L. et al. Comparison of culture-dependent and -independent methods for bacterial community monitoring during Montasio cheese manufacturing. **Research in Microbiology**, v. 162, n. 3, p. 231–239, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2011.01.002>>.

CASTRO, R. D. et al. Lactic acid microbiota identification in water, raw milk, endogenous starter culture, and fresh Minas artisanal cheese from the Campo das Vertentes region of Brazil during the dry and rainy seasons. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 8, p. 6086–6096, ago. 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030216303502>>.

CAVICCHIOLI, V. Q. et al. Genetic Diversity and Some Aspects of Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria Isolated from Goat Milk. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 175, n. 6, p. 2806–2822, 2015.

CAVICCHIOLI, V. Q. et al. Novel bacteriocinogenic *Enterococcus hirae* and *Pediococcus pentosaceus* strains with antilisterial activity isolated from Brazilian artisanal cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 4, p. 2526–2535, abr. 2017. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030217301315>>.

CHATTERJEE, S.; RAVAL, I. H. Pathogenic Microbial Genetic Diversity with Reference to Health. In: **Microbial Diversity in the Genomic Era**. Gujarat, India: Elsevier, 2019. p. 559–577.

CLAEYS, W. L. et al. Consumption of raw or heated milk from different species: An evaluation of the nutritional and potential health benefits. **Food Control**, v. 42, p. 188–201, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.01.045>>.

COCOLIN, L. et al. Culture independent methods to assess the diversity and dynamics of microbiota during food fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 167, n. 1, p. 29–43, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.008>>.

COCOLIN, L.; DOLCI, P.; RANTSIOU, K. Biodiversity and dynamics of meat fermentations: The contribution of molecular methods for a better comprehension of a complex ecosystem. **Meat Science**, v. 89, n. 3, p. 296–302, nov. 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.04.011>>.

COCOLIN, L.; ERCOLINI, D. **Molecular Techniques in the Microbial Ecology of Fermented Foods**. 1. ed. New York, NY: Springer New York, 2008. v. 1

COOPERSERRO. **Coopertativa dos Produtores Rurais do Serro**. Disponível em: <<http://cooperserro.com.br/queijo-artesanal/>>. Acesso em: 12 abr. 2021.

COPPOLA, S.; BLAIOTTA, G.; ERCOLINI, D. Dairy Products. In: COCOLIN, L.; ERCOLINI, D. (Ed.). **Molecular Techniques in the Microbial Ecology of Fermented**

**Foods**. New York, NY: Springer New York, 2008. p. 31–90.

COTTER, P. D.; BERESFORD, T. P. Microbiome Changes During Ripening. In: **Cheese**. Fourth ed. Cork, Ireland: Elsevier, 2017. 1p. 389–409.

CRMV-MG, C. R. de M. V. do E. de M. G. Queijo Minas Artesanal. Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia. **FEP MVZ**, 2019.

D'AMICO, D. J. Microbiological Quality and Safety Issues in Cheesemaking. **Microbiology Spectrum**, v. 2, n. 1, p. 251–309, 2014. Disponível em: <<http://www.asmscience.org/content/book/10.1128/9781555818593.chap11>>.

DAL BELLO, B. et al. Microbial ecology of artisanal products from North West of Italy and antimicrobial activity of the autochthonous populations. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n. 7, p. 1151–1159, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2010.03.008>>.

DASH, H. R.; DAS, S. Molecular Methods for Studying Microorganisms From Atypical Environments. In: **Methods in Microbiology**. 1. ed. Elsevier Ltd., 2018. 45p. 89–122.

DE CESARE, A. et al. Application of Automated Ribotyping To Support the Evaluation of *Listeria monocytogenes* Sources in a Taleggio Cheese Producing Plant. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 5, p. 1116–1121, 1 maio 2007. Disponível em: <<https://meridian.allenpress.com/jfp/article/70/5/1116/172446/Application-of-Automated-Ribotyping-To-Support-the>>.

DE FILIPPIS, F.; PARENTE, E.; ERCOLINI, D. Recent Past, Present, and Future of the Food Microbiome. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 9, n. 1, p. 589–608, 25 mar. 2018. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-food-030117-012312>>.

DE JESUS, J. et al. Quick Identification of the Time of Maturation of Artisanal Minas Cheese by FTIR-ATR Spectroscopy and Multivariate Techniques. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 31, n. 10, p. 2000–2011, 2020. Disponível em: <[http://jbcs.sbq.org.br/audiencia\\_pdf.asp?aid2=10943&nomeArquivo=2019-0615AR.pdf](http://jbcs.sbq.org.br/audiencia_pdf.asp?aid2=10943&nomeArquivo=2019-0615AR.pdf)>.

DE JONGHE, V. et al. Toxinogenic and spoilage potential of aerobic spore-formers isolated from raw milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 136, n. 3, p. 318–325, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.11.007>>.

DE LA ROSA-ALCARAZ, M. de los Á. et al. Poro de Tabasco cheese: Chemical composition and microbiological quality during its artisanal manufacturing process. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 4, p. 3025–3037, 2020.

DOLCI, P. et al. Advanced methods for the identification, enumeration, and characterization of microorganisms in fermented foods. In: HOLZAPFER, W. (Ed.). **Advances in Fermented Foods and Beverages**. 1. ed. Turin, Italy: Elsevier, 2015. p. 157–176.

DONNELLY, C. **The Oxford Companion to Cheese**. 1. ed. New York, USA: Oxford University Press, v. 1, 2017.

DONNELLY, C. W. **Cheese and Microbes**. Vermont: American Society of Microbiology, 2014.

EMATER. **Queijo Minas Artesanal. Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Minas Gerais**. Belo Horizonte; Brasil, 2019.

EMATER. **Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Minas Gerais - Informações sobre as regiões produtoras de QMA**, 2020.

EMATER - MG. Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Minas Gerais. In: **Relatório de atividades 2019**. Belo Horizonte: Queijo Minas Artesanal, p. 36–37, 2019.

EMATER, (Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural). **Guia Técnico para Implantação de Boas Práticas de Fabricação em Unidades Produtoras de Queijo Minas Artesanal**. Belo Horizonte, 2009. Disponível em: <[http://www.emater.mg.gov.br/doc/intranet/upload/QUEIJO\\_SITE/cartilha\\_queijo\\_2.pdf](http://www.emater.mg.gov.br/doc/intranet/upload/QUEIJO_SITE/cartilha_queijo_2.pdf)>.

EMBRAPA GADO DE LEITE. **Controle inteligente da qualidade do leite, Anuario Leite**. Juiz de Fora, MG. 2019. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/198698/1/Anuario-LEITE-2019.pdf>>.

EMBRAPA GADO DE LEITE. Produção mundial de leite: tendências nos principais países. **Anuário do Leite**, n. 34 art, p. 104, 2020. Disponível em: <[embrapa.br/gad-de-leite](http://embrapa.br/gad-de-leite)>.

EPAMIG, **Queijo Minas Artesanal - principais problemas de fabricação: manual técnico de orientação ao produtor**. 22. ed. Belo Horizonte: EPAMIG, 2019.

ERCOLINI, D. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. **Journal of Microbiological Methods**, v. 56, n. 3, p. 297–314, mar. 2004. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016770120300321X>>.

ERCOLINI, D. High-throughput sequencing and metagenomics: Moving forward in the culture-independent analysis of food microbial ecology. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 10, p. 3148–3155, 2013.

ERCOLINI, D.; HILL, P. J.; DODD, C. E. R. Development of a fluorescence in situ hybridization method for cheese using a 16S rRNA probe. **Journal of Microbiological Methods**, v. 52, n. 2, p. 267–271, fev. 2003. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167701202001628>>.

ESCOBAR-ZEPEDA, A.; DE LEÓN, A. V. P.; SANCHEZ-FLORES, A. The road to metagenomics: From microbiology to DNA sequencing technologies and bioinformatics. **Frontiers in Genetics**, v. 6, n. DEC, p. 1–15, 2015.

FIGUEIREDO, S. P. et al. Características do leite cru e do queijo Minas artesanal do Serro em diferentes meses. **Archives of Veterinary Science**, v. 20, n. 1, p. 68–81, 2015.

FODA, M. I. et al. Monitoring the differences in the gross composition of white soft cheese using Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy. **World Applied Sciences Journal**, v. 26, n. 3, p. 289–295, 2013.

FOX, P. F. et al. Pathogens in Cheese and Foodborne Illnesses. In: **Fundamentals of Cheese Science**. Boston, MA: Springer US, 2017. p. 681–713.

FRAZILIO, D. A. et al. Finding a common core microbiota in two Brazilian dairies through culture and DNA metabarcoding studies. **Journal of Food Science and Technology**, 8 ago. 2019. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s13197-019-04003-1>>.

FUKA, M. M. et al. Evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) used to describe structure of bacterial communities in Istrian cheese. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 101, p. 16650–16654, 2012.

- FUSCO, V.; QUERO, G. M. Culture-Dependent and Culture-Independent Nucleic-Acid-Based Methods Used in the Microbial Safety Assessment of Milk and Dairy Products. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 4, p. 493–537, jul. 2014. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/1541-4337.12074>>.
- GAGLIO, R. et al. Transformation of raw ewes' milk applying “Grana” type pressed cheese technology: Development of extra-hard “Gran Ovino” cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 307, n. May, p. 108277, out. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108277>>.
- GALIMBERTI, A. et al. Emerging DNA-based technologies to characterize food ecosystems. **FRIN**, v. 69, p. 424–433, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2015.01.017>>.
- GALINARI, É. et al. Microbiological aspects of the biofilm on wooden utensils used to make a Brazilian artisanal cheese. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 713–720, 2014.
- GANTZIAS, C. et al. MALDI-TOF MS profiling of non-starter lactic acid bacteria from artisanal cheeses of the Greek island of Naxos. **International Journal of Food Microbiology**, v. 323, n. January, p. 108586, jun. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108586>>.
- GAROFALO, C. et al. Study of the bacterial diversity of foods: PCR-DGGE versus LH-PCR. **International Journal of Food Microbiology**, v. 242, p. 24–36, fev. 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160516305967>>.
- GEVERS, D.; HUYS, G.; SWINGS, J. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. **FEMS Microbiology Letters**, v. 205, n. 1, p. 31–36, 2001.
- GIBBS, P. A. Pathogenic *Clostridium* species. In: BLACKBURN, C. DE W.; MCCLUE, P. J. (Ed.). **Foodborne Pathogens**. 2. ed. Cambridge, UK: Elsevier, 2009. p. 820–843.
- GOBBETTI, M. et al. Drivers that establish and assembly the lactic acid bacteria biota in cheeses. **Trends in Food Science and Technology**, v. 78, n. June, p. 244–254, 2018.
- GOMES DA CRUZ, A. et al. Probiotic cheese: Health benefits, technological and stability aspects. **Trends in Food Science and Technology**, v. 20, n. 8, p. 344–354, 2009.
- GONZALES-BARRON, U. et al. Foodborne pathogens in raw milk and cheese of sheep and goat origin: a meta-analysis approach. **Current Opinion in Food Science**, v. 18, n. October, p. 7–13, 2017.
- HAIJGHOLIZADEH, M. et al. Molecular detection, phylogenetic analysis, and antibacterial performance of lactic acid bacteria isolated from traditional cheeses, North-West Iran. **Food Science & Nutrition**, v. 8, n. 11, p. 6007–6013, 12 nov. 2020. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/fsn3.1887>>.
- HAYEK, S. A.; IBRAHIM, S. A. Current Limitations and Challenges with Lactic Acid Bacteria: A Review. **Food and Nutrition Sciences**, v. 04, n. 11, p. 73–87, 2013. Disponível em: <[http://file.scirp.org/Html/10-2700895\\_40133.htm](http://file.scirp.org/Html/10-2700895_40133.htm)>.
- HOLZAPFEL, W. H. et al. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, n. 2, p. 365s-373s, 1 fev. 2001. Disponível em: <<https://academic.oup.com/ajcn/article/73/2/365s/4737564>>.

HOPPE-SEYLER, T.-S. et al. Molecular identification and differentiation of *Brevibacterium* species and strains. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 30, n. 1, p. 50–57, jan. 2007. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0723202006000476>>.

IEPHA-MG, **Inventário de Proteção ao Acervo Cultural de Minas Gerais - Bem cultural imaterial - Designação: 1647 Queijo do Serro**. Belo Horizonte, 2011.

IEPHA-MG, **Processo de registro modo de fazer queijo artesanal do Serro**. Belo Horizonte: Minas Gerais, Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico de Minas, 2002.

IEPHA-MG, **Modo de fazer o queijo Artesanal da região do Serro**. Belo Horizonte, MG: Cadernos do patrimônio, 2018.

IPHAN, **Queijo Artesanal de Minas - Patrimônio Cultural do Brasil**. Dossiê int ed. Belo Horizonte: Ministério da Cultura, 2006. v. 1

IPHAN, Modo artesanal de fazer queijo de Minas nas regiões do Serro, da Serra da Canastra e Serra do Salitre/Alto Paranaíba. In: GERAIS, S. DE C. DO E. DE M. (Ed.). **Saberes, Fazeres, Gingas e Celebrações: Ações para a salvaguarda de bens registrados como Patrimônio Cultural do Brasil 2002-2018**. 1. ed. Brasília, DF: IPHAN, 2018. p. 133–137.

IPHAN, **Modo artesanal de fazer queijo de Minas: Serro, Serra da Canastra e Serra do Salitre/Alto Paranaíba. Dossiê 11**. Brasília, DF. IPHAN, 2014.

ISHII, S.; SADOWSKY, M. J. Applications of the rep-PCR DNA fingerprinting technique to study microbial diversity, ecology and evolution: Minireview. **Environmental Microbiology**, v. 11, n. 4, p. 733–740, 2009.

ISO 15214, 1998. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria - Colony-count technique at 30 °C. **International Standard**, v. 1998, p. 1–58, 1998.

J. D'AMICO, D.; DONNELLY, C. W. Growth and Survival of Microbial Pathogens in Cheese. In: **Cheese**. Fourth Edi ed. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 573–594.

JAGADEESAN, B. et al. The use of next generation sequencing for improving food safety: Translation into practice. **Food Microbiology**, v. 79, n. June 2018, p. 96–115, jun. 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002018305306>>.

JANY, J.-L.; BARBIER, G. Culture-independent methods for identifying microbial communities in cheese. **Food Microbiology**, v. 25, n. 7, p. 839–848, out. 2008. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S074000200800107X>>.

KAMIMURA, B. A. et al. Large-scale mapping of microbial diversity in artisanal Brazilian cheeses. **Food Microbiology**, v. 80, n. October 2018, p. 40–49, jun. 2019a. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.12.014>>.

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, 21 set. 2019b. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/1541-4337.12486>>.

KARABEY, B. et al. Determination of the microbial flora in traditional İzmir Tulum cheeses by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. **Journal of Food Science and Technology**, v. 55, n. 3, p. 956–963, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13197-017-3003-z>>.

KARIMI, R.; MORTAZAVIAN, A. M.; KARAMI, M. Incorporation of *Lactobacillus casei*

in Iranian ultrafiltered Feta cheese made by partial replacement of NaCl with KCl. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 8, p. 4209–4222, ago. 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2011-4872>>.

KASHYAP, S. K.; MAHERCHANDANI, S.; KUMAR, N. Ribotyping. In: **Animal Biotechnology**. Elsevier, 2014. p. 327–344.

KLAENHAMMER, T. R. et al. Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 3, p. 393–409, ago. 2005. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1016/j.femsre.2005.04.007>>.

KLIJN, N.; WEERKAMP, A. H.; DE VOS, W. M. Identification of mesophilic lactic acid bacteria by using polymerase chain reaction-amplified variable regions of 16S rRNA and specific DNA probes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 11, p. 3390–3393, maio 1991. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079642512000734>>.

KOCA, N. et al. Application of Fourier Transform Infrared Spectroscopy for Monitoring Short-Chain Free Fatty Acids in Swiss Cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 8, p. 3596–3603, ago. 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2007-0063>>.

KONGO, J. M. et al. Characterization of dominant lactic acid bacteria isolated from São Jorge cheese, using biochemical and ribotyping methods. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 5, p. 1838–1844, nov. 2007. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.2007.03423.x>>.

KOUSTA, M. et al. Prevalence and sources of cheese contamination with pathogens at farm and processing levels. **Food Control**, v. 21, n. 6, p. 805–815, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.11.015>>.

KUANG, Y. et al. Characterization of bacterial population of raw milk from bovine mastitis by culture-independent PCR-DGGE method. **Biochemical Engineering Journal**, v. 45, n. 1, p. 76–81, 2009.

LAWSON, P. A.; TSALTAS, D. Application of Molecular Methods for Microbial Identification in Dairy Products. In: PAPADEMAS, P. (Ed.). **Dairy Microbiology: A Practical Approach**. 1 st ed. Boca Raton: CRC Press, 2014. p. 177–216.

LE NGUYEN, D. D. et al. Determination of fish origin by using 16S rDNA fingerprinting of bacterial communities by PCR-DGGE: An application on Pangasius fish from Viet Nam. **Food Control**, v. 19, n. 5, p. 454–460, 2008.

LEITE, A. I. N. et al. FTIR-ATR spectroscopy as a tool for the rapid detection of adulterations in butter cheeses. **LWT**, v. 109, n. April, p. 63–69, jul. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.04.017>>.

LEITE, M. O. **Isolamento e seleção de culturas lácticas nacionais resistentes a bacteriófagos para elaboração de queijo Minas curado**. 1993. Universidade Federal de Viçosa, 1993.

LEMPK, M. W. **Influência do inóculo “rala” sobre as características físico-químicas, microbiológicas e reológicas do queijo Minas artesanal do Serro - MG**. 2018. Universidade Federal de Minas Gerais, 2018.

LEWIS, W. H. et al. Innovations to culturing the uncultured microbial majority. **Nature Reviews Microbiology**, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41579-020-00458->

8>.

LIMA, L. P. de et al. Evolução do marco legal do leite cru refrigerado no Brasil. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 75, n. 3, p. 190–203, 25 dez. 2020. Disponível em: <<https://www.revistadoilct.com.br/rlct/article/view/810>>.

LONDOÑO-ZAPATA, A. F. et al. Characterization of lactic acid bacterial communities associated with a traditional Colombian cheese: Double cream cheese. **LWT - Food Science and Technology**, v. 82, p. 39–48, 2017.

LUIZ, L. M. P. et al. Isolation and identification of lactic acid bacteria from Brazilian Minas artisanal cheese. **CYTA - Journal of Food**, v. 15, n. 1, p. 125–128, 29 nov. 2016a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/19476337.2016.1219392>>.

LUIZ, L. M. P. et al. Isolation and identification of lactic acid bacteria from Brazilian Minas artisanal cheese. **CyTA - Journal of Food**, v. 15, n. 1, p. 1–4, 29 nov. 2016b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/19476337.2016.1219392>>.

MACHADO, E. C. et al. Características físico-químicas e sensoriais do queijo Minas artesanal produzido na região do Serro, Minas Gerais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 4, p. 516–521, dez. 2004. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0101-20612004000400006&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612004000400006&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt)>.

MAPA, **Instrução Normativa nº 77, de 26 de novembro de 2018**. Estabelece os critérios e procedimentos para a produção, acondicionamento, conservação, transporte, seleção e recepção do leite cru em estabelecimentos registrados no serviço de inspeção oficial, 2018.

MARGALHO, L. P. et al. Brazilian artisanal cheeses are rich and diverse sources of nonstarter lactic acid bacteria regarding technological, biopreservative, and safety properties - Insights through multivariate analysis. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 9, p. 7908–7926, set. 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2020-18194>>.

MARTÍN-PLATERO, A. M. et al. Polyphasic Approach to Bacterial Dynamics during the Ripening of Spanish Farmhouse Cheese, Using Culture-Dependent and -Independent Methods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 18, p. 5662–5673, 15 set. 2008. Disponível em: <<https://aem.asm.org/content/74/18/5662>>.

MARTINS, J. M. et al. Determining the minimum ripening time of artisanal Minas cheese, a traditional Brazilian cheese. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 219–230, maio 2015. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1517-83822015000100219&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822015000100219&lng=en&nrm=iso&tlng=en)>.

MARTINS, M. C. de 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, n. December 2017, p. 295–300, jun. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.03.060>>.

MARTINS, M. C. de F. et al. Novel sequence types of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* obtained from Brazilian dairy production environments. **LWT**, v. 124, n. December 2019, p. 109146, abr. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109146>>.

MASOUD, W. et al. Characterization of bacterial populations in Danish raw milk cheeses made with different starter cultures by denaturing gradient gel electrophoresis and pyrosequencing. **International Dairy Journal**, v. 21, n. 3, p. 142–148, mar. 2011. Disponível

em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2010.10.007>>.

METZ, M.; SHEEHAN, J.; FENG, P. C. H. Use of indicator bacteria for monitoring sanitary quality of raw milk cheeses – A literature review. **Food Microbiology**, v. 85, n. June 2019, p. 103283, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103283>>.

MEUGNIER, H. et al. Identification and ribotyping of *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus equorum* strains isolated from goat milk and cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 31, n. 1–3, p. 325–331, ago. 1996. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0168160596009750>>.

MINAS GERAIS. **Lei nº 14.185 de 31 de janeiro de 2002**. Belo Horizonte. Dispõe sobre o processo de produção de queijo Minas artesanal, 2002a. .

MINAS GERAIS. **Portaria nº 518, de 14 de junho de 2002**. Belo Horizonte. Dispõe sobre requisitos básicos das instalações, materiais e equipamentos para a fabricação do Queijo Minas artesanal, 2002b.

MINAS GERAIS. **Portaria nº 546, de 29 de outubro de 2002**. Belo Horizonte. Identifica a microrregião do Serro, 2002c.

MINAS GERAIS. **Portaria nº 1.305 de 30 de abril de 2013**. Belo Horizonte. Estabelece diretrizes para a produção do queijo Minas artesanal, 2013. Disponível em: <<http://ima.mg.gov.br/files/1575/Ano-2013/15649/Portaria-nº-1305,-de-30-de-abril-de-2013.pdf>>.

MINAS GERAIS. **Lei nº 23.157, de 18 de dezembro de 2018**. Belo Horizonte. Dispõe sobre a produção e a comercialização dos queijos artesanais de Minas Gerais., 2018. Disponível em: <<https://www.almg.gov.br/consulte/legislacao/completa/completa.html?tipo=LEI&num=23157&comp=&ano=2018>>.

MINAS GERAIS. **Portaria IMA nº 1.937, de 14 de agosto de 2019**. Belo Horizonte. Dispõe sobre a habilitação sanitária dos queijos artesanais e da concessão do selo Arte às queijarias com habilitação sanitária no IMA, 2019. Disponível em: <<http://ima.mg.gov.br/files/1338/Ano-2019/15620/Portaria-nº-1937,-de-14-de-agosto-de-2019.pdf>>.

MINAS GERAIS. **Portaria IMA nº 1.969, de 26 de março e 2020**. Belo Horizonte. Dispõe sobre a produção de Queijo Minas Artesanal em queijarias e entrepostos localizados dentro de microrregiões definidas e para as demais regiões do Estado, caracterizadas ou não como produtora de Queijo Minas Artesanal – QMA., 2020. Disponível em: <<http://ima.mg.gov.br/files/1706/Ano-2020/17923/Portaria-nº-1969,-de-26-de-marco-de-2020..pdf>>.

MINAS GERAIS. **Portaria do IMA nº 2.033, de 23 de janeiro de 2021**. Belo Horizonte. Dispõe sobre parâmetros e padrões físico-químicos e microbiológicos de alimentos de origem animal e água de abastecimento, 2021. Disponível em: <<http://ima.mg.gov.br/files/1739/Ano-2021/18428/Portaria-nº-2033,-de-23-de-janeiro-de-2021.pdf>>.

MITTAL, B.; CHATURVEDI, P.; TULSYAN, S. Restriction Fragment Length Polymorphism. In: **Brenner's Encyclopedia of Genetics**. Uttar Pradesh, India: Elsevier, 2013. 6p. 190–193.

MOHAMED, M. A. et al. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy. In: **Membrane Characterization**. Johor, Malaysia: Elsevier, 2017. p. 3–29.

MONTEIRO, R. P.; DA MATTA, V. M. **Queijo Minas Artesanal Valorizando a Agroindústria Familiar**. Brasília, DF., EMBRAPA Agroindústria de Alimentos, 2018.

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. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.019>>.

MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 73, n. 1, p. 127–141, 1998.

MUYZER, G.; WAAL, E. C. D. E.; UITIERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and environmental microbiology**, v. 59, n. 3, p. 695–700, 1993. Disponível em: <<papers2://publication/uuid/01BB9958-3AA3-4757-883C-24AA3D92B4B7>>.

MYERS, R. M. et al. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. **Nucleic Acid Research**, v. 13, n. 9, p. 3131–3145, 1985.

NAGPAL, R. et al. Potential of probiotics and prebiotics for synbiotic functional dairy foods: an overview. **International Journal of Probiotics and Prebiotics**, v. 2, n. 2/3, p. 75, 2007.

NAZIR, R. et al. Exploring bacterial diversity: From cell to sequence. In: **Freshwater Microbiology: Perspectives of Bacterial Dynamics in Lake Ecosystems**. Srinagar, India: Elsevier, 2019. p. 263–306.

NDOYE, B. et al. Exploring suppression subtractive hybridization (SSH) for discriminating *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* SK11 and ATCC 19257 in mixed culture based on the expression of strain-specific genes. **Journal of Applied Microbiology**, v. 110, p. 499–512, 2010.

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, 24 set. 2011. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s13594-011-0031-8>>.

NERO, L. A. et al. Lactic microbiota of the minas artisanal cheese produced in the serro region, Minas Gerais, Brazil. **LWT**, v. 148, n. February, p. 111698, ago. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111698>>.

NETTO, M. M. **A geografia do queijo Minas artesanal**. 2011. Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Rio Claro, 2011.

O’SULLIVAN, O.; COTTER, P. D. Microbiota of Raw Milk and Raw Milk Cheeses. In: **Cheese**. Fourth Edition. Cork, Ireland: Elsevier, 2017. 1p. 301–316.

OLIVEIRA, A. C. C. de et al. **Museu Regional Casa dos Ottoni**. Brasília: IBRAM (Instituto Brasileiro de Museus), 2018a.

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

ORTOLANI, M. B. T. et al. Microbiological Quality and Safety of Raw Milk and Soft Cheese

- and Detection of Autochthonous Lactic Acid Bacteria with Antagonistic Activity Against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., and *Staphylococcus aureus*. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 7, n. 2, p. 175–180, fev. 2010. Disponível em: <<http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/fpd.2009.0390>>.
- OULAHAL, N. et al. Examination of wooden shelves used in the ripening of a raw milk smear cheese by FTIR spectroscopy. **Food Control**, v. 20, n. 7, p. 658–663, jul. 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.10.012>>.
- PANIGRAHI, S.; VELRAJ, P.; SUBBA RAO, T. Functional Microbial Diversity in Contaminated Environment and Application in Bioremediation. In: **Microbial Diversity in the Genomic Era**. Elsevier, 2019. p. 359–385.
- PANTHI, R. R. et al. Selection and Treatment of Milk for Cheesemaking. In: **Cheese**. Fourth Ed. ed. Cork, Ireland: Elsevier, 2017. 1p. 23–50.
- PAVLOVIC, S. et al. Next-Generation Sequencing: The Enabler and the Way Ahead. In: **Microbiomics**. Elsevier, 2020. p. 175–200.
- PAXSON, H. Locating Value in Artisan Cheese: Reverse Engineering Terroir for New-World Landscapes. **American Anthropologist**, v. 112, n. 3, p. 444–457, 23 ago. 2010. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1548-1433.2010.01251.x>>.
- PELÁEZ, C.; REQUENA, T. Exploiting the potential of bacteria in the cheese ecosystem. **International Dairy Journal**, v. 15, n. 6–9, p. 831–844, 2005.
- PELLEY, J. W. Recombinant DNA and Biotechnology. In: **Elsevier's Integrated Review Biochemistry**. Elsevier, 2012. p. 161–169.
- PEREIRA, D. **Queijo do Serro ganha museu e espaço multicultural**. Serro, Sertãoobras, 2019. Disponível em: <<https://www.sertaobras.org.br/2019/10/22/queijo-do-serro-ganha-museu-e-espaco-multicultural/>>. Acesso em: 12 abr. 2021.
- PEREIRA, L. G. de C. Queijos artesanais brasileiros: aspectos culturais e legislativos. **Cadernos Aslegis**, v. 46, n. Maio/Agosto, p. 125–134, 2012.
- PERIN, L. M. et al. Lantibiotics biosynthesis genes and bacteriocinogenic activity of *Lactobacillus* spp. isolated from raw milk and cheese. **Folia Microbiologica**, v. 57, n. 3, p. 183–190, 24 maio 2012. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12223-012-0113-x>>.
- PERIN, L. M. et al. Microbiota of Minas cheese as influenced by the nisin producer *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* GLc05. **International Journal of Food Microbiology**, v. 214, p. 159–167, dez. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.08.006>>.
- PERIN, L. M. et al. Bacterial ecology of artisanal Minas cheeses assessed by culture-dependent and -independent methods. **Food Microbiology**, v. 65, p. 160–169, ago. 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2017.02.005>>.
- PERIN, L. M. et al. The Microbiology of Raw Milk. In: **Raw Milk**. Elsevier, 2019. 53p. 45–64.
- PEROBELLI, F. S.; ARAÚJO JUNIOR, I. F. de; CASTRO, L. S. de. As dimensões espaciais da cadeia produtiva do leite em Minas Gerais. **Nova Economia**, v. 28, n. 1, p. 297–337, abr. 2018. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-)

63512018000100297&lng=pt&tlng=pt>.

PINEDA, A. P. A. et al. Overview on Diversity and Microbiological Safety of Brazilian Artisanal Cheeses. **Preprints**, v. 1, n. September, p. 1–24, 2020.

PINEDA, A. P. A. et al. Brazilian Artisanal Cheeses: Diversity, Microbiological Safety, and Challenges for the Sector. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, n. April, 20 abr. 2021. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2021.666922/full>>.

PINTO, M. S. **Diagnóstico socioeconômico, cultural e avaliação dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos do queijo Minas artesanal do Serro**. 2004. Universidade Federal de Viçosa, 2004.

PLÉ, C. et al. Combining selected immunomodulatory *Propionibacterium freudenreichii* and *Lactobacillus delbrueckii* strains: Reverse engineering development of an anti-inflammatory cheese. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 60, n. 4, p. 935–948, abr. 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/mnfr.201500580>>.

POGAČIĆ, T. et al. Diversity and dynamic of lactic acid bacteria strains during aging of along ripened hard cheese produced from raw milk and undefined natural starter. **Food Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 207–215, 2013.

POT, B. et al. The potential impact of the Lactobacillus name change: The results of an expert meeting organised by the Lactic Acid Bacteria Industrial Platform (LABIP). **Trends in Food Science & Technology**, v. 94, n. June, p. 105–113, dez. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.07.006>>.

PRADO JUNIOR, J. F. **Nos trilhos do “tremruá” o queijo Minas Artesanal como patrimônio vivencial na região do Serro-MG**. 2018. Universidade Estadual de Campinas, 2018.

QUIGLEY, L. et al. Molecular approaches to analysing the microbial composition of raw milk and raw milk cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 150, n. 2–3, p. 81–94, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.001>>.

RAFIE, S. et al. Botulism outbreak in a family after ingestion of locally produced cheese. **Iranian Journal of Medical Sciences**, v. 42, n. 2, p. 201–204, 2017.

RAMPADARATH, S.; PUCHOOA, D.; BAL, S. Repetitive element palindromic PCR (rep-PCR) as a genetic tool to study interspecific diversity in Euphorbiaceae family. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 18, n. 6, p. 412–417, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejbt.2015.09.003>>.

RANDAZZO, C. et al. LAB species and strain identification. In: POLTRONIERI, P. (Ed.). **Microbiology in Dairy Processing**. First Edit ed. Chichester, UK: John Wiley & Sons Ltd and the Institute of Food Technologists, 2017a. p. 139–159.

RANDAZZO, C. et al. LAB species and strain identification. In: **Microbiology in Dairy Processing**. Chichester, UK: John Wiley & Sons Ltd and the Institute of Food Technologists, 2017b. p. 139–159.

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

RATHNAYAKA, R. M. U. S. K.; DEVAPPA, R. K.; RAKSHIT, S. K. Rapid Detection of

Food Pathogens Using Molecular Methods. In: **Molecular Techniques in Food Biology**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2018. p. 341–359.

RAZA, N.; KIM, K.-H. Quantification techniques for important environmental contaminants in milk and dairy products. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 98, p. 79–94, jan. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.11.002>>.

REBRIKOV, D. V. et al. Suppression Subtractive Hybridization. In: **Gene Expression Profiling**. New Jersey: Humana Press, 2004. 258p. 107–134.

RESENDE, M. F. S. et al. Queijo de minas artesanal da Serra da Canastra: influência da altitude das queijarias nas populações de bactérias acidoláticas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 6, p. 1567–1573, dez. 2011. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-09352011000600039&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352011000600039&lng=pt&tlng=pt)>.

RIBANI, A. et al. Application of next generation semiconductor based sequencing for species identification in dairy products. **Food Chemistry**, v. 246, n. October 2017, p. 90–98, abr. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.006>>.

RIBEIRO JÚNIOR, J. C. et al. The main spoilage-related psychrotrophic bacteria in refrigerated raw milk. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 1, p. 75–83, jan. 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2017-13069>>.

RIETHMULLER, J. **La résistance des entérobactéries aux carbapénèmes**. 2013. Université de Strasbourg, 2013.

ROLIM, F. R. L. et al. Cheeses as food matrixes for probiotics: In vitro and in vivo tests. **Trends in Food Science & Technology**, v. 100, n. September 2019, p. 138–154, jun. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.04.008>>.

ROUZEAU-SZYNALSKI, K. et al. Why be serious about emetic *Bacillus cereus*: Cereulide production and industrial challenges. **Food Microbiology**, v. 85, n. February 2019, p. 103279, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103279>>.

ROZENTAL, T. et al. First molecular detection of *Coxiella burnetii* in Brazilian artisanal cheese: a neglected food safety hazard in ready-to-eat raw-milk product. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 24, n. 3, p. 208–212, 2020.

RUGGIRELLO, M. et al. Study of *Lactococcus lactis* during advanced ripening stages of model cheeses characterized by GC-MS. **Food Microbiology**, v. 74, p. 132–142, set. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.03.012>>.

RUGGIRELLO, M.; COCOLIN, L.; DOLCI, P. Fate of *Lactococcus lactis* starter cultures during late ripening in cheese models. **Food Microbiology**, v. 59, p. 112–118, out. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2016.05.001>>.

RYSSEL, M. et al. Microbial diversity and dynamics throughout manufacturing and ripening of surface ripened semi-hard Danish Danbo cheeses investigated by culture-independent techniques. **International Journal of Food Microbiology**, v. 215, p. 124–130, dez. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.09.012>>.

SÄDE, E.; BJÖRKROTH, J. IDENTIFICATION METHODS | DNA Fingerprinting. In: **Encyclopedia of Food Microbiology**. Elsevier, 2014. 2p. 274–281.

SAMELIS, J. et al. FTIR-based polyphasic identification of lactic acid bacteria isolated from

traditional Greek Graviera cheese. **Food Microbiology**, v. 28, n. 1, p. 76–83, fev. 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2010.08.009>>.

SANT ANNA, F. M. de; ACURCIO, L. B. Fingerprinting of Lab Isolated From Silage, Water, Raw Milk, Starter Culture and Minas Artisanal Cheese from the Campo Das Vertentes Region, Brazil. **Journal of Dairy & Veterinary Sciences**, v. 5, n. 4, p. 1–4, 6 abr. 2018. Disponível em: <<https://juniperpublishers.com/jdvs/JDVS.MS.ID.555670.php>>.

SCHWARTZ, D. C.; CANTOR, C. R. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. **Cell**, v. 37, n. 1, p. 67–75, maio 1984. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0092867484903015>>.

SETTANNI, L.; MOSCHETTI, G. Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. **Food Microbiology**, v. 27, n. 6, p. 691–697, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2010.05.023>>.

SHAH, N. P. Functional cultures and health benefits. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 11, p. 1262–1277, 2007.

SHEIKHA, A. F. El; LEVIN, R.; XU, J. **Molecular Techniques in Food Biology**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2018.

SIDOOSKI, T. et al. Physical and nutritional conditions for optimized production of bacteriocins by lactic acid bacteria – A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 0, n. 0, p. 1–11, 2018. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408398.2018.1474852>>.

SILVA, M. R. et al. Ocorrência de *Brucella* em queijo Minas artesanal da microrregião do Serro: um importante problema de saúde pública. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 28, n. Supl 5, p. 79–84, 2018.

SILVETTI, T.; MORANDI, S.; BRASCA, M. Lactic acid bacteria: A cell factory for delivering functional biomolecules in dairy products. **Microbiological Opportunities and Challenges in the Dairy Industry**, p. 251–278, 2017.

SOFU, A.; EKINCI, F. Y. Bacterial diversity dynamics of traditional Turkish Ezine Cheese as evaluated by PCR-DGGE and SSCP analysis. **International Journal of Dairy Technology**, v. 69, n. 4, p. 592–600, 2016.

SPANU, C. et al. Occurrence and behavior of *Bacillus cereus* in naturally contaminated ricotta salata cheese during refrigerated storage. **Food Microbiology**, v. 58, p. 135–138, set. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2016.05.002>>.

SRIVASTAVA, N. et al. **Analyzing Functional Microbial Diversity**. Elsevier Inc., 2019.

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. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2012.12.001>>.

STRATHDEE, F.; FREE, A. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). In: **DNA Electrophoresis (Methods and Protocols)**. Totowa, NJ: Humana Press, 2013. 1054p. 145–157.

SZAJEWSKA, H.; MRUKOWICZ, J. Z. Probiotics in the treatment and prevention of acute infectious diarrhea in infants and children: A systematic review of published randomized,

double-blind, placebo-controlled trials. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 33, n. 4 SUPPL., 2001.

TILOCCA, B. et al. Milk microbiota: Characterization methods and role in cheese production. **Journal of Proteomics**, v. 210, n. October 2019, p. 103534, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.103534>>.

TRMČIĆ, A. et al. Coliform detection in cheese is associated with specific cheese characteristics, but no association was found with pathogen detection. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 8, p. 6105–6120, ago. 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002203021630340X>>.

VALE, R. C. do. **Influência do tipo de fermento nas características de queijo Minas artesanal do Serro - MG maturado em condições controladas**. 2018. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais, 2018.

VALE, R. C. do; RODRIGUES, M. P. J.; MARTINS, J. M. Influence of the type of ferment in the physicochemical characteristics of cheese Minas artesanal do Serro – Minas Gerais, matured in controlled conditions. **Revista Instituto Laticínios Cândido Tostes**, v. 73, n. 2, p. 82–90, 2018.

VAN ASSELT, E. D. et al. Overview of Food Safety Hazards in the European Dairy Supply Chain. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 16, n. 1, p. 59–75, jan. 2017. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/1541-4337.12245>>.

VAN HOORDE, K. et al. Diversity of lactic acid bacteria in two Flemish artisan raw milk Gouda-type cheeses. **Food Microbiology**, v. 25, n. 7, p. 929–935, 2008.

VASAVADA, P. C. Pathogenic Bacteria in Milk - A review. **Journal of Dairy Science**, v. 71, n. 10, p. 2809–2816, 16 dez. 1988. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(88\)79876-8](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(88)79876-8)>.

VERMOTE, L. et al. Amplicon and shotgun metagenomic sequencing indicates that microbial ecosystems present in cheese brines reflect environmental inoculation during the cheese production process. **International Dairy Journal**, v. 87, p. 44–53, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.07.010>>.

VERSALOVIC, J.; DE BRUIJN, F. J.; LUPSKI, J. R. Repetitive Sequence-based PCR (rep-PCR) DNA Fingerprinting of Bacterial Genomes. In: DE BRUIJN, F. J.; LUPSKI, J. R.; WEINSTOCK, G. M. (Ed.). **Bacterial Genomes**. James Vers ed. Boston, MA: Springer US, 1998. p. 437–454.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to finerprinting of bacterial enomes. **Nucleic Acids Research**, v. 19, n. 24, p. 6823–6831, 1991. Disponível em: <<https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/19.24.6823>>.

VINCENT, A. T. et al. Next-generation sequencing (NGS) in the microbiological world: How to make the most of your money. **Journal of Microbiological Methods**, v. 138, p. 60–71, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2016.02.016>>.

WIEDMANN, M.; CARROLL, L. M. Next-generation sequencing. In: **Encyclopedia of Food Chemistry**. Ithaca, NY: Elsevier, 2018. 1p. 376–383.

XIAO, J.; ZHANG, Y.; YANG, Z. Lactic Acid Bacteria in Health and Disease. In: **Lactic Acid Bacteria**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2014. p. 303–374.

YELURI JONNALA, B. R. et al. Sequencing of the Cheese Microbiome and Its Relevance to Industry. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. MAY, 23 maio 2018. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.01020/full>>.

YOON, Y.; LEE, S.; CHOI, K. H. Microbial benefits and risks of raw milk cheese. **Food Control**, v. 63, p. 201–215, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.11.013>>.

ZHANG, L. et al. Manufacture of Cheddar cheese using probiotic *Lactobacillus plantarum* K25 and its cholesterol-lowering effects in a mice model. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 1, p. 127–135, 6 jan. 2013. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11274-012-1165-4>>.

ZHENG, J. et al. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 4, p. 2782–2858, 1 abr. 2020. Disponível em: <<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijsem.0.004107>>.