

DALILA LUZIA DE OLIVEIRA SOARES

**PROPRIEDADES BIOTECNOLÓGICAS DE *Geotrichum candidum* ISOLADO DE
QUEIJO MINAS ARTESANAL DA CANASTRA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: José Guilherme Prado Martin

Coorientadora: Solimar Gonçalves Machado

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2023**

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

T

S676p
2022

Soares, Dalila Luzia de Oliveira, 1997-

Propriedades biotecnológicas de *Geotrichum candidum*
isolado de queijo Minas artesanal da Canastra / Dalila Luzia de
Oliveira Soares. – Viçosa, MG, 2022.

1 dissertação eletrônica (49 f.): il. (algumas color.).

Orientador: José Guilherme Prado Martin.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Microbiologia, 2022.

Referências bibliográficas: f. 45-49.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.092>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Queijo - Microbiologia. 2. Queijo-de-minas. 3. Fungos.
4. Proteólise. 5. Lipólise. 6. Antagonistas fúngicos. I. Martin,
José Guilherme Prado, 1983-. II. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Microbiologia. Programa de
Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola. III. Título.

CDD 22. ed. 637.353

DALILA LUZIA DE OLIVEIRA SOARES

PROPRIEDADES BIOTECNOLÓGICAS DE *Geotrichum candidum* ISOLADO DE QUEIJO MINAS ARTESANAL DA CANASTRA

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 13 de dezembro de 2022.

Assentimento:


Dalila Luzia de Oliveira Soares
Autora


José Guilherme Prado Martin
Orientador

*Aos meus pais, Jorge e Valdirene, por
todo o apoio e suporte durante toda a
minha caminhada!*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus, pois sem Ele nada disso hoje seria possível. Nos diversos momentos de dificuldade, pude encontrar apoio e conforto na palavra do Senhor.

Aos meus pais, Jorge e Valdirene, que nunca mediram esforços para que eu pudesse estudar e, graças a eles, eu estou hoje finalizando o mestrado. A eles eu devo toda a minha gratidão e maior amor do mundo.

Ao meu orientador, Prof. José Guilherme Prado Martin, por sempre ter sido presente mesmo durante o seu período de pós-doutoramento fora do Brasil. Agradeço pela paciência, toda a atenção, compreensão e ensinamentos transmitidos.

A professora Solimar Gonçalves Machado, minha coorientadora, que me ajudou e deu grande suporte em diversos momentos, além do fornecimento de materiais para a realização dos experimentos deste trabalho.

Ao Prof. José Humberto de Queiroz, do Departamento de Bioquímica/UFV, pelo auxílio durante o planejamento dos experimentos e disponibilidade.

Ao Alex Gazolla de Castro, técnico do Departamento de Microbiologia/UFV, por todo o suporte durante este período, além da amizade.

Às equipes dos laboratórios LAMAP e BIOTAN que sempre estiveram disponíveis e abriram suas portas para me auxiliar.

Aos amigos FERMICRO, por toda ajuda prestada, principalmente na reta final. Vocês fizeram a rotina mais leve. Em especial, Thamylles, Bianca, Bárbara, André, Walmar e Thaíla, que sempre estiveram comigo e me ajudaram muito. Agradeço a vocês pela amizade.

Ao meu namorado, Yan, por ter trilhado grande parte dessa jornada comigo, me dando suporte, carinho e sempre me apoiando em todas as fases e decisões.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo financiamento do projeto (Processo APQ-04407-17).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, na modalidade bolsa de estudo.

RESUMO

SOARES, Dalila Luzia de Oliveira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2022. **Propriedades biotecnológicas de *Geotrichum candidum* isolado de queijo Minas artesanal da Canastra**. Orientador: José Guilherme Prado Martin. Coorientadora: Solimar Gonçalves Machado.

Os queijos estão entre os derivados lácteos mais consumidos no mundo. No Brasil, uma grande diversidade de queijos é produzida, tanto no âmbito industrial quanto artesanal. Estes incluem produtos maturados por fungos, a exemplo dos mundialmente conhecidos queijos tipo Camembert, Roquefort e Brie, bem como, mais recentemente, queijos artesanais, como os produzidos na Serra da Canastra. Fungos desempenham papel fundamental na formação de características sensoriais particulares em queijos, como textura, sabores e aromas. Neste trabalho, foi avaliado o potencial biotecnológico de *Geotrichum candidum* FERM-GC-31, isolado de queijo artesanal da Serra da Canastra, visando à sua aplicação industrial como cultura secundária em produtos lácteos. O isolado foi aplicado em modelo de mini-queijo em placas de 24 poços e em placas de Petri de 60 x 15 mm para estudo das atividades proteolítica e lipolítica durante maturação a 12°C durante 20 dias. Além disso, o isolado foi avaliado quanto ao antagonismo de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 19435 e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* ATCC 19257, bactérias lácticas comumente utilizadas como fermentos lácteos. Para proteases, o ensaio enzimático padronizado em 30 minutos de reação e 45°C resultou em atividade máxima nos valores de pH 5,5 e 9,0, indicando a produção de proteases neutras e alcalinas. Já para lipases, as maiores atividades foram observadas a 35°C e pH 9,0 após 20 minutos de reação. De forma geral, *G. candidum* apresentou atividades proteolítica total máxima de cerca de 19.000 U/mL e lipolítica de 6.076,11 U/mL, ambas no 15º dia após o aparecimento do micélio fúngico. Em relação ao antagonismo, *L. lactis* subsp. *cremoris* apresentou maior atividade de inibição contra *G. candidum* (28, 48%) em comparação à *L. lactis* subsp. *lactis* (7,34%). Os resultados deste trabalho demonstram que *G. candidum* FERM-GC-31 tem potencial para ser utilizado como cultura secundária devido às suas significativas atividades lipolíticas e proteolíticas, bem como pelo baixo índice de antagonismo de fermentos lácteos convencionais.

Palavras-chave: Maturação. Fungos. Proteólise. Lipólise. Antagonismo.

ABSTRACT

SOARES, Dalila Luzia de Oliveira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December, 2022. **Biotechnological properties of *Geotrichum candidum* isolated from Minas artisanal cheese from Canastra**. Adviser: José Guilherme Prado Martin. Co-adviser: Solimar Gonçalves Machado.

Cheeses stand out as the most consumed dairy products in the world. In Brazil, a great diversity of cheeses is produced both in industrial and artisanal models. They include mould-ripened cheeses, such as the classical Camembert, Roquefort and Brie as well as, more recently, mould-ripened artisanal cheeses, for example Canastra cheeses. Fungi play an important role in the production of particular sensorial characteristics in cheeses, such as texture, flavors and aromas. In this work, the biotechnological potential of *Geotrichum candidum* FERM-GC-31 isolated from Canastra artisanal cheese was evaluated, aiming at its industrial application as a secondary culture in dairy products. The isolate was inoculated in a mini-cheese model in 24-well plates and in 60 x 15 mm Petri dishes to evaluate the proteolytic and lipolytic activities during ripening at 12°C for 20 days. In addition, the isolate was evaluated for antagonism of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 19435 and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* ATCC 19257, lactic acid bacteria commonly used as starter cultures. For proteases, the standardized enzymatic assay at 30 minutes of reaction and 45°C resulted in maximum activity at pH values 5.5 and 9.0, indicating the production of neutral and alkaline proteases. For lipases, the highest activities were observed at 35°C and pH 9.0 after 20 minutes of reaction. In general, *G. candidum* showed maximum total proteolytic activity around 19,000 U/mL and lipolytic activity of 6,076.11 U/mL, both on the 15th day after the appearance of the fungal mycelium. Regarding antagonism, *L. lactis* subsp. *cremoris* showed greater inhibition activity against *G. candidum* (28, 48%) compared to *L. lactis* subsp. *lactis* (7.34%). The results of this work demonstrate that *G. candidum* FERM-GC-31 can be used as a secondary culture due to its significant lipolytic and proteolytic activities, as well as the low antagonism rate of conventional starter cultures.

Keywords: Ripening. Fungi. Proteolysis. Lipolysis. Antagonism.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1. Queijos artesanais.....	12
2.2. Fungos em queijos maturados	13
2.3. Atividade enzimática durante a maturação de queijos	16
2.3.1. Proteólise	17
2.3.2. Lipólise	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1. Manutenção e cultivo do isolado	23
3.2. Produção do modelo de queijo	23
3.3. Padronização das condições dos ensaios enzimáticos	23
3.3.1. Curva de tempo de reação	23
3.3.1.1. Obtenção da matéria prima	24
3.3.1.2 Preparo do extrato bruto	24
3.3.1.3. Ensaio de atividade proteolítica	24
3.3.1.4. Ensaio de atividade lipolítica	24
3.3.2. Temperatura de maior atividade	25
3.3.3. pH de maior atividade	25
3.4. Curva de cultivo de <i>G. candidum</i> FERM-GC-31	25
3.5. Atividade antagonista	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1. Padronização das condições dos ensaios enzimáticos	28
4.1.1. Parâmetros dos ensaios enzimáticos de protease	30
4.1.2. Parâmetros dos ensaios enzimáticos de lipase	31
4.2. Curvas de cultivo	33
4.3. Teste de antagonismo	40
5. CONCLUSÕES	44
6. REFERÊNCIAS	45

1. INTRODUÇÃO

Queijos estão entre os derivados lácteos mais consumidos no mundo. A diversidade de queijos existente está, em parte, relacionada à ação da microbiota na matriz do alimento. Tal microbiota exerce impacto significativo nas características sensoriais relacionadas à aceitabilidade desses produtos pelos consumidores. Nesse contexto, destacam-se as bactérias do ácido lático (BAL), responsáveis pela fermentação do leite e consequente produção de ácido lático, bem como outros metabólitos; este grupo compreende os microrganismos majoritários do leite cru (MCSWENEY, 2004). Uma vez que no Brasil queijos artesanais são produzidos a partir dessa matéria-prima, essa diversidade é, então, carregada para o queijo (SANT'ANNA et al., 2019), diferentemente dos queijos industrializados, nos quais o uso de leite pasteurizado exige o uso de culturas iniciadoras (fermentos) padronizadas, que variam a depender do tipo de queijo produzido.

Além de BAL, fungos podem exercer um papel de protagonismo nas características do queijo, especialmente durante o processo de maturação. Sendo assim, culturas secundárias ou fungos autóctones do ambiente de produção podem colonizar a matriz láctea, contribuindo para atributos desejáveis no produto. Durante a maturação, os fungos podem crescer na superfície do queijo, como nos franceses Camembert e Brie, ou em cavidades mecanicamente formadas no interior da massa, a exemplo do observado para os chamados queijos azuis, como Gorgonzola e Roquefort (BOARI et al., 2022). Dentre os principais fungos utilizados industrialmente para a maturação de queijos, destacam-se *Penicillium roqueforti*, *Penicillium camemberti* e *Geotrichum candidum* (XIA et al., 2020).

Nos queijos maturados por fungos, esses microrganismos são responsáveis pela produção de enzimas proteolíticas e lipolíticas que atuam sobre proteínas (principalmente a caseína do leite) e lipídeos, respectivamente, constituintes da matriz do queijo. Tais processos contribuem para as características de sabor, aroma e textura típicos (WU et al., 2019). Considerando que a proteólise e a lipólise são os principais eventos relacionados à maturação de queijos com fungos, pode-se mensurar suas respectivas intensidades visando ao acompanhamento do processo de maturação. No caso da proteólise, a reação tem início na coagulação, por ação residual do coagulante e de enzimas do leite, como a plasmina, que proteolisa a caseína – fenômeno denominado de proteólise primária. Já a proteólise secundária

decorre da ação de enzimas intracelulares e extracelulares das culturas iniciadoras e de culturas secundárias, resultando na liberação de peptídeos menores e aminoácidos livres (KARACA; GÜVEN, 2018). Os produtos da proteólise incluem peptídeos de diferentes tamanhos e aminoácidos livres, os quais são transportados para o interior da célula e utilizados em reações intracitoplasmáticas, resultando em diversos compostos de aroma e sabor, como amônia e compostos voláteis de enxofre derivados da metionina. Da mesma forma, os ácidos graxos, produtos da lipólise extracelular são catabolizados, gerando álcoois secundários, lactonas, ésteres etc. (LESSARD et al., 2014).

Com a finalidade de compreender este complexo processo de maturação, diferentes técnicas podem ser utilizadas para a quantificação da ação enzimática na matriz dos queijos. O presente trabalho teve por objetivo simular essa matriz através de um modelo de mini-queijos e avaliar as características biotecnológicas de *G. candidum* FERM-GC-31 isolado de queijo artesanal da Canastra, como a atividade proteolítica e lipolítica. Além disso, considerando que, em produtos lácteos, as culturas secundárias estão normalmente associadas com culturas de BAL, e que as mesmas são conhecidas pela produção de compostos antifúngicos, buscou-se verificar possíveis relações de antagonismo de duas espécies de BAL, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* contra *G. candidum* FERM-GC-31.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Queijos artesanais

Os queijos estão entre os derivados lácteos mais consumidos mundialmente; em 2019, o mercado mundial de queijos aumentou 2,3%, valor equivalente a 114,1 bilhões de dólares. Além disso, estima-se que até 2030 o volume global de produção alcance a marca de 31 milhões de toneladas (ABIQ, 2021). No Brasil há uma expressiva produção dos mais variados tipos de queijos, como os queijos cuja produção foi importada de outros países e aqui adaptada, a exemplo dos queijos tipo Camembert, Gorgonzola e Roquefort, ou, em âmbito artesanal, queijos que têm sido reconhecidos como verdadeiros patrimônios nacionais, a exemplo do Queijo Minas Artesanal (QMA) da Canastra.

Em todas as regiões brasileiras são produzidos queijos artesanais. Na Região Sul, por exemplo, destacam-se o Colonial e Serrano; na Região Nordeste, os queijos Manteiga e Coalho; na Região Norte, o queijo do Marajó; na Região Centro-Oeste, o queijo Caipira e, por fim, na região Sudeste tem-se a produção de QMA em diferentes regiões (KAMIMURA et al., 2019).

No âmbito nacional, o estado de Minas Gerais se destaca, com a maior produção de queijos artesanais. De acordo com o Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), existem, atualmente, 10 regiões reconhecidas como produtoras de QMA, sendo elas: Serra da Canastra, Araxá, Serro, Campo das Vertentes, Cerrado, Serra do Salitre, Triângulo Mineiro, Serra da Ibitipoca, Diamantina e Entre Serras da Piedade e Caraça, sendo a última definida pela portaria do IMA Nº 2141, de 19 de abril de 2022. Para que uma região seja reconhecida como produtora de QMA, é necessário que atenda ao processo de produção tradicional, a partir de leite cru, coalho, o soro-fermento (conhecido como “pingo”), sal, prensagem manual e a etapa de maturação.

O QMA apresenta particularidades sensoriais definidas, em parte, pela microbiota autóctone, além de características relacionadas à matéria-prima, condições edafoclimáticas e de processamento. A microbiota do queijo pode ser influenciada pelas condições do local de produção e principalmente pela microbiota do leite cru, dentre outros fatores (SANT’ANNA et al., 2019). Em queijos artesanais, a microbiota é predominantemente composta por bactérias do ácido láctico (BAL), que exercem papel significativo na formação da coalhada, na segurança do produto final,

bem como na definição das características sensoriais (CAMARGO et al., 2021). Em queijos maturados por fungos, culturas secundárias são inoculadas na massa ou na superfície dos queijos, consistindo nos principais responsáveis pela formação da textura, sabores e aromas característicos. Fungos como *Penicillium camemberti*, *Penicillium roqueforti* e *Geotrichum candidum* são os mais comumente utilizados, devido à produção de enzimas proteolíticas e lipolíticas importantes durante a maturação (XIA et al., 2020).

Em queijos artesanais, fungos filamentosos também podem contribuir para a obtenção de produtos com alto valor agregado, atendendo a um nicho específico de mercado; a produção de queijos artesanais maturados por fungos tem crescido a cada ano no Brasil, com destaque para aqueles produzidos no estado de Minas Gerais (PINEDA et al., 2021). A microbiota autóctone da matéria-prima, do processamento e do ambiente de produção e maturação consistem nas principais fontes de fungos (CAMARGO et al., 2021). De maneira a preservar a tipicidade dos queijos, muitos produtores optam por lavar a casca com o intuito de remover esses microrganismos, prática popularmente conhecida como “toilette do queijo”. No entanto, a manutenção da microbiota na superfície do QMA pode resultar em produtos com maior proteólise, e, por consequência, características sensoriais particulares de interesse (CARNEIRO et al., 2020).

2.2. Fungos em queijos maturados

Existe uma grande diversidade de queijos maturados por fungos, com destaque para os mundialmente conhecidos Brie, Camembert e Roquefort (França), Gorgonzola (Itália), Danablu (Dinamarca), dentre outros. A espécie e forma de inoculação dos fungos na massa do queijo depende do processamento, que podem variar de acordo com a variedade do queijo. Em Camembert, por exemplo, *P. camemberti* é geralmente aspergido sobre o queijo após a enformagem, adquirindo um aspecto aveludado em toda sua superfície. Neste queijo, ocorre significativa atividade proteolítica e lipolítica, de forma que ao final do processo de maturação o interior do queijo apresenta característica de textura cremosa decorrente da matriz láctea proteolisada (GRACIOLI et al., 2013). Já para o Gorgonzola, utiliza-se *P. roqueforti*, que é inoculado na massa e cresce internamente recobrindo olhaduras mecânicas ou veios obtidos após perfuração, adquirindo coloração azul-esverdeado característica (BOARI et al., 2022).

Diversos trabalhos têm avaliado a microbiota de queijos artesanais maturados por fungos produzidos em vários países, como França (PENLAND et al., 2021), Itália (ANELLI et al., 2019), Turquia (OZTURKOGLU-BUDAK et al., 2016), Portugal (CARDINALI et al., 2021), Eslováquia (LAURENČÍK et al., 2008), Espanha (MARÍN; PALMERO; JURADO, 2015), Chipre (PAPADEMAS et al., 2019) e Áustria (SCHORNSTEINER et al., 2014). Dentre os principais fungos encontrados, destacam-se principalmente *Penicillium*, *Aspergillus* e *Geotrichum*, além de *Mucor*, *Fusarium*, *Acremonium* e *Scopulariopsis*. No Brasil, a maturação de queijos artesanais por fungos autóctones tem ganhado destaque nos últimos anos, especialmente em locais tradicionalmente ligados à atividade queijeira, como as microrregiões do Serro e da Canastra, no estado de Minas Gerais (PINEDA et al., 2021). O estado tem sido beneficiado, inclusive, pela aprovação, em 2020, de uma nova legislação acerca das condições de maturação do QMA, abrindo novas oportunidades de mercado para milhares de produtores (Minas Gerais, 2020).

Estudos publicados nos últimos anos têm elucidado em parte a microbiota característica dos queijos artesanais produzidos no Brasil. Essa caracterização é importante não apenas para a compreensão do papel da microbiota na matriz dos queijos, mas também para a busca de potenciais microrganismos que possam ser biotecnologicamente aplicados, além de se avaliarem aspectos relacionados à segurança desses produtos, visto que muitos dos fungos normalmente encontrados podem ser produtores de micotoxinas, como aqueles dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* (DE SOUZA et al., 2021). Para a produção de micotoxinas, diversos fatores influenciam nessa produção, como a atividade de água na matriz, pH, temperatura, interações com outros microrganismos, teor de cloreto de sódio, composição nutricional etc. (HYMERY et al., 2014). Devido a isso, muitos produtores optam por lavar as cascas dos queijos regularmente com o objetivo de remover a microbiota e evitar que os mesmos possam ocasionar defeitos em seus queijos. Contudo, esses microrganismos podem contribuir positivamente para as características sensoriais dos produtos finais (ISIDORO, 2019).

Estudos baseados em técnicas independentes de cultivo têm revelado as principais espécies de fungos em queijos artesanais brasileiros. Por meio do sequenciamento da região ITS, Kothe; Mohellibi; Renault (2022) demonstraram a presença de *G. candidum*, *Kodamaea ohmeri* e *Debaromyces hansenii*, mas também espécies menos comuns como *Diutina catenulata*, *Moniliella* sp., *Penicillium commune*

e *Clavispora lusitaniae* em queijos produzidos no Sudeste e no Sul do Brasil. Em queijos produzidos na região do Serro, estado de Minas Gerais, foram detectados *P. roqueforti*, *P. commune*, *Scopulariopsis* spp., *Aspergillus* spp., *D. hansenii*, *Yarrowia lipolytica*, *Fusarium solani*, dentre outros (DE SOUZA et al., 2021). Aragão (2018) estudou a diversidade de fungos filamentosos e leveduras nas regiões do Serro e Canastra em diferentes estações; enquanto *Fusarium*, *Aspergillus*, *Geotrichum*, *Acremonium* prevaleceram em queijos produzidos no verão, *Torulaspora*, *Kodamaea* e *Trichosporon* foram predominantes no inverno.

Dentre os fungos encontrados em queijos artesanais com potencial de aplicação biotecnológica, destaca-se *G. candidum*, microrganismo dimórfico que pode ser encontrado na forma leveduriforme ou filamentosa, a depender das condições de crescimento. De forma geral, a temperatura ótima é de 25°C; no entanto, é capaz de crescer entre 5 e 35°C. Já o pH ótimo está entre 5,0 e 5,5. Além disso, *G. candidum* é sensível a concentrações de sal mais elevadas, de forma que 5% (m/v) já causa completa inibição do seu desenvolvimento. Este fungo pode ser encontrado nos mais diversos ambientes, como solo, silagem, frutas e no leite, por exemplo (ELISKASES-LECHNER; GUÉGUEN; PANOFF, 2011).

G. candidum é amplamente utilizado na indústria de alimentos e aplicado na produção de lácteos, como queijos e no leite fermentado de origem nórdica, denominado *villi* (MACHADO e FREITAS, 2022). Este fungo não é capaz de fermentar açúcares e não assimila a lactose presente no substrato, mas sim lactato previamente produzido por BAL, além de galactose e glicose provenientes da hidrólise da lactose por *Penicillium camemberti*, por exemplo, quando utilizados conjuntamente como culturas secundárias. Além destes, outros monossacarídeos também podem ser assimilados por *G. candidum*, a exemplo de xilose e sorbose (RATTRAY; EPPERT, 2021).

O fungo é reconhecido por sua significativa produção de enzimas proteolíticas, amino e carboxipeptidases e lipases. Em queijo tipo Camembert, por exemplo, *P. camemberti* produz pequenos peptídeos hidrofóbicos pela hidrólise de β -caseína, que conferem sabor amargo. *G. candidum*, por sua vez, sintetiza aminopeptidases que hidrolisam esses peptídeos, contribuindo para a redução do amargor no produto (MARCELLINO et al., 2001). Além disso, *G. candidum* também exerce um papel relevante na alcalinização da casca do queijo, tanto pelo consumo do lactato quanto pela produção de amônia no decorrer da maturação. O fungo pode exercer um papel

ainda mais pronunciado que *P. camemberti* na produção de amônia nesse tipo de queijo, decorrente do metabolismo da metionina (Lessard et al., 2014).

Estudos têm revelado alguns tipos de lipases produzidas por *G. candidum*. A produção é estirpe-dependente, tanto para proteases quanto lipases, mas, de maneira geral, *G. candidum* produz dois grupos de lipases extracelulares, classificadas em lipases A e B ou I e II (SUGIHARA; SHIMADA; TOMINAGA, 1990). Enquanto a lipase A tem atuação inespecífica, produzindo ácidos graxos de cadeia carbônica média, a lipase B tem alta especificidade por ácidos graxos insaturados de cadeia longa, resultando na liberação de altos níveis de ácido oleico, por exemplo (RATTRAY; EPPERT, 2021). Já o trabalho de Brabcová et al. (2013) descreveu um terceiro tipo de lipase até então não relacionada a *G. candidum*. Essas enzimas foram purificadas e apresentaram conformações estruturais diferentes e a nova lipase apresentou afinidade por substratos não utilizados pelas enzimas I e II.

2.3. Atividade enzimática durante a maturação de queijos

Dentre os derivados lácteos, o queijo é um dos que apresenta uma das matrizes mais complexas. Tal complexidade se deve, em parte, ao processo de maturação, cujo período pode variar a depender do tipo de queijo (KARACA; GÜVEN, 2018). Queijos de casca florida, como o Camembert, em geral são maturados por até 60 dias (GALLI, 2018), enquanto queijos duros como o Parmesão podem ser maturados por no mínimo 6 meses até anos (AZEVEDO, 2009). A maturação, portanto, define as características sensoriais dos queijos, em decorrência de uma cascata de eventos bioquímicos, como aqueles relacionados ao metabolismo da lactose residual, do citrato e do lactato, além da proteólise e da lipólise (MCSWEENEY, 2004). Essas reações bioquímicas resultam na produção de ácidos orgânicos e compostos voláteis, gerando peptídeos a partir da proteólise, ácidos graxos livres a partir da lipólise etc. Contudo, uma vez que a maturação está diretamente relacionada aos atributos sensoriais e, portanto, à aceitação pelo consumidor, deve ser realizada de maneira controlada e por períodos que resultem em propriedades desejadas, visto que queijos maturados por períodos de tempo demasiadamente prolongados podem assumir sabores e odores mais fortes e complexos, muitas vezes percebidos como desagradáveis (KHATTAB et al., 2019).

No Brasil, a maturação de queijos artesanais de leite cru deve respeitar os períodos mínimos estabelecidos em lei. Em Minas Gerais, por exemplo, este período corresponde a 14 dias para QMA da Canastra, Araxá e Serra do Salitre; 17 dias, para QMA produzido no Serro e 22 dias para os queijos produzidos em outras regiões (Minas Gerais, 2021). A determinação destes períodos mínimos de maturação provém de estudos científicos e visam à segurança do produto final, uma vez que as alterações físico-químicas e a produção de metabólitos microbianos contribuem para a minimização dos riscos de veiculação de patógenos alimentares (MARTINS et al., 2015).

Reações enzimáticas que ocorrem durante a maturação são dependentes de enzimas majoritariamente produzidas pela microbiota do queijo. Previamente à maturação, a cultura iniciadora composta por BAL fermenta a lactose da matéria-prima, produzindo, através da via glicolítica e da redução do ácido pirúvico à ácido láctico, principalmente ácido láctico (KINSELLA; HWANG, 1976). A partir do lactato, bactérias do ácido láctico não iniciadoras (NSLAB – do inglês *non starter lactic acid bacteria*) são capazes de oxidar o lactato a acetato e gás carbônico (CO₂), ou convertê-lo na mistura racêmica de D e L-lactato.

A depender da microbiota, podem ocorrer, ainda, outros processos; na presença de *Propionibacterium* sp., por exemplo, o lactato é convertido a propionato, CO₂ e acetato. Além disso, o piruvato pode ser convertido à etanol, acetoina e diacetil, responsáveis pela formação de sabor amanteigado característico. Já na presença de *Clostridium* sp., piruvato pode ser convertido a butirato e H₂, responsáveis por fissuras e trincas, além de sabores desagradáveis, demonstrando, portanto, que efeitos indesejáveis também podem ser resultado da ação microbiana no decorrer da etapa de maturação, impactando negativamente na qualidade sensorial do produto (KHATTAB et al., 2019).

A seguir, serão brevemente apresentadas as reações enzimáticas mais relevantes para a qualidade do queijo maturado, decorrentes da atividade microbiana na matriz láctea, a proteólise e a lipólise.

2.3.1. Proteólise

A proteólise é certamente o processo mais complexo da maturação de queijos. Inicialmente, a caseína é degradada em polipeptídeos pela ação residual do

coagulante utilizado para a formação da coalhada, processo denominado de proteólise primária (KHATTAB et al., 2019). Neste, a principal enzima utilizada é a quimosina, que cliva a ligação entre os resíduos Met-106 e Phe-105 da κ -caseína, liberando o oligopeptídeo carregado negativamente; isso resulta na eliminação do efeito de repulsão eletrostática, permitindo que as micelas se agreguem e formem o coágulo (Figura 1) (MOHANTY et al., 1999). Além da ação residual da quimosina, enzimas naturalmente presentes no leite podem atuar na proteólise primária, como a plasmina, enzima termoestável (não é desnaturada durante a pasteurização) que atua na degradação da caseína, mais especificamente na β -caseína e na α s2-caseína (BASTIAN; BROWN, 1996).

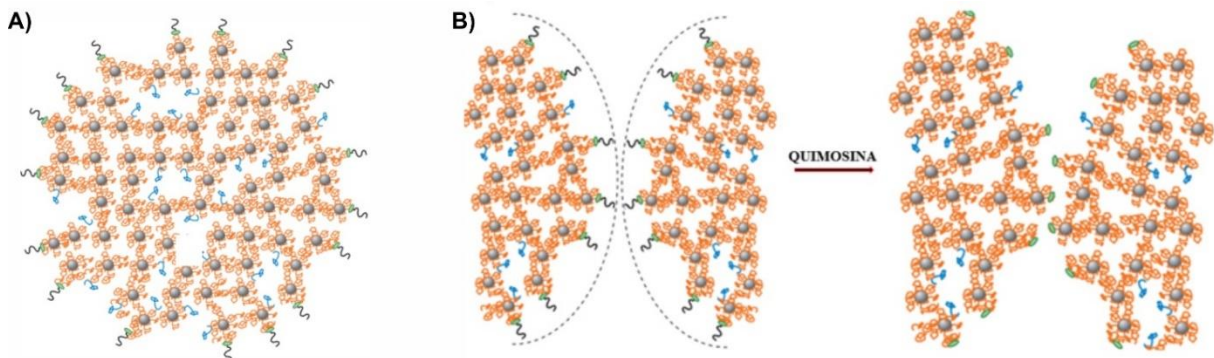


Figura 1 - Estrutura e interação entre micelas de caseína. A) Estrutura da micela de caseína α - e β -caseínas (em laranja), nanoclusters de fosfato de cálcio (esferas cinzas), κ -caseína (em verde), β -caseína (em azul) a cadeia de macropeptídeos (em preto). B) Interação entre micelas de caseínas: micelas estabilizadas pela repulsão eletrostática entre os macropeptídeos (à esquerda) e micelas após a atividade da enzima quimosina (à direita), que cliva a ligação entre os resíduos Met-106 e Phe-105, liberando os macropeptídeos e permitindo a formação do coágulo. Fonte: Adaptado de Dalgleish; Corredig (2012).

Além dos mecanismos supracitados, BAL também podem atuar no processo de proteólise primária. Essas bactérias são fastidiosas, necessitando de um meio nutricionalmente rico para o crescimento. Assim, produzem um conjunto de enzimas peptidases que atuam sobre a caseína e sobre os peptídeos derivados da mesma (Figura 2). Uma protease (PrtP) acoplada à membrana celular de BAL podem ser ativadas pela lipoproteína PrtM. Após a proteólise das moléculas de caseína, os transportadores Opp, Dpp e DtpT carregam os peptídeos para o interior da célula. Já no citoplasma, os peptídeos são convertidos a aminoácidos livres, que podem ser metabolizados pela célula microbiana, satisfazendo, então, suas necessidades

nutricionais. Sendo assim, BAL também exercem um papel relevante no processo de proteólise da caseína durante a maturação dos queijos (SAVIJOKI; INGMER; VARMANEN, 2006).

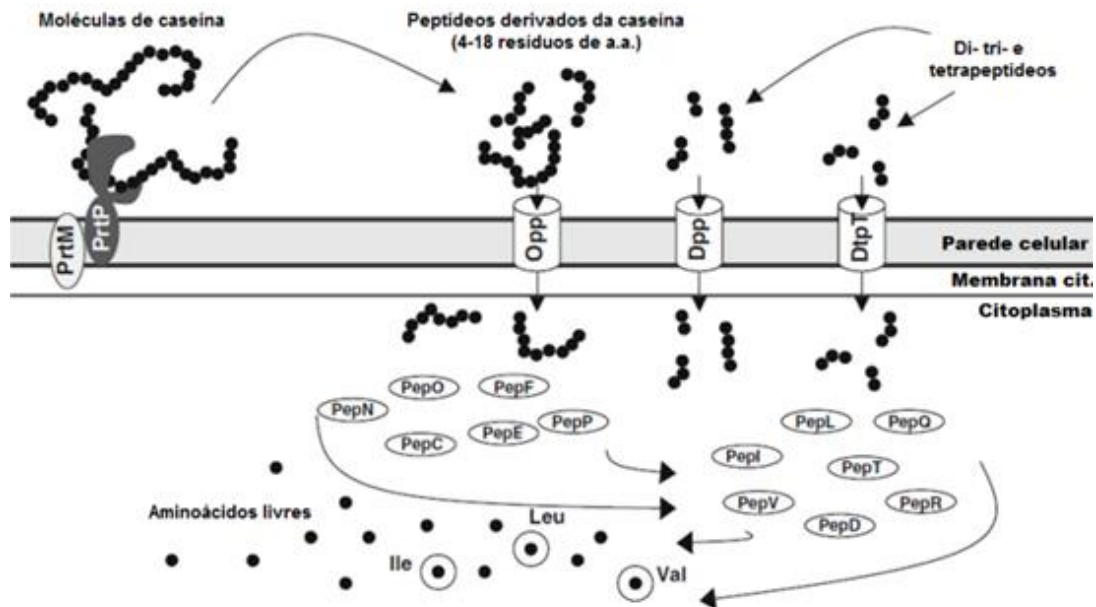


Figura 2 - Sistema de proteases de BAL. As BAL possuem uma protease (PrtP) na membrana celular responsável pela proteólise da caseína na matriz dos queijos. Essa protease é ativada pela lipoproteína PrtM. Após a hidrólise, os peptídeos são transportados para o interior da célula, de acordo com seus tamanhos, pelos respectivos transportadores (Opp, Dpp e DtpT). Fonte: Adaptado de Savijoki; Ingmer; Varmanen (2006).

Já na proteólise secundária, enzimas produzidas por NSLAB e culturas secundárias, como fungos, são responsáveis pela proteólise dos polipeptídeos em peptídeos menores e aminoácidos livres (MCSWEENEY, 2004). Alguns pequenos peptídeos são responsáveis por sabores amargos, enquanto os aminoácidos podem participar de uma série de vias, resultando na formação de diferentes compostos de sabor e aroma. Dentre essas reações, destacam-se as descarboxilações, que dão origem às aminas; as desaminações, as quais originam os α -cetoácidos correspondentes de cada aminoácido, que, por sua vez, podem sofrer reações adicionais, produzindo ésteres e aldeídos. Ademais, os aminoácidos que contêm grupos enxofre, como a metionina, podem originar compostos sulfurados, como o metanotiol (que confere sabor de ranço), metional (batata) e sulfeto de dimetila (alho).

(KHATTAB et al., 2019). Os diferentes compostos produzidos no decorrer deste processo estão resumidos na Figura 3.

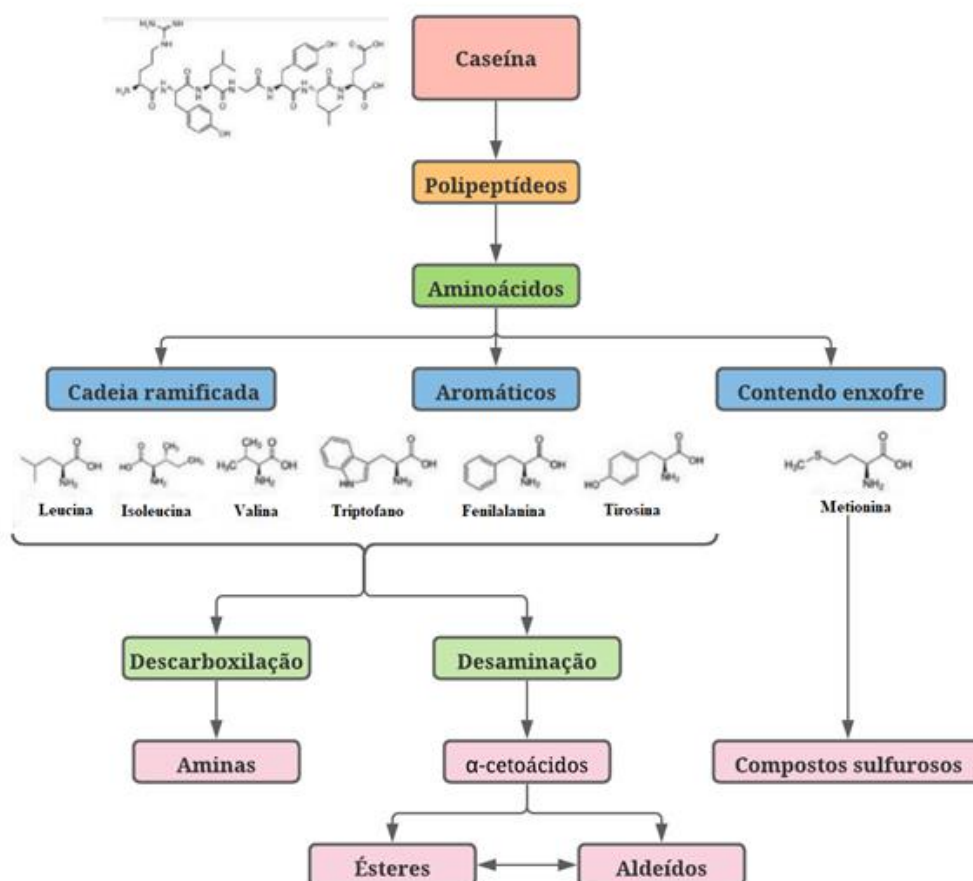


Figura 3 - Figura esquemática do processo de geração de compostos de aroma e sabor durante a proteólise da caseína. A proteólise da caseína resulta em peptídeos e aminoácidos livres que podem passar por outras diversas reações, produzindo compostos voláteis. Fonte: Adaptado de Khattab et al. (2019)

A proteólise está diretamente relacionada ao tempo de maturação, ou seja, quanto mais prolongado este for, mais intensamente a proteólise ocorrerá na matriz do queijo. Dessa forma, o processo também está relacionado com o tipo de queijo e os aromas e sabores esperados, visto que queijos com maturação mais prolongada apresentam sabores mais fortes, amargos e odores pungentes (CLARK et al., 2009).

2.3.2. Lipólise

Na lipólise, lipases quebram a ligação éster entre o ácido graxo e o glicerol dos triacilgliceróis, liberando ácidos graxos. Estes, por sua vez, podem passar por diversas reações, relacionadas à liberação de compostos responsáveis pela formação de aromas e sabores desejados, bem como *off-flavors* (COLLINS; MCSWEENEY; WILKINSON, 2003). Dentre essas reações, destaque para a esterificação, que gera ésteres que conferem sabor frutado; a transesterificação intramolecular, que resulta na formação de lactonas, as quais promovem sabores suaves e adocicados; a esterificação com um grupo sulfidril, que produz compostos com grupamentos tioésteres, os quais conferem sabor de alho; e, por fim, as reações de β -oxidação, que podem gerar *off-flavors* indesejáveis. Além disso, os ácidos graxos de cadeia curta, a exemplo dos ácidos hexanoico, octanoico e decanoico, estão relacionados aos sabores pungente, ceroso e gorduroso, respectivamente (KHATTAB et al., 2019). Um esquema representando as principais reações e os produtos gerados no decorrer da lipólise em queijos está apresentado na Figura 4.

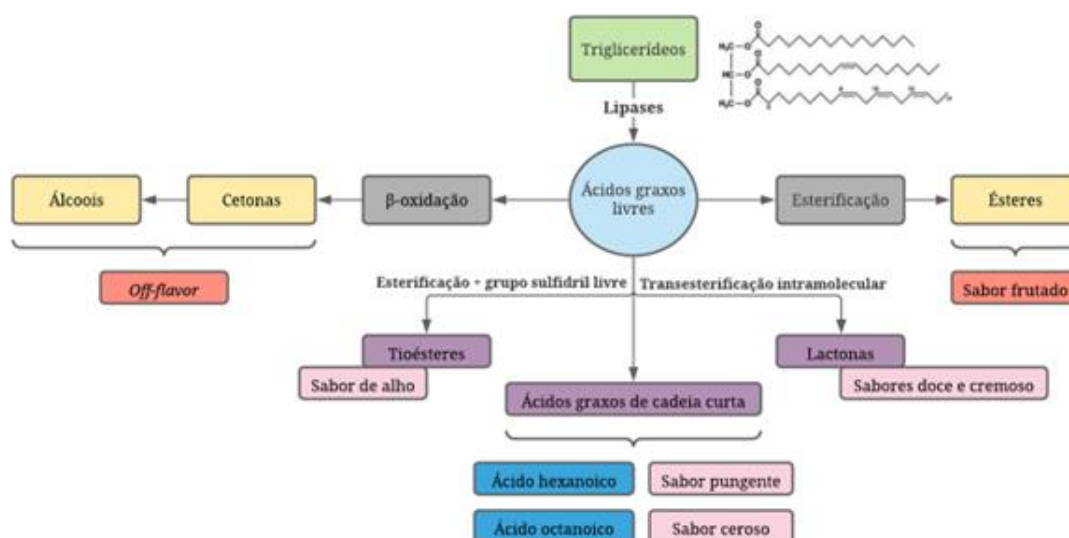


Figura 4 - Reações e produtos formados no decorrer da lipólise em queijos. Fonte: Adaptado de Khattab et al. (2019).

Dentre os ésteres resultantes da reação de um ácido graxo com um álcool, os mais comuns em queijos correspondem aos ésteres etílicos, visto que o etanol é o álcool predominante nesta matriz (MCSWEENEY, 2004). Em queijos azuis, o sabor mofado é decorrente da produção de cetonas pela via de β -oxidação. As mesmas, se forem convertidas aos seus álcoois secundários equivalentes, são fontes de *off-flavor*.

(HASSAN; ABD ELGAWAD; ENAB, 2013). Dessa forma, queijos com extensa atividade lipolítica possuem forte sabor de mofado, o que reforça, mais uma vez, a influência do tempo de maturação no produto final.

A extensão da atividade lipolítica é ainda diretamente influenciada pelo teor de gordura do leite. Katsiari et al. (2002) demonstraram que queijos do tipo Feta produzidos com leite de baixo teor de gordura apresentaram sabores menos intensos quando comparados aos queijos produzidos com leite integral. Para contornar este problema, adicionou-se cultura adjuvante contendo *L. lactis* e *L. cremoris*, resultando em queijos com atributos sensoriais semelhantes aqueles produzidos com leite integral; contudo, o queijo produzido com leite de baixo teor de gordura apresentou qualidade sensorial inferior, o que pode estar relacionado ao fato de ser a lipólise a principal responsável pelas características sensoriais desejadas.

De forma geral, fungos filamentosos são bons produtores de enzimas lipolíticas, dentre os quais destacam-se *G. candidum* e *Penicillium* spp. Nos queijos em que se deseja alta atividade de lipólise, justamente para a obtenção dos sabores e aromas citados acima, opta-se por esses gêneros para a maturação, resultando em queijos maturados de alto valor agregado (BOUTROU; GUÉGUEN, 2005).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Manutenção e cultivo do isolado

O isolado de *G. candidum* (FERM-GC-31) foi obtido de QMA da Canastra, Minas Gerais, em estudo realizado pelo grupo de pesquisa (CESAR, 2019), atualmente depositado na Coleção de Culturas Fúngicas da Serra da Canastra (FERMICRO/UFV). O isolado está conservado pelo método de Castellani (CASTELLANI, 1939); para as análises, foi reativado em meio ágar Extrato de Malte (MEA) acrescido de 0,01% (v/v) de solução alcóolica de cloranfenicol (10 mg/mL) e incubado a 25°C por 7 dias

3.2. Produção do modelo de queijo

O modelo de queijo foi produzido utilizando-se leite desnatado e ultrafiltrado, concentrado em um fator de 3 vezes, fornecido pelo Laboratório InovaLeite do Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA/UFV). O leite foi mantido a -18 °C até o momento dos experimentos. Para padronização do teor de gordura para 20 g/kg, adicionou-se creme de leite com 54 % (m/v) de gordura. Após, foi adicionado cloreto de sódio (concentração final de 0,7%, m/m). Então, aplicou-se tratamento térmico a 83°C durante 30 minutos, seguido de resfriamento em banho-maria até 45°C. Em seguida, adicionou-se coagulante (HA-LA®) na concentração indicada pelo fabricante. A mistura dos ingredientes foi enformada de duas maneiras distintas, a depender da análise pretendida: 15 mL distribuídos em placas de Petri de 60 x 15 mm; ou 2 mL em cada poço de placas de 24 poços. A coagulação foi obtida após incubação das placas a 30°C durante 1 hora. A coalhada dos mini-queijos foi dessorada durante 3 dias a 20°C, sendo o soro exsudado retirado assepticamente com o auxílio de uma pipeta de 1000 µL. Os mini-queijos prontos foram mantidos a 12°C até o momento da inoculação (GARNIER et al., 2018).

3.3. Padronização das condições dos ensaios enzimáticos

3.3.1. Curva de tempo de reação

3.3.1.1. Obtenção da matéria-prima

Para determinar o melhor intervalo de tempo para os ensaios de atividade de proteases e lipases, foi obtida uma curva de tempo de reação a partir do mini-queijo produzido em placas de Petri de 60 x 15 mm. Os mini-queijos foram inoculados com 141,5 µL de uma suspensão de esporos contendo $1,0 \times 10^7$ esporos/mL ($5,0 \times 10^4$ esporos/cm²). Após incubação a 12°C e 7 dias após visualização do micélio fúngico na superfície do mini-queijo, preparou-se o extrato bruto utilizado nos ensaios de atividade enzimática.

3.3.1.2. Preparo do extrato bruto enzimático

O extrato bruto enzimático foi obtido a partir da homogeneização do mini-queijo acrescido do mesmo volume em água destilada em vórtex durante 2 minutos. Após, as amostras foram transferidas para tubos tipo Falcon e centrifugadas a 10.000 g a 4°C durante 20 minutos. Considerou-se como extrato bruto o sobrenadante obtido após a centrifugação (KUMURA et al., 2019).

3.3.1.3. Ensaio de atividade proteolítica

Para determinar a atividade de proteases, 1,5 mL do extrato bruto foi centrifugado a 10.000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e então, utilizado para compor os ensaios. A reação enzimática foi constituída de: 250 µL de solução de azocaseína 2% (m/v) em tampão Tris-HCl 100 mM (pH 8,0) e 150 µL do extrato bruto enzimático. O controle consistiu em 150 µL do extrato bruto obtido a partir do mini-queijo não inoculado. As reações foram incubadas a 37°C em banho termostato. As medidas de absorbância foram tomadas após 0, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos de reação, sendo imediatamente interrompidas pela adição de 600 µL de solução de ácido tricloroacético (TCA) 20% (m/v). Em seguida, os tubos foram centrifugados a 10.000 g por 10 minutos e as medidas de absorbância determinadas em espectrofotômetro K37-VIS (KASVI) a 366 nm. Os ensaios foram realizados em triplicata (CHRISTENSEN et al., 2003; DUFOUR et al., 2008).

3.3.1.4 Ensaio de atividade lipolítica

A atividade de lipases foi determinada com base na reação lipolítica do 4-nitrofenilpalmitato (p-NPP), resultando em 4-nitrofenol (coloração amarela) e ácido palmítico, de acordo com Salgado et al. (2021) e Christensen et al. (2003). Para isto, 1,5 mL do extrato bruto foi centrifugado a 10.000 g por 10 minutos. Então, duas soluções foram utilizadas: solução A (0,3% m/v de p-NPP em isopropanol) e solução B (0,2% m/v de desoxicolato de sódio e 0,1% m/v de goma arábica em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 8,0). As reações foram realizadas em microtubos seguindo-se as seguintes proporções: 500 µL de água, 450 µL da solução B, 50 µL da solução A e 25 µL do extrato bruto enzimático. Os tubos foram incubados a 30°C e as medidas tomadas após 0, 10, 20, 30, 40 e 60 min de reação. As medidas de absorbância foram determinadas em espectrofotômetro a 410 nm. Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.3.2. Temperatura de maior atividade

Para determinar a temperatura ótima das lipases e proteases, os ensaios foram realizados conforme descrito anteriormente nas seguintes temperaturas: 30, 35, 40, 45, 50, 55 e 60°C, utilizando-se os respectivos tempos reacionais determinados através do ensaio da curva de tempo de reação descrito anteriormente.

3.3.3. pH de maior atividade

Após a avaliação do tempo de reação e temperatura ótimos, determinou-se a curva de pH para a melhor atividade enzimática. Os ensaios foram conduzidos conforme descrito anteriormente e de acordo com os resultados obtidos nas etapas anteriores, nos seguintes valores de pH: 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; e 9,0. Os valores de pH foram ajustados com os seguintes tampões: citrato-fosfato (pH 3,0 a 5,5), fosfato (pH 6,0 a 8,0) e glicina (pH 9,0).

3.4. Curva de cultivo de *G. candidum* FERM-GC-31

Para determinação da curva de atividade enzimática por tempo de cultivo de *G. candidum* FERM-GC-31, foram utilizados os modelos de mini-queijo em placa de 24 poços. Os mini-queijos foram inoculados com 10 µL de uma suspensão de esporos

contendo $1,0 \times 10^7$ esporos/mL ($5,0 \times 10^4$ esporos/cm²). As placas foram incubadas a 12°C durante 20 dias. A partir do 4º dia, momento em que o micélio pôde ser visualmente observado sobre a superfície do mini-queijo, as amostras foram diariamente coletadas, em triplicata. Para determinação da atividade enzimática, preparou-se o extrato bruto enzimático a partir do mini-queijo acrescido do mesmo peso em água, e processado em vórtex durante 2 minutos, seguido de centrifugação a 10.000 g a 4°C por 30 minutos (KUMURA et al., 2019). O sobrenadante resultante foi utilizado como extrato bruto. As atividades proteolítica e lipolítica foram determinadas conforme descrito nos itens 3.3.1.3 e 3.3.1.4. Para o ensaio de protease, uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para aumentar a absorbância em 0,01 por minuto a 366 nm nas condições de tempo e temperatura de incubação do teste (YAZGAN et al., 2010). Para lipase, a curva padrão de 4-nitrofenol (p-NP) foi realizada da mesma maneira que para a reação enzimática; contudo, a solução A foi substituída por uma solução de p-NP em isopropanol (faixa de concentração de 0 a 3500 µM) e o extrato bruto enzimático foi substituído pelo extrato do mini-queijo controle (sem inóculo fúngico). Uma unidade de lipase (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para a liberação de 1,0 µM de p-NP por minuto nas condições utilizadas na reação (SALGADO et al., 2021). Todos os ensaios foram realizados em triplicata para todas as repetições biológicas.

3.5. Atividade antagonista

Para avaliação da atividade antagonista de fermentos comumente utilizados na produção de queijos contra o isolado FERM-GC-31, foi utilizado o método de cultura pareada para as seguintes BAL: *L. lactis* subsp. *cremoris* ATCC 19257 e *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 19435. Para isto, ambas foram previamente inoculadas em caldo Man, Rogosa e Sharpe (MRS), seguido de incubação a 37°C por 18 horas para *L. lactis* subsp. *lactis* e a 26°C por 18 horas para *L. lactis* subsp. *cremoris*. As culturas foram, então, estriadas em meio ágar Brain Heart Infusion (BHI), respeitando-se uma distância de 1,5 cm da borda da placa, que foi incubada nas respectivas temperaturas durante 48 horas. Após o crescimento das bactérias, um fragmento de 6 mm de diâmetro da cultura de *G. candidum* FERM-GC-31 crescida durante 7 dias em meio MEA foi transferido para as placas com as estrias bacterianas do lado diametralmente

oposto respeitando-se uma distância de 1,5 cm da borda da placa. As placas foram incubadas a 25°C durante 10 dias. O controle consistiu em placas contendo apenas o fragmento do isolado fúngico, incubadas nas mesmas condições descritas acima (FREITAS et al., 2016). Todos os ensaios foram realizados em triplicata. O grau de inibição do crescimento foi obtido por meio da equação 1:

$$IC = [(C-T)/C] \times 100 \quad \text{Eq. (1)}$$

Na qual:

IC = inibição do crescimento;

C = crescimento radial do micélio do controle (em mm);

T = crescimento radial do micélio nos tratamentos contendo as bactérias (em mm).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Padronização das condições dos ensaios enzimáticos

Os modelos de queijos produzidos em placas de 24 poços e placas de Petri de 60 x 15 mm podem ser visualizados na Figura 5.

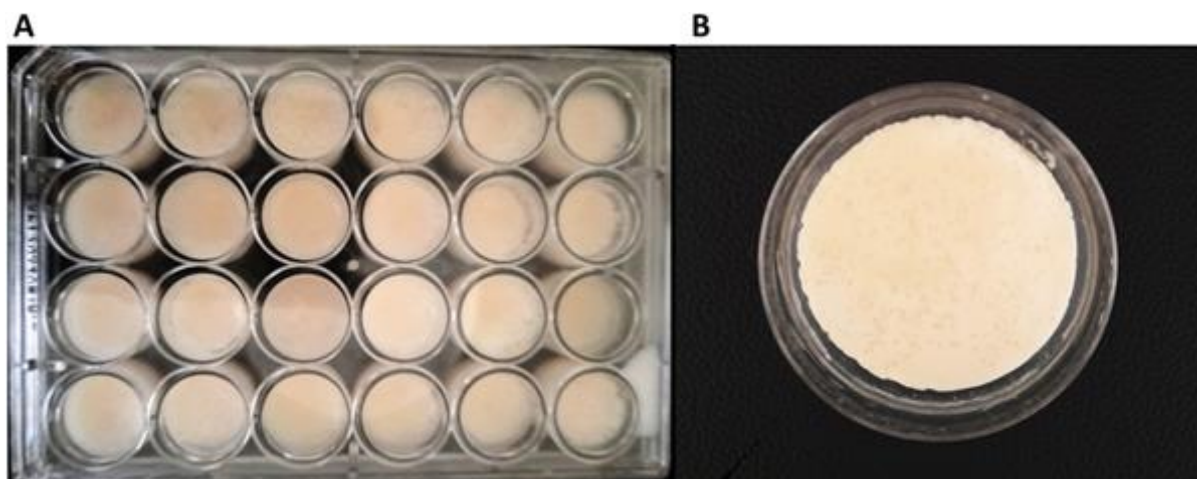


Figura 5 - Modelos de queijos produzidos em placa de 24 poços (A) e placa de Petri de 60 x 15 mm (B). Fonte: autoria própria.

Os parâmetros ótimos de atividade das enzimas, como tempo de reação, temperatura e pH foram avaliados. A definição do parâmetro de tempo de reação é importante para garantir linearidade entre as funções de formação do produto da reação e o tempo da mesma, de maneira que haja uma taxa constante de formação de produto ou de consumo do substrato (PACHECO; MENDES, 2021). Para estes ensaios, a absorbância equivalente à reação enzimática foi obtida através da diferença entre a leitura dos extratos derivados de modelos inoculados com *G. candidum* FERM-GC-31 e dos extratos não inoculados (controle). Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 6.

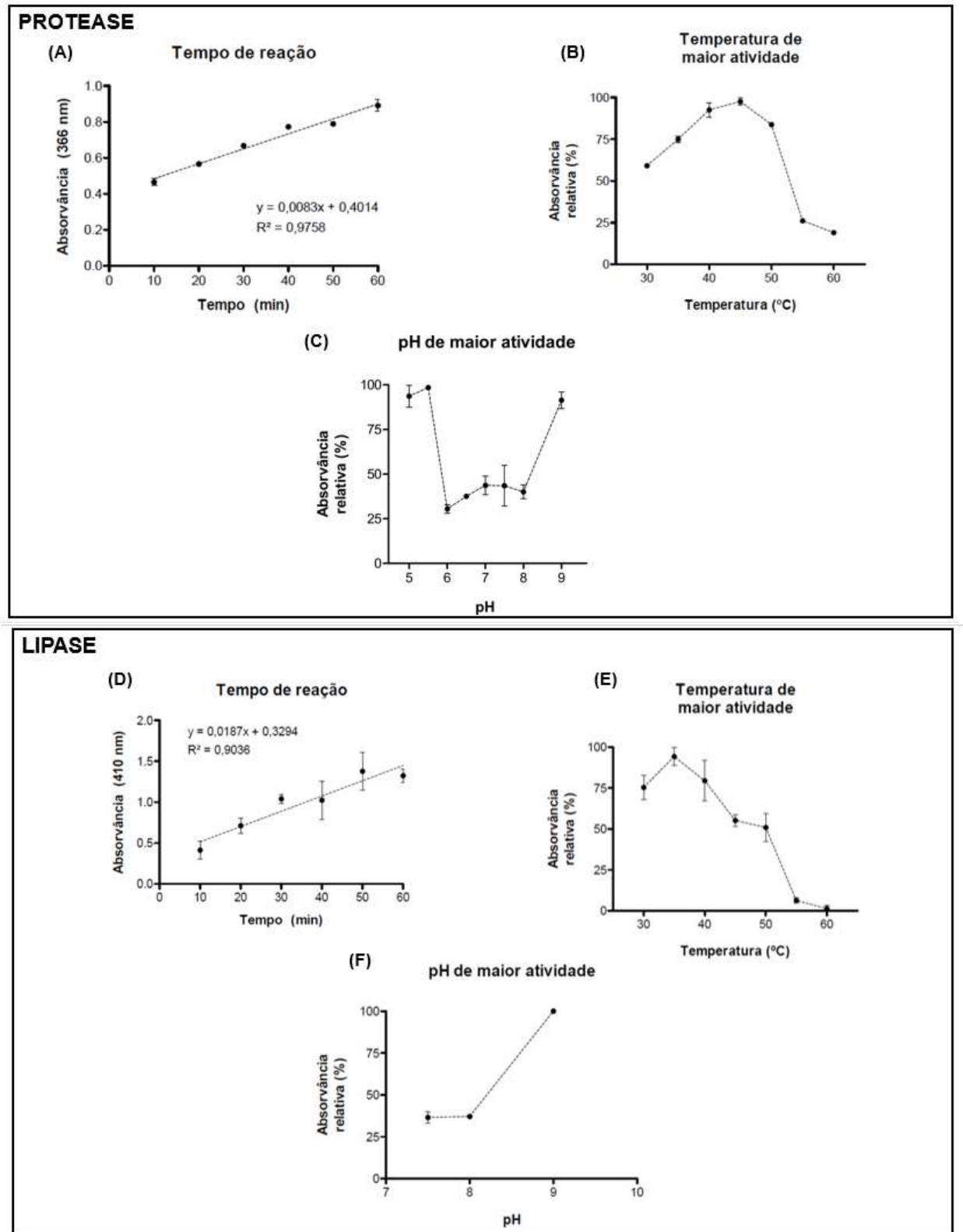


Figura 6: Resultados para atividade enzimática de proteases e lipases de *G. candidum* FERM-GC-31. A absorvância relativa foi determinada em relação ao maior valor de absorvância medido no espectrofotômetro em cada comprimento de onda. Fonte: autoria própria.

4.1.1. Parâmetros dos ensaios enzimáticos de protease

Para o ensaio de tempo de reação (Figura 6A), observou-se uma relação linear entre a leitura de absorbância e o tempo, permitindo-se selecionar o menor tempo de reação que apresentasse uma absorbância com diferença de pelo menos 0,2 em relação ao primeiro tempo avaliado (10 minutos). A definição do menor tempo de reação é útil, ainda, para a otimização do ensaio, contribuindo para a execução do ensaio em tempo reduzido; além disso, tempos de reação excessivos podem exceder a Lei de Lambert-Beer, tornando os resultados de leituras espectrométricas não confiáveis. Assim, definiu-se em 30 minutos o menor tempo de reação para essa enzima.

Tendo em vista que a temperatura é um dos fatores que mais afeta a atividade enzimática, o teste para este parâmetro foi realizado na faixa entre 30 e 60°C, com intervalos regulares de 5 °C entre cada ponto avaliado. A temperatura de maior atividade das proteases de *G. candidum* FERM-GC-31 foi de 45°C (Figura 6B). A 30 °C, as proteases apresentaram cerca de 60% de atividade máxima determinada, com redução a partir de 45 °C e atividade proteolítica menor que 20 % a 60 °C.

A temperatura exerce dois tipos de efeito nas reações enzimáticas, sendo um dos parâmetros que mais interfere na atividade catalítica. À medida que a temperatura é aumentada, a velocidade da reação também aumenta até o ponto máximo, denominado de temperatura ótima. A partir do ponto máximo, a temperatura exerce um efeito antagônico, diminuindo a velocidade da reação conforme a temperatura continua a aumentar. Este fenômeno ocorre devido à inativação ou desnaturação proteica sob altas temperaturas, processo que pode ser irreversível considerando-se o nível de desnaturação (PACHECO; MENDES, 2021). Protease de *G. candidum* produzida e purificada de *dahi*, produto lácteo fermentado de origem indiana, apresentou temperatura ótima de atividade em 37°C, mas estabilidade térmica entre 25 a 45°C (MUHAMMAD et al., 2019).

O pH consiste em outro fator que interfere de maneira significativa na atividade enzimática, dado que exerce influência sobre grupos dissociáveis dos aminoácidos que compõe a enzima. Esses grupos podem ser protonados ou desprotonados, dependendo do valor de pH do meio reacional, influenciando diretamente na atividade catalítica, uma vez que pode resultar em alterações conformacionais na estrutura da enzima (PACHECO; MENDES, 2021). Em relação ao pH do meio reacional, os testes

foram realizados entre 3,0 e 9,0. Os resultados para a atividade de protease em diferentes valores de pH estão apresentados na Figura 6C. Em valores abaixo de 5,0, a azocaseína, substrato utilizado, foi em parte precipitada, dificultando a homogeneização da reação final, devido a isso estes valores não foram apresentados no gráfico da figura 6E. Foram observados dois picos de maior atividade proteolítica, em valores de pH 5,5 e 9,0. No primeiro pico, observou-se a maior leitura de absorbância; no entanto, em pH 9,0 houve uma manutenção de aproximadamente 95% da atividade enzimática. Sugere-se, portanto, que tendo em vista que não houve purificação do extrato enzimático, proteases alcalinas e neutras foram produzidas pelo isolado FERM-GC-31 nos mini-queijos produzidos e incubados a 12°C.

Tendo em vista que em produtos lácteos, como os queijos ou o *villi*, por exemplo, a coalhada tem um pH inicial mais ácido, até mesmo devido à ação de BAL produzindo ácido láctico, o fato de *G. candidum* FERM-GC-31 produzir proteases com maior atividade em pH 5,5 é um indicativo de possível aplicação deste isolado nessas matrizes a depender do nível de proteólise desejada. Isso indica que este isolado começaria a apresentar atividade proteolítica desde o início da incubação. O trabalho de Lessard et al. (2012) produziu um queijo tipo Camembert e avaliou o desenvolvimento de *G. candidum*, *P. camemberti* e algumas outras culturas na matriz. Foi observado que o pH inicial da coalhada foi de 4,54 e alcançou 8,10 com 14 dias de maturação do queijo a 14°C por 9 dias e os demais dias de maturação (até 31 dias) a 4°C. *G. candidum* possui papel fundamental na alcalinização da casca de queijos tipo Camembert devido ao metabolismo de metionina, levando à produção de amônia (LESSARD et al., 2014). Ou seja, para que este fungo tenha ação proteolítica inicial no queijo, é importante que ele produza proteases com espectro de ação em valores de pH ácidos e próximos à neutralidade.

4.1.2. Parâmetros dos ensaios enzimáticos de lipase

Em relação às lipases, o método utiliza o p-NPP como substrato da enzima. Na presença de lipase, este é hidrolisado em p-NP e ácido palmítico (SALGADO et al., 2021). Durante a execução da análise, contudo, a mistura do tampão de reação com o substrato mostrava-se turva, o que pode estar relacionado à precipitação de parte do p-NPP, uma vez que o mesmo não é solúvel em água. Com a turbidez do meio reacional, o tratamento controle resultou em leituras altas de absorbância, não

correspondendo à faixa de linearidade. Para contornar este problema, a reação foi diluída, mantendo-se as devidas proporções entre os componentes do ensaio. Após esse ajuste, o tempo de reação foi avaliado durante 60 minutos com intervalos regulares de 10 minutos. Os resultados obtidos podem ser observados na Figura 6D. A partir de 30 minutos, as leituras de absorbância a 410 nm superaram o valor de 1, indicando uma possível perda de linearidade entre as variáveis de tempo e absorbância. Devido a isso, o melhor tempo determinado para este ensaio de lipase foi de 20 minutos.

Em relação à temperatura, os resultados para lipase estão apresentados na Figura 6E. Aumento da velocidade da atividade de lipases foi observado apenas entre 30 e 35 °C, esta considerada a temperatura de maior atividade; a 60 °C, nenhuma atividade lipolítica foi observada, indicando desnaturação completa das enzimas presentes no meio reacional. A variação mais brusca foi observada para a faixa entre 50 e 55 °C, com queda de 54 % para 15 % de atividade enzimática.

Na produção do *villi* tradicional, por exemplo, é comum que, após a inoculação das BAL e de *G. candidum*, o produto seja diretamente incubado nos recipientes em que serão comercializados. Isso é realizado para facilitar a suspensão da gordura do leite na superfície para que a mesma possa ser submetida à lipólise pelas enzimas de *G. candidum*, produzindo o sabor característico de “mofo”, também comum em queijos maturados por fungos (BAKRY; CAMPELO, 2018). Esse sabor característico se deve à ação lipolítica proveniente de *G. candidum*, o qual produz, a partir da β -oxidação dos ácidos graxos, moléculas chamadas de alcan-2-onas, como heptan-2-ona, por exemplo (KHATTAB et al., 2019).

Em virtude do método para detecção da atividade lipolítica utilizado neste estudo, apenas em valores de pH de 7,5, 8,0 e 9,0, foi possível se obterem as leituras de absorbância. Como as enzimas lipolíticas atuam em moléculas hidrofóbicas e a reação ocorre em meio aquoso, é necessário que o tampão forneça a interface hidrofóbica para a ação da enzima, de forma que o desoxicolato de sódio exerce essa função, possibilitando a sua utilização apenas com tampões acima de pH 7,5, devido à sua solubilidade (Figura 7). Sendo assim, observou-se que, em pH 9,0, houve mais de 50 % de atividade relativa detectada em relação aos demais valores, os quais apresentaram resultados próximos. No entanto, a utilização dessa metodologia forneceu uma limitação na análise, ocasionando em uma possível subestimação da atividade de lipase produzida por *G. candidum*, devido ao fato de que alguns trabalhos

na literatura indicam que este fungo é capaz de produzir lipases com pH ótimo em torno de 6,5 (Lipases A e B). Dessa forma, ainda se faz necessário testar a atividade lipolítica de *G. candidum* FERM-GC-31 com a utilização de outras metodologias, como por exemplo a titulação dos ácidos graxos presentes na amostra. Todavia, outros fungos como *P. roqueforti* e *P. camemberti*, também utilizados na maturação de alguns queijos, produzem lipases alcalinas extracelulares com atividade ótima em pH 9,0 (RATTRAY; EPPERT, 2021).

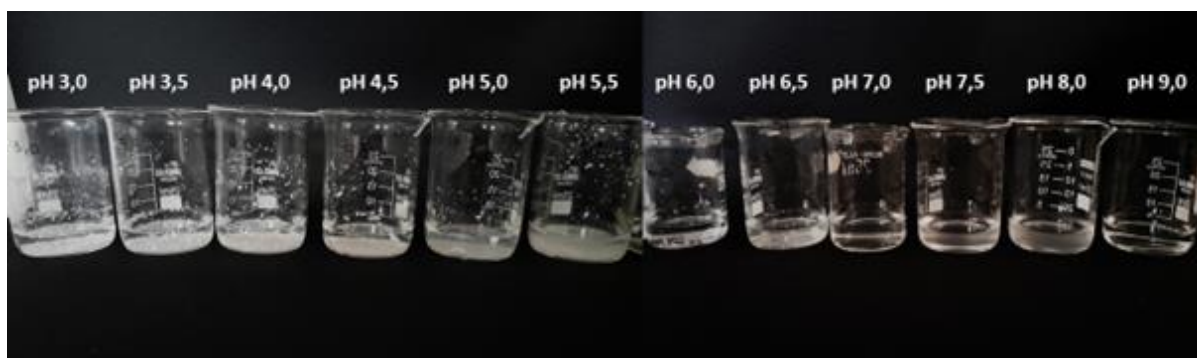


Figura 7 - Precipitação do desoxicolato de sódio em diferentes valores de pH, variando de 3,0 a 9,0. Fonte: autoria própria.

4.2. Curvas de cultivo

Com os protocolos de ensaios enzimáticos padronizados, objetivou-se, na etapa seguinte, determinar a evolução das atividades proteolítica e lipolítica durante os dias de incubação. Para isto, os mini-queijos em placas de 24 poços foram inoculados com esporos de *G. candidum* FERM-GC-31 (Figura 5A). O aparecimento do micélio foi observado na superfície do modelo de queijo a partir do 4º dia após a inoculação; este foi, portanto, considerado o dia inicial para coleta de amostras e preparo do extrato bruto enzimático a ser utilizado nas reações. Os resultados gerais para ambas as enzimas podem ser observados na Tabela 1.

Inicialmente, os ensaios de atividade proteolítica foram padronizados da seguinte maneira: 250 µL de tampão pH 5,5 e 9,0 contendo azocaseína e acrescidos de 150 µL do extrato bruto enzimático; 600 µL de TCA 20% foram adicionados para paralisar a reação a 45°C após 30 minutos, com retirada de amostras diariamente com início no 4º dia após inoculação (marcando o primeiro dia de aparecimento do micélio na superfície) e até completar 20 dias a partir do inóculo, totalizando 16 dias de

amostragem. No entanto, devido à alta atividade proteolítica, as leituras de absorbância ultrapassaram o limite de detecção do espectrofotômetro a partir do segundo dia. Dessa forma, o extrato enzimático foi diluído em 20 vezes, de maneira que os ensaios foram conduzidos da seguinte forma: 142,5 µL de água destilada acrescido de 250 µL tampão (pH 5,5 e 9,0) e 7,5 µL de extrato enzimático; para paralisar a reação, foram adicionados 600 µL de TCA 20%.

Tabela 1 - Valores de absorbância obtidos para as reações de protease e lipase durante a curva de cultivo (o dia 1 é referente ao início da amostragem, após a visualização do micélio fúngico). Para protease, a partir do dia 2, os valores de absorbância foram obtidos pela multiplicação por um fator de diluição de 20 vezes.

Dias de cultivo após o aparecimento do micélio	Protease		Lipase
	Abs ₃₆₆		Abs ₄₁₀
	pH 5,5	pH 9,0	pH 9,0
0	0,3274	0,429	0,5611
1	0,6185	0,8516	0,6367
2	7,0466	7,5155	0,6842
3	9,7133	11,5222	0,8834
4	6,5022	11,2155	0,6644
5	10,2644	12,6466	0,6491
6	13,6666	14,5044	0,6846
7	15,2933	14,9955	0,7773
8	15,1733	15,8111	0,854
9	14,2755	13,8711	0,9403
10	16,7955	16,3422	0,8097
11	15,6666	16,6933	0,8576
12	17,8933	17,4	0,8882
13	18,6511	18,14	1,1486
14	16,7866	17,5333	0,7124
15	21,9555	21,4733	1,1892
16	21,0488	19,14	1,0197

Conforme observado na Tabela 1, no primeiro dia houve uma ligeira atividade de proteases, tanto para o teste em pH 5,5 quanto 9,0. Esse resultado pode estar relacionado à atividade residual da quimosina e da plasmina. A primeira é a enzima presente no coagulante utilizado na produção dos mini-queijos, de forma que sua atividade residual pode ter se iniciado no início da incubação, uma vez que diminui com o aumento do pH resultante do crescimento do fungo (BOUTROU; KERRIOU; GASSI, 2006). Já a plasmina é uma enzima presente naturalmente no leite, resistente ao tratamento térmico, tendo sua atividade ótima em valores de pH entre 7,5 e 8,0 (ISMAIL; NIELSEN, 2010). Já para as lipases, também foram observadas leituras de absorbância que poderiam indicar atividade enzimática no dia inicial, no entanto, diferentemente das proteases, este valor pode estar relacionado à turvação do meio reacional causado pela baixa solubilidade do p-NPP em solução aquosa. Devido a isso, para os cálculos de unidade enzimática de lipases, assim como de proteases, o valor do dia zero foi descontado dos demais valores, no intuito de eliminar essas influências sobre a quantificação de atividades proteolítica e lipolítica.

Sendo assim, os resultados para os ensaios de proteases estão apresentados na Figura 8. Como pode-se observar, *G. candidum* FERM-GC-31 apresentou alta atividade proteolítica, de forma que, sua atividade total alcançou o máximo de quase 19.000 U/mL no 15º dia de crescimento na matriz. Cabe salientar, contudo, que a atividade enzimática de *G. candidum* em queijos deve ser devidamente controlada, de maneira a se evitar proteólise intensa e, conseqüentemente, prejudicar a aparência do produto. Um defeito bastante comum em queijos com crescimento excessivo de *G. candidum* decorrente de baixa concentração de sal consiste no chamado efeito “pele de sapo” (SPINNLER, 2017). Em queijo Brie e Camembert, por exemplo, a proteólise intensa modifica a aparência do queijo, conferindo-lhe uma superfície de aspecto irregular e escorregadio, indesejável e percebida de maneira negativa pelos consumidores (BOARI et al., 2022).

Além disso, considerando que *G. candidum* é conhecido pela não assimilação de lactose como fonte de carbono, preconiza-se que este isolado possa ter utilizado, então, proteínas como fonte de carbono para o seu crescimento inicial, como é descrito por Adour et al. (2002), demonstrando que, em um meio contendo apenas peptonas e ácido láctico como fonte de carbono e nitrogênio, *G. candidum* tem preferência pelo consumo das peptonas como fonte de carbono. No entanto, assim como foi feito no trabalho de Boutrou, Aziza e Amrane (2006), neste trabalho não foi

inoculado nenhum outro microrganismo que pudesse atuar sobre as caseínas deixando os peptídeos disponíveis para assimilação de *G. candidum*. Dessa forma, infere-se que o fungo em questão pode ter participado da proteólise primária das caseínas para a utilização como fonte de carbono e nitrogênio, produzindo então proteases com pH ótimo em torno de 5,5, como foi identificado no teste de pH. Além disso, *G. candidum* FERM-GC-31 também pode estar envolvido na proteólise secundária, visto que é descrito a sua produção de peptidases com pH ótimo entre 6,5 e 9,5 (BOUTROU; AZIZA; AMRANE 2006), convergindo para a identificação de proteases alcalinas deste trabalho com pH ótimo equivalente a 9,0.

Ademais, é importante considerar que *G. candidum* tem um efeito de alcalinização do queijo, favorecendo a atuação de enzimas alcalinas como as que foram detectadas nos ensaios enzimáticos deste estudo. Essa alcalinização ocorre devido ao consumo de lactato como fonte de carbono e energia e também à produção de metabólitos alcalinos, como a amônia. No caso deste trabalho, microrganismos produtores de ácido láctico não foram inoculados no modelo de queijo, então a alcalinização se daria pela produção de amônia, principalmente (LESSARD et al., 2014). Lessard et al. (2014) demonstraram, através de um metatranscriptoma de queijo tipo Camembert, que *G. candidum* tem mais transcritos relacionados à produção de amônia do que *P. camemberti*, através do catabolismo da metionina pelas vias de Ehrlich e a de eliminação. Somado a isso, durante a via de Ehrlich, *G. candidum* libera amônia através da desaminação do glutamato em α -cetoglutarato, reação catalisada pela enzima NAD-glutamato desidrogenase. Uma vez que α -cetoglutarato é um intermediário do Ciclo do Ácido Cítrico, é plausível associar a presença dessa via no metabolismo de *G. candidum*, mais uma vez, com a utilização de peptídeos e aminoácidos para crescimento celular e obtenção de energia.

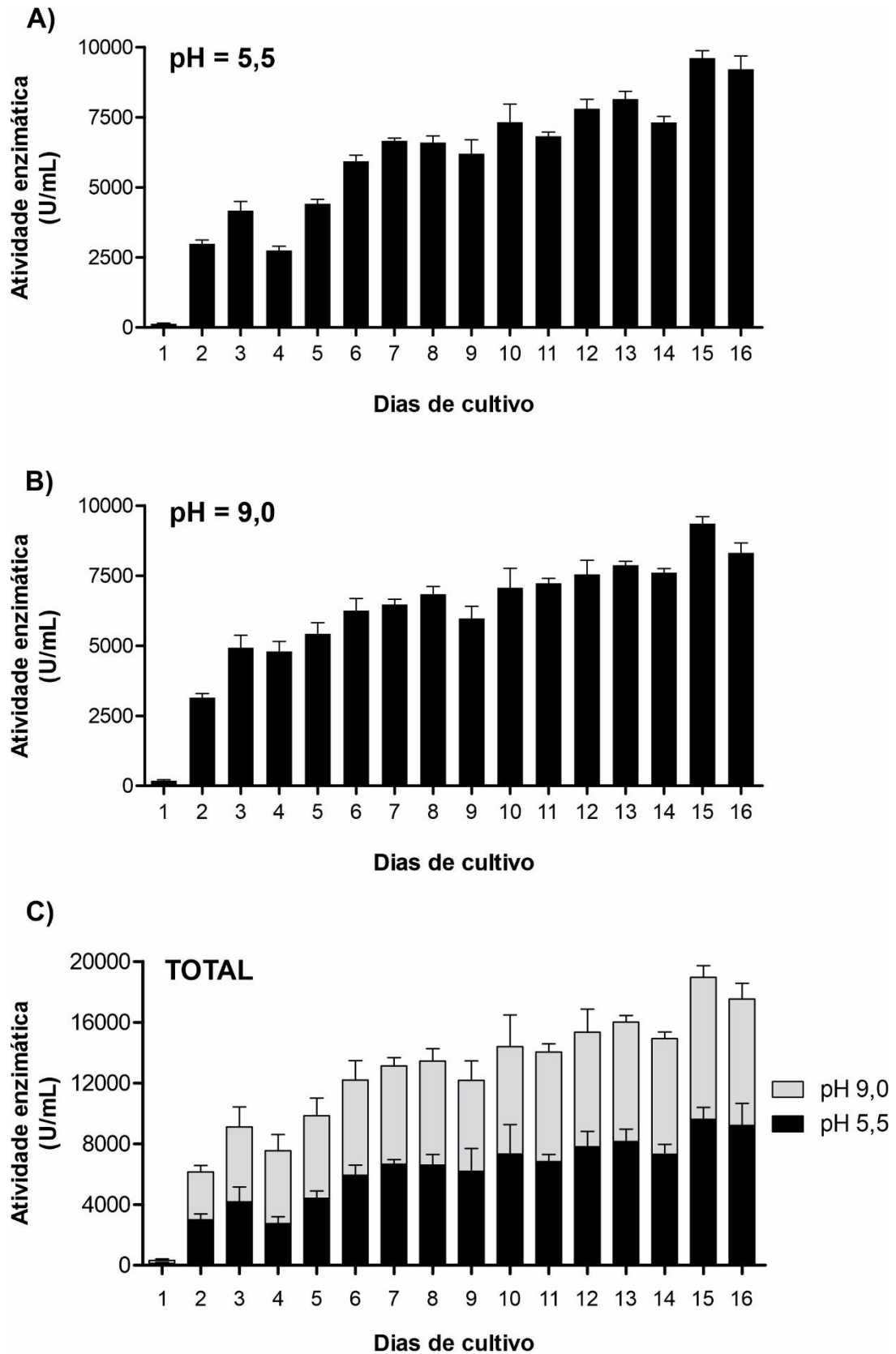


Figura 8 - Curvas de cultivo para proteases de *G. candidum* FERM-GC-31 em meio reacional pH 5,5 (A), em meio reacional 9,0 (B), e atividade enzimática total em ambos os meios reacionais. Fonte: autoria própria.

Já para a determinação da curva de cultivo para lipase, foi utilizada a reação padronizada consistindo de 500 µL de água destilada, 450 µL de tampão pH 9,0 contendo desoxicolato de sódio 0,2% (m/v) e goma arábica 0,1% (m/v), 50 µL do substrato p-NPP e 25 µL do extrato bruto enzimático. Para a quantificação da atividade enzimática, foi construída uma curva padrão com base no produto da reação catalisada pelas lipases. Neste caso, como o substrato utilizado foi o p-NPP, o produto quantificado foi o p-NP, composto cromóforo de coloração amarela. Para a curva padrão foi utilizado o p-NP comercial nas concentrações de 0, 100, 500, 1000, 2000, 3000 e 3500 µM. Esta curva pode ser observada na figura 9, com a respectiva equação determinada.

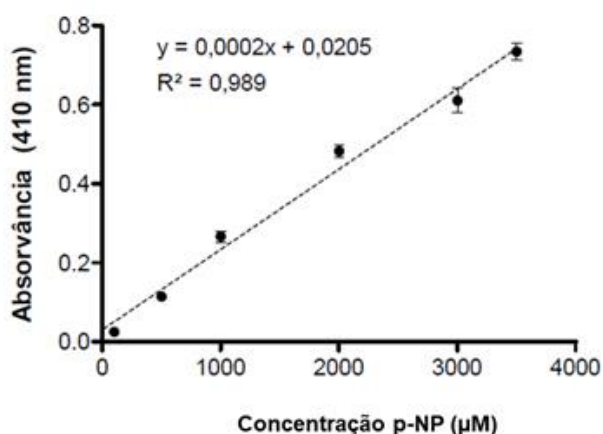


Figura 9 - Curva padrão de p-nitrofenol (p-NP) com as concentrações variando de 0 a 3500 µM. Fonte: autoria própria.

A partir da equação obtida pela curva de p-NP, calculou-se a concentração do produto liberada em cada ensaio, mensurando-se, assim, a atividade de lipases presentes no extrato, de forma que a atividade máxima encontrada foi referente ao 15º dia em um total de 6.076,11 U/mL (Figura 10).

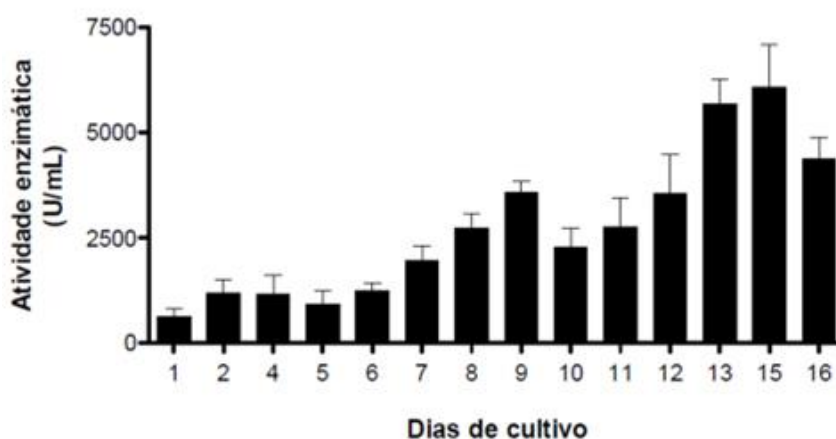


Figura 10 - Curva de cultivo para lipases de *G. candidum* FERM-GC-31. Fonte: autoria própria.

É possível que os resultados para lipases possam estar subestimados devido à uma competição pelo sítio catalítico da enzima por ácidos graxos livres (AGL) presentes na matriz, derivados da própria lipólise. Essa consiste em uma das limitações do método utilizado para detecção com substratos cromogênicos derivados de ésteres de p-nitrofenil, que apesar disso, é considerado um método rápido, fácil e amplamente utilizado, ainda que para amostras complexas, como queijos, apresente esta limitação (BLAKE; KOKA; WEIMER, 1996). Em matrizes lácteas, quanto maior a concentração de gordura, maior a possibilidade de competição pelo sítio catalítico, dada a maior taxa de lipólise e, conseqüentemente, maior liberação de AGL (Mckellar; Cholette, 1986). Esse problema pode ser parcialmente contornado com a centrifugação das amostras antes do ensaio visando à remoção de gordura. Contudo, ainda se observa perda de lipases, interferindo no resultado final.

Estudo desenvolvido por Li et al. (2020) avaliou o efeito da maturação, por *G. candidum*, de um queijo desenvolvido à base de leite de soja sobre os atributos sensoriais do produto. Foram avaliadas temperaturas de maturação de 4 °C, 10 °C e 15 °C durante diferentes tempos de maturação (21, 28 e 35 dias). Queijos maturados por 10 °C durante 28 dias apresentaram as maiores notas de aceitação sensorial. Assim como estes, os queijos maturados por 21 dias a 15 °C com *G. candidum* demonstraram extensa ação proteolítica e lipolítica, maiores que nas amostras maturadas a 4 °C; assim, o aumento da temperatura foi útil para diminuir o tempo de maturação do produto, nas condições avaliadas. Em contrapartida, as amostras maturadas por 35 dias a 10 ou 15 °C não foram consideradas aceitáveis, pois

apresentaram níveis muito elevados de proteólise e lipólise, e, conseqüentemente, sabores amargos e amoniacais, bem como o defeito conhecido como “pele de sapo”, decorrente do crescimento excessivo de *G. candidum*. Assim, a atividade das enzimas de *G. candidum* em temperaturas ao redor de 12°C pode gerar produtos com boa aceitação do consumidor, considerando-se o tempo de maturação.

4.3. Teste de antagonismo

Considerando-se o potencial de aplicação do isolado de *G. candidum* FERM-GC-31 em produtos lácteos, como queijos e leite fermentado *villi*, produto de origem nórdica, avaliou-se se existe uma relação de antagonismo entre BAL comumente utilizadas na fermentação destes produtos e o isolado fúngico. Na Tabela 2 podem ser observados os valores médios dos diâmetros das colônias do fungo (em mm) nos diferentes tratamentos, bem como no controle. Além disso, o padrão de crescimento do isolado junto às BAL pode ser observado na Figura 11.

Tabela 2 - Medidas do crescimento de *G. candidum* em análise de antagonismo com *L. lactis* subsp. *lactis* e *L. lactis* subsp. *cremoris*.

Tratamentos	Diâmetro médio (mm)	Inibição do crescimento (%)
Controle	53,13	-
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	49,23	7,34
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	38,0	28,48

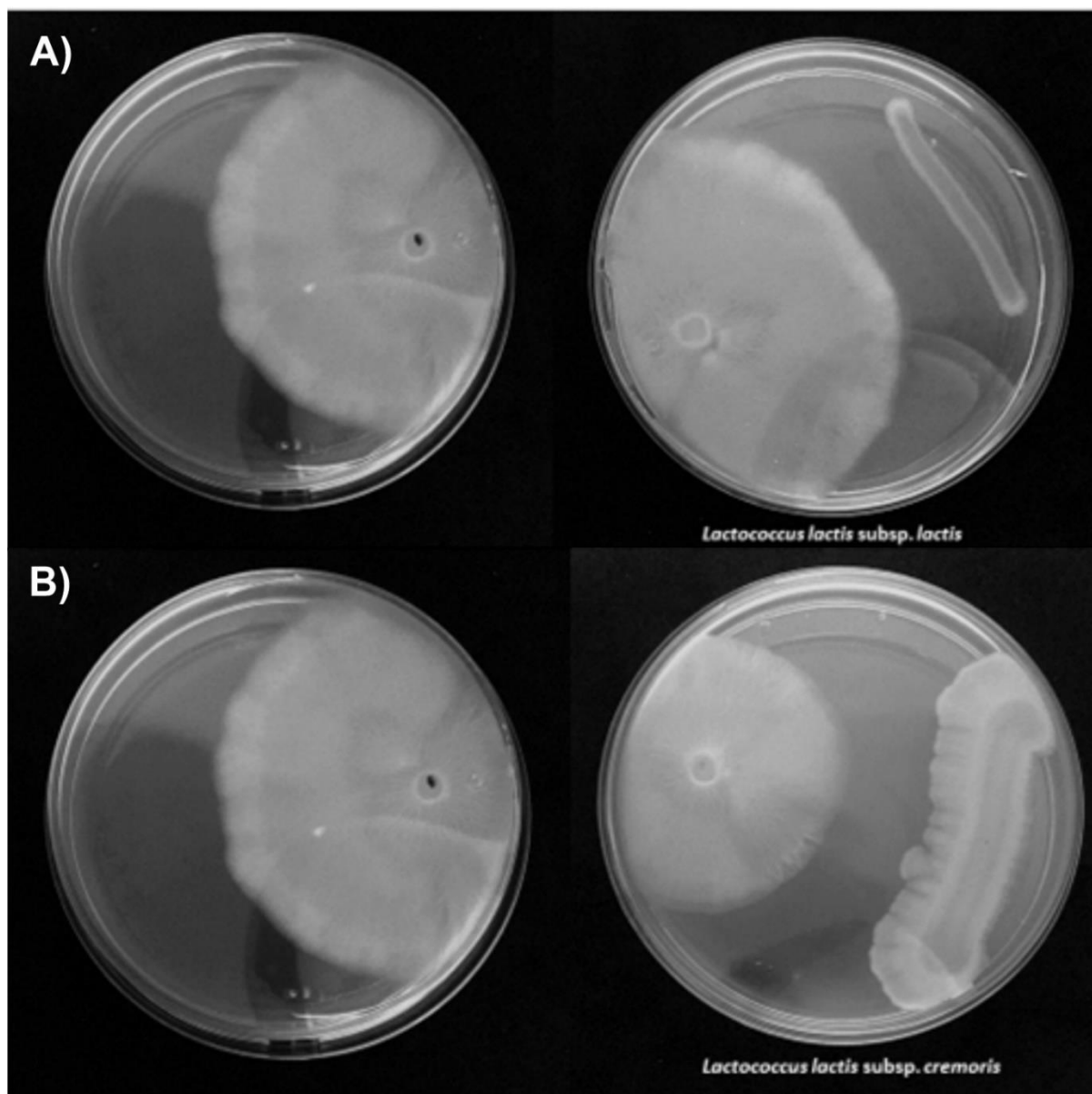


Figura 11 - Crescimento de *G. candidum* FERM-GC-31 durante teste de antagonismo. (A) Placa controle contendo apenas o fungo (à esquerda) e placa contendo o fungo inoculado ao lado de *L. lactis* subsp. *lactis*; (B) Placa controle contendo apenas o fungo (à esquerda) e placa contendo *G. candidum* FERM-GC-31 inoculado ao lado de *L. lactis* subsp. *cremoris*. Fonte: autoria própria.

A produção de compostos antimicrobianos, como bacteriocinas, ácidos orgânicos, dentre outras moléculas, por BAL é bem conhecida (MUN et al., 2019). Para este trabalho, o antagonismo foi avaliado apenas contra duas espécies de BAL, tendo em vista sua aplicação como fermento em vários tipos de produtos lácteos. A atividade antifúngica de BAL se deve, de forma geral, à produção de ácidos orgânicos, como o láctico, acético, caproico, ácidos graxos 3-hidroxi, reuterina, peróxido de hidrogênio, ácido fenilático e dipeptídeos cíclicos (REIS et al., 2012).

O trabalho de Gajbhiye; Kapadnis (2021) demonstrou, inclusive, a produção de ácido tetradecanoico e ciclo dipeptídeo (Leu-Pro) por *L. lactis* subsp. *cremoris*, compostos com atividade antifúngica. Essas moléculas se mostraram dependentes do pH, com atividade antifúngica máxima entre pH 5,5 e 6,5 a 30°C, e também foram sensíveis a temperaturas mais elevadas, além de serem resistentes à atividade de proteases.

Neste trabalho, *L. lactis* subsp. *cremoris* apresentou maior inibição do crescimento de *G. candidum* FERM-GC-31. No entanto, *L. lactis* subsp. *cremoris* apresentou um crescimento mais significativo do que *L. lactis* subsp. *lactis* (Figura 11), o que pode ter interferido na inibição do crescimento de *G. candidum* FERM-GC-31 também por competição nutricional. Apesar de ambas as bactérias terem sido incubadas durante 48 horas antes da inoculação do fungo, a temperatura ótima de crescimento de *L. lactis* subsp. *cremoris* ATCC 19247 é 26°C, muito próxima à temperatura ótima do crescimento do fungo, 25°C. Enquanto que *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 19435 tem temperatura ótima a 37°C com atmosfera de 95% ar e 5% de CO₂; assim, estes fatores podem ter interferido no desenvolvimento da bactéria e, conseqüentemente, na produção de moléculas inibidoras do crescimento de *G. candidum*.

Alguns queijos, assim como o *viili*, utilizam *L. lactis* subsp. *lactis* e *L. lactis* subsp. *cremoris* como parte de suas culturas *starter* para fermentação. No primeiro caso, o uso destas culturas já é tradicionalmente associado ao *G. candidum*, e não inibem, portanto, o desenvolvimento do fungo (BAKRY; CAMPELO, 2018). Já foram testadas diversas espécies de BAL e propionibactérias contra o crescimento de *G. candidum*, *Y. lipolytica*, *P. commune* e *Mucor racemosus* (SALAS et al., 2018). Os referidos autores avaliaram diferentes combinações entre espécies do gênero *Lactobacillus* (*L. plantarum*, *L. brevis*, *L. rhamnosus*, *L. harbinensis*) em modelos de iogurte e queijos produzidos de maneira similar ao presente estudo, assim como a atividade antifúngica destas e de outras espécies de BAL isoladamente. *G. candidum*, assim como *Y. lipolytica* foram mais resistentes a todas as atividades antifúngicas testadas, de forma que, quando ocorreu a inibição, foi em níveis leves ou muito baixos.

Contudo, muitas moléculas com ação antifúngica produzidas por BAL atuam sinergicamente (CROWLEY; MAHONY; VAN SINDEREN, 2013). Dessa forma, comprovando-se a produção desse tipo de molécula, a aplicação do isolado de *G. candidum* FERM-GC-31 em conjunto com os respectivos fermentos não resultaria em

inibição completa do fungo. Ademais, sua produção de moléculas alcalinas e assimilação do lactato do meio resultariam em aumento do pH da matriz láctea, reduzindo os efeitos da ação antifúngica via produção de ácidos orgânicos. Essa relação poderá ser avaliada por estudos futuros complementares.

5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, conclui-se que *G. candidum* FERM-GC-31 isolado de queijo artesanal da Canastra produz enzimas proteolíticas e lipolíticas quando inoculado em matriz láctea, com manutenção das atividades enzimáticas durante o período de incubação nas condições avaliadas. Houve expressiva atividade proteolítica, mais significativa que a lipolítica, possivelmente devido à utilização de proteínas e peptídeos como fontes de carbono e nitrogênio, visto que a espécie *G. candidum* não assimila lactose. No entanto, a metodologia utilizada para detecção da atividade lipolítica mostrou-se limitada para a matriz em questão, de forma que os resultados obtidos possam estar subestimados. Ademais, *G. candidum* FERM-GC-31 sofreu maior inibição do seu crescimento por *L. lactis* subsp. *cremoris* em meio de cultivo; a repetição do teste em matriz láctea pode providenciar uma melhor avaliação do fenômeno do antagonismo na presença das referidas bactérias lácticas no substrato fermentativo. *G. candidum* FERM-GC-31 demonstrou-se como um potencial inóculo para produtos lácteos fermentados, a exemplo de queijos e de leite fermentado tipo *villi*. Considerando-se que o nível de proteólise deve ser controlado de maneira a se garantir a qualidade sensorial do produto final, o controle do crescimento de *G. candidum* na matriz do alimento deve ser melhor investigada. A análise, em etapas futuras, da hidrólise das frações de caseínas por SDS-PAGE, bem como a utilização de técnicas como a de titulação de ácidos graxos, poderá prover uma análise mais acurada acerca da atividade lipolítica em produtos lácteos.

6. REFERÊNCIAS

- ADOUR, L. et al. Growth of *Geotrichum candidum* and *Penicillium camembertii* in liquid media in relation with the consumption of carbon and nitrogen sources and the release of ammonia and carbon dioxide. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 4, p. 533–542, 2002.
- ANELLI, P. et al. Fungal mycobiota and mycotoxin risk for traditional artisan Italian cave cheese. **Food Microbiology**, v. 78, p. 62–72, 2019.
- ARAGÃO, M. **Diversidade de fungos filamentosos e leveduras em Queijo Minas Artesanal das microrregiões do Serro e Serra da Canastra**. 2018. Dissertação (Micologia de Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, 2018.
- BAKRY, A. M.; CAMPELO, P. H. Mini-Review on Functional Characteristics of Viili and Manufacturing Process. **iMedPub Journals**, v. 2, n. May, p. 3–8, 2018.
- BLAKE, M. R.; KOKA, R.; WEIMER, B. C. A Semiautomated Reflectance Colorimetric Method for the Determination of Lipase Activity in Milk. **Journal of Dairy Science**, v. 79, n. 7, p. 1164–1171, 1996.
- BOARI, C.A.; FREITAS, R.; MARTINS, E.; CARVALHO, A.F. Microbiologia da fermentação de queijos. In: MARTIN, J.G.P; LINDNER, J.D.D. Microbiologia de Alimentos Fermentados. São Paulo: Editora Blucher, 2022, p. 249-276.
- BOUTROU, R.; AZIZA, M.; AMRANE, A. Enhanced proteolytic activities of *Geotrichum candidum* and *Penicillium camembertii* in mixed culture. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 325–331, 2006.
- BOUTROU, R.; KERRIOU, L.; GASSI, J. Y. Contribution of *Geotrichum candidum* to the proteolysis of soft cheese. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 7, p. 775–783, 2006.
- BRABCOVÁ, J. et al. Highly selective purification of three lipases from *Geotrichum candidum* 4013 and their characterization and biotechnological applications. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 98, p. 62–72, 2013.
- CAMARGO, A. C. et al. Microbial shifts through the ripening of the “Entre Serras” Minas artisanal cheese monitored by high-throughput sequencing. **Food Research International**, v. 139, p. 109803, 2021.
- CARDINALI, F. et al. Microbial communities and volatile profile of Queijo de Azeitão PDO cheese, a traditional Mediterranean thistle-curdled cheese from Portugal. **Food Research International**, v. 147, n. June, 2021.
- CARNEIRO, J. DE O. et al. Artisan minas cheese of Serro: proteolysis during ripening. **Heliyon**, v. 6, n. 7, p. e04446, 2020.

CHEN, L.; DANIEL, R. M.; COOLBEAR, T. Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. **International Dairy Journal**, v. 13, n. 4, p. 255–275, 2003.

CHRISTENSEN, A. B. et al. Quorum-sensing-directed protein expression in *Serratia proteamaculans* B5a. **Microbiology**, v. 149, n. 2, p. 471–483, 2003.

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

CROWLEY, S.; MAHONY, J.; VAN SINDEREN, D. Current perspectives on antifungal lactic acid bacteria as natural bio-preservatives. **Trends in Food Science and Technology**, v. 33, n. 2, p. 93–109, 2013.

DE SOUZA, T. P. et al. Mycobiota of Minas artisanal cheese: Safety and quality. **International Dairy Journal**, v. 120, p. 105085, 2021.

DUFOUR, D. et al. Molecular typing of industrial strains of *Pseudomonas* spp. isolated from milk and genetical and biochemical characterization of an extracellular protease produced by one of them. **International Journal of Food Microbiology**, v. 125, n. 2, p. 188–196, 2008.

ELISKASES-LECHNER, F.; GUÉGUEN, M.; PANOFF, J. M. Yeasts and Molds: *Geotrichum candidum*. **Encyclopedia of Dairy Sciences**: Second Edition, p. 765–771, 2011.

FREITAS, A. D. G. et al. Atividade antagonista de bactérias endofíticas de plantas da amazônia contra o fungo simbionte *L. gongylophorus*, e dos fungos associados presentes nos ninhos de *Atta sexdens*. **Scientia Amazonia**, v. 5, n. 1, p. 1–14, 2016.

GAJBHIYE, M.; KAPADNIS, B. *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* of Plant Origin Produces Antifungal Cyclo-(Leu-Pro) and Tetradecanoic Acid. **Indian Journal of Microbiology**, v. 61, n. 1, p. 74–80, 2021.

GARNIER, L. et al. Technical note: High-throughput method for antifungal activity screening in a cheese-mimicking model. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 6, p. 4971–4976, 2018.

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

ISMAIL, B.; NIELSEN, S. S. Invited review: Plasmin protease in milk: Current knowledge and relevance to dairy industry. *Journal of Dairy Science*, v. 93, n. 11, p. 4999–5009, 2010.

ISIDORO, W. R. **Caracterização da microbiota de queijos artesanais provenientes da Serra da Canastra – MG e da cultura iniciadora natural utilizada em sua produção**. 2019. Dissertação (Ciência dos Alimentos - Bromatologia) -

Departamento de Farmácia, Universidade de São Paulo, SP, 2019.

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

KUMURA, H. et al. Lipase and protease production of dairy *Penicillium* sp. on milk-protein-based solid substrates. **International Journal of Dairy Technology**, v. 72, n. 3, p. 403–408, 2019.

LAURENČÍK, M. et al. The diversity of eukaryotic microbiota in the traditional Slovak sheep cheese - Bryndza. **International Journal of Food Microbiology**, v. 127, n. 1–2, p. 176–179, 2008.

LESSARD, M. H. et al. The composition of camembert cheese-ripening cultures modulates both mycelial growth and appearance. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 6, p. 1813–1819, 2012.

LESSARD, M. H. et al. Metatranscriptome analysis of fungal strains *Penicillium camemberti* and *Geotrichum candidum* reveal cheese matrix breakdown and potential development of sensory properties of ripened Camembert-type cheese. **BMC Genomics**, v. 15, p. 1–13, 2014.

LI, Y. et al. Influence of the addition of *Geotrichum candidum* on the microbial, chemical, textural, and sensory features of soft soy cheese. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 44, n. 11, p. 1–11, 2020.

MACHADO, S.G.; FREITAS, R. Leites fermentados. In: MARTIN, J.G.P; LINDNER, J.D.D. Microbiologia de Alimentos Fermentados. São Paulo: Editora Blucher, 2022, p. 223-248

MARCELLINO, N. et al. Diversity of *Geotrichum candidum* Strains Isolated from Traditional Cheesemaking Fabrications in France. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 10, p. 4752–4759, 2001.

MARÍN, P.; PALMERO, D.; JURADO, M. Occurrence of moulds associated with ovine raw milk and cheeses of the Spanish region of Castilla La Mancha. **International Journal of Dairy Technology**, v. 68, n. 4, p. 565–572, 2015.

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, 2015.

MCKELLAR, R. C.; CHOLETTE, H. Determination of the extracellular lipases of *Pseudomonas fluorescens* spp. in skim milk with the beta-naphthyl caprylate assay. **The Journal of dairy research**, v. 53, n. 2, p. 301–312, 1986.

MCSWEENEY, P. L. H. Biochemistry of Cheese Ripening. **International Journal of Dairy Technology**, v. 1, n. 2, p. 127–144, 2004.

MINAS GERAIS. Instituto Mineiro de Agropecuária - IMA. **Portaria IMA Nº 2051, de 7 de abril de 2021**. Define o período de maturação do Queijo Minas Artesanal produzido nas microrregiões de Araxá, Campo das Vertentes, Canastra, Cerrado, Serra do Salitre, Serro e Triângulo Mineiro. IMA, Belo Horizonte, 2021.

MINAS GERAIS. Instituto Mineiro de Agropecuária - IMA. **Portaria IMA Nº 2141, de 19 de abril de 2022**. Identifica a Região Entre Serras da Piedade ao Caraça como produtora de Queijo Minas Artesanal. IMA, Belo Horizonte, 2022.

MINAS GERAIS. Decreto 48024, de 19 de agosto de 2020. Regulamentação da Lei nº 23.157, de 18 de dezembro de 2018, que dispõe sobre a produção e a comercialização dos queijos artesanais de Minas Gerais. **Diário Oficial do Estado de Minas Gerais**, Brasil, 20 de agosto de 2020.

MUHAMMAD, A. et al. Purification, characterization and thermodynamic assessment of an alkaline protease by *Geotrichum candidum* of dairy origin. **Iranian Journal of Biotechnology**, v. 17, n. 2, p. 30–37, 2019.

MUN, S. Y. et al. Purification and characterization of an antimicrobial compound produced by *Lactobacillus plantarum* EM showing both antifungal and antibacterial activities. **Lwt**, v. 114, n. April, p. 108403, 2019.

OZTURKOGLU-BUDAK, S. et al. Protease and lipase activities of fungal and bacterial strains derived from an artisanal raw ewe's milk cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 237, p. 17–27, 2016.

PACHECO, T. F.; MENDES, T. D. Guia prático para caracterização de enzimas. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa**, p. 1–61, 2021.

PAPADEMAS, P. et al. Conventional and omics approaches shed light on Halitzia cheese, a long-forgotten white-brined cheese from Cyprus. **International Dairy Journal**, v. 98, p. 72–83, 2019.

PENLAND, M. et al. Linking Pélardon artisanal goat cheese microbial communities to aroma compounds during cheese-making and ripening. **International Journal of Food Microbiology**, v. 345, n. March, 2021.

PINEDA, A. P. A. et al. Brazilian Artisanal Cheeses: Diversity, Microbiological Safety, and Challenges for the Sector. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, n. April, 2021.

RATTRAY, F. P.; EPPERT, I. Secondary cultures. **Encyclopedia of Dairy Sciences: Third edition**, v. 3, p. 336–342, 2021.

REIS, J. A. et al. Lactic Acid Bacteria Antimicrobial Compounds: Characteristics and Applications. **Food Engineering Reviews**, v. 4, n. 2, p. 124–140, 2012.

SALAS, M. L. et al. Antifungal activity of lactic acid bacteria combinations in dairy mimicking models and their potential as bioprotective cultures in pilot scale applications. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. AUG, p. 1–18, 2018.

SALGADO, C. A. et al. Identification and characterization of a polyurethanase with lipase activity from *Serratia liquefaciens* isolated from cold raw cow's milk. **Food Chemistry**, v. 337, n. September 2020, p. 127954, 2021.

SCHORNSTEINER, E. et al. Cultivation-independent analysis of microbial communities on Austrian raw milk hard cheese rinds. **International Journal of Food Microbiology**, v. 180, p. 88–97, 2014.

SEONG, C. N. et al. Production, purification, and characterization of a novel thermostable serine protease from soil isolate, *Streptomyces tendae*. **Biotechnology Letters**, v. 26, n. 11, p. 907–909, 2004.

SPINNLER, H.-E., 2017. Surface Mold–Ripened Cheeses, in: Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology: Fourth Edition. **Elsevier**, v. 1, p. 911–928, 2017

SUGIHARA, A.; SHIMADA, Y.; TOMINAGA, Y. Separation and characterization of two molecular forms of *Geotrichum candidum* lipase. **Journal of Biochemistry**, v. 107, n. 3, p. 426–430, 1990.

YAZGAN, N. N. et al. A high sensitive assay platform based on surface-enhanced Raman scattering for quantification of protease activity. **Talanta**, v. 82, n. 2, p. 631–639, 2010.

WOLFE, B.E. et al. Cheese Rind Communities Provide Tractable Systems for In Situ and In Vitro Studies of Microbial Diversity. **Cell**, v. 158, n. 2, p422–433, 2014.

WU, S. et al. Influence of *Monascus purpureus* BD-M-4 on the physicochemical properties, proteolysis and volatile compounds of surface mould-ripened cheese. **Food Science and Biotechnology**, v. 28, n. 1, p. 129–138, 2019.