

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Mariana Freitas Cardoso

**Identificação e quantificação de fungos em queijo colonial utilizando a região ITS1 do
gene ITS**

Florianópolis

2021

Mariana Freitas Cardoso

**Identificação e quantificação de fungos em queijo colonial utilizando a região ITS1 do
gene ITS**

Trabalho Conclusão do Curso de Graduação em
Ciência e Tecnologia de Alimentos do Centro de
Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa
Catarina como requisito para a obtenção do título de
Bacharel em Ciência e Tecnologia de Alimentos
Orientador: Prof^ª. Dra. Silvani Verruck

Florianópolis

2021

Ficha de identificação da obra

Cardoso, Mariana

Identificação e quantificação de fungos em queijo colonial utilizando a região ITS1 do gene ITS / Mariana Cardoso ; orientador, Silvani Verruck, 2021.

55 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

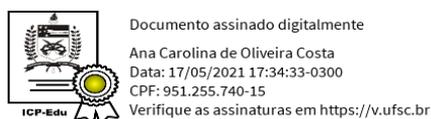
1. Ciência e Tecnologia de Alimentos. 2. metagenômica. 3. queijo artesanal. 4. sequenciamento genético. 5. leveduras. I. Verruck, Silvani. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. III. Título.

Mariana Freitas Cardoso

**Título: Identificação e quantificação de fungos em queijo colonial utilizando a região
ITS1 do gene ITS**

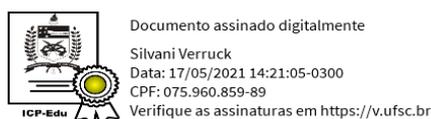
Este Trabalho Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de “Bacharel em Ciência e Tecnologia de Alimentos” e aprovado em sua forma final pelo Curso

Florianópolis, 04 de maio de 2021

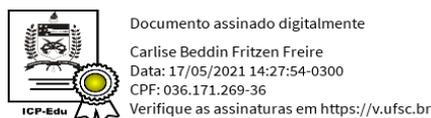


Prof.^a Dr.^a Ana Carolina de Oliveira Costa
Coordenador do Curso

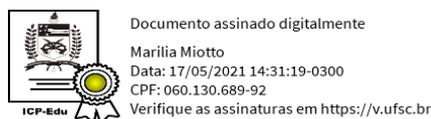
Banca Examinadora:



Prof.^a Dr.^a Silvani Verruck
Orientador(a)
Universidade Federal de Santa Catarina



Prof.^a Dr.^a Carlise Beddin Fritzen Freire
Avaliador(a)
Universidade Federal de Santa Catarina



Prof.^a Dr.^a Marília Miotto
Avaliador(a)
Universidade Federal de Santa Catarina

Dedico este trabalho ao meu avô José Mário de Oliveira Freitas, *in memoriam*, que me apresentou aos queijos artesanais, sobretudo ao seu legado de profissional exemplar e entusiasta da ciência. Os encontros vespertinos em que sentávamos para tomar café e comer queijo, fazem-me muita falta.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida.

À minha orientadora Prof^a. Dr.^a Silvani Verruck pela enorme dedicação e paciência durante todo o período de realização deste trabalho.

À minha família pelo apoio e amor incondicional.

À Vanessa Rava pela linda amizade que cultivamos.

Às amigas de longa data que guardo sempre com muito carinho, em especial Júlia e Luiza.

Ao Eduardo pela compreensão, paciência e amor.

Às colegas de curso pela força e pelos desabafos.

À Prof^a. Dr.^a Marília Miotto por colaborar na realização das análises.

Aos demais professores pelas ricas contribuições ao longo desta jornada.

Ao Jonas por toda ajuda durante o período da graduação.

À Neoprosecta pela realização das análises.

À Universidade Federal de Santa Catarina pelo ensino de qualidade.

RESUMO

O queijo artesanal colonial é um dos produtos típicos da região sul do Brasil muito apreciado inclusive por turistas, e é definido como aquele obtido pela coagulação do leite bovino por meio do coalho e/ou outras enzimas coagulantes. Sabe-se que este tipo de alimento abriga uma complexa comunidade microbiana. Por isso, este trabalho teve por objetivo avaliar a microbiota fúngica presente em queijos artesanais, através do uso de sequenciamento genético das populações presentes no alimento. Para a identificação de bolores e leveduras a amplificação foi gerada com primers para a região ITS1, primer ITS1 (GAACCGCGGARGGATCA) e primer ITS2 (GCTGCGTTCTTCATCGATGC). O equipamento utilizado para sequenciar as bibliotecas foi o MiSeq Sequencing System (Illumina Inc., USA) e o kit V2, com 300 ciclos e sequenciamento single-end. As análises das sequências foram realizadas por meio do pipeline Sentinel. Foram identificadas um total de 19 espécies de leveduras, sendo *Diutina catenulata*, *Clavispora lusitaniae*, *Kodamaea ohmeri*, *Kluyveromyces marxianus* e *Candida ethanolica* as que apresentaram maior número de reads na amostra de queijo colonial. Uma vez que o queijo representa um ambiente propício para o crescimento de microrganismos, a presença de leveduras não é inesperada. As atividades lipolítica e proteolítica destes microrganismos contribuem para formação de produtos diretamente ligados ao aroma, sabor e textura do queijo.

Palavras-chave: queijo artesanal; sequenciamento genético; fungos; leveduras.

ABSTRACT

Colonial artisanal cheese is one of the typical products of the southern region of Brazil, much appreciated even with tourists, and is defined as that obtained by coagulating bovine milk using rennet and / or other coagulating enzymes. It is known that this type of food is home to a complex microbial community. Therefore, this work aimed to evaluate the microbiota present in artisanal cheeses through the use of genetic sequencing of the populations present in the food. For the identification of molds and yeasts, amplification was generated with primers for the ITS1 region, ITS1 primer (GAACCGCGGARGGATCA) and ITS2 primer (GCTGCGTTCTTCATCGATGC). The equipment used to sequence the libraries was the MiSeq Sequencing System (Illumina Inc., USA) and the V2 kit, with 300 cycles and single-end sequencing. Sequence analyzes were performed using the Sentinel pipeline. A total of 19 yeast species were identified, being *Diutina catenulata*, *Clavispora lusitaniae*, *Kodamaea ohmeri*, *Kluyveromyces marxianus* and *Candida ethanolica* those that obtained the highest number of reads. Since cheese represents an environment conducive to the growth of microorganisms, the presence of yeasts is not unexpected. The lipolytic and proteolytic activities of these microorganisms contribute to the formation of products directly linked to the aroma, flavor and texture of the cheese.

Keywords: metagenomics; artisanal cheese; genetic sequencing; mold; yeast

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Quantidade de filos, classes, ordens, famílias, gêneros e espécies encontradas.33
- Figura 2** Leveduras mais abundantes no queijo artesanal colonial.36

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 Gêneros e leveduras relevantes em alimentos.....	23
Quadro 2 Estudos de aplicação de métodos microbiológicos moleculares em queijos.....	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Quantidade de sequências identificadas das espécies de leveduras em queijo artesanal colonial	35
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFM1 Aflatoxina

ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOAC Association of Official Analytical Chemists

BAL Bactérias do Ácido Lático

COOPASE Cooperativa de Produção e Consumo de Produtores de Agroindústrias Familiares de Seara

DG18 Ágar Dicloran 18

DMD Diagnóstico microbiológico digital

DRBC Ágar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol

NGS Next Genome Sequence

OTA Ocratoxina

PDA- AC Ágar de Batata Dextrose Acidificado

PNCEBT Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose Animal

QAC Queijo Artesanal Colonial

RTIQ Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade

UFC Unidade Formadora de Colônia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	OBJETIVOS	18
2.1	Objetivo Geral.....	18
2.2	Objetivos Específicos	18
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1	QUEIJO ARTESANAL	19
3.2	IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS E BACTÉRIAS PRESENTES EM QUEIJOS ARTESANAIS USANDO FERRAMENTAS MICROBIOLÓGICAS CLÁSSICAS.....	21
3.3	IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS EM QUEIJOS USANDO FERRAMENTAS GENÔMICAS OU METAGENÔMICA.....	26
4.	MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1	AMOSTRA.....	31
4.2	ANÁLISE METAGENÔMICA	31
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
6.	CONCLUSÃO.....	41
	REFERÊNCIAS	42

1 INTRODUÇÃO

A crescente demanda por alimentos menos processados enaltece, muitas vezes, a produção de alimentos feitos de forma artesanal. O Queijo Artesanal Colonial (QAC) é um dos produtos típicos da região sul do Brasil muito apreciado inclusive por turistas. Assim como ocorre com outros queijos artesanais, sua produção persiste por séculos e simboliza um modo de vida coberto de relevância histórica, social, cultural e econômica para os pequenos produtores (CÓRDOVA *et al.*, 2016). A história do queijo colonial remonta às primeiras décadas do século XX, com a colonização do Oeste de Santa Catarina por descendentes de italianos, alemães e poloneses migrando do Rio Grande do Sul para Santa Catarina, em busca da aquisição de terras a menor custo (DORIGON; RENK, 2016). Essas terras, então nomeadas “colônias”, abrigavam os “colonos”, termos que persistem até hoje para denominar propriedade rural e produtor rural, respectivamente (CARVALHO, 2015). Desta forma, o termo “colonial” possui ligação direta com as tradições, modo de vida e o saber fazer dos imigrantes e que até os tempos atuais é valorizado pelo consumidor (DORIGON, 2010). A atividade leiteira nas colônias era uma prática feminina, e o destino do leite, especialmente em colônias italianas, era para produção de queijo, no qual as receitas eram passadas de geração para geração (DORIGON; RENK, 2016).

A valorização do queijo artesanal colonial revela um importante desenvolvimento das regiões rurais. Por isso, o crescimento do consumo do queijo artesanal requer atenção quanto à sua qualidade, pois a ausência de processamentos térmicos torna as boas práticas de fabricação e a maturação as principais formas de diminuir a presença de patógenos (PEREIRA *et al.*, 2018). Neste contexto, os bolores e leveduras representam um grande grupo de microrganismos, e na maioria das vezes, a presença deles em queijos é indesejável (ZACARCHENCO *et al.*, 2011). Porém, em algumas variedades de queijos, os fungos filamentosos representam importante papel no desenvolvimento de sabores e aromas ao longo da maturação do produto (FOX; MCSWEENEY, 2004). Como por exemplo, algumas espécies dos gêneros *Penicillium* e *Mucor*, que são capazes de alterar sabor e aroma durante a maturação de alguns tipos de queijo (ARAGÃO, 2018). De forma geral, segundo este mesmo autor, os fungos filamentosos dos gêneros *Penicillium*, *Geotrichum*, *Aspergillus*, *Mucor* e *Fusarium* são os mais frequentes em queijos fabricados a partir de leite cru, e as leveduras mais frequentes em queijos pertencem aos gêneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Geotrichum*, *Kluyveromyces*, *Kodamaea*,

Pichia, Rhodotorula, Saccharomyces, Torulaspora, Trichosporon, Yarrowia e Zygosaccharomyces.

Diversos estudos já foram realizados para determinar a composição da microbiota de queijos artesanais. A maioria deles utiliza-se da microbiologia clássica, ou seja, métodos dependentes de cultura com a determinação do número de unidades formadoras de colônias (UFC) e provas bioquímicas. Entretanto, tais abordagens podem manifestar resultados imprecisos devido a presença de microrganismos injuriados que não são possíveis de se detectar, além de não levar em consideração microrganismos que necessitam de meios mais complexos para análise (RANTSIOU *et al.*, 2005). A análise de fungos pelo método tradicional de contagem de placas requer, muitas vezes, o uso de antibióticos para inativar bactérias e dura pelo menos cinco dias (VANETTI; MACHADO, 2021). Portanto, os longos períodos de incubação das técnicas de cultura tornam os métodos dependentes de cultura demorados e laboriosos (JANY; BARBIER, 2008).

Visto isso, há pelo menos vinte anos, o uso de abordagens independentes de cultura para identificar e caracterizar comunidades microbianas tem sido pesquisado e desenvolvido (COCOLIN; ERCOLIN, 2015). Os estudos baseiam-se, cada vez mais, na análise direta de DNA (ou RNA) sem qualquer etapa de cultura, e seguem protocolos em que o DNA total (ou RNA) é extraído diretamente do substrato, permitindo assim estudar a diversidade total do alimento em uma única etapa (JANY e BARBIER, 2008). Estes mesmos autores destacam como elemento chave das abordagens moleculares a amplificação por PCR de uma sequência alvo específica.

A origem da microbiologia genômica relaciona-se com o surgimento da biologia molecular no século XX e com a descoberta de que o DNA porta informações hereditárias (MARDANOV *et al.*, 2018). As técnicas moleculares apresentam como vantagens a rapidez, precisão, reprodutibilidade e a capacidade de detectar células viáveis e não viáveis, assim como células danificadas ou lisadas (O'SULLIVAN *et al.*, 2013). Após análise de estudos de microbiologia molecular, Kazou *et al.* (2021) concluíram que existe variação considerável entre espécies cultivadas e de ocorrência natural, e isso altera dramaticamente o conhecimento da verdadeira diversidade microbiana presente nos diversos habitats. O sequenciamento para identificação da microbiota de uma amostra a partir de genes marcadores como o gene 16S para bactérias e ITS para fungos é o destaque da metagenômica (MARAN, 2020). No presente estudo foi realizada a análise metagenômica do queijo artesanal colonial produzido na cidade de Seara, no Oeste do estado de Santa Catarina, com o objetivo de avaliar a microbiota fúngica

das populações presentes neste produto através do uso de sequenciamento genético da região ITS, a qual é altamente polimórfica e possui capacidade de separar fungos em nível de espécies e mesmo de subespécies (FAJARNINGSIH, 2016).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a microbiota fúngica presente em queijo artesanal colonial da cidade de Seara- SC, através do uso de sequenciamento genético das populações presentes neste produto.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar e quantificar o microbioma fúngico presente em amostras de queijo artesanal usando como base o gene ITS;
- Relatar o sequenciamento genético das amostras utilizando o sistema Diagnóstico Microbiológico Digital;
- Analisar o metagenoma através da plataforma Miseq da Illumina.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 QUEIJO ARTESANAL

O Brasil destaca-se por ser o 4º maior produtor de queijos no mundo, produzindo aproximadamente 760 mil toneladas de queijos por ano, estando em contínuo crescimento (USDA, 2019). São conhecidos mais de 30 tipos de queijos artesanais em território nacional (KAMIMURA *et al.*, 2019). Os queijos artesanais brasileiros são aqueles elaborados por métodos tradicionais que possuem vinculação e valorização territorial, regional ou cultural e que respeitam os protocolos de elaboração estabelecidos para cada variedade, geralmente produzidos a partir de leite cru (BRASIL, 2019). As regiões sul, sudeste e nordeste do país são os principais produtores de queijos artesanais, sendo o estado de Minas Gerais o responsável por cerca de 50% da produção de queijos no território nacional (PIMENTEL *et al.*, 2020). As microrregiões tradicionais produtoras neste estado são: Serro, Serra da Canastra, Cerrado, Araxá, e Campo das Vertentes, as quais distribuem-se em 62 municípios (DORES, FERREIRA, 2012). Já na região norte do país, o queijo de destaque é o Marajó, produzido há mais de 100 anos no Estado do Pará, através da coagulação espontânea do leite de búfalo cru, com adição ou não de leite de vaca (CRUZ *et al.*, 2015). No Nordeste, os queijos de destaque são o Manteiga e o Coalho, sendo este último produzido há mais 150 anos na região (QUEIROGA *et al.*, 2013; NASSU *et al.*, 2009). Na região central do país tem-se o queijo Caipira como tradição no estado do Mato Grosso do Sul (MENEZES, 2009). Por fim, no sul do país, nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, destaca-se o queijo Colonial, fabricado a partir do leite cru de vacas europeias e o queijo Serrano fabricado desde o século XV, o qual funcionava como produto de barganha para obtenção de sal, açúcar, farinha entre outros alimentos (KAMIMURA *et al.*, 2019). No Estado de Santa Catarina em 2017, a produção de queijo artesanal foi computada em 8.210 toneladas por ano, conforme o censo agrícola brasileiro (CARVALHO, M. de M. *et al.*, 2019). Os queijos e outros produtos artesanais podem ser identificados, em território nacional, pelo selo ARTE (BRASIL, 2018).

A Lei 17.486 de 2018 do Estado Santa Catarina estabelece a definição de queijo artesanal como sendo aquele elaborado a partir de leite cru da própria fazenda, com métodos tradicionais, com vinculação ao território de origem, conforme Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ) estabelecido para cada tipo e variedade (SANTA CATARINA, 2018). Fica permitido a aquisição de leite de propriedades rurais próximas desde que atendam

todas as normas sanitárias pertinentes. Esta mesma lei regulamenta a produção e comercialização de queijos artesanais de leite cru no Estado de Santa Catarina.

Ainda no Estado de Santa Catarina, o decreto nº 362/2019 apresenta normas que devem ser seguidas pelos produtores (SANTA CATARINA, 2019). Algumas delas são: o uso de mão de obra predominantemente familiar na fabricação dos queijos artesanais conforme tipo e variedade definidos em Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ) e a produção restrita à propriedade rural certificada como livre de brucelose e tuberculose, conforme disposto no Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT). Em relação ao Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade, cada tipo de queijo artesanal deve apresentar seu RTIQ e são classificados de acordo com a matéria gorda, teor de umidade e maturação (SANTA CATARINA, 2019).

O queijo colonial artesanal é definido como aquele obtido pela coagulação do leite bovino por meio do coalho e/ou outras enzimas coagulantes. Normalmente, possui formato arredondado com peso próximo a 1kg (BONDARCZUK, 2013). Quando imaturo pode não desenvolver casca, quando maduro pode apresentar casca fina e amarelada e após maturação longa a casca pode tornar-se dura e grossa (BONDARCZUK, 2013). As regiões de produção do queijo colonial correspondem àquelas colonizadas principalmente por descendentes de italianos e alemães. Em Santa Catarina, configuram a região oeste e em menor quantidade o sul do Estado; no Paraná o sudoeste e oeste do Estado; e no Rio Grande do Sul a serra gaúcha e o Noroeste do Estado (DORIGON, 2020).

Segundo Dorigon (2020) a produção do queijo colonial inicia-se com a filtração do leite não pasteurizado em peneira apropriada e aquecimento até 30°C, seguido da adição de sal e coalho. Cerca de 40 minutos após a adição do coalho, o leite já está coagulado, sendo então talhado para que o soro se separe da massa para posterior transferência para as fôrmas. O processo de transferência para as fôrmas é feito através de uma prensa manual com uma forma redonda, onde permanece até o escoamento do soro. Em seguida será maturado por 5 a 12 dias e estará pronto para consumo ou comercialização. Tradicionalmente, o coalho utilizado na fabricação do queijo artesanal colonial era biológico, obtido do estômago higienizado, salgado e seco de bovinos. No entanto, por motivos de praticidade e segurança, o coalho artesanal foi substituído pelo coalho industrial.

A qualidade da matéria prima está diretamente relacionada com a qualidade do produto final. Fatores como sanidade do rebanho, higiene na ordenha, higiene de equipamentos, tratamento térmico, manipulação e armazenamento adequados são alguns critérios para

alcançar uma qualidade microbiológica satisfatória no queijo artesanal (BONDARCZUK, 2013).

3.2 IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS PRESENTES EM QUEIJOS ARTESANAIS USANDO FERRAMENTAS MICROBIOLÓGICAS CLÁSSICAS

Bolores e leveduras representam um grande grupo de microrganismos. Embora existam mais de 100 mil espécies conhecidas de fungos, cerca de 200 são patogênicas aos seres humanos e aos animais (TORTORA, 2017). Entre estas espécies estão as causadoras de alergias, micoses e micotoxicoses não veiculadas por alimentos. Em queijos, a presença de bolores e leveduras, em sua maioria, é indesejável (ZACARCHECNO *et al.*, 2011). No entanto, em algumas variedades de queijos, os fungos filamentosos representam importante papel no desenvolvimento de sabores e aromas ao longo da maturação do produto (ARAGÃO, 2018). Os bolores são os fungos mais comuns encontrados naturalmente em queijos. Eles formam massas visíveis, denominadas micélios, compostas de longos filamentos (hifas) que se ramificam e se entrelaçam. Em relação às características do ambiente, os fungos são capazes de se desenvolver em condições adversas, onde muitas bactérias não conseguem. O pH próximo a 5,0 configura um bom ambiente para seu crescimento. Baixos teores de umidade também são aceitáveis e a resistência à pressão osmótica, faz com que grande parte dos fungos seja capaz de crescer em concentrações mais altas de sal, como em queijos (TORTORA, 2017).

Os fungos filamentosos dos gêneros *Penicillium*, *Geotrichum*, *Aspergillus*, *Mucor* e *Fusarium* são os mais frequentes em queijos fabricados a partir de leite cru, e algumas espécies dos gêneros *Penicillium* e *Mucor* possuem papel importante na maturação de alguns tipos de queijo, devido à capacidade de alterar sabor e aroma (ARAGÃO, 2018). A melhoria das características de textura, sabor e valor nutricional do queijo estão relacionadas com a ação de enzimas fúngicas na degradação de constituintes do leite, como proteínas e lipídios (HYMERY, 2014).

Um dos fatores mais importantes na deterioração de alimentos por fungos é a formação de metabólitos secundários tóxicos chamados micotoxinas (FILTENBORG; FRISVAD e THIRANE, 1996). O termo micotoxina” deriva das palavras gregas "mykes" (fungos ou bolor limoso) e "tóxico" refere-se à toxina (HYMERY *et al.*, 2014). Este termo começou a ser empregado em 1962 com a morte de mais de 400.000 perus jovens após a ingestão de ração com amendoim de origem brasileira e posterior constatação da contaminação dos grãos por

aflatoxina, produzida pelo fungo *A. flavus* (SANTOS e SILVA, 2010; FREIRE *et al.*, 2007). As micotoxinas são compostos de ocorrência natural, de baixo peso molecular, e uma vez que são metabólitos secundários, não são essenciais para o crescimento do fungo, no entanto, acredita-se que concedam vantagem seletiva à cepa produtora (HYMERY *et al.*, 2014). De acordo com a FAO (2021) o acúmulo de micotoxinas em alimentos e rações é a causa de diversos envenenamentos, como indução de câncer, mutagenicidade, distúrbios urogenitais, vasculares, renais e nervosos. Em 1974, na Índia, 397 pessoas foram afetadas e cerca de 108 morreram após ingestão de milho contaminado com aflatoxina B1. Em 2004, a presença de aflatoxina também em milho causou um surto no Quênia, com mais de 300 casos confirmados e 125 mortes (FREIRE *et al.*, 2007; CDC, 2004)

A contaminação humana ou animal por micotoxinas pode acontecer de forma direta ou indireta. A contaminação direta ocorre quando o alimento/ração é contaminado com um fungo toxigênico com posterior formação de toxina e a indireta ocorre quando o alimento/ração tem a presença da toxina mesmo após a eliminação do fungo toxigênico durante o processamento (FREIRE *et al.*, 2007). Em queijos, as toxinas detectadas por vários estudos são principalmente citrinina, penitrem A, roquefortina C, esterigmatocistina, aflatoxina e ocratoxina A (OTA), sendo as duas últimas as mais perigosas (ANELLI *et al.*, 2019; HYMERY *et al.*, 2014). Dentre as micotoxinas encontradas em queijo, a aflatoxina M1 é a única controlada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a qual estabelece o limite máximo tolerável é de 2,5 µg / kg (BRASIL, 2011). As toxinas podem ter origem direta do queijo, através de agentes de deterioração, ou vir do leite usado para fabricação do queijo devido à contaminação da ração dada às vacas (HYMERY *et al.*, 2014). O papel das micotoxinas no queijo ainda não é bem elucidado. Entretanto, em uma revisão sobre fungos filamentosos e micotoxinas em queijos, Hymery *et al.* (2014) cita algumas hipóteses como competição com outros organismos, adaptação ao ambiente e eliminação de resíduos. Portanto, a presença de alguns fungos em queijos pode ser um sinal de alerta para a produção dessas micotoxinas.

Já as leveduras são fungos unicelulares, não filamentosos, geralmente esféricos ou ovais. Assim como os fungos filamentosos, as leveduras são abrangentemente distribuídas na natureza e é comum serem encontradas na forma de um pó branco cobrindo frutas e folhas (TORTORA, 2017). As leveduras mais frequentes em queijos pertencem aos gêneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Geotrichum*, *Kluyveromyces*, *Kodamaea*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Torulaspota*, *Trichosporon*, *Yarrowia* e *Zygosaccharomyces* (ARAGÃO, 2018). *Debaryomyces hansenii* é a espécie mais comumente isolada em queijos (BUCHL;

SEILER, 2011). A identificação de leveduras como microrganismos deteriorantes advém de seu metabolismo heterofermentativo (ZACARCHENCO *et al.*, 2011). Quando contaminado, o queijo adquire sabor de massa crua fermentada de pão (ZACARCHENCO *et al.*, 2011). Há também leveduras proteolíticas que provocam aroma intenso de compostos sulfurosos nos queijos contaminados, bem como a presença de ácidos graxos livres pode produzir sabores e aromas de ranço em razão da atividade lipolítica (ZACARCHENCO *et al.*, 2011). Alguns gêneros de leveduras importantes em alimentos são destacados por JAY (2005), FRANCO e LANDGRAF (2016) e estão apresentados no Quadro 1.

Quadro 1 Gêneros e leveduras relevantes em alimentos.

Gênero	Classificação	Alimentos
<i>Candida</i>	Este gênero foi erigido em 1923 por Berkhout e desde então sofreu muitas mudanças na definição e composição. O nome genérico significa “branco brilhante”. Podem ser fermentativas ou não. Não produzem esporos assexuados. Multiplicam-se por brotamento multilateral ou polar. <i>Candida tropicalis</i> é a mais comum em alimentos.	Carne de boi e frango
<i>Kluyveromyces</i>	São leveduras fermentativas. Multiplicam-se por brotamento multilateral. <i>K. marxianus</i> é uma das duas leveduras mais prevalentes em produtos lácteos. <i>Kluyveromyces spp.</i> produzem β -galactosidase e são fermentadores vigorosos de açúcares, incluindo lactose. <i>K. marxianus</i> contém coenzima Q-6 e está envolvido na fermentação de kumiss. Ele também é usado para a produção de lactase a partir do soro de leite e como o organismo de escolha para a produção de células de levedura a partir do soro de leite.	Frutas, queijo
<i>Trichosporon</i>	Fermentação fraca ou ausente. Multiplicam-se por brotamento e formação de artroconídios. Leveduras oxidativas, não formadoras de esporos. Envolvidas nas fermentações de grãos de cacau e idli. <i>T. pullulans</i> é a espécie mais prevalente e produz lipase.	Camarão fresco, carne moída, aves, cordeiro congelado e outros
<i>Torulaspota</i>	Fortes fermentadores de açúcares e contêm a coenzima Q-6. Multiplicam-se por brotamento multilateral sem formação de pseudomicélios. <i>T. delbrueckii</i> é a espécie mais prevalente	Alimentos com alto teor de açúcar
<i>Yarrowia</i>	Anteriormente <i>Saccharomycopsis</i> , essas leveduras pertencem à ordem Endomycetales. <i>Candida lipolytica</i> é	Frutas, vegetais, carnes e aves.

	o anamorfo e <i>Y. lipolytica</i> é o estágio teleomórfico (perfeito).	
<i>Debaryomyces</i>	Fermentação fraca. Um dos dois gêneros de levedura mais prevalentes em produtos lácteos. <i>D. hansenii</i> é a espécie de origem alimentar mais prevalente. Ele pode crescer em NaCl 24% e em uma atividade de água tão baixa quanto 0,65.	Limo em salmouras, cresce em salmouras e queijos e causa a deterioração do concentrado de suco de laranja e do iogurte.
<i>Pichia</i>	Fermentação variável. Multiplicam-se por brotamento multilateral. Este é o maior gênero de leveduras verdadeiras.	Já encontrada em peixes e camarões frescos, conhecida por crescer salmouras de oliva, deterioração de pickles e chucrute
<i>Saccharomyces</i>	Atividade fermentativa intensa. Multiplicação por brotamento lateral ou formação de pseudomicélio. Destaque para <i>S. cerevisiae</i> .	Pães, cervejas, vinhos.

Fonte: Adaptado de JAY (2005); FRANCO;LANDGRAF (2016)

A microbiologia clássica utiliza-se do método de contagem padrão em placas para realizar a quantificação de bolores e leveduras em alimentos. Este método é feito a partir da determinação do número de unidades formadoras de colônias (UFC). O plaqueamento em superfície é o método mais indicado, uma vez que evita danos com o meio de cultura aquecido e aumenta a exposição ao oxigênio (SILVA *et al.*, 2017).

De acordo com Frank e Yousef, (2004) é recomendado o Ágar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC) para produtos lácteos em geral. Para alimentos com atividade de água superior a 0,95, os autores Ryu e Wolf-Hall (2015) recomendam o Ágar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC) e o Ágar Dicloran Glicerol 18 (DG18), para alimentos de atividade de água menor ou igual a 0,95. Para produtos não submetidos a tratamento térmico, acidificação ou outro tratamento que possa provocar injúrias às células, pode também ser utilizado Ágar Batata Dextrose Acidificado (PDA-AC) (SILVA *et al.*, 2017). Também podem ser utilizados kits analíticos oficializados pela AOAC (Association of Official Analytical Chemists) (RYU; WOLF-HALL, 2015).

De modo geral, a identificação de fungos e leveduras utilizando a microbiologia clássica como ferramenta envolve etapas de pesagem e diluição da amostra, preparo do meio de cultura e incubação por um período de 5 dias. Para identificar e diferenciar as leveduras, são consideradas a morfologia celular, a morfologia da colônia e a reprodução sexuada. Os testes fisiológicos para identificação de leveduras são baseados na capacidade dos isolados em hidrolisar ureia e crescer em meios seletivos, em diferentes temperaturas e fontes de nitrogênio. Apesar das desvantagens (como variação interlaboratorial, diferenças entre as cepas e o número de características testadas) os padrões de fermentação de carboidratos, ainda são usados para identificação de bactérias e leveduras (KAZOU *et al.*, 2021).

Pereira *et al.* (2019) analisaram a microbiota do Queijo Artesanal Serrano produzido em Santa Catarina, em diferentes etapas de maturação. Não foi observado um desenvolvimento significativo de fungos filamentosos, uma vez que não é característica deste produto o aparecimento de bolores aparentes. Entretanto, dentre os gêneros encontrados estão *Aspergillus*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Byssosclamyces*, *Mucor*, *Cladosporium* e *Penicillium*. O estudo discute que tais fungos filamentosos não podem caracterizar o queijo artesanal serrano devido à baixa frequência nas amostras, e que a presença dos mesmos pode estar relacionada com contaminações no processo de fabricação deste produto. Apesar disso, as leveduras apresentaram maior relevância no estudo. Foram isoladas 82 culturas diferentes, as quais foram observadas em 72 das 80 amostras analisadas. *K. lactis*, levedura que hidrolisa a lactose, foi a espécie isolada com maior frequência. Esta levedura foi observada em outros estudos de queijos artesanais. A levedura *C. famata* também obteve relevância. *C. catenulata*, prevalente em queijos artesanais, também foi identificada, enquanto *C. zeylanoides* mostrou-se presente em todas as etapas de maturação do queijo.

Aragão (2018) analisou a diversidade de fungos filamentosos e leveduras do Queijo Minas Artesanal de amostras maturadas em duas estações do ano. No verão/úmido foram identificados 57 isolados de fungos filamentosos e 46 isolados no inverno/seco. Algumas espécies identificadas foram: *Paecilomyces* sp., *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *A. ochraceus*, *Geotrichum candidum* e *Fusarium* sp. Os isolados potencialmente toxicogênicos (*Aspergillus niger* e *A. ochraceus*) não eram produtores de micotoxinas. Para o estudo de leveduras, na amostra de queijo maturado no verão úmido, foram isoladas 15 leveduras e no inverno/seco 7 leveduras. No entanto, das 15 leveduras, 80% não foram identificadas e o restante dos isolados dividiu-se entre as espécies *Candida palmiolephila* e *Hyphopichia burtonii*. Nas amostras do

inverno/seco, dentre as espécies identificadas estão *Candida intermedia*, *Kluyveromyces lactis* e *Torulasporea delbrueckii*.

Souza (2016) em estudo de fungos deteriorantes e micotoxinas em queijo parmesão, não constatou a presença de micotoxinas. Entretanto, detectou contaminação no ar e nas prateleiras da câmara de maturação dos queijos. Oliveira *et al.* (2011), em pesquisa de AFM₁ em amostras de queijo Minas Frescal e queijo Minas Padrão detectou a toxina em 13 das 48 amostras analisadas (27,1%), sendo seis amostras de Minas Frescal e 7 para o queijo Minas Padrão. Prado *et al.* (2000) analisou 75 amostras de queijo "Minas" (in natura, canastra e padrão) as quais 56 (74,7%) apresentaram contaminação com AFM₁.

3.3 IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS EM QUEIJOS USANDO FERRAMENTAS GENÔMICAS OU METAGENÔMICA

O leite cru abriga uma comunidade microbiana complexa. Devido ao seu alto valor nutricional, seu alto teor de água e pH quase neutro, este alimento está suscetível ao desenvolvimento de muitos microrganismos (FRANK, 1997). Tradicionalmente, o estudo dessa comunidade microbiana é realizado por técnicas empregadas pela microbiologia clássica, ou seja, métodos tradicionais de contagem de bactérias em placas, isolamento e identificação bioquímica dos microrganismos (VANETTI; MACHADO, 2021). Todavia, essas abordagens podem manifestar resultados imprecisos devido a presença de microrganismos injuriados que não são possíveis detectar, além de não levar em consideração microrganismos que necessitam de meios mais complexos para análise (RANTSIOU *et al.*, 2005).

Como alternativa aos métodos fenotípicos para fins taxonômicos, reconheceu-se a necessidade de métodos moleculares rápidos, reproduzíveis, precisos e não tendenciosos (KAZOU *et al.*, 2021). Para a identificação de bactérias e leveduras associadas a produtos lácteos, os métodos moleculares baseados em PCR são comumente aplicados, e essas metodologias utilizam primers com diferentes sequências genômicas como alvo, por exemplo a região ITS para identificação de fungos (KAZOU *et al.*, 2021). Segundo Fajarningsih (2016), esta é uma região não codificante altamente polimórfica com capacidade de separar fungos em nível de espécie e mesmo de subespécies. Por isso, a região ITS tornou-se a região frequentemente usada para identificar bolores e leveduras em derivados lácteos (BANJARA *et al.*, 2015, BUEHLER *et al.*, 2017). Um exemplo de método molecular amplamente utilizado é a Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE, do inglês Pulsed-Field Gel Electrophoresis),

o qual consiste em uma técnica em que o DNA é clivado em sítios específicos através de uma enzima de restrição, e os fragmentos de DNA são separados por eletroforese em gel de agarose de campo pulsado (CUNHA, 2016). Os tamanhos dos fragmentos de DNA determinam suas separações, de modo que fragmentos pequenos movimentam-se mais rápido do que fragmentos grandes, criando então padrões de banda de DNA, que são comparadas com padrões de referência para serem identificadas (CUNHA, 2016). O desenvolvimento da técnica de PFGE constituiu um grande avanço metodológico para estudar o genoma de microrganismos (LOPEZ-CANOVAS *et al.*, 2019). Dentre os métodos de tipagem molecular, PFGE é atualmente considerado padrão ouro (SOFU, 2017).

Entretanto, nos últimos vinte anos houve maior concentração no desenvolvimento de metodologias independentes de cultura, sem o enriquecimento ou isolamento de cepas, como forma de evitar resultados enganosos por baixa detecção de organismos subdominantes ou difíceis de cultivar (COCOLIN; ERCOLINI, 2015; YELURI; JONNALA *et al.*, 2018). Esses estudos baseiam-se principalmente no sequenciamento genético das populações presentes nos alimentos. Afinal, diversos estudos já demonstraram variação considerável entre espécies cultivadas e de ocorrência natural (KASOU *et al.*, 2021).

De forma geral, o termo “metagenômica” está relacionado com a identificação e caracterização de comunidades microbianas a nível genômico por meio de abordagens independentes de cultura (National Research Council (US) Committee on Metagenomics: Challenges and Functional Applications, 2007). O destaque dessa abordagem está no sequenciamento para a identificação de toda a microbiota de uma amostra através de genes marcadores como o gene 16S para as bactérias e da região intergênica ITS para fungos. Esta metodologia apresenta resultados a nível taxonômico do filo até a espécie do microrganismo identificado, utilizando ferramentas de bioinformática e bancos de dados públicos como o GreenGene e RibosomalDatabase (DE CESARE, 2019; FRANCIOSA *et al.*, 2018). A partir dessas metodologias é possível identificar a microbiota de qualquer alimento, entre eles os queijos artesanais. Desta forma é possível entender a relação entre os microrganismos, suas atividades e funcionalidades no alimento (FRANCIOSA *et al.*, 2018).

O método empregado para descrever o sequenciamento de todo o genoma de um organismo recebe o nome de Sequenciamento Completo do Genoma (Whole Genome Sequence (WGS)), e este é dividido atualmente em três gerações (OAKLEY; GONZALEZ-ESCALONA; MOLINA, 2015). A primeira geração envolve o método de terminação de cadeia, também conhecido por Sequenciamento de Sanger. Neste método, os fragmentos de DNA são utilizados

como moldes para sintetizar uma fita de DNA complementar utilizando primers como iniciadores da reação de síntese e dideoxinucleotídeos como terminadores de cadeia, que impedem a reação de prosseguir. Dessa forma, obtêm-se diversos fragmentos de DNA complementar de tamanhos diferentes, que são separadas por eletroforese para posterior identificação das bandas de DNA e sequenciamento (PEIXOTO, 2013). Ainda que alterações tenham sido feitas ao longo dos anos, esse método ainda continua sendo um método trabalhoso, caro e com comprimento de leitura muito curto (OAKLEY *et al.*, 2015, SANTOS *et al.*, 2013).

Entretanto, a revolução genômica deu-se a partir do desenvolvimento do sequenciamento do genoma, especialmente em meados dos anos 2000, por métodos de sequenciamento de última geração (NGS), abordagem esta que se tornou líder de estudos (MARDANOV *et al.*, 2018). O sequenciamento de segunda geração ou sequenciamento de próxima geração (NGS) surgiu após investimentos públicos e privados que levaram à criação de tecnologias como as máquinas de sequenciamento 454 (MARAN *et al.*, 2020). Este equipamento permite que a quantidade de DNA sequenciado seja maior por meio da paralelização em massa das reações de sequenciamento (HEATHER; CHAIN, 2016). O sequenciamento direto e paralelo de milhões e bilhões de moléculas de DNA é um dos diferenciais das metodologias NGS, o que possibilita o aumento da escala e a resolução das análises (CHRISTOFF, 2016). Além disso, a redução da quantidade de amostra necessária e a diminuição significativa no custo por nucleotídeo sequenciado também são progressos obtidos com NGS (CHRISTOFF, 2016). De forma geral, pode-se dizer que esta técnica está relacionada com a detecção de fótons de luz produzidos em quantidade proporcional ao número de nucleotídeos incorporados à cadeia de DNA (FIETTO; MACIEL, 2015).

Uma vez que a plataforma 454 obteve grande sucesso, outras empresas de sequenciamento desenvolveram suas próprias metodologias (MARAN *et al.*, 2020). A plataforma Illumina Solexa, por exemplo, realiza o sequenciamento por síntese através da enzima DNA polimerase e nucleotídeos marcados com fluoróforos (SANTOS *et al.*, 2013), e possui como inovação a clonagem *in vitro* dos fragmentos em uma plataforma sólida de vidro (METZKER, 2009). Uma outra plataforma é a SOLiD R que realiza o sequenciamento por ligação e que, diferente da Solexa, utiliza a enzima DNA ligase, e não DNA polimerase. Esta enzima une as pontas de moléculas de DNA, e o sequenciamento é feito a partir da sensibilidade da enzima para alinhar pares de base que identifica os nucleotídeos presentes em uma dada posição do DNA (PEIXOTO, 2013). Já a plataforma Íon Torrent, desenvolvida por Jonathan Rothburg, é a última plataforma da segunda geração, chamada de “sequenciamento pós luz”

(HEATHER; CHAIN, 2016). Esta técnica utiliza-se de microchips como sensores de detecção que identificam íons hidrogênio liberados depois que cada nucleotídeo complementar é incorporado na fita-molde de DNA (CHRISTOFF, 2017).

A terceira geração realiza o sequenciamento de moléculas únicas sem a necessidade de amplificação, tornando os procedimentos simplificados e reduzindo os custos (MARAN *et al.*, 2020). Sendo assim, a ausência da necessidade de amplificação prévia da amostra é o princípio básico desta geração, tornando possível detectar a sequência de DNA diretamente de uma única molécula (CHRISTOFF, 2017). Nesta geração, destaca-se a plataforma Pacific BioScienc, capaz de ler em tempo real pequenos genomas como bactérias, plasmídeos e fagos (WASFI; AWWAD; AYESH, 2018).

Em estudo de Aragão (2018), citado anteriormente, as amostras de queijo minas artesanal também foram analisadas por método independente de cultura. Foi identificado na amostra maturada no verão úmido 39 gêneros e 42 espécies, sendo os gêneros mais prevalentes em leveduras *Candida*, *Kodamaea*, *Torulaspora* e *Trichosporon* e *Fusarium*, *Microascus*, *Acremonium* os gêneros de fungos filamentosos. Na amostra maturada no inverno seco 41 gêneros e 46 espécies foram identificadas, sendo *Trichosporon*, *Debaryomyces*, *Torulaspora* e *Kluyveromyces* os gêneros mais prevalentes em leveduras e *Aspergillus*, *Fusarium* e *Acremonium* os gêneros de fungos filamentosos.

Anelli *et al.*, 2009, em estudo do queijo italiano artesanal maturado em caverna, identificou que maior parte da população fúngica incluiu as espécies *Aspergillus* e *Penicillium*, com algumas espécies toxigênicas. Entretanto, a única micotoxina detectada na amostra de queijo foi a OTA, em apenas uma amostra, e sua presença está ligada à ocorrência de bolores ocratoxigênicos, especificamente de *A. westerdijkiae* e *A. steynii*, detectados na superfície de alguns queijos. No Quadro 2 estão representados alguns estudos realizados a partir de métodos moleculares em queijos.

Quadro 2 Estudos de aplicação de métodos microbiológicos moleculares em queijos.

Matéria prima	Metodologia	Principais microrganismos identificados	Referência
Queijo tradicional francês “Tomme d'orchies”	Illumina	<i>Yarrowia lipolytica</i> , <i>Galactomyces geotrichum</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Cladosporium cladosporioides</i> .	(CEUGNIEZ <i>et al.</i> , 2017)
Queijo austríaco feito a partir de leite cru	MiseQ Illumina	<i>Candida apicola</i> , <i>Debaromyces</i> , <i>Scopulariopsis</i>	(QUIJADA <i>et al.</i> , 2020)
Queijo branco em conserva artesanal da Sérvia Ocidental	BioNumerics 6.5	<i>Debaryomyces hansenii</i> , <i>Kluyveromyces lactis e</i> <i>Candida zeylanoides</i>	(ŠURANSKÁ <i>et al.</i> , 2016)
Queijo de caverna tradicional italiano	BioNumerics 5.1	<i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Alternaria</i> . <i>Microascus melanosporus</i> , <i>Neosartorya hiratsuka</i> , <i>Scopulariopsis brevicaulis</i> , <i>Scopulariopsis flava</i> , <i>Cladosporium sphaerospermum</i>	(ANELLI <i>et al.</i> , 2019)
Tarag, leite fermentado de vaca (Mongólia e China)	454 Life Sciences, Branford, CT	<i>Candida Galactomyces</i> , <i>Saccharomyces</i> , <i>Trichosporon</i> , <i>Kluyveromyces</i> , <i>Pichia e</i> <i>Candida</i>	(SUN <i>et al.</i> , 2014)
Queijo <i>Wagashi</i> de Benin	Illumina	<i>K. marxianus</i> , <i>S. keratitidis</i> , <i>C. parapsilosis e S. Cerevisiae</i>	(SESSOU <i>et al.</i> , 2019)
Queijo coalho	Illumina	<i>Candida tropicalis</i> , <i>Candida parapsilosis</i> , <i>Pichia membranifaciens</i> , <i>Tritirachium oryzae</i> , <i>Malassezia furfur e</i> <i>Kluyveromyces marxianus</i>	(LIMA, 2017)
Queijo Minas Artesanal	Illumina	<i>Kodamaea ohmeri</i> , <i>Acremonium citrinum</i> , <i>and Candida catenulata</i>	(ARAGÃO <i>et al.</i> , 2018)

Fonte: A autora.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AMOSTRA

Uma amostra de queijo artesanal colonial comercializada no município de Seara, no oeste de Santa Catarina, Brasil, foi submetida à avaliação metagenômica, após o período de maturação de 20 dias. O produtor artesanal faz parte da Cooperativa de Produção e Consumo dos Produtores e das Agroindústrias Familiares de Seara (COOPASE). A amostra foi coletada em janeiro de 2021 e congelada em sua embalagem original até o momento da investigação da comunidade fúngica.

4.2 ANÁLISE METAGENÔMICA

A amostra foi descongelada e utilizando-se bag estéril, pesou-se uma alíquota de 25 g da amostra a qual foi homogeneizada com 225 ml de solução salina triptonada. Posteriormente, a extração de DNA foi realizada utilizando-se a técnica de beads magnéticas, com um protocolo proprietário (Neoprosecta Microbiome Technologies, Brasil). A metodologia utilizada para identificação de fungos neste trabalho foi o sequenciamento de alto desempenho da região ITS1. A amplificação foi gerada com primers para a região ITS1, primer, ITS1 (GAACCGCGGARGGATCA) (SCHMIDT *et al.*, 2013) e primer, ITS2 (GCTGCGTTCTTCATCGATGC) (WHITE *et al.*, 1990). As bibliotecas foram preparadas segundo um protocolo proprietário (Neoprosecta Microbiome Technologies, Brasil). O equipamento utilizado para sequenciar as bibliotecas foi o MiSeq Sequencing System (Illumina Inc., USA) e o kit V2, com 300 ciclos e sequenciamento single-end. E as análises das sequências foram realizadas por meio do pipeline Sentinel.

A avaliação da qualidade Phred (QP) dos arquivos fastq no pipeline Sentinel foi elaborada utilizando-se o programa FastQC v.0.11.8 (ANDREWS, 2010). Então, estes arquivos passaram por uma triagem de primers e sequências com baixa qualidade (Phred <20) através do software proprietário utilizado para tal finalidade que foi construído em Python v.3.6 e inspirado nas aplicabilidades do projeto BioPython (COCK *et al.* 2009).

Em geral, os clusters com abundância menor que 2 estão associados a sequências quimeras (SMYTH *et al.*, 2010). Portanto, eles foram removidos das análises. Empregou-se blastn v.2.6.0+ (ALTSCHUL *et al.*, 1990) para obter as identificações, e como referência

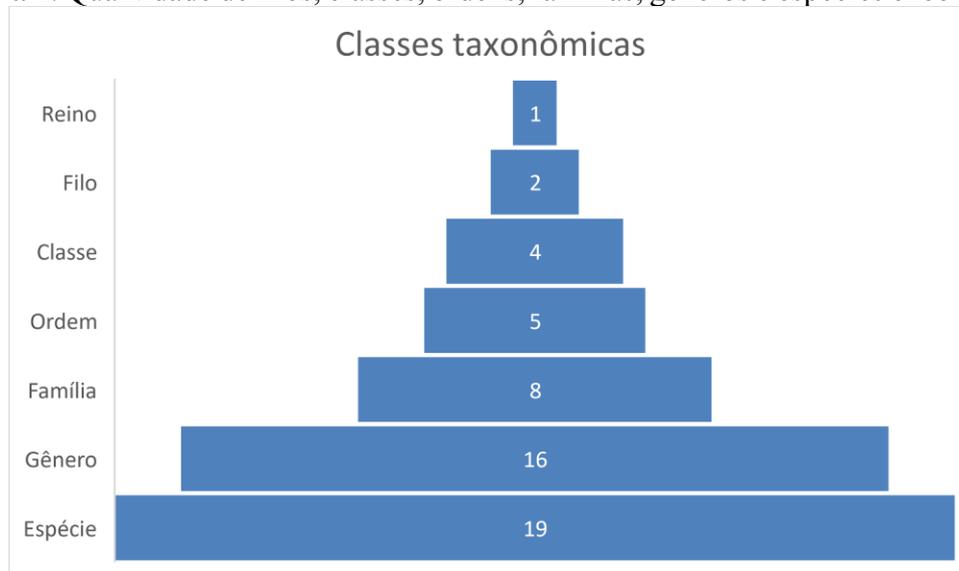
utilizou-se o banco de dados proprietário. A definição de espécie foi estabelecida através de uma instrução em Python que avalia se um dos três quesitos foram atendidos pelos hits: 1) maior bit-score; 2) menor e-value; e 3) taxonomias com maior representação. A espécie representante é selecionada a partir dos hits que atenderam um dos itens anteriores.

A estrutura de bioinformática da Neoprospecta está hospedada na plataforma computacional da Amazon, onde as análises foram executadas. As análises de Diagnóstico Microbiológico Digital (DMD) para fungos, foram realizadas contra bancos de dados de referência para o gene ITS nos bancos de dados proprietários. O banco de sequências para os genes ITS, dispõe de sequências de genes completos, os quais contém sequências recuperadas de genomas, não ambíguas e filtradas para sequências quimeras.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A busca pela comunidade microbiana de uma amostra utilizando a ferramenta metagenômica, a bioinformática e bancos de dados públicos permite obter resultados a nível taxonômico do filo à espécie do microrganismo (FRANSIOSA *et al.*, 2018). As quantidades respectivas de cada classe taxonômica dos microrganismos encontrados nesse estudo estão representadas na Figura 1. Os dois filos encontrados foram Basidiomycota e Ascomycota. As classes foram Saccharomycetes, Agaricomycetes, Agaricostilbomycetes e Tremellomycetes. A ordem obteve os representantes Saccharomycetales, Polyporales, Agaricostilbales, Agaricales e Tremellales. E as famílias foram Metschnikowiaceae, Pichiaceae, Tricholomataceae, Saccharomycetaceae, Agaricostilbaceae, Phanerochaetaceae, Debaryomycetaceae, Dipodascaceae. Dentre os gêneros identificados, destacam-se nos laticínios o gênero *Kluyveromyce*, com as espécies *K. lactis* e *K. marxianus*, que são as únicas espécies fermentadoras de lactose e são importantes para a maturação e formação de aroma (BELLOCH; QUEROL; BARRIO, 2011). O gênero *Candida* também merece destaque devido ao envolvimento com a deterioração de derivados lácteos (SILVA, 2003). Entretanto, a maioria das espécies desse gênero não são patogênicas e geralmente as espécies patogênicas não são encontradas no queijo (JACQUES; CASAREGOLA, 2008).

Figura 1. Quantidade de filos, classes, ordens, famílias, gêneros e espécies encontradas.



Fonte: A autora.

O resultado obtido após o sequenciamento dos genomas é dado em número de reads, que são milhões de pequenos pedaços de DNA, os quais equivalem a uma pequena sequência de poucos pares de base (PEREIRA, 2014). Essa sequência está correlacionada a qual espécie estes pares de base pertencem a fim de identificar o organismo presente. Na análise metagenômica do queijo artesanal colonial, foram encontrados um total de 321.083 reads, sendo identificadas 19 espécies de leveduras.

Embora a metodologia utilizada neste estudo também se aplique a bolores, nesta amostra estes microrganismos não foram identificados. Uma vez que o queijo estudado estava embalado à vácuo, isto pode ter contribuído para a ausência de bolores. Porém, este resultado é positivo, pois implica na ausência de produção de micotoxinas e possivelmente a não contaminação do ambiente com esporos produzidos por algumas espécies de bolores.

A Tabela 1 apresenta os números de reads atribuído a cada espécie identificada. As leveduras, encontradas em uma grande variedade de queijos, são frequentemente utilizadas como culturas auxiliares e estão principalmente na superfície, onde seu número é geralmente 100-1.000 vezes maior do que no interior do queijo (KAZOU *et al.*, 2021). As leveduras de amadurecimento mais comuns disponíveis comercialmente são *Debaromyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus* e *Geotrichum candidum* e, atualmente, culturas lácteas específicas contendo cepas de levedura atribuídas à essas espécies estão disponíveis comercialmente para maturação de queijo (LAVOIE *et al.*, 2012; KAZOU *et al.*, 2021).

Semelhantemente ao presente estudo, Cardoso *et al.*, (2015), em estudo da comunidade microbiana do queijo serro Minas, também encontraram *Debaromyces hansenii*, *Kodamaea ohmeri* e *Kluyveromyces marxianus* como as leveduras predominantes. Enquanto isso, no queijo de leite cru *Tête de Moine* foram identificadas as seguintes espécies de leveduras *Clavispora lusitaniae*, *Debaryomyces hansenii*, *Pichia pseudocactophila*, *Kluyveromyces marxianus*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Debaryomyces capitatus* e *Pichia jadinii* (BUCHL; SEILER, 2011). Devido às características de baixo pH, baixo teor de umidade, elevada concentração de sal e armazenamento refrigerado, é esperado a ocorrência de leveduras no queijo (FLEET, 1990). Em grande parte das vezes, a presença de leveduras em alimentos é benéfica para a construção de sabor do produto (PITT; HOCKING, 1997). Em queijos, as bactérias compõem a microbiota principal, enquanto bactérias halófilas, bolores e leveduras constituem a microbiota secundária (PEREIRA, 2018).

Tabela 1 Quantidade de sequências identificadas das espécies de leveduras em queijo artesanal colonial.

Espécie	Número de reads
<i>Diutina catenulata</i>	245.460
<i>Clavispora lusitaniae</i>	42.560
<i>Kodamaea ohmeri</i>	20.882
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	5.350
<i>Candida ethanolica</i>	3.875
<i>Tricholoma matsutake</i>	851
<i>Galactomyces sp. BPY-54</i>	707
<i>Candida pararugosa</i>	402
<i>Geotrichum bryndzae</i>	359
<i>Starmerella etchellsii</i>	313
<i>Yarrowia lipolytica</i>	123
<i>Trichosporon coremiiforme</i>	101
<i>Trichosporon ovoides</i>	23
<i>Phanerochaete sórdida</i>	23
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	20
<i>Kluyveromyces lactis</i>	8
<i>Candida intermedia</i>	5
<i>Sterigmatomyces halophilus</i>	5
<i>Debaromyces hanseii</i>	1

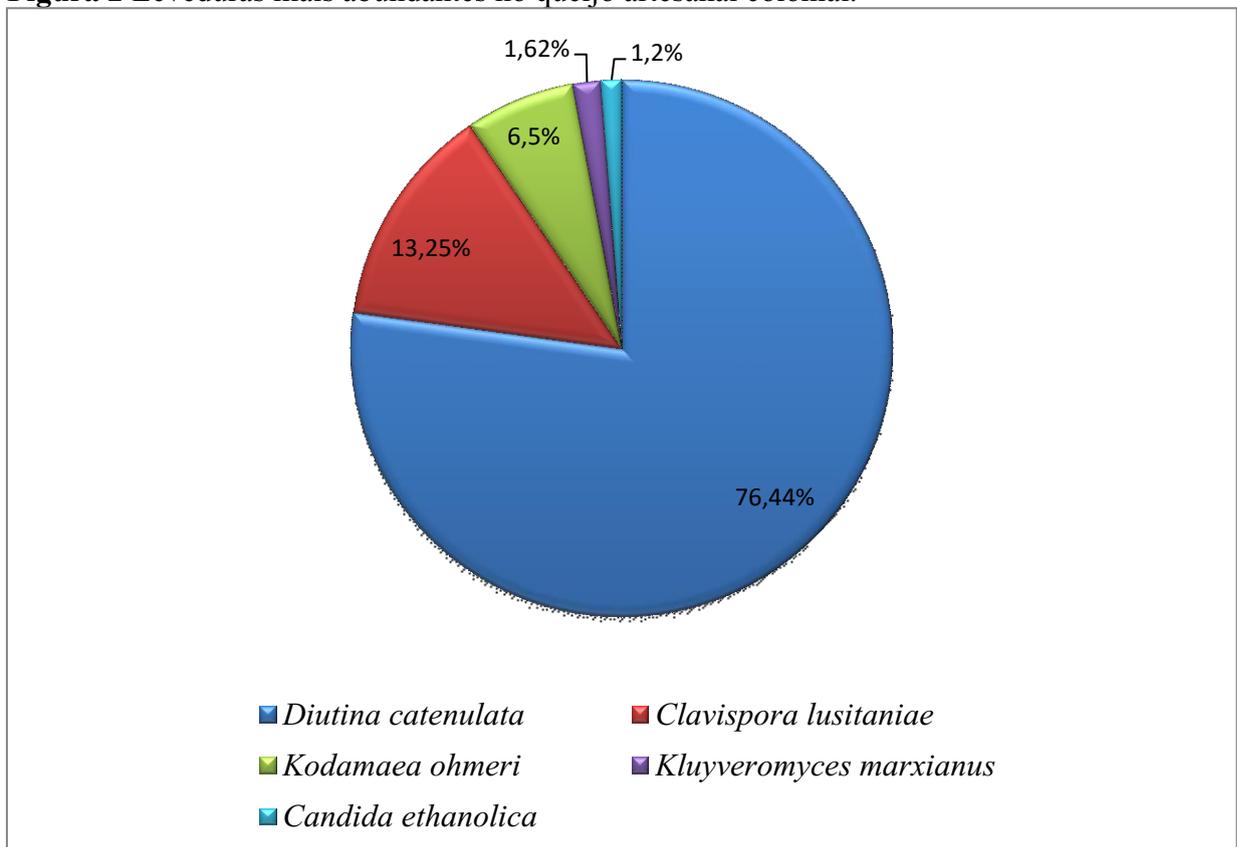
Fonte: A autora

A atividade proteolítica e lipolítica realizada pelas leveduras contribui com a liberação de aminoácidos, ácidos graxos e ésteres, que funcionam como precursores de aroma (LIMA *et al.*, 2009). Em estudo de caracterização de leveduras do queijo coalho, *Yarrowia lipolytica* apresentou-se como melhor produtora de enzimas lipolíticas e proteolíticas (ALMEIDA, 2011). Atividade sinérgica entre *Yarrowia lipolytica* e *Penicillium roqueforti* foi observada por GKATZIONIS *et al.* (2014) em estudo do queijo azul Stilton, em que houve potencialização da produção de compostos aromáticos cetônicos, característicos de queijos azuis. Levando em consideração as atividades lipolíticas e proteolíticas dessa levedura, *Y. lipolytica* pode contribuir com o processo de maturação dos queijos ao atribuir características organolépticas de aroma, corpo, sabor e textura (GROENEWALD *et al.*, 2013), fato que pode ter ocorrido também no queijo analisado no atual estudo. De forma geral, as propriedades lipolíticas e proteolíticas, a formação de componentes do aroma, a fermentação de lactose, a assimilação de lactato, a interações positivas com as culturas iniciadoras e a osmotolerância são características

tecnológicas desejadas em leveduras que funcionam como culturas iniciadoras espontâneas ou controladas para queijos (JAKOBSEN; NARVHUS, 1996).

Neste estudo de identificação fúngica do queijo artesanal colonial, os cinco microrganismos mais abundantes foram as leveduras: *Diutina catenulata*, *Clavispora lusitaniae*, *Kodamaea ohmeri*, *Kluyveromyces marxianus* e *Candida ethanolica* como mostrado na Figura 2.

Figura 2 Leveduras mais abundantes no queijo artesanal colonial.



Fonte: A autora

Diutina catenulata é uma levedura ascomiceta, contaminante de laticínios e isolada de humanos, animais e fontes ambientais (O'BRIEN *et al.*, 2018). Em queijo artesanais, mostra-se como uma das mais prevalentes (PEREIRA, 2018), fato que se repetiu no estudo atual, mostrando-se a levedura com maior número de reads. Este mesmo autor, em estudo da microbiota natural do queijo artesanal serrano, identificou *D. catenulata* em 14 amostras durante todo o processo de maturação. Bem como no queijo serro Minas, em que a levedura esteve presente em três períodos de maturação, como identificado por Cardoso *et al.* (2015). Welthagen e Viljoen (1999) relataram intensa atividade proteolítica e lipolítica da *Diutina*

catenulata em queijo Gouda. No queijo azul Stilton, *Diutina catelunata* foi identificada na crosta externa por métodos independentes de cultura, mas sua detecção não foi possível em métodos dependentes de cultura (GKATZIONIS *et al.*, 2014).

Clavispora lusitaniae foi a segunda levedura mais abundante. Em estudo de produtos lácteos fermentados artesanais tradicionais de Bangladesh, *Clavispora lusitaniae*, também esteve como segunda levedura mais predominante da microflora, atrás apenas de *Kodamaeae ohmeri* (NAHIDUL-ISLAM *et al.*, 2018). Antes nomeada *Candida lusitaniae*, teve sua nomenclatura alterada após identificação de ascósporos clavados nunca antes observados nesta espécie (MIRANDA, 1979). O gênero *Clavispora* é caracterizado principalmente pela forma de ascósporo e liberação do asco (MIRANDA, 1979). Esta levedura ocorre em uma ampla gama de substratos de origem vegetal e animal, bem como resíduos industriais e amostras clínicas (LACHANCE *et al.*, 2003). Em estudos de amadurecimento de queijo feitos com coalhada, foi relatado fraca atividade proteolítica de *Clavispora lusitaniae*, mas houve aumento do pH devido à capacidade de utilizar lactato (BUCHL; SEILER, 2011). Entretanto, *Clavispora lusitaniae* apresentou atividade proteolítica e crescimento na faixa de temperatura entre 10° e 45°C em estudo de leveduras de starters autóctones de queijos (BINETTI *et al.*, 2013).

Kodamaeae ohmeri ocupa o terceiro lugar de levedura mais abundante. A identificação dessa levedura associada à fabricação de queijo foi feita pela primeira vez por Borelli *et al.* (2006), em estudo da população de leveduras relacionadas à fabricação de queijo artesanal produzido na Serra da Canastra. Esta levedura já foi identificada em flores e insetos (ROSA *et al.*, 2003). *K. ohmeri* também foi uma das leveduras prevalentes em estudo com queijo artesanal do serro de Minas em todos os períodos de maturação estudados e exibiu baixa atividade lipolítica e de produção de β -galactosidase (CARDOSO *et al.*, 2015). Esta levedura também já foi identificada em intestino de peixe marinho (LI *et al.*, 2008), em fermento endógeno (pingo e rala) utilizados para produção do Queijo Minas Artesanal (QMA) da região do Serro-MG (MIRANDA, 2020), em salmoura de pepino e é conhecida na indústria de alimentos por suas propriedades de fermentação em picles e deterioração de frutas (BORELLI *et al.*, 2006). Este mesmo autor, em seu estudo de produtos lácteos de dez diferentes propriedades, sugere que *K. ohmeri* pode fazer parte da microbiota natural de iniciação em muitas propriedades, fato que pode ter se repetido no queijo analisado neste estudo.

Kluyveromyces marxianus está entre as espécies de levedura mais predominantes e importantes no leite cru devido a sua capacidade de fermentar a lactose e hidrolisar a gordura e as proteínas do leite (FLEET 1990; EL-SHAROUD *et al.*, 2009). Devido à sua capacidade de

utilizar a lactose como uma fonte de carbono, *K. marxianus* é frequentemente isolado de fontes lácteas, como leites fermentados e queijos (FRÖHLICH-WYDER; ARIAS-ROTH; JAKOB, 2018). Termotolerância, produção de inulinase e taxa de crescimento rápida são algumas outras características desta espécie (LANE *et al.*, 2011). Uma vez que cepas pertencentes à espécie *Kluyveromyces marxianus* foram isoladas de uma grande variedade de habitats, diferentes funcionalidades biotecnológicas têm sido investigadas com esta levedura, como por exemplo produção de enzimas, de compostos de aroma e de etanol, redução do teor de lactose em produtos alimentícios, produção de bioingredientes a partir de soro de queijo entre outros (FONSECA *et al.*, 2008). Nas últimas três décadas, diversos estudos abordaram a produção de etanol a partir da lactose após hidrolisá-la em glicose e galactose usando fermentação de levedura, especialmente as pertencentes às espécies *K. fragilis*, *K. marxianus* e *Candida pseudotropicalis* (AWAST; ANAND, 2020). No entanto, são poucos os casos de produção de etanol em escala industrial a partir de permeado e soro de leite usando espécies *Kluyveromyces* (AWAST; ANAND, 2020).

Candida ethanolica foi isolada pela primeira vez a partir de leveduras forrageiras industriais cultivadas em etanol sintético como única fonte de carbono e diferenciava-se das demais espécies de *Candida* por não assimilar nitrato, não produzir urease e não fermentar açúcares, podendo apresentar crescimento até 42°C (STROS; KRATOCHVILOVÁ, 1980). Esta levedura já foi identificada em bebida fabricada a partir da fermentação sólida de mandioca (RAMOS *et al.*, 2015), em alimento fermentado etíope (BIRMETA *et al.*, 2018), em rúmem bovino (FERNANDES *et al.*, 2019) e em milho úmido e silagem de milho (SANTOS *et al.*, 2016; CARVALHO *et al.*, 2015). Já foi identificada também como deteriorante em vinhos e destilados, como “Grappa”, onde não favoreceu o processo fermentativo (IACUMIN *et al.*, 2011). No entanto, mostrou-se útil em fermentações de grãos de cacau por possuir uma enzima que favorece a qualidade final do produto (FERREIRA, 2018). Ainda, mostrou-se eficaz, em associação com bactérias do ácido láctico, como cultura inicial, em produção de biomassa de peixe (INOUE *et al.*, 2013). Assim como na produção de cerveja artesanal, como levedura não convencional e em alternativa à *S. cerevisiae*, com a intenção de melhorar o aroma, o sabor e gerar produtos diferenciados (FERREIRA, 2018). Uma vez que esta levedura foi isolada em diferentes ambientes, sua presença em queijo pode estar relacionada com o fenômeno de translocação microbiana, através da alimentação da vaca (do trato gastrointestinal para o úbere) (DERAKHSANI *et al.*, 2018).

Em relação aos microrganismos menos abundantes na amostra, *Debaryomyces hansenii* ocupou o último lugar com apenas 1 read. O gênero *Debaryomyces* é um dos mais prevalente em laticínios (JAY, 2005). Em estudos de amadurecimento de queijo feitos com pastas assépticas de coalhada, *Debaryomyces hansenii* produziu um aroma ácido, frutado e de queijo (BUCHL; SEILER, 2011). Já as espécies do gênero *Trichosporon spp.* são amplamente distribuídos na natureza e ocasionalmente podem pertencer à microbiota humana (CHAGAS-NETO; CHAVES; COLOMBO, 2008). E a espécie proteolítica *Trichosporon ovoides*, em estudo em pasta asséptica de coalhada de queijo de Wyder e Puhon (1999) foi considerada como tendo um aroma de queijo e rançoso. E a espécie *Torulaspota delbrueckii*, a mais comum do gênero *Torulaspota*, causou inchaço em amostras de queijo feta dinamarquês e esteve associada com a deterioração de outros queijos (JAY, 2005; WESTALL, FILTENBORG, 1998).

A influência das leveduras nos produtos lácteos pode ser benéfica ou prejudicial. Algumas espécies desempenham um papel importante na produção de lácteos fermentados tradicionais e queijos (BUCHL; SEILER, 2011). A função desempenhada pelas leveduras durante a produção e maturação de queijos está relacionada com a produção de etanol, acetaldeído, etil acetato e etil butirato que são resultantes da fermentação da lactose e que atribuem características organolépticas específicas ao produto final (BORELLI, 2002; WELTHAGEN; VILJOEN, 1999).

As interações entre leveduras e outros microrganismos em ambientes lácteos pode ocorrer de três formas: i) podem inibir ou eliminar microrganismos indesejáveis por causar defeitos de qualidade ou por possuírem potenciais características patogênicas; ii) podem inibir a cultura starter, ou iii) podem contribuir positivamente para o processo fermentativo ou de maturação, apoiando a função da cultura starter (JAKOBSEN; NARVHUS, 1996).

Em queijos, pode haver uma relação sinérgica entre leveduras, *Brevibacterium linens*, *Microbacterium spp.*, *Micrococos* e bactérias do ácido láctico (BAL), na qual a sobrevivência dos lactobacilos é aumentada pela presença de leveduras (BUCHL; SEILER, 2011). As leveduras aumentam o pH do meio (resultante do metabolismo das BAL) pela utilização do lactato e pela formação de substâncias alcalinas por meio da proteólise, permitindo o desenvolvimento de bactérias sensíveis ao ácido como *Brevibacterium linens* e micrococos, além de fornecerem vitaminas e aminoácidos às bactérias (BUCHL; SEILER, 2011).

Entretanto, a atividade antagônica também é observada. O crescimento excessivo de certas espécies de levedura pode ser um fator importante na deterioração dos produtos lácteos (JACQUES; CASAREGOLA, 2008). A deterioração por leveduras pode ser visivelmente

identificada devido a alterações na superfície dos produtos, como escurecimento, e defeitos como pele de sapo, causados principalmente por espécies de *Yarrowia* e *Galactomyces* (AWAST; ANAND, 2020). Porém, alterações não visíveis também são possíveis através da observação de sabor estranho, alteração na textura ou mal odor devido à formação de dióxido de carbono, enzimas proteolíticas e lipolíticas e outros compostos voláteis (AWAST; ANAND, 2020). A fermentação contínua da lactose por leveduras durante a maturação pode levar ao aumento da acidez, gases e sabores frutados, e a hidrólise contínua de proteína e gordura pode contribuir para sabores amargos e rançosos, bem como um amolecimento da textura do produto (FLEET, 1990).

6. CONCLUSÃO

A análise metagenômica do queijo artesanal colonial obteve como resultado a detecção de 19 espécies de leveduras dentre as quais *Diutina catenulata*, *Clavispora lusitaniae*, *Kodamaea ohmeri*, *Kluyveromyces marxianus* e *Candida ethanolica* foram as que apresentaram maior abundância na amostra. Certas leveduras durante o período de maturação do queijo, fornecem características desejáveis pelo consumidor como aroma, sabor e textura. Portanto, a presença destes microrganismos é de grande valia para a qualidade do produto final. Porém, uma vez que o queijo artesanal pode ser feito a partir do leite cru, as boas práticas de fabricação devem ser rigidamente seguidas, para que a presença de fungos e leveduras não torne o produto contaminado e forneça riscos à saúde dos consumidores.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A. C. **Caracterização de leveduras isoladas de queijo coalho**. 2011. 66 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Biologia de Fungos, Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.
- ANDREWS, S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. 2010. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>.
- ANELLI, P. *et al.* Fungal mycobiota and mycotoxin risk for traditional artisan Italian cave cheese. **Food Microbiology**, [S.L.], v. 78, p. 62-72, abr. 2019.
- ARAGÃO, M. O. P. **Diversidade de fungos filamentosos e leveduras em Queijo Minas Artesanal das microrregiões do Serro e da Serra da Canastra**. 2018. 118 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras MG, 2018.
- ARAGÃO, M. *et al.* Fungal Community and Physicochemical Profiles of Ripened Cheeses. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [S.L.], p. 1-23, 7 abr. 2021.
- APHA, A. J. of P. H. **Compend Methods Microbiol Exam Foods**. Fifth ed. Washington, DC: **American Public Health Association Press**, 2015. Disponível em: <<http://ajph.aphapublications.org/doi/book/10.2105/MBEF.0222>>.
- AWAST, N.; ANAND, S. The Role of Yeast and Molds in Dairy Industry: An Updat. In: MINJ, Jagrani; V, Aparna Sudhakaran; KUMARI, Anuradha. **Dairy Processing: Advanced Research to Applications**. Singapore: Springer, 2020. Cap. 12. p. 243-300.
- BANJARA, N. *et al.* Diversity of Yeast and Mold Species from a Variety of Cheese Types. **Current Microbiology**. [S.I.], p. 792-800. 19 fev. 2015.
- BELLOCH, C.; QUEROL, A.; BARRIO, E.. Yeasts and Molds | *Kluyveromyces* spp. **Encyclopedia Of Dairy Sciences**, [S.L.], p. 754-764, 2011.
- BINETTI, A. *et al.* Yeasts from autochthonal cheese starters: technological and functional properties. **Journal of Applied Microbiology**. Argentina, p. 434-444. mar. 2013.
- BIRMETA, G. *et al.* Yeasts and bacteria associated with kocho, an Ethiopian fermented food produced from enset (*Ensete ventricosum*). **Antonie van Leeuwenhoek**, [S.L.], v. 112, n. 4, p. 651-659, 27 out. 2018.
- BORELLI, B. M. **Quantificação dos indicadores higiênico-sanitários e da diversidade de leveduras durante a fabricação do queijo Minas curado da Serra da Canastra - MG**. 2002.

109 p. Dissertação (Mestrado em Biologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

BORELLI, Beatriz M.; FERREIRA, E. G.; LACERDA, Inayara C. A.; FRANCO, G. R.; ROSA, C. A. Yeast populations associated with the artisanal cheese produced in the region of Serra da Canastra, Brazil. **World Journal Of Microbiology And Biotechnology**, [S.L.], v. 22, n. 11, p. 1115-1119, abr. 2006.

BRASIL. Lei nº 13.680, de 14 de junho de 2018. Dispõe sobre o processo de fiscalização de produtos alimentícios de origem animal produzidos de forma artesanal. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 14 de junho de 2018.

BRASIL. LEI 13.860, DE 18 DE JULHO DE 2019. Dispõe sobre a elaboração e a comercialização de queijos artesanais e dá outras providências. Brasil: **Diário Oficial da União**, Brasília., 2019

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. (2011, fevereiro 22). Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos (Resolução nº 7, de 18 de fevereiro de 2011). **Diário Oficial da União**, Brasília.

BUCHL, N. R.; SEILER, H. Yeasts and Molds: yeasts in milk and dairy products. In: FUQUAY, John W; FOX, Patrick F; MCSWEENEY, Paul L.H.. **Encyclopedia of Dairy Sciences**. 2. ed. Reino Unido: Academic Press, 2011. p. 1-4068.

BONDARCZUK, N. H. **Identidade e Qualidade dos Queijos de Origem Brasileira**. 2013. 74 f. TCC (Graduação) - Curso de Veterinária, Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal do Rio Grande Sul, Porto Alegre, 2013.

BUEHLER, A.J.; EVANOWSKI, R.L.; MARTIN, N.H.; BOOR, K.J.; WIEDMANN, M. Internal transcribed spacer (ITS) sequencing reveals considerable fungal diversity in dairy products. **Journal Of Dairy Science**, [S.L.], v. 100, n. 11, p. 8814-8825, nov. 2017.

CARDOSO, V.M. *et al.* A influência das estações e do tempo de maturação nas comunidades de leveduras de um queijo tradicional brasileiro. **Food Research International**. Minas Gerais, p. 331-340. mar. 2015.

CARVALHO, B.F. *et al.* Occurrence of mycotoxins and yeasts and moulds identification in corn silages in tropical climate. **Journal Of Applied Microbiology**, [s. l.], p. 1181-1192, 28 dez. 2015.

CARVALHO, M. M. *et al.* Traditional Colonial-type cheese from the south of Brazil: A case to support the new Brazilian laws for artisanal cheese production from raw milk. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 11, p. 9711–9720, 2019.

CARVALHO, M. Medeiros, M.S., Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Setembro de 2015. **A agricultura familiar rural e a produção de queijos artesanais no município de Seara**, Estado de Santa Catarina - um estudo de caso. Orientadora: Luciana de Oliveira Farinã. Coorientador: Clovis Dorigon.

CARVALHO, M. Medeiros; LINDNER, Juliano de Dea; FARIÑA, Luciana Oliveira. A Produção de Queijo Colonial Artesanal no Município de Seara, Estado de Santa Catarina, frente à legislação Brasileira. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, [S.L.], v. 70, n. 5, p. 1-9, nov. 2016.

CDC. Outbreak of Aflatoxin Poisoning Eastern and Central Provinces, Kenya, January July 2004. **Morbidity And Mortality Weekly Report**. [S.I.], p. 790-793. 3 set. 2004.

CEUGNIEZ, A.; TAMINIAU, B.; COUCHENEY, F.; JACQUES, P.; DELCENSERIE, V.; DAUBE, G.; DRIDER, D. Fungal diversity of “Tomme d'Orchies” cheese during the ripening process as revealed by a metagenomic study. **International Journal of Food Microbiology**. França, p. 89-93. 03 out. 2017.

CHAGAS-NETO, T. C.; CHAVES, G. M.; COLOMBO, A. L. Update on the Genus Trichosporon. **Mycopathologia**, [S.L.], v. 166, n. 3, p. 121-132, jun. 2008.

CHAUHAN, A. *et al.* Metagenomic assessment of the eastern oyster-associated microbiota. **Genome announcements**, v. 2, n. 5, 23 out. 2014.

CHRISTOFF, A. P. Genômica e sequenciamento de nova geração. *In*: TURCHETTOZOLET, Andreia Carina *et al.* (org.). **Marcadores Moleculares na Era Genômica: Metodologias e Aplicações**. Ribeirão Preto, SP: Sociedade Brasileira de Genética, 2017. p. 21–50.

COCK, P. J. A *et al.* Biopython: freely available Python tools for computational molecular biology and bioinformatics. **Bioinformatics**, v. 25, n. 11, p. 1422–1423, 2009.

COCOLIN, L.; ERCOLINI, D. Zooming into food-associated microbial consortia: a cultural evolution. **Current Opinion in Food Science**, [S.L.], v. 2, p. 43-50, abr. 2015.

CÓRDOVA U.A. *et al.* O Queijo Artesanal Serrano Como Fator de Desenvolvimento Nos Campos de Altitude do Sul do Brasil. EPAGRI. 2016.

CRUZ, B. E. V. da *et al.* Identificação geográfica para o queijo do Marajó com estratégia de desenvolvimento territorial para a microregião Arari- Marajó PA. **Cadernos de Prospecção**, Salvador, v. 8, p. 158-168, 2015.

CUNHA, P. Métodos de tipagem microbiológica para o rastreamento e controle de surtos. **Neoprosecta**, p. 13, 2016.

DE CESARE, A. Metagenomics to investigate the dynamics of microbial communities in poultry and poultry products. **Lohmann Information**, v. 53, n. September, 2019.

DERAKHSHANI, H. *et al.* Invited review: microbiota of the bovine udder. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 12, p. 10605-10625, 2018.

DORIGON, C.; RENK, A. Técnicas e métodos tradicionais de processamento de produtos coloniais: de miudezas de colonos pobres aos mercados de qualidade diferenciada. *Revista de Economia Agrícola*, São Paulo, v. 58, n. 1, p. 101-113, 2011.

DORIGON, C. **História, cultura e valorização territorial no Sul do Brasil**. 2020. Disponível em: https://slowfoodbrasil.org/arca_do_gosto/queijo-colonial/. Acesso em: 09 mar. 2021.

DORIGON, C. O mercado informal dos produtos coloniais da região oeste de Santa Catarina. In: ENCONTRO NACIONAL DE ESTUDOS DE CONSUMO, 5. Rio de Janeiro:2010.

EL-SHAROUD, W. M. *et al.* Molecular Identification of Yeasts Associated with Traditional Egyptian Dairy Products. **Journal Of Food Science**. p. 341-346. set. 2009

FAJARNINGSIH, N. D. Internal Transcribed Spacer (ITS) as Dna Barcoding to Identify Fungal Species: a Review. **Squalen Bulletin Of Marine And Fisheries Postharvest And Biotechnology**, [S.I], p. 37-44, jul. 2016.

FAO. **Manual on the application of the HACCP system in Mycotoxin prevention and control**. 2001 (FAO. Food and Nutrition Paper, 73). Disponível em: <http://www.fao.org/3/Y1390E/y1390e00.htm>. Acesso em: 12 abr. 2021.

FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura **Micotoxinas**. 2021. Disponível em: <http://www.fao.org/food/food-safety-quality/a-z-index/mycotoxins/es/>. Acesso em: 12 abr. 2021.

FERNANDES, T. *et al.* Identification and characterization of yeasts from bovine rumen for potential use as probiotics. **Journal of Applied Microbiology**. [S. L.], p. 845-855. mar. 2019.

FERREIRA, M. C. B. **Exploring the non-conventional yeast species *Candida ethanolica* for biotechnological applications: a physiological and genomic analysis**. 2018. 68 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biological Engineering, Técnico Lisboa, Lisboa, 2018.

FIETTO, J. L. R.; MACIEL, T. E. F. Sequenciando genomas. In: Leandro Marcio Moreira. (Org.). **Ciências genômicas: fundamentos e aplicações**. 1ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética. p.27-64, 2015.

FILTENBORG, O.; FRISVAD, J. C.; THIRANE, U. Moulds in food spoilage. **International Journal of Food Microbiology**. N. 33, p. 85-102, 1996.

FLEET, G., 1990. Yeasts in dairy products—a review. **J. Appl. Bacteriol.** 68, 199–211.

FRANCIOSA, I. et al. Sausage fermentation and starter cultures in the era of molecular biology methods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 279, n. April, p. 26–32, 2018.

FRANCO, B. D. Gombossy de Melo; LANDGRAF, Mariza. **Microbiologia dos Alimentos**. [S.I]: Atheneu, 2016.

FREIRE, F. C. O., Vieira I. G. P., Guedes M. I. F. *et al.* Micotoxinas: Importância na Alimentação e na Saúde Humana e Animal. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Embrapa Agroindústria Tropical**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, ISSN 1677- 1915, p. 09-38, out, 2007.

FRÖHLICH-WYDER, M.; ARIAS-ROTH, Emmanuelle; JAKOB, Ernst. Cheese yeasts. **Wiley**. [S. L.], p. 129-141. nov. 2018.

FONSECA, G. G. *et al.* The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. **Applied Microbiology And Biotechnology**. [S. L.], p. 339-354. abr. 2008.

FOX, P.F.; MCSWEENEY, P.I.H. Cheese: An Overview. **Cheese Chemistry, Physics And Microbiology**, p.1-18, 2004.

GIELLO, M. *et al.* Impact of *Lactobacillus curvatus* 54M16 on microbiota composition and growth of *Listeria monocytogenes* in fermented sausages. **Food Microbiology**, v. 72, p. 1–15, jun. 2018.

GKATZIONIS, K. *et al.* Diversity and activities of yeasts from different parts of a Stilton cheese. **International Journal of Food Microbiology**. Birmingham, Reino Unido., p. 109-116. mai. 2014.

GROENEWALD, M. *et al.* *Yarrowia lipolytica*: safety assessment of an oleaginous yeast with a great industrial potential. **Critical Reviews in Microbiology**, [S.L.], v. 40, n. 3, p. 187-206,

mar. 2013.

IACUMIN, L. *et al.* Influence of specific fermentation conditions on natural microflora of pomace in “Grappa” production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [S.L.], v. 28, n. 4, p. 1747-1759, dez. 2011.

INOUE, S. *et al.* Fermentation of non-sterilized fish biomass with a mixed culture of film-forming yeasts and lactobacilli and its effect on innate and adaptive immunity in mice. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, [S.L.], v. 116, n. 6, p. 682-687, dez. 2013.

JAKOBSEN, M.; NARVHUS, Judy. Yeasts and their possible beneficial and negative effects on the quality of dairy products. **International Dairy Journal**. Denmark, p. 755-768. ago. 1996.

JACQUES, N; CASAREGOLA, S. Safety assessment of dairy microorganisms: the hemiascomycetous yeasts. **International Journal of Food Microbiology**, [S.L.], v. 126, n. 3, p. 321-326, 1 set. 2008.

JANY, J. L; BARBIER, G. (2008). Culture-independent methods for identifying microbial communities in cheese. *Food Microbiol.* 25, 839–848.

JAY, J.M. **Microbiologia de Alimentos**. 6ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

JONES, G. Microbial metagenomics and the food industry. **New Food Magazine**, n. 510618, 2017.

JONNALA, B. R. Y. *et al.* Sequencing of the Cheese Microbiome and Its Relevance to Industry. **Frontiers in Microbiology**. [S.I.], p. 1-12. 23 maio 2018.

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

LACHANCE, M *et al.* The D1/D2 domain of the large-subunit rDNA of the yeast species is unusually polymorphic. **Fems Yeast Research**, [S.L.], v. 4, n. 3, p. 253-258, dez. 2003.

LANE, M. M. *et al.* Physiological and metabolic diversity in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. **Antonie van Leeuwenhoek**, [S.L.], v. 100, n. 4, p. 507-519, 15 jun. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10482-011-9606-x>.

LAVOIE, K. *et al.* Characterization of the fungal microflora in raw milk and specialty cheeses of the province of Quebec. **Dairy Science & Technology**, [S.L.], v. 92, n. 5, p. 455-468, 29 dez. 2011.

LI, X.; CHI, Z.; LIU, Z.; YAN, K.; LI, H. Phytase Production by a Marine Yeast *Kodamea ohmeri* BG3. **Applied Biochemistry And Biotechnology**, [S.L.], v. 149, n. 2, p. 183-193, 5 jan. 2008.

LI, Z.; WANG, L. Metagenomic 16S rRNA Sequencing Analysis of Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*) Microbiota from the Puget Sound Region in the United States. **Genome announcements**, v. 5, n. 23, p. e00468-17, 8 jun. 2017.

LIMA, C. D. L. C.; LIMA, L. A.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; FERREIRA, E.G.; ROSA, C. A. Bactérias do ácido lático e leveduras associadas com o queijo de minas artesanal produzido na região da Serra do Salitre, Minas Gerais. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.61, n.1, p. 266- 272, 2009.

LIMA, J. M. Pereira. **Avaliação do microbioma do queijo coalho**. 2017. 61 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Ciência Animal, Universidade Federal Rural do Semi Árido, Mossoró, 2017.

LOPEZ-CANOVAS, L. *et al.* **Pulsed Field Gel Electrophoresis: Past, present, and future**. Academic Press Inc., 2019.

MARAN, B. M. **Identificação e quantificação de bactérias usando as regiões V3-V4 do gene 16S rRNA em salame artesanal através de análise metagenômica**. 2020. 61 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia de Alimentos, Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2020.

MARDANOV, A. V. *et al.* Metagenomics: A Paradigm Shift in Microbiology. In: NAGARAJAN, M. (Org.). **Metagenomics**. First ed. [S.L.]: Elsevier. p. 1-13, 2018.

MENEZES, S. Souza M. **A força dos laços de proximidade na tradição e inovação no / do território sergipano das fabriquetas de queijo**. 2009. 360 f. Tese (Doutorado) - Curso de Geografia, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2009.

METZKER, Michael L. Sequencing technologies — the next generation. **Nature Reviews Genetics**, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 31-46, 8 dez. 2009. Springer Science and Business Media LLC.

MINEKUS, M. *et al.* A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. **The Royal Society Of Chemistry**, [S. L.], p. 1113-1124, 2014.

MIRANDA, N. M. Zille. **Caracterização probiótica de leveduras isoladas de Queijo Minas Artesanal**. 2020. 58 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, A Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri,

Diamantina, 2020.

MIRANDA, L. Rodrigues. *Clavispora*, a new yeast genus of the Saccharomycetales. **Antonie van Leeuwenhoek**. Delft, p. 479-483. jan. 1979.

NAHIDUL-ISLAM, S. M. *et al.* Bacterial and fungal microbiota in traditional Bangladeshi fermented milk products analysed by culture-dependent and culture-independent methods. **Food Research International**, [S.L.], v. 111, p. 431-437, set. 2018.

NASSU *et al.* Caracterização físico-química e análise sensorial de requeijão produzido no Rio Grande do Norte – Brasil **Rev. Cienc. Agron.** , 40, pp. 54-59, 2009.

OAKLEY, B. B.; GONZALEZ-ESCALONA, N.; MOLINA, M. 12. Molecular Typing and Differentiation. *Compendium Methods Microbiol Exam Foods*. [S.L.]: **American Public Health Association**, 2015.

O'BRIEN, C. E. *et al.* Genome analysis of the yeast *Diutina catenulata*, a member of the Debaryomycetaceae/Metschnikowiaceae (CTG-Ser) clade. **Plos One**, [S.L.], v. 13, n. 6, p. 1-12, 26 jun. 2018. Public Library of Science (PLoS).

OLIVEIRA, C.A.F.; FRANCO, R.C.; ROSIM, R.e.; FERNANDES, A.M.. Survey of aflatoxin M1 in cheese from the North-east region of São Paulo, Brazil. **Food Additives and Contaminants: Part B**, [S.L.], v. 4, n. 1, p. 57-60, mar. 2011.

O'SULLIVAN, D.J. *et al.* Nucleic acid-based approaches to investigate microbial-related cheese quality defects. **Frontiers in Microbiology**, 4,1–15, 2013.

OXARAN, V. *et al.* *Listeria monocytogenes* incidence changes and diversity in some Brazilian dairy industries and retail products. **Food Microbiology**, v. 68, p. 16–23, dez. 2017.

PEREIRA, J. G. *et al.* Disseminação de salmonella no processamento industrial em pequena escala de salame artesanal. **Archives of Veterinary Science**, v. 24, n. 1, p. 1–9, mar. 2019.

PEREIRA, M. N. **Queijo artesanal serrano: micobiota natural e qualidade em relação à aflatoxina M1 e sujidades**. 2018. 137 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência dos Alimentos., Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2018.

PEREIRA, V. M. Y. **Montagem e análise de genomas a partir de metagenomas**. 2014. - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014

PITT, J.I.; HOCKING, A.D. **Fungi and Food Spoilage**. 2. ed. [S.L.]: Springer, 1997. 599 p.

PRADO, G. *et al.* Aflatoxina M 1 em amostras de queijo 'minas' comercializadas na cidade de Belo Horizonte - Minas Gerais / Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, [S.L.], v. 20, n. 3, p. 398-400, dez. 2000.

QUEIROGA, R.C.R.E; SANTOS, B.M; GOMES, A.P; MONTEIRO, M.J; TEIXEIRA, S.M; SOUZA, E.L; PEREIRA, C.J.D; PINTADO, M.M.E. Nutritional, textural and sensory properties of Coalho cheese made of goats', cows' milk and their mixture. **LWT – Food Science and Technol.** v. 50, p. 538-544, mar. 2013.

QUIJADA, N. M. *et al.* Austrian Raw-Milk Hard-Cheese Ripening Involves Successional Dynamics of Non-Inoculated Bacteria and Fungi. **Foods**, [S.I], p. 1-21, 11 dez. 2020.

RAMOS, C. L. *et al.* Características microbiológicas e químicas do tarubá, bebida indígena produzida a partir da fermentação sólida da mandioca. **Food Microbiology**. [S. L.], p. 182-188. ago. 2015.

RANTSIOU, K. *et al.* Culture-dependent and -independent methods to investigate the microbial ecology of Italian fermented sausages. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 4, p. 1977–1986, abr. 2005.

National Research Council, 2007. The New Science of Metagenomics: Revealing the Secrets of Our Microbial Planet. Washington, DC: **The National Academies Press**.

ROSA, C.A., *et al.* Yeast communities associated with stingless bees. **FEMS Yeast Research** 4:271–275, dec. 2003.

RYU, D.; WOLF-HALL, C.. Yeasts and Molds. In: SALFINGER, Ivone; TORTORELLO, Mary Lou (ed.). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 5. ed. [S.I]: Apha Press, 2015. Cap. 21. p. 277-286.

SANTA CATARINA, G. do E. Decreto n 362 de 21 de novembro de 2019. Regulamenta a Lei no 17.486, de 2018, que dispõe sobre a produção e comercialização de queijos artesanais de leite cru e adota outras providências. **Brasil: Diário Oficial do Estado**, 2019.

SANTA CATARINA. Lei N° 17.486, de 16 de janeiro de 2018. Dispõe sobre a produção e comercialização de queijos artesanais de leite cru, e adota outras providências. **Brasil: Diário Oficial do Estado**, 2018.

SANTOS, W. F. *et al.* **Sequenciamento de DNA: Métodos E Aplicações**. XIII Safety, Health and Environment World Congress, p. 138–140, 2013.

SANTOS, M. C. *et al.* Identification of the major yeasts isolated from high moisture corn and corn silages in the United States using genetic and biochemical methods. **Journal Of Dairy**

Science. [S. L.], p. 1151-1160. fev. 2016.

SANTOS, M. Rufino; SILVA, J. Oliveira. Impacto da presença de aflatoxinas em alimentos destinados ao consumo humano e animal. **Revista Multidisciplinar da Saúde**, [s. l], v. 04, p. 49-61, 2010.

SCHMIDT, P. A. *et al.* Illumina metabarcoding of a soil fungal community. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 65, p. 128–132, 1 out. 2013.

SCHMITT, B. **Avaliação do uso de diferentes culturas iniciadoras na produção de salame tipo italiano do Frigorífico Antônio Carlos**. 2017. Universidade Federal de Santa Catarina, 2017.

SCHOCH, C.L., *et al.* Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **Proc Nat Acad Sci** 109 (16), 6241–6246, 2012.

SESSOU, P. *et al.* High-Throughput Illumina MiSeq amplicon sequencing of yeast communities associated with indigenous dairy products from Republics of Benin and Niger. **Frontiers In Microbiology**. [S. L.], p. 1-12. abr. 2019.

SILVA, J. Victorino da. **Qualidade microbiológica e ocorrência de leveduras em diferentes amostras de queijos tipo "minas frescal"**. 2003. 119 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Engenharia e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual Paulista (Unesp), São José do Rio Preto, 2003.

SILVA, N. *et al.* **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e água**. 5. ed. São Paulo: Blucher, 2017. 535 p.

SMYTH, R. P. *et al.* Reducing chimera formation during PCR amplification to ensure accurate genotyping. **Gene**, v. 469, p. 45–51, 2010.

SOFU, A. Analyses of dynamics in dairy products and identification of lactic acid bacteria population by molecular methods. **Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology**, 5(1), 6–13, 2017.

SOUZA, É. Cássia. **Ocorrência de fungos deteriorantes e potencialmente produtores de micotoxinas durante o processamento e maturação de queijo Parmesão**. 2016. 52 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós- Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Triângulo Mineiro, Uberaba, 2016.

STROS, J. R. F.; KRATOCHVILOVÁ, A. K. *Candida ethanolica* n. sp. **Zeitschrift Fur Allgemeine Mikrobiologie**. [S. L.], p. 579-581. 25 fev. 1980.

SUN, Z. *et al.* Investigation of bacterial and fungal diversity in tarag using high-throughput sequencing. **Journal Of Dairy Science**. China, p. 6085-6096. out. 2014.

ŠURANSKÁ, H. *et al.* Caracterização da biota de leveduras e bolores em queijos brancos tradicionais em conserva por técnicas moleculares independentes e dependentes da cultura. **Folia Microbiol** 61, 455–463 (2016)

USDA. **USDA Foreign Agricultural Service**. Disponível em: < https://www.fas.usda.gov/data/search?f%5B0%5D=field_commodities%3A7 >. Acesso em: 15 fevereiro 2021.

VANETTI, M. C. D.; MACHADO, S. G. Spoilage Detection. In: TOLDRÁ, Fidel; NOLLET, Leo M.L. (ed.). **Handbook of Dairy Foods Analysis**. 2. ed. [S.I]: Crc Press, 2021. p. 699-711.

VERDAN, A. P.; ISAKA, G. V. Qualidade microbiológica de produtos artesanais comercializados em Canoinhas, SC. **Higiene Alimentar**, v. 29, p. 85–89, 2015.

WASFI, A. *et al.* Graphene-based nanopore approaches for DNA sequencing: a literature review. **Biosensors And Bioelectronics**, [S.L.], v. 119, p. 191-203, nov. 2018.

WHITE, T. J. *et al.* AMPLIFICATION AND DIRECT SEQUENCING OF FUNGAL RIBOSOMAL RNA GENES FOR PHYLOGENETICS. In: **PCR Protocols**. [S.L.] p. 315–322., 1990.

WELTHAGEN, J.J.; VILJOEN, B.C. The isolation and identification of yeasts obtained during the manufacture and ripening of Cheddar cheese. **Food Microbiol.**, v.16, p.63-73, 1999.

WESTALL, S.; FILTENBORG, O. Yeast occurrence in Danish feta cheese. **Food Microbiology**, [S.L.], v. 15, n. 2, p. 215-222, abr. 1998.

WYDER, M.; PUHAN, Z. Role of selected yeasts in cheese ripening. **International Dairy Journal**, [S.L.], v. 9, n. 2, p. 117-124, fev. 1999.

ZACARCHECNO, P. B. *et al.* **Revista Leite & Derivados** Edição 129, set/out 2011, p. 92-99. ISSN 1807-9733.

