

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental
Programa de Pós-graduação em Ciências dos Alimentos

**Caracterização funcional genômica dos micro-organismos
predominantes no fermento endógeno “pingo” do queijo da
Serra da Canastra**

Débora Preceliano de Oliveira

Dissertação para obtenção do Título de
Mestre em Ciência dos Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Christian Hoffmann

São Paulo

2020

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental
Programa de Pós-graduação em Ciências dos Alimentos

**Caracterização funcional genômica dos micro-organismos
predominantes no fermento endógeno “pingo” do queijo da Serra
da Canastra**

Débora Preceliano de Oliveira

Versão corrigida da dissertação conforme resolução CoPGr 6018

Dissertação para obtenção do Título de
Mestre em Ciência dos Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Christian Hoffmann

São Paulo

2020

Débora Preceliano de Oliveira

Caracterização funcional genômica dos micro-organismos
predominantes no fermento endógeno “pingo” do queijo da Serra da
Canastra

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Prof. Dr. Christian Hoffmann
orientador/presidente

1º. Examinador

2º. Examinador

3º. Examinador

4º. Examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2020.

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

O48c Oliveira, Débora Preceliano de
Caracterização funcional genômica dos micro-organismos predominantes no fermento endógeno "pingo" do queijo da Serra da Canastra / Débora Preceliano de Oliveira. - São Paulo, 2020.
81 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.
Orientador: Hoffmann, Christian

1. Queijo minas artesanal. 2. pingo. 3. fermento endógeno. 4. caracterização funcional-genômica. 5. fermentação. I. T. II. Hoffmann, Christian, orientador.

Aos que me deram a vida e zelam por ela:
Deus, minha força e esperança;
Meus pais, Silvia e Milton, minha base de amor, união e gratidão.
À minha tia e madrinha, Célia (in memoriam);
Às Minas de ouro e montanhas **Gerais**:
De onde vem o queijo Canastra e minhas raízes;
Ao povo mineiro, em especial, **meus avós José e Silvia** (in memoriam).

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Silvia, pelo amor incondicional no sentido mais plural e profundo da palavra, por ser um exemplo de garra, força e perseverança mesmo nos momentos em que tudo parece perdido. Pelas quinhentas mil viagens à USP, pela paciência, conselhos, por não me deixar desistir em momento algum e por ser a melhor mãe deste mundo. **Ao meu pai, Milton**, por sempre me incentivar a buscar os meus sonhos, proporcionar ao máximo condições para que eles se realizem. Pelo amor, cuidado, milhares de caronas e por me esperar até altas horas da madrugada no laboratório. Palavras não são suficientes para agradecer e demonstrar todo o amor que sinto por vocês dois! Amo muito vocês!

À minha avó, Silvia Maria de Jesus, que pela primeira vez não verá fisicamente este título com o qual sonhamos, mas que me apoia, protege, guia e inspira de onde estiver. Este é o primeiro de muitos sonhos que realizarei por nós duas. Te amo para sempre vovó!

Ao Darci, meu tio, maratonista, conselheiro e melhor amigo, com quem posso contar nas horas mais difíceis, quem deixa a vida mais leve e nos faz rir quase que diariamente. A quem devo muito, por tudo que fez e faz por mim, e que pode contar comigo para tudo nessa vida.

Às minhas tias: Cordélia e Zélia, por colaborarem cada qual a seu modo com meu trabalho, seja com uma fatia de bolo na hora certa ou com a companhia a caminho da USP ou de casa.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Christian Hoffmann, pela oportunidade, por acreditar na minha capacidade em assumir um trabalho desafiador para uma nutricionista que, até então nunca havia estudado bioinformática e temia a tela preta do Linux. Por confiar em mim e no meu potencial como aluna mais do que eu mesma. Pelas longas conversas, pelo pensamento crítico e construtivo, por mostrar que é possível fazer ciência de qualidade no Brasil. Meu muito obrigada!

À Loredana d'Ovidio, a irmã que a USP me deu, minha parceira de bancada, de muitos perrengues, noitadas no laboratório, inúmeros desabafos, choros e de várias gargalhadas também. A pessoa que me fez ver que ainda existe gente boa nesse mundo, disposta a ajudar por amizade, no sentido mais puro e verdadeiro. Meu

braço direito e esquerdo no laboratório, sem o qual este trabalho não seria realizado. Minha gratidão e amizade eternas por você!

Ao Slavi, pelos chocolates que aliviaram muitos momentos de aflição, por todas as nossas conversas no chá da tarde, pela companhia no ônibus de volta para casa, conselhos e por ser um amigo e profissional que admiro, respeito e me inspiro muito.

Às selenitas Leila e Luciane, que tenho o prazer de chamá-las amigas, por serem um bálsamo de tranquilidade e alegria, a quem respeito como profissionais competentes que são, e tenho absoluta certeza de que brilharão muito onde escolherem estar.

À prof. Dra. Silvia Maria Franciscato Cozzolino, por ser a nutricionista que me inspira e motiva desde a graduação. Referência de profissional e, pelo pouco que pude conviver de pessoa. Obrigada pela atenção, por ter me recebido e principalmente por ter me apresentado ao meu orientador.

À Mestre Hevoise Fátima Papini, profissional e pessoa exemplar, que inspira e contagia à todos com sua energia positiva. Tenho uma gratidão enorme pela oportunidade e profundo respeito por sua trajetória profissional e pessoal. Muito obrigada.

À prof. Dra. Ingrid Schmidt-Hebbel Martens, que me orientou em projetos de iniciação científica e no TCC, me estimulando a ir sempre além. Profissional capacitada e pessoa ímpar. Obrigada pela amizade hoje em dia.

A todos os produtores de queijo Canastra, sem o qual definitivamente este trabalho não seria realizado, obrigada por manterem a tradição na produção do queijo, por nos receberem tão bem e por toda a colaboração.

Aos professores e colegas envolvidos no Projeto Queijo, foi um sonho participar deste grupo de pesquisa, com professores que até então eu conhecia apenas dos livros, artigos ou mídias sociais. Obrigada por todo o aprendizado que me proporcionaram e pela inesquecível viagem à Serra da Canastra.

Ao Prof. Dr. Uelinton, por ter me assumido como aluna formalmente durante um período de burocracias e, ter de fato contribuído como tal no meu exame de qualificação. Jamais esquecerei do seu apoio, obrigada.

A todos do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, que me acolheram durante uma fase de bancada que se tornou extensa durante um período de obras no laboratório do meu orientador. Tenho um carinho especial por este lugar, pois é realmente como coração de mãe, sempre cabe mais um. E mesmo com todas as dificuldades e diferenças me senti muito feliz trabalhando ao som de várias trilhas sonoras e com todos os quitutes e festas da copa. Sentirei saudades.

À todos do Laboratório de Nutrição, Metabolismo e Microbioma, o qual eu vi em várias fases e sinto que irá crescer e frutificar. Foi um imenso orgulho participar.

Aos colegas de *Journal Club* e do Programa de Pós-graduação em Bioinformática, em especial ao **Leandro Boralli**, meu muito obrigada por responderem às minhas dúvidas constantes. Estes foram os melhores grupos de estudos que participei.

Ao Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, pela oportunidade de realizar o mestrado em um dos melhores programas de pós-graduação do país, com profissionais extremamente competentes.

À Universidade de São Paulo, que me proporcionou a realização de grandes sonhos, ao ser aluna e iniciar minha vida científica e acadêmica.

Ao Instituto Mauá de Tecnologia, pela parceria ao realizarem análise de teor de sódio das amostras.

Ao CEFAP, pela realização dos sequenciamentos de nova geração.

À CAPES e ao FoRC, pelo auxílio financeiro na execução do projeto.

“Mesmo quando tudo parece desabar, cabe a mim decidir entre rir ou chorar, ir ou ficar, desistir ou lutar, porque descobri, no caminho incerto da vida, que o mais importante é o decidir.”

Cora Coralina

Resumo: OLIVEIRA, D. P. Caracterização funcional genômica dos micro-organismos predominantes no fermento endógeno “pingo” do queijo da Serra da Canastra. 2020. 048c. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2020.

O queijo minas artesanal é reconhecido como Patrimônio Cultural Imaterial Brasileiro, sendo reconhecidas sete regiões produtoras de queijo artesanal em Minas Gerais, dentre elas, a Serra da Canastra. Durante a produção do queijo da Serra da Canastra é utilizada uma cultura iniciadora da fermentação, denominada popularmente como “pingo”, o qual é proveniente de parte do soro eliminado da produção do queijo do dia anterior. Estudos sobre a composição desse fermento endógeno estão focados, principalmente, na identificação das bactérias lácticas, através de métodos de análise microbiológica tradicionais e que apresentam diversas limitações quando comparado com técnicas moleculares. O presente estudo tem como objetivo caracterizar o genoma dos micro-organismos predominantes neste fermento endógeno utilizado na produção do queijo artesanal da Serra da Canastra (MG). Para realização do estudo foram coletadas amostras de pingo de 10 produtores com histórico de fabricação de queijos de boa qualidade e provenientes das cidades de Medeiros e São Roque de Minas. Uma coleção de estirpes foi feita através do isolamento aeróbico de bactérias presentes no pingo, em meios de cultura diversos, escolhidos para maximizar o potencial metabólico presente na cultura iniciadora e aumentar a diversidade microbiana dos isolados. Foram obtidos 464 isolados bacterianos diferenciados morfológicamente e pela coloração de Gram. Posteriormente, a coleção de estirpes foi triada através do sequenciamento do gene codificante para o rDNA 16S. Foram selecionados 13 isolados representativos para ter seu genoma sequenciado, sendo que, os principais gêneros encontrados foram *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* e *Streptococcus*. Todos os genomas selecionados foram caracterizados quanto à sua função, apresentando dados interessantes relativos à produção de alguns compostos, como o diacetil, presente em vários queijos ao redor do mundo, e extremamente relevante para o desenvolvimento de sabor e aroma. Além disso permite levantar hipóteses importantes em relação ao possível controle biológico do sistema, pela produção de bacteriocinas, que são conhecidas na literatura por reduzirem e/ou inibirem a população de cepas patogênicas, como *Listeria monocytogenes*. O presente estudo, é o primeiro a caracterizar o genoma das cepas fundamentais para a fermentação láctica que ocorre na produção do queijo. Estudos como este, contribuem para a criação de uma identidade e/ou um padrão de origem dos queijos Canastra, além de contribuir para a melhoria do produto e promoverem a descoberta de novas aplicações tecnológicas.

Palavras chave: queijos artesanais. Serra da Canastra; “pingo”; caracterização genômica; fermentação.

Abstract: OLIVEIRA, D. P. **Functional genomic characterization of most microorganisms in the endogenous fermento “pingo” of Serra da Canastra cheese** 2020. 048c. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2020.

The artisanal Minas cheese was recognized as a Brazilian Intangible Cultural Heritage. There are seven recognized regions that produce the artisanal cheese in Minas Gerais, among them is Serra da Canastra. During the production of Serra da Canastra cheese a starter culture of fermentation is used, popularly known as "pingo", which consists in a whey part recovered from the previous day's production. Studies regarding the endogenous yeast composition are specially focused in lactic bacteria, using traditional methods of microbiological analysis. This study aims to characterize the microorganisms' genome predominant in this endogenous yeast used in the artisanal Serra da Canastra cheese production. For this study, samples were collected from 10 producers with a history of manufacturing good quality cheese from Medeiros and São Roque de Minas cities. A collection of strains was created through the isolation of bacteria living in pingo of 10 producers, using different culture medias, have been chosen to maximize the metabolic pathways potential present in the starter culture and increase the microbial diversity of the isolates. We obtained 464 bacterial isolates, based on morphological characteristics as well as Gram staining. Subsequently, the strain collection was screened by sequencing the coding gene for the 16S rDNA. Sequencing was used to select 13 representative isolates for full genome, and the main genus found were *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* and *Streptococcus*. All selected genomes were characterized as to their function, presenting interesting data regarding the production of some compounds, such as diacetyl, present in various cheeses around the world, and extremely relevant to their flavor and aroma. Additionally, raising important hypotheses in relation to a possible biological control of the system, through the production of bacteriocins, which are known in the literature to reduce and/or inhibit the population of pathogenic strains such as *Listeria monocytogenes*. The present study is the first to characterize the genome of strains that are fundamental for lactic fermentation that occurs in the production of Canastra cheese. Studies like this, contribute to the creation of an identity and/or a standard of origin for Canastra cheeses, alongside with contributing to the improvement of the product and promoting the discovery of new technological applications.

Keywords: artisanal cheeses. Serra da Canastra; “pingo”; genomic characterization; fermentation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Regiões produtoras de QMA em Minas Gerais	18
Figura 2- Mapa dos municípios produtores do queijo Canastra.....	20
Figura 3- Processo de fabricação do Queijo Minas Artesanal Canastra.....	21
Figura 4- Fluxo de trabalho do preparo da biblioteca 16S	35
Figura 5- Localização do gene de <i>Lactococcina</i> no genoma de <i>Lactococcus lactis</i>	47
Figura 6- Pan-genoma das cepas de <i>Enterococcus faecalis</i>	51
Figura 7- Pan-genoma das cepas de <i>Lactococcus lactis</i>	53
Figura 8- Via metabólica identificada para síntese da vitamina B2	54
Figura 9- Pan-genoma das cepas de <i>Leuconostoc</i> sp.	56
Figura 10- Via metabólica da produção de diacetil.....	57
Figura 11- Pan-genoma da cepa de <i>Streptococcus</i> spp.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Estudos sobre a microbiota do pingo em diferentes regiões de Minas Gerais.....	24
Tabela 2- Detecção por HTS de aumento e diminuição de micro-organismos pela ação de fatores, tais como NaCl, superfície de madeira, temperatura, pH e umidade	28
Tabela 3- Meios de cultura utilizados, objetivos de uso e condições de incubação	31
Tabela 4- Primers para Preparo da Biblioteca de Sequenciamento	33
Tabela 5- Dados das amostras de pingo em relação a altitude, temperatura e umidade no dia da coleta, pH e teor de NaCl no período úmido	38
Tabela 6- Identificação taxonômica das amostras sequenciadas pelo 16S rDNA... ..	40
Tabela 7- Genomas escolhidos para o estudo e qualidade das sequências	42
Tabela 8- Métricas de avaliação da qualidade do <i>assembly</i>	43

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Genes de bacteriocinas identificados nos genomas	46
Quadro 2- Bactérias que apresentaram resistência a antibióticos.....	48
APÊNDICE	
Quadro 1- Genomas retirados do NCBI para comparação com <i>Enterococcus faecalis</i>	72
Quadro 2- Genomas retirados do NCBI para comparação com <i>Leuconostoc</i> sp.	72
Quadro 3- Genomas retirados do NCBI para comparação com <i>Lactococcus lactis</i>	73
Quadro 4- Genomas retirados do NCBI para comparação com <i>Streptococcus</i> spp.	74
Quadro 5- Principais metabolismos e genes encontrados em <i>Enterococcus faecalis</i>	75
Quadro 6- Principais metabolismos e genes encontrados em <i>Lactococcus lactis</i>	76
Quadro 7- Principais metabolismos e genes encontrados em <i>Leuconostoc</i> sp.	77
Quadro 8- Principais metabolismos e genes encontrados em <i>Streptococcus</i> sp.	78

Sumário

1. INTRODUÇÃO	16
2. REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1. O Queijo Minas Artesanal.....	19
2.2. O Queijo Canastra.....	20
2.3. Técnica do <i>backslopping</i> e culturas iniciadoras.....	21
2.4. O “pingo”.....	23
2.5. Microbiota do “pingo”.....	25
2.6. Bactérias láticas.....	26
2.6.1. Fermentação lática.....	27
2.7. Estudos genômicos em queijos.....	29
3. OBJETIVOS	29
3.1. Objetivo Geral.....	29
3.2. Objetivos Específicos.....	29
4. MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1. Coleta de amostras.....	29
4.2. Análises físico-químicas.....	30
4.2.1. Análise de pH.....	30
4.2.2. Análise de teor de sódio.....	30
4.3. Cultura e isolamento bacteriano.....	31
4.4. Extração do DNA.....	32
4.5. Preparo de Biblioteca para Sequenciamento do 16S rDNA.....	33
4.6. Análise dos dados do sequenciamento rDNA 16S.....	35
4.7. Triagem das cepas.....	35
4.8. Sequenciamento do genoma (WGS).....	36
4.9. Análise bioinformática.....	36
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1. Caracterização do pingo.....	37
5.2. Sequenciamento 16S rDNA.....	38
5.3. Seleção dos genomas.....	41

5.4. Análises dos genomas	42
5.4.1. <i>Ochrobactrum</i> sp.....	44
5.4.2. Bacteriófagos	44
5.4.3. Bacteriocinas.....	45
5.4.4. Resistência à antibióticos	47
5.5. Pan-genoma e ANI.....	49
5.5.1. <i>Enterococcus faecalis</i>	50
5.5.2. <i>Lactococcus lactis</i>	52
5.5.3. <i>Leuconostoc</i> sp.	55
5.5.4. <i>Streptococcus</i> spp.	58
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	59
7. REFERÊNCIAS.....	61
APÊNDICE A.....	72

1. INTRODUÇÃO

A técnica de produção do queijo, no Brasil, foi introduzida pelos colonizadores portugueses logo nos primeiros anos da Colônia. A fabricação de queijos naquele momento provavelmente deu-se a partir da receita portuguesa proveniente da Serra da Estrela, com o uso do leite do gado bovino trazido à Colônia (IPHAN, 2006).

Tradições seculares, como a produção de queijo, são preservadas pelo Instituto Estadual do Patrimônio Histórico e Artístico de Minas Gerais (IEPHA) através do Decreto nº 42.505 de 15 de abril de 2002, que instituiu as formas de registro de bens culturais de natureza imaterial ou intangível, e que constituem o patrimônio cultural de Minas Gerais. Isto possibilitou o registro do modo de produção do queijo minas artesanal (QMA), e o queijo do Serro foi o primeiro a obter esta designação.

Em maio de 2008, o Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional (IPHAN) reconheceu o QMA como Patrimônio Cultural Imaterial Brasileiro. Estes reconhecimentos corroboram a importância cultural, social e econômica do produto no estado. Atualmente, existem sete regiões principais de Minas Gerais reconhecidas como produtoras de QMA: Araxá, Campo das Vertentes, Cerrado, Serra da Canastra, Serra do Salitre, Serro e Triângulo Mineiro (IMA, 2018).

Os atributos sensoriais do QMA são em grande parte conferidos pelos micro-organismos presentes no processo de fermentação e maturação dos queijos. Estas características são algo inerente à cada região, já que há variação dos micro-organismos presentes nos queijos de acordo com o clima, alimentação do gado, condições de manejo do rebanho e a forma de processamento do produto. Embora existam especificidades de cada QMA, o processamento dos queijos em praticamente todas as microrregiões tradicionais envolve a adição do “pingo” e não contempla a etapa de pasteurização do leite (DORES, 2013; MONTEIRO et al., 2018).

O pingo é utilizado na produção de queijos devido a presença de culturas iniciadoras naturais (bactérias ácido-láticas iniciadoras - BALI). Os produtores artesanais da região da Serra da Canastra utilizam a microbiota naturalmente presente no soro (coletado após a segunda salga da massa) como coadjuvante à produção do queijo. Diariamente após a enformagem e salga do queijo, parte do

soro eliminado é coletado e adicionado à produção subsequente (DALMASSO, 2008; GABARAL, 2007; NÓBREGA et al., 2008).

A técnica de retro-utilização deste fermento endógeno, conhecido como “pingo”, é chamada de *backslopping* sendo comumente utilizada na produção de queijos artesanais na Europa, tais como Cabécou ou Rocamadour, Picodon, Parmigiano Reggiano, Comté e Sbrinz (DALMASSO, 2008; GABARAL, 2007; NÓBREGA et al., 2008).

Porém, apesar de sua ampla utilização na fabricação de queijos artesanais em Minas Gerais, pouco ainda é conhecido sobre o potencial gênico das espécies e estirpes de bactérias presentes nas regiões produtoras de QMA (CASTRO et al., 2016; NÓBREGA et al., 2008; SILVA, 2012).

Nesse contexto, o presente estudo visa identificar os micro-organismos cultiváveis e predominantes no pingo, bem como caracterizá-los quanto ao potencial gênico, auxiliando na elucidação de seu papel na determinação das características sensoriais do queijo Canastra. Para tanto, o estudo utilizou técnicas de microbiologia básica associadas à técnicas de biologia molecular, como o sequenciamento genômico *Next Generation Sequencing (NGS)*.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

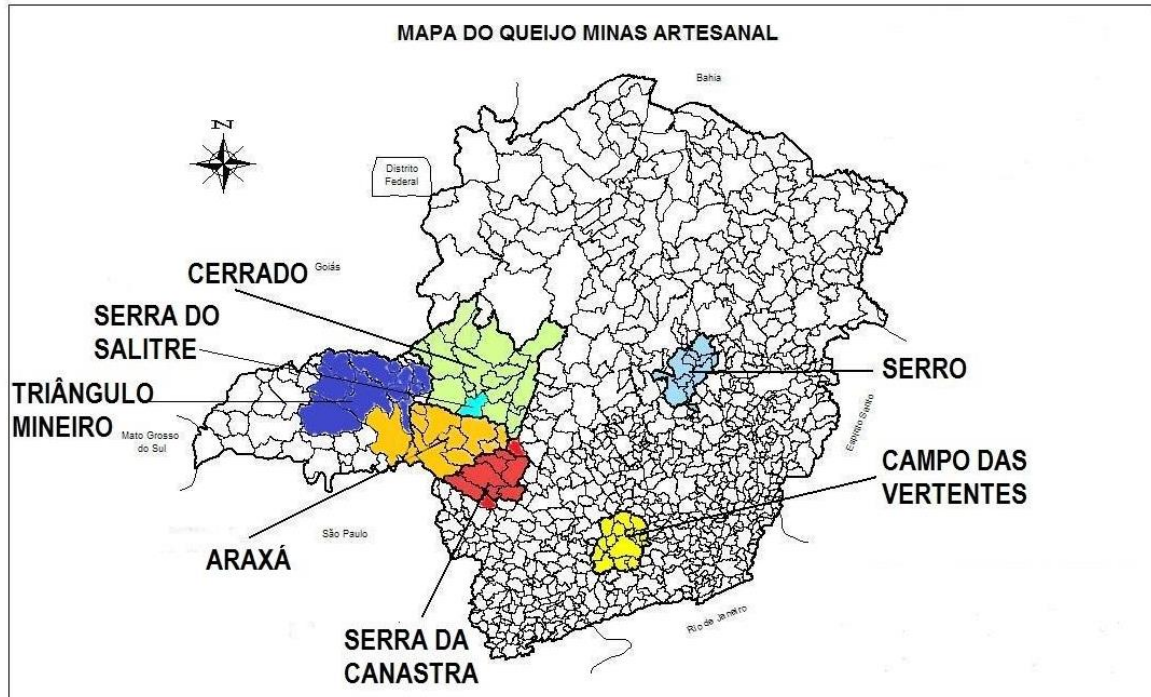
2.1. O Queijo Minas Artesanal

Minas Gerais é o principal estado produtor de leite do Brasil, com 9,14 bilhões de litros/ano, o que representa 26% da produção nacional. Os demais estados com maior produção de leite são Paraná (4,37 bilhões de litros/ano) e Rio Grande do Sul (4,24 bilhões de litros/ano) (IBGE, 2015; USDA, 2017). O estado de Minas Gerais acumula ainda o título de maior estado produtor de queijos do Brasil (CASTRO et al., 2016).

Existem cerca de 30 mil produtores de queijos artesanais em Minas Gerais, distribuídos em 503 municípios, sendo que 9 mil produtores utilizam o leite cru como matéria prima na sua produção (CAMPAGNOLLO et al., 2018; EMATER, 2004; EMBRAPA, 2018). Além da tradição, os queijos artesanais apresentam função importante na economia sendo a fonte de renda principal das famílias

(CAMPAGNOLLO et al.; 2018; EMATER, 2004; EMBRAPA, 2018). As sete regiões produtoras de queijo minas artesanal estão indicadas na Figura 1.

Figura 1 – Regiões produtoras de QMA em Minas Gerais.



Fonte: EMATER, 2004 (adaptado).

A Lei nº 23.157 de 18 de dezembro de 2018, dispõe sobre a produção e a comercialização dos queijos artesanais de Minas Gerais, e considera como queijo artesanal todo o queijo elaborado com leite de vaca integral fresco e cru (sem pasteurização), produzido na propriedade e com características de identidade e qualidades específicas, ou seja, consistência firme, cor e sabor próprios, massa uniforme, isenta de corantes e conservantes, com ou sem olhaduras mecânicas (CARVALHO et al., 2015; MINAS GERAIS, 2018).

Em 31 de janeiro de 2002 a Lei estadual nº 14.185 qualifica e reconhece a produção de queijo artesanal de leite cru, porém a lei autoriza a comercialização somente dentro do estado, sem período de maturação definido. O comércio do QMA fora do estado de Minas Gerais, é permitido apenas após 60 dias de cura ou maturação, em temperatura igual ou superior à 25°C, produzidos em estabelecimentos registrados no Serviço de Inspeção Federal (SIF). Entretanto, este período de maturação é considerado indesejável pelos produtores da região,

uma vez que este período prolongado de maturação afeta as características do produto final (DORES et al., 2013; LIMA e DOULA, 2012; MINAS GERAIS, 2002).

Diante disto, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), através da Instrução Normativa nº 30 de 2013, permitiu que queijos artesanais fossem maturados por um período inferior a 60 dias, desde que estudos técnico-científicos assegurassem que este período reduzido não compromete a inocuidade do produto final mas ainda sujeitos ao processo de reconhecimento pelo SIF (BRASIL, 2013).

Recentemente, a Lei nº13.680 de 14 de junho de 2018 permitiu a comercialização interestadual de produtos alimentícios produzidos de forma artesanal, com características e métodos tradicionais ou regionais próprios, empregando as boas práticas agropecuárias e de fabricação, e desde que submetidos à fiscalização de órgãos de saúde pública dos Estados e do Distrito Federal. O produto artesanal tem que ser identificado, em todo o território nacional, por selo único com a indicação ARTE, conforme regulamento federal (BRASIL, 2018).

2.2. O Queijo Canastra

O que caracteriza o queijo Canastra são os ingredientes (leite de vaca cru integral, cultura láctea natural “pingo”, coalho e sal), consistência semidura com tendência a macia e de natureza manteigosa, textura compacta, cor branca-amarelada, odor e sabor ligeiramente ácidos e não picantes. Quanto a crosta, esta pode ser fina, amarelada e sem trincas (EMATER, 2004).

A região da Serra da Canastra, localizada à sudoeste do Estado de Minas Gerais (Figura 1), é uma das regiões produtoras de QMA. O clima é classificado como tropical de altitude, típico do cerrado, com temperatura média anual em torno de 22,2 °C e com chuvas distribuídas entre os meses de outubro a março. As condições físico-ambientais encontradas na região fornecem um ambiente propício ao desenvolvimento de micro-organismos responsáveis pelo sabor característico do queijo da Canastra (INPI e SEBRAE, 2016).

As cidades que compõem a região da Canastra são: Bambuí, Delfinópolis, Medeiros, Piumhi, São Roque de Minas, Tapiraí, Vargem Bonita, Córrego D’Anta e São João Batista do Glória (Figura 2) (IMA, 2018).

Figura 2 - Mapa dos municípios produtores do queijo Canastra.



Fonte: TargetMap (adaptado).

A Associação dos Produtores de Queijo Canastra (APROCAN) estima que tenham 800 fabricantes de queijo na região. Apenas na cidade de Medeiros, na qual a produção de leite é a principal atividade econômica da cidade, a estimativa era de 400 produtores de queijo artesanal em 2013 (FAEMG, 2013).

Dados levantados pelo Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas (SEBRAE, 2017), revelaram que a região da Serra da Canastra possui mais de 25 mil estabelecimentos agropecuários com produção de leite, a quantidade produzida em 2017 foi superior a 190 mil litros. Para produzir um queijo de um quilo são necessários 10 litros de leite, em média cada produtor fabrica 20 unidades por dia, cerca de 6 mil toneladas de queijo são comercializadas todo ano, segundo a APROCAN.

2.3. Técnica do *backslopping* e culturas iniciadoras

O uso de iniciadores naturais de soro de queijo, do inglês *natural whey starters* (NWS), é herdado da prática do *backslopping* que consiste na retro-utilização deste soro eliminado de uma fabricação anterior dos queijos.

Originárias principalmente de operações anteriores da produção do queijo, as culturas iniciadoras também são provenientes do ambiente e da microbiota do leite cru. Há vários tipos de culturas iniciadoras, classificadas essencialmente de acordo com: suas funções básicas (ex: produção de ácido lático e/ou de diacetil), temperatura de crescimento das bactérias durante a fabricação e/ou maturação do queijo, e composição bacteriana (DEMARIGNY et al., 2011).

A composição bacteriana é subdividida em: tipos de cultura iniciadora, podendo ser culturas iniciadoras naturais (*NSC - Natural Starter Culture*) ou seja, inerentes ao produto e obtidas durante a fabricação dos queijos, seja pela técnica do *backslopping* ou por aplicação de pressão seletiva (ex: tratamento térmico, temperatura de incubação ou pH baixo). Há também as culturas iniciadoras mistas (*MSS - Mixed-Strain Starter*) derivadas das culturas iniciadoras naturais e reproduzidas em instituições especializadas, como centros de pesquisa e/ou empresas comerciais (PARENTE et al., 2017).

Os tipos de culturas mencionados representam os iniciadores tradicionais (*traditional starters*), no entanto, as culturas iniciadoras definidas (*DSS - Defined-Strain Starters*) compostas de uma ou mais cepas, representam o oposto, embora sejam selecionadas, produzidas, mantidas e distribuídas por instituições especializadas como as MSS. Suas características principais são a alta reprodutibilidade e alta resistência a fagos, o que permitiu a substituição de algumas culturas iniciadoras tradicionais, inclusive em queijos com denominação de origem europeus (*Protected Designation of Origin - PDO*) (PARENTE et al., 2017).

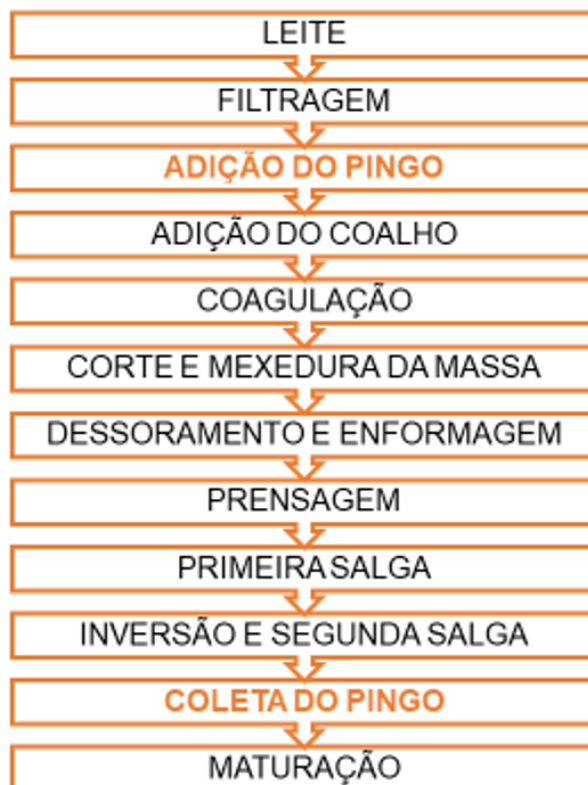
O uso das culturas *starters* traz muitas vantagens tecnológicas, já que as BAL contribuem para a acidificação e a formação da coalhada, liberam inúmeras enzimas no núcleo do queijo, favorecendo a maturação e desenvolvimento das características sensoriais desejadas, além do metabolismo das BAL influenciar na estrutura do queijo com produção de exopolissacarídeos, proteólise e substâncias antimicrobianas (HERREROS et al.; 2003; TOPISIROVIC et al., 2006).

2.4. O “pingo”

Ao final do dia de produção, o queijo é colocado em uma superfície levemente inclinada para favorecer a drenagem do soro remanescente da fermentação e fabricação do queijo. Este processo dura cerca de 12 horas, normalmente durante

a primeira noite após a fabricação, e este soro remanescente é coletado. Ao ser adicionado ao leite, este soro salgado que fermentou neste intervalo de tempo constitui um autêntico fermento natural endógeno, popularmente chamado de “pingo”, conforme figura 3 (CASTRO et al., 2016; GABARAL, 2007; NÓBREGA et al., 2008; SILVA et al., 2011).

Figura 3 - Processo de Fabricação do Queijo Minas Artesanal Canastra.



Fontes: EMATER, 2004; KAMIMURA et al., 2019 (adaptado).

Esse procedimento é comum na produção de diversos queijos artesanais europeus feitos com leite não pasteurizado, como por exemplo, os queijos: Grana Padano, Gruyère, Pecorino Romano, Provolone Valpadana, Rocamadour e Sbrinz (DALMASSO, 2008; GATTI et al., 2014).

Os grupos microbianos presentes no “pingo” direcionam a fermentação e maturação do queijo. Além disso, também agregam ao produto uma microbiota diversificada, representativa da região na qual o queijo é fabricado, conferindo-lhe características sensoriais diferenciadas e endêmicas (GABARAL, 2007; NÓBREGA et al., 2008).

Na Europa, existem mais de 135 variedades de queijos artesanais com denominação de origem, embora a matéria-prima, modo e/ou condições de fabricação sejam diferenciados, estes podem ser considerados ecossistemas únicos e com uma considerável variedade nos tipos de bactérias ácido lácticas (BAL) que cada um contém (GABARAL, 2007; NÓBREGA et al., 2008).

Originárias do leite cru e culturas iniciadoras endógenas, as BAL são essenciais à maturação e à segurança do queijo artesanal mineiro. Elas produzem grande número de enzimas glicolíticas, lipolíticas e proteolíticas que transformam os componentes fundamentais do leite, e do queijo em compostos com propriedades sensoriais desejáveis (CASTRO et al., 2016; VILJOEN, 2001).

2.5. Microbiota do “pingo”

A microbiota do queijo é dinâmica e variável e, em um primeiro momento há a prevalência de BAL provenientes da sua matéria-prima, o leite. Estas são chamadas de culturas iniciadoras primárias (*primary starters*) e, estão envolvidas nas reações bioquímicas iniciais da produção de queijo, como na produção de citrato, componente importante para a textura de alguns tipos de queijos (BLAYA et al., 2018; PARENTE et al., 2017).

A microbiota secundária apresenta maior diversidade do ponto de vista taxonômico e funcional, sendo possível encontrar: BAL não iniciadoras (*NSLAB - Non Starter Lactic Acid Bacteria*), *Propionibacterium*, *Staphylococcus*, bolores e leveduras (BLAYA et al., 2018; PARENTE et al., 2017).

A maior parte dos dados de composição microbiana são do queijo, que é caracterizado pela prevalência de *Lactococcus*, seguido de *Lactobacillus* e *Leuconostoc*, embora também sejam encontrados *Enterococcus faecalis* e *Weissella paramesenteroides*, além de contaminantes como *Staphylococcus* (KAMIMURA et al., 2019). Um estudo pareado entre queijo e pingo, revelou que independente do produtor, a cultura iniciadora (pingo) e o produto final (queijo) demonstram ter microbiotas estáveis e semelhantes. Em comum há o predomínio dos gêneros *Streptococcus* e *Lactococcus* (KAMIMURA et al., 2020).

Os estudos que investigaram especificamente a microbiota do pingo (Tabela 1), são mais antigos e, em sua maioria utilizaram métodos tradicionais, dentre eles: o número mais provável (NMP) para contagem de coliformes totais e

termotolerantes, a enumeração em unidade formadora de colônia (UFC), coloração de Gram e teste de catalase, que auxiliam na identificação.

Tabela 1 - Estudos sobre a microbiota do pingo em diferentes regiões de Minas Gerais.

Estudo e região estudada	n	Micro-organismos encontradas	Quantidade
BORELLI et al., 2006. Serra da Canastra	10	Coliformes totais Coliformes fecais <i>Staphylococcus</i> spp. <i>Staphylococcus aureus</i> Bolores e leveduras	de 93 a > 1100 NMP g ⁻¹ ou mL ⁻¹ de 9 a 1100 NMP g ⁻¹ ou mL ⁻¹ de 4,3 a 6,3 log UFC. g ⁻¹ ou mL ⁻¹ de < 2,0 a 5,7 log UFC. g ⁻¹ ou mL ⁻¹ de 3,6 a 5,2 log UFC. g ⁻¹ ou mL ⁻¹
CASTRO et al., 2016. Campos das Vertentes	12	Coliformes totais Coliformes termotolerantes <i>Staphylococcus</i> spp. Bolores e leveduras	742 (S) e 6,766 (C) NMP/mL 3.2* (S) e 2,854* (C) NMP/mL 3,5 x 10 ⁴ (S) e 2,1 x 10 ⁶ (C)UFC/mL 9,6 x 10 ⁵ (S) e 5,1 x 10 ⁵ (C) UFC/mL
DORES et al., 2013. Serra da Canastra	16	<i>Staphylococcus aureus</i>	de 1 a 3.11 log UFC.mL ⁻¹ (C) de 1 a 2.76 log UFC.mL ⁻¹ (S)
LIMA et al., 2009. Serra do Salitre	10	<i>Enterococcus</i> spp. <i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i> <i>E. raffinosus</i> <i>Lactococcus</i> spp. <i>L. lactis</i> <i>S. agalactiae</i> <i>S. bovis</i> <i>Pediococcus</i> sp. <i>P. acidilati</i> <i>P. pentosaceus</i>	4,75 log UFC/mL 4,94 log UFC/mL 4,48 log UFC/mL 4,49 log UFC/mL 4,45 log UFC/mL 4,89 log UFC/mL 5,00 log UFC/mL 6,75 log UFC/mL 4,32 log UFC/mL 4,18 log UFC/mL 6,48 log UFC/mL

N: Número de bactérias totais identificadas em cada estudo; (C): Período Chuvoso; (S): Período Seco; (NMP): Número Mais Provável; (UFC): Unidade Formadora de Colônia. (P < 0.05).

Destaca-se que dos estudos citados na Tabela 1 apenas a metade utilizou métodos modernos de análise como *Polymerase Chain Reaction (PCR)* e sequenciamento 16S rDNA. Recentemente, o uso de sequenciamento de DNA de alto rendimento (*NGS, Next Generation Sequencing; HTS, High Throughput Sequencing*), promove uma identificação ainda mais precisa dos micro-organismos e de suas propriedades funcionais (JONNALA et al., 2018).

Técnicas microbiológicas tradicionais, como o cultivo das bactérias em meios de cultura M17 e MRS e o isolamento das mesmas, associado ao uso da técnica de sequenciamento do 16S rDNA, identificaram 15 bactérias do gênero *Lactobacillus* provenientes do pingo do queijo da Serra da Canastra (RAFAEL, 2017). Neste mesmo estudo foram identificadas 13 cepas de *Lactobacillus plantarum*, uma de *L. paracasei* e uma de *L. rhamnosus*, evidenciando a prevalência de BAL no pingo.

No entanto, o resultado dos estudos demonstrados na Tabela 1 identificaram bactérias como coliformes totais e termotolerantes, pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, que são bacilos Gram-negativos, não formadores de esporos e capazes de fermentar a lactose com produção de gás. Geralmente esses micro-organismos, dependendo da sua concentração, estão associados à contaminação de origem fecal, sendo um importante indicador da possível presença de bactérias patogênicas de origem entérica (FRANCO e LANDGRAF, 2003).

Dentre as bactérias detectadas no pingo com potencial patogênico está *Staphylococcus aureus* que é frequentemente encontrado no leite cru e na produção de queijos. Esta bactéria é halotolerante e pode produzir uma ou mais enterotoxinas estafilocócicas (SE) nos alimentos que, após ingeridas, podem causar intoxicação alimentar. Um único estudo na literatura destaca a pesquisa específica de enterotoxinas estafilocócicas no pingo, não as tendo encontrado em nenhuma das amostras analisadas (BORELLI et al., 2006).

2.6. Bactérias lácticas

As bactérias lácticas ou ácido-láticas (BAL) são um grupo de micro-organismos Gram-positivos, catalase negativos, não formadores de esporos e que, geralmente, se multiplicam sob condições microaerófilas ou estritamente anaeróbias (BRUNO, 2011; LIMA et al., 2009; MOTTA e GOMES, 2015).

Os gêneros mais importantes de BAL são: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissela*, *Carnobacterium* e *Tetragenococcus* (BRUNO, 2011; LIMA et al., 2009; MOTTA e GOMES, 2015).

Determinadas BAL utilizam, preferencialmente, a lactose como fonte de carbono e tendo como produtos de seu metabolismo diversas substâncias antimicrobianas como: ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, dióxido de

carbono, diacetil, acetaldeído e bacteriocinas que atuam favoravelmente no produto alimentício, pois podem reduzir ou impedir significativamente a multiplicação de bactérias com potencial patogênico (LIMA et al., 2009). As BAL constituem um grupo bem estabelecido de micro-organismos, com função tecnológica amplamente utilizado na indústria alimentícia (BURON-MOLES et al., 2019; LIMA et al., 2009).

Naturalmente biodiversas, as BAL podem ser encontradas em vários nichos ecológicos, como o trato gastrointestinal de humanos, animais, insetos, plantas, solo e água. Essa característica dá-se pela capacidade adquirida pelas BAL de metabolizar vários tipos de carboidratos, e que fornece vantagens competitivas na colonização de vários ecossistemas. A variedade de substratos utilizados se aproveita de algumas vias metabólicas, o que torna as BAL únicas e distintas em termos de potencial de fermentação (BURON-MOLES et al., 2019).

2.6.1. Fermentação láctica

A fermentação láctica é um processo que resulta na formação de ácido láctico a partir de uma fonte de carboidrato. As BAL podem ser divididas em: homofermentativas (produzem ácido láctico como o principal produto da fermentação da glucose) e heterofermentativas (além de ácido láctico, formam outras substâncias, como dióxido de carbono, ácido acético e etanol, a partir da fermentação da glucose), sendo que esta última é subdividida em espécies fermentativas facultativas e obrigatórias (BURON-MOLES et al., 2019; FRANCO e LANDGRAF, 2003).

Bactérias como *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* e algumas espécies de *Lactobacillus* são consideradas homofermentativas obrigatórias, devido à sua capacidade de converter hexoses quase que completamente em ácido láctico através da glicólise (*EMP - Embden-Meyerhof-Parnas*), já as pentoses não são degradadas por todas as bactérias homofermentativas (BURON-MOLES et al., 2019).

Espécies de BAL facultativamente heterofermentativas, como *Leuconostoc* e certos *Lactobacillus* degradam as hexoses em ácido láctico através da via EMP e, por possuírem aldolase e fosfocetolase, também podem metabolizar pentoses e frequentemente gluconato (BURON-MOLES et al., 2019; TORTORA et al., 2005).

As BAL obrigatoriamente heterofermentativas não podem utilizar hexoses pela via EMP devido à falta da enzima glicolítica frutose-1,6-bifosfato aldolase. Em vez disso, degradam as hexoses pela via do fosfogluconato, produzindo não apenas ácido láctico como produto final, mas também quantidades significativas de dióxido de carbono, etanol e/ou ácido acético (BURON-MOLES et al., 2019).

2.7. Estudos genômicos em queijos

O estudo de ecossistemas microbianos em alimentos artesanais é importante para desvendar a sua diversidade (CEUGNIEZ et al., 2016). O número de estudos realizados em produtos lácteos aumentou na última década, particularmente os realizados em derivados de leite. Em queijos, demonstram que, além das BAL outros gêneros podem ser encontrados e, com potencial participação no desenvolvimento das características sensoriais do produto final.

O trabalho de Wolfe et al. (2014), sequenciou 137 comunidades diferentes de micro-organismos presentes na casca de queijos produzidos em 10 países. Nestas microbiotas foram identificados 24 gêneros de amplo cultivo e distribuição, dentre eles, bactérias não encontradas usualmente em queijos, como: *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Brachybacterium*, *Arthrobacter*, *Nocardiopsis*, *Yaniella*, *Halomonas*, *Psychrobacter*, *Pseudomonas*, *Pseudoalteromonas*, *Vibrio*, *Hafnia/Serratia* e *Sphingobacterium*.

Ceugniez et al. (2016), por sua vez investigou a comunidade microbiana do queijo francês “Tomme d’Orchies”, utilizando NGS. Além da microbiota clássica do queijo, foram identificadas várias cepas de origem ambiental como *Corynebacterium* sp. Também foi possível verificar que a microbiota da superfície mostrou maior diversidade, do que a microbiota do núcleo do queijo, sendo que 85% foi atribuída à matéria-prima e demais ingredientes utilizados na fabricação do queijo.

A composição bacteriana do queijo Grana Padano foi avaliada utilizando dois métodos moleculares, o RAPD-PCR e o sequenciamento metagenômico de *amplicons*, com a união das duas técnicas e uma amostragem de 118 queijos, foi possível identificar que *Lactobacillus* (*L. delbrueckii*, *Lacticaseibacillus* *L. rhamnosus*, *L. casei* e *Limosilactobacillus fermentum*), *Lactococcus* (*L. lactis raffinolactis*, *L. helveticus* e *L. lactis*) e *Streptococcus thermophilus* constituem as espécies dominantes da microbiota do Grana Padano (ZAGO et al., 2020).

Jonnala et al. (2018) citam a influência de outros fatores como pH, temperatura, cloreto de sódio (NaCl), dentre outros, na abundância de algumas bactérias detectadas em diferentes tipos de queijos (Tabela 2).

Tabela 2 – Detecção por *HTS de aumento e diminuição de micro-organismos pela ação de fatores, tais como NaCl, superfície de madeira, temperatura, pH e umidade.

Fator de influência	Tipo de Queijo	Aumento/Diminuição	Referências
NaCl	Irlandês artesanal	↓ <i>Leuconostoc</i> ↓ <i>Pseudomonas</i>	Quigley et al., 2012
Superfície de madeira	Cotja	↑ <i>L. mesenteroides</i> ↑ <i>W. paramesenteroides</i>	Escobar-Zepeda et al., 2016
Temperatura e pH	Mozzarella Grana Padano Parmigiano Reggiano	↑ <i>L. lactis</i> ↑ <i>L. fermentum</i> ↑ <i>S. thermophilus</i> ↑ <i>L. delbrueckii</i> ↑ <i>L. helveticus</i>	De Filippis et al., 2014
Umidade	Brie Camembert Cloth bound cheddar, St. Nectaire, Tomme de Savoie	↑ <i>Galactomyces</i> ↓ <i>Scopulariopsis</i> ↓ <i>Aspargillus</i> ↓ <i>Actinobacteria</i> ↓ <i>Staphylococcus</i>	Wolfe et al., 2014

Fonte: Jonnala et al. (2018) (adaptado).

Abundância de bactérias em diferentes amostras de queijos detectada pelo *HTS (*high throughput sequencing*), ↑ (aumento) e ↓ (diminuição) indica os níveis de certas bactérias, conforme influência pelos fatores declarados, com variação inversamente proporcional.

O conhecimento de microbiomas alimentares, principalmente com alimentos fermentados, é importante para entender que determinadas condições podem causar alterações no produto, pois processos como a fermentação são primariamente acionados por micro-organismos que afetarão drasticamente o resultado (CHOI et al., 2020).

Nesse sentido o desenvolvimento de tecnologias de sequenciamento de nova geração, auxilia na obtenção de informações genômicas rápidas e de baixo custo, promovendo compreensão das propriedades microbianas que formam as matrizes alimentares. Além disso, torna possível a investigação de genomas individuais, possibilitando entender como as bactérias respondem à determinadas condições, o que viabiliza o seu controle e intervenção pelo fabricante de queijo (CHOI et al., 2020).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Caracterizar o genoma de micro-organismos predominantes no fermento endógeno utilizado na produção do queijo tradicional da Serra da Canastra.

3.2. Objetivos Específicos

- Identificar os micro-organismos mais frequentes no pingo de 10 produtores com histórico de boas práticas de produção, através do isolamento de estirpes representativas;
- A partir da identificação das bactérias sequenciadas (rDNA 16S), selecionar estirpes de potencial tecnológico para sequenciamento dos genomas e anotar suas principais vias metabólicas para levantamento de hipóteses, quanto à atuação destas espécies nas culturas *starters* responsáveis pelo microbioma do queijo Canastra.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Coleta de amostras

Foram coletadas 10 amostras de pingo, em alíquotas de aproximadamente 50 mL, nas cidades de Medeiros e São Roque de Minas, principais municípios produtores de queijo Canastra, sendo 50 % das amostras provenientes de cada

local. Dos 10 produtores que forneceram as alíquotas, apenas 4 não possuem cadastro no Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA).

A coleta foi realizada no período entre Outubro de 2017 à Fevereiro de 2018, sendo a temperatura e umidade verificadas nas queijarias no momento da coleta das amostras. Estas foram transportadas em caixas isotérmicas contendo gelo reutilizável (gelox) até a chegada ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (São Paulo - SP), em não mais que 24 horas após a coleta.

As amostras foram mantidas sob refrigeração a 4°C até a sua utilização para o isolamento bacteriano, o qual se deu em até 24 horas após a chegada no laboratório. Alíquotas da mesma amostra foram preparadas para a aferição do pH, do teor de cloreto de sódio e para a estocagem a -80°C em glicerol 15% para estudos futuros.

4.2. Análises físico-químicas

4.2.1. Análise de pH

O pH de todas as amostras foi determinado com o uso de pHmetro (BEL engineering® PHS3BW) calibrado conforme instruções do fabricante. A aferição foi realizada em aproximadamente 25 mL de amostra de pingo à temperatura média de 19,4°C (cada amostra teve sua temperatura aferida e registrada no momento da determinação do pH).

4.2.2. Análise de teor de sódio

A determinação de sódio das amostras de pingo foi realizada em fotômetro de chama modelo B462 (Micronal), em colaboração com o Instituto Mauá de Tecnologia, utilizando a metodologia descrita por Okumura, Cavalheiro e Nóbrega (2004), 0,2 mL da amostra de pingo foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL e adicionado água destilada até completar o volume de 100 mL. Para a obtenção da curva de calibração, foram preparadas soluções de NaCl com concentrações de 0,025, 0,050, 0,075, 0,100, 0,125, 0,150, 0,175, 0,200, 0,250 g/L, a partir de uma solução estoque de NaCl (2,5g/L). Os resultados foram expressos em teor de NaCl (%).

4.3 Cultura e isolamento bacteriano

Para a obtenção das culturas bacterianas, uma alíquota de 1 mL de cada amostra de pingo foi diluída serialmente e assepticamente (até 10^{-4}), em tubos contendo 9 mL de água peptonada 0,1% estéril. A partir de cada diluição (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4}), 100 μ L foram inoculados em 8 diferentes meios de cultura distintos em placas de Petri (Tabela 3), utilizando a técnica de espalhamento em superfície, com auxílio de uma alça de Drigalski estéril.

Tabela 3 - Meios de cultura utilizados, objetivos de uso e condições de incubação.

Meio de Cultura	Objetivos	Condição de incubação
Ágar Gema de Ovo	<ul style="list-style-type: none"> • Meio diferencial, não seletivo; • Indicado para observação de lipólise e proteólise. 	<ul style="list-style-type: none"> - Aerobiose; - À 25°C de 24 a 48 horas.
Ágar M17	<ul style="list-style-type: none"> • Meio seletivo para bactérias lácticas. 	<ul style="list-style-type: none"> - Aerobiose; - À 25°C de 24 a 48 horas.
Ágar MRS	<ul style="list-style-type: none"> • Meio seletivo para bactérias lácticas. 	<ul style="list-style-type: none"> - Aerobiose; - À 25°C de 24 a 48 horas.
Ágar Sangue	<ul style="list-style-type: none"> • Determinação de hemólise, tanto alfa, quanto beta. 	<ul style="list-style-type: none"> - Aerobiose; - À 25°C de 24 a 48 horas.
BHI Ágar	<ul style="list-style-type: none"> • Meio não seletivo; • Rico em nutrientes; • Obtenção quantitativa de bactérias; • Desenvolvimento de morfologias diversas. 	<ul style="list-style-type: none"> - Aerobiose; - À 25°C de 24 a 48 horas.
CRBM	<ul style="list-style-type: none"> • Utilizado para a cultura de micro-organismos presentes em queijos feitos a partir de leite cru. 	<ul style="list-style-type: none"> - Aerobiose; - À 25°C de 5 a 22 dias.
MacConkey Ágar	<ul style="list-style-type: none"> • Utilizado por propiciar a multiplicação de bactérias da família <i>Enterobacteriaceae</i>; • Favorece a multiplicação de bactérias fermentadoras de lactose. 	<ul style="list-style-type: none"> - Aerobiose; - À 25°C de 24 a 72 horas.
TSA +5% NaCl	<ul style="list-style-type: none"> • Identificação de micro-organismos halofílicos e halotolerantes. 	<ul style="list-style-type: none"> - Aerobiose; - À 25°C de 5 a 22 dias.

BHI: *Brain Heart Infusion*; CRBM: *Cheese Ripening Bacteria Media*; MRS: Man Rogosa & Sharpe; TSA: *Tryptic Soy Agar*;

As placas inoculadas foram incubadas em aerobiose, em estufa bacteriológica à temperatura de 25°C por 22 dias (tempo de maturação mínimo dos queijos). Para evitar a desidratação do ágar durante o longo período de incubação, foi utilizada uma camada mais espessa de meio de cultura e um béquer com água destilada foi colocado dentro da estufa bacteriológica para manutenção da umidade.

As colônias foram selecionadas a partir do 2º dia de incubação, e subsequentemente todos os dias, durante o período de 22 dias de incubação. Colônias foram selecionadas baseando-se em diferenciação morfológica observada no meio de cultura inicial. Por exemplo, em meio ágar gema de ovo foram consideradas distintas colônias que aparentavam a mesma morfologia, mas que diferiram na sua capacidade de produção de lecitinase, indicada por halo de hidrólise no ágar.

As colônias selecionadas foram purificadas por esgotamento utilizando ágar BHI em duas ou três passagens sucessivas. Após o esgotamento, os isolados foram caracterizados por coloração utilizando o método de Gram.

Estoques de trabalho foram preparados crescendo cada isolado em microplaca de cultura de 96 poços contendo 200 µL de caldo BHI em cada poço, e, incubadas em estufa bacteriológica à 25°C por 24 horas. Alíquotas de 100 µL das culturas foram diluídas em caldo BHI contendo glicerol para se obter uma concentração final de 20%. As placas foram seladas com filme *Cyclerseal sealing film* (PlateMax) e armazenadas a -80°C. O restante da cultura foi centrifugado por 20 minutos à 4°C, a 2.600 xg para obtenção dos *pellets*. O sobrenadante foi descartado e os *pellets* armazenados a -80°C.

4.4. Extração do DNA

Foram usados dois métodos distintos para extração do DNA genômico das cepas isoladas. Na primeira fase (*screening* por sequenciamento do rDNA 16S) foi utilizado o protocolo otimizado de Goldenberger; Ritzler e Altwegg (1995) descrito a seguir.

Os *pellets* das culturas bacterianas foram ressuspensos e incubados a 65°C por 20 minutos com um tampão de lise, contendo Tris-HCl (50mM, pH:8,5), EDTA

(10mM), SDS (1%), Proteinase K (150 µg/mL). Em seguida, as amostras foram incubadas a 95°C por 10 minutos. Ambas etapas de incubação foram realizadas em termobloco (*Dry Bath incubator - Model MD-01N*).

Após esta lise, foram adicionados 8 µL de NaCl (5 mol/L) e 200 µL de Isopropanol em cada tubo. A suspensão foi homogeneizada por pipetagem e centrifugado a 20.000 xg por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado com 200 µL de álcool 70% (recém preparado). A suspensão foi centrifugada novamente nas mesmas condições e o sobrenadante removido por pipetagem. Os tubos foram incubados a 37°C no termobloco até que todo o excedente de álcool fosse evaporado.

O ácido nucleico obtido foi ressuspendido em 200 µL de Tris-HCl (1M; pH 8,0), ao qual foram adicionados 50 µL de uma solução de RNase, contendo 5 µL de RNase (RNAsecure™ RNase Inactivation Reagent - Invitrogen™) e 45 µL de TE (Tris-HCl 1M; EDTA 0,5M; pH 8,0) e incubado a 37°C por 1 hora. Em seguida, foi realizada lavagens com isopropanol e álcool 70%, com subseqüentes centrifugações a 20.000 xg por 10 minutos, conforme descrito anteriormente. A ressuspensão final foi com 100 µL de Tris (10mM) e a concentração de DNA foi aferida em *NanoPhotometer® N50* (Implen) para verificar a quantidade e qualidade da extração.

Já na segunda fase, correspondente ao sequenciamento *Whole Genome Sequencing (WGS)*, a extração do DNA genômico das cepas selecionadas na triagem foi realizada com o *DNeasy Blood & Tissue Kit* (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante.

4.5. Preparo de biblioteca para sequenciamento do 16S rDNA

O preparo da biblioteca para sequenciamento do 16S rDNA das bactérias isoladas, seguiu o protocolo *16S Metagenomic Sequencing Library Preparation (s/d)* da Illumina, com adaptações. Para cada isolado foram amplificadas 5 regiões sobrejacentes do rDNA 16S, de maneira a obter uma cobertura quase completa do gene e melhorar a identificação taxonômica dos isolados.

A primeira etapa do protocolo de preparação das bibliotecas consistiu em realizar *Polymerase Chain Reaction (PCR)* para obtenção dos 5 *amplicons* alvo. As

reações de PCR continham 12,5 µL de *OneTaq® Hot Start 2X Master Mix* (NEB M0485S), 0,8 pMol de primer, 1 µL de DNA (em média 20 ng/mL) e água ultrapura para completar um volume final de 25 µL. Apenas para a obtenção do *amplicon 5* foi necessário utilizar 2,5 µL de *GC Enhancer* da enzima. As condições da PCR foram: 95°C por 1 min, 25 ciclos a 94°C por 30 s; 50°C por 30 s; 72°C por 30 s; e extensão final à 72°C por 7 min e, o termociclador utilizado foi o *Veriti™ 96-Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems).

Foram utilizados primers descritos por Wilmotte (1993) exemplificados na Tabela 4, acrescidos dos adaptadores Illumina.

Tabela 4 - Primers para Preparo da Biblioteca de Sequenciamento.

<i>Amplicon</i>	<i>Primer Forward</i>	<i>Sequência do Primer</i>	<i>Primer Reverse</i>	<i>Sequência do Primer</i>
1	IBSF8/20	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	IBSR534/18	ATTACCGCGGCTGCTGGC
2	IBSF349/17	AGGCAGCAGTGGGGAAT	IBSR806/20	GGACTACNVGGGTWTCTAAT
3	IBSF517/17	GCCAGCAGCCGCGGTAA	IBSR926/20	CCGTCAATYYTTTTRAGTTT
4	IBSF787/20	ATTAGAWACCCBNGTAGTCC	IBSR1407/16	GACGGGCGGTGTGTRC
5	IBSF917/16	GAATTGACGGGGRCCC	IBSR1541/20	AAGGAGGTGATCCAGCCGCA

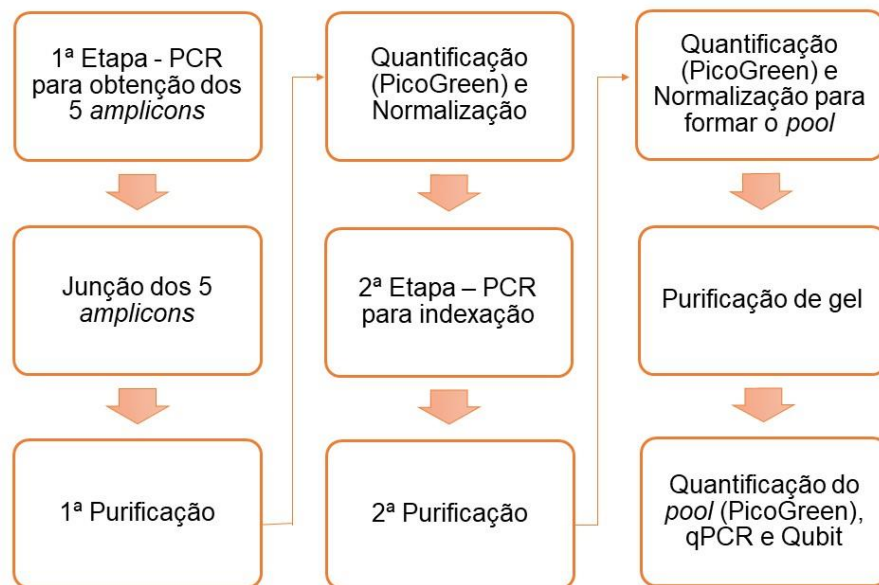
Fonte: Wilmotte,1993 (adaptado).

Os *amplicons* foram analisados eletroforeticamente em gel de agarose 1% em tampão TBE (Tris 89mM; Borato 89mM; EDTA 2mM; pH ~8,3). Os 5 *amplicons* obtidos foram combinados e utilizados para a preparação da biblioteca de sequenciamento (Figura 4), fazendo uso de kits de reagentes Illumina Nextera XT Index Kit v2 Set A e Set B (*96 indexes, 384 samples*).

Cada biblioteca foi quantificada por fluorimetria utilizando o kit *Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay* (Invitrogen P7589). As bibliotecas foram combinadas em quantidades equimolares para a construção do *pool* utilizado para o sequenciamento. O *pool* de bibliotecas foi purificado utilizando o kit *QIAquick Gel Extraction* (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante. O *pool* purificado foi quantificado por qPCR utilizando o kit *KAPA Library Quantification Kit Illumina® Platforms* (Roche), de acordo com as instruções do fabricante.

O *pool* de bibliotecas foi sequenciado pelo centro multiusuário CEFAP (Centro de Facilidades de Apoio à Pesquisa), abrigado no ICB/USP (Instituto de Ciências Biológicas/Universidade de São Paulo), utilizando a plataforma Illumina Miseq.

Figura 4 - Fluxo de trabalho do preparo da biblioteca 16S.



Fonte: 16S Library Preparation Workflow (adaptado).

Foram realizados dois sequenciamentos do 16S rDNA, com 192 amostras cada, totalizando 384 amostras. No entanto, houve uma falha no primeiro sequenciamento, que apresentou qualidade insatisfatória, e foram utilizados somente os dados da segunda corrida de sequenciamento para as análises subsequentes.

4.6. Análise dos dados do sequenciamento rDNA 16S

Os dados do sequenciamento 16S rDNA foram analisados utilizando o programa EMIRGE (MILLER et al., 2011), seguindo a recomendação (*default*) de 40 a 80 iterações.

4.7. Triagem das cepas

Para auxiliar a triagem das cepas, levou-se em consideração os resultados do estudo de Isidorio (2019), o qual sequenciou o 16S rDNA da comunidade microbiana de 78 amostras de pingo da Serra da Canastra. Neste estudo, a identificação das

principais bactérias do pingo teve melhor classificação taxonômica no nível de gênero. Baseando-se nestes dados e na frequência e diversidade de isolados obtidos, foram selecionadas 13 cepas para o sequenciamento completo do genoma (WGS).

4.8. Sequenciamento do genoma (WGS)

Para o sequenciamento do genoma foi utilizado o kit padrão Illumina Miseq (Nextera® DNA Library Preparation Kit). O preparo da biblioteca seguiu as recomendações do kit. Foi utilizada plataforma Illumina NextSeq 500 do centro multiusuário CEFAP (Centro de Facilidades de Apoio à Pesquisa), abrigado no ICB/USP (Instituto de Ciências Biológicas/Universidade de São Paulo), para a corrida.

4.9. Análise bioinformática

As sequências obtidas para cada isolado foram pré-processadas utilizando o programa BBDuk v38.76 (BUSHNELL et al., 2017) para a remoção de sequências de baixa qualidade (*trimming* ou trimagem).

A qualidade da trimagem foi avaliada usando o mesmo programa e utilizados os mesmos parâmetros, sendo eles: $k=23$ (número de *kmers*), $mink=11$ (comprimento do *kmer* mais curto a ser usado para identificá-lo como referência) e $hdist=1$ (distância de Hamming).

Para cada isolado, os genomas foram montados usando o programa SPAdes v3.14.1 (BANKEVICH et al., 2012). A qualidade de montagem (*assembly*), foi avaliada usando o programa QUAST v5.0.2 (MIKHEENKO et al., 2018).

Os *assemblies* foram subsequentemente analisados com o programa Anvi'o v.6.2 (EREN, et al., 2015), utilizando uma de suas análises, chamada *screening cultivars*. Esta análise visa identificar se as culturas sequenciadas são realmente axênicas por métodos bioinformáticos. Bins foram criadas utilizando o programa Anvi'o e sua implementação do programa CONCOCT v1.1.0 (ALNEBERG et al., 2013). Finalmente, as bins detectadas como genomas de interesse foram exportadas para análises subsequentes. A completude e a redundância dos genomas recuperados foram calculadas usando o software Anvi'o.

Os genomas (bins) obtidos foram avaliados para a presença de genes de bacteriocinas com o programa BAGEL4 (HEEL et al., 2018), genes de resistência a antibióticos através do Resfinder (ZANKARI et al., 2012) e bacteriófagos lisogênicos integrados usando o programa MARVEL (AMGARTEN et al., 2018).

Os 11 genomas obtidos de 4 gêneros bacterianos predominantes no pingo (*Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* e *Enterococcus*), foram selecionados para uma análise pan-genômica utilizando o programa Anvi'o 6.2 (DELMONT e EREN, 2018). Para esta análise foram selecionados genomas completos, depositados no GenBank (National Center for Biotechnology Information - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) do mesmo gênero/espécie ao que foi encontrado nas amostras de pingo e, preferencialmente obtidos de origem láctea. A tabela com o número de acesso e informações dos genomas encontra-se no Apêndice A. *Average Nucleotide Identity (ANI)*, foi calculado para os novos genomas contra os genomas selecionados do GenBank, usando o pyANI (PRITCHARD et al., 2016).

Genes foram preditos utilizando o programa Prokka implementado no Anvi'o 6.2 e ORF's foram anotadas quanto a sua função usando a *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)* (KANEHISA et al., 2016).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização do pingo

O estudo da microbiota dos alimentos relaciona-se com a estrutura/dinâmica das comunidades microbianas e parâmetros físico-químicos como o pH, atividade de água, concentração de sal e temperatura (FILIPPIS et al., 2016). Os resultados das análises físico-químicas estão detalhados na Tabela 5, bem como as características das queijarias de onde as amostras foram coletadas.

Os dados de altitude, umidade e temperatura médias na queijaria, foram coletados durante a estação úmida, no momento de retirada das amostras. Os valores de pH médio das amostras analisadas foi de 5,063, variando de 4,56 a 5,87. Já a concentração média de NaCl no pingo foi de 5,382%, com alta variação 1,8% a 11,02%. Não há medida padrão para a salga do queijo, esta etapa é feita de maneira empírica, o que pode explicar esta variação.

Tabela 5 – Dados das amostras de pingo em relação a altitude, temperatura e umidade no dia da coleta, pH e teor de NaCl no período úmido.

Amostras	Cidade	Altitude (m)	Temperatura (°C)	Umidade (mm)	pH	NaCl (%)
P045	São Roque de Minas	803	24,5	65	4,56	2,11
P047	São Roque de Minas	885	24,6	79	5,22	6,28
P051	São Roque de Minas	NA	28,4	59	4,82	11,02
P052	São Roque de Minas	850	24,4	55	5,25	10,25
P055	São Roque de Minas	866	24,1	55	5,87	5,37
P057	Medeiros	949	NA	NA	5,04	5,48
P058	Medeiros	952	NA	NA	5,02	3,34
P065	Medeiros	946	NA	NA	5,13	1,80
P066	Medeiros	1092	NA	NA	4,92	4,11
P067	Medeiros	1001	NA	NA	4,80	4,11

NA: não aferido.

5.2. Sequenciamento 16S rDNA

Foram isoladas 464 colônias no total, sendo 213 bactérias Gram-positivas e 251 bactérias Gram-negativas, das quais 192 foram sequenciadas. A identificação taxonômica a nível de família, gênero e espécie foi possível para 113 bactérias (Tabela 6).

O sequenciamento do 16S rDNA fornece uma forma rápida e eficiente de se obter a identificação de isolados microbianos. Entretanto, frequentemente é limitado a uma identificação somente em nível de gênero, devido ao sequenciamento de fragmentos pequenos do gene completo (JONNALA et al., 2018).

Estudos prévios demonstraram que os gêneros predominantes no pingo do queijo Canastra são *Lactococcus* (45,6%) e *Streptococcus* (33,8%), mas também

foram encontrados *Leuconostoc* (6,1%), *Staphylococcus* (5,1%), *Psychrobacter* (4,1%) *Escherichia-Shigella* (0,6%), *Weissella* (0,5%), *Lactobacillus* (0,2%) e *Corynebacterium* (0,1%) (ISIDORIO, 2019; KAMIMURA et al., 2019).

Os dados encontrados nos estudos de Isidório (2019) e Kamimura et al. (2020), corroboram com os principais gêneros de bactérias lácticas identificados no leite de vaca, sendo eles *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Enterococcus*. Embora também tenham sido encontradas bactérias psicrotólicas como *Pseudomonas* e *Acinetobacter*, além da presença de bactérias anaeróbicas tais como: *Bacteroides*, *Faecalibacterium*, *Prevotella* e *Catenibacterium*, e que são comumente associadas à contaminação de origem fecal (TILOCCA et al., 2020).

Tabela 6 – Identificação taxonômica das amostras sequenciadas pelo 16S rDNA.

Identificação			Amostras									Total Geral	
Família	Gênero	Espécie	P045	P047	P051	P052	P055	P057	P058	P065	P066		P067
Carnobacteriaceae	<i>Granulicatella</i>	<i>Granulicatella</i> sp.					1						1
Corynebacteriaceae	<i>Corynebacterium</i>	<i>Corynebacterium</i> spp.						2		3			5
	<i>Citrobacter</i>	<i>Citrobacter freundii</i>				1			1			1	3
	<i>Enterobacter</i>	<i>Enterobacter</i> spp.				1						1	2
	<i>Escherichia-Shigella</i>	<i>Escherichia coli</i>	3			3			1			2	9
Enterobacteriaceae	NI	NI	4			2	2	2	1				9
	<i>Hafnia-Obesumbacterium</i>	<i>Hafnia-Obesumbacterium</i> sp.							1				1
	<i>Providencia</i>	<i>Providencia</i> spp.	2										2
	<i>Raoultella</i>	<i>Raoultella ornithinolytica</i>				1							1
	<i>Serratia</i>	<i>Serratia</i> spp.	1								2		3
	<i>Enterococcus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>									1	1	2
Enterococcaceae		<i>Enterococcus faecium</i>						1					1
	NI	NI								1		1	2
Leuconostocaceae	<i>Leuconostoc</i>	<i>Leuconostoc</i> sp.		1									1
Microbacteriaceae	<i>Leucobacter</i>	<i>Leucobacter</i> spp.				2							2
Micrococcaceae	<i>Kocuria</i>	<i>Kocuria salsicia</i>					1		1	1			4
	<i>Rothia</i>	<i>Rothia</i> sp.		1									1
Moraxellaceae	<i>Acinetobacter</i>	<i>Acinetobacter</i> spp.		1		1			2				5
	<i>Psychrobacter</i>	<i>Psychrobacter</i> sp.					1						1
Paenibacillaceae	<i>Paenibacillus</i>	<i>Paenibacillus</i> sp.					1						1
Rhizobiaceae	<i>Ochrobactrum</i>	<i>Ochrobactrum</i> sp.				1							1
	<i>Macrococcus</i>	<i>Macrococcus</i> spp.					3	1	1			1	6
Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	3			1	3				1		8
		<i>Staphylococcus sciuri</i>	8	1			6				1	8	24
	<i>Lactococcus</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	2							2		2	6
	NI	NI	2				1						3
Streptococcaceae	<i>Streptococcus</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>					1						1
	NI	NI				1	3	1		1			6
Xanthomonadaceae	<i>Stenotrophomonas</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>										2	2
Total Geral			25	4	1	13	23	7	8	8	5	19	113

NI = Não Identificados.

5.3. Seleção dos genomas

Foram selecionadas 13 isolados representativos utilizando os critérios indicados acima. Ainda, na tentativa de expandir a diversidade coberta pelo sequenciamento, e por haver disponibilidade de espaço na placa de sequenciamento, foram incluídas algumas bactérias provenientes da primeira triagem usando o rDNA 16S, que embora com qualidade insatisfatória, indicou a possível presença de bactérias de interesse para a descrição do sistema de produção do queijo Canastra. Foi incluído ainda um isolado identificado como *Ochrobactrum* sp., um clado irmão à bactéria patogênica *Brucella* sp. Este isolado também foi inserido no sequenciamento para confirmação desta identificação.

Foram inicialmente selecionados para o sequenciamento completo isolados classificados como: *Leuconostoc* sp., *Lactococcus lactis*, *Streptococcus* sp., devido ao potencial tecnológico que apresentam (Tabela 7). Entretanto, foram analisados também genomas de *Enterococcus* spp., gênero bastante prevalente no pingo do queijo Canastra, obtidos durante o sequenciamento, possivelmente oriundas de contaminação basal de culturas não axênicas.

Na Tabela 7, também é possível verificar os dados de qualidade das sequências, informados pelo programa (Anvi'o). Os dados se referem à completude e redundância dos genomas obtidos. É indicado que genomas tenham valores de completude superiores à 50% e os de redundância inferiores à 10%, indicando uma excelente qualidade dos genomas obtidos (EREN, et al., 2015).

Tabela 7 – Genomas escolhidos para o estudo e qualidade das sequências.

ID	Produtor	Cidade	Bactérias	Completo	Redundância
EF01	P045	São Roque de Minas	<i>Enterococcus faecalis</i>	100.0	8.5
EF02	P057	Medeiros	<i>Enterococcus faecalis</i>	97.2	21.1
EF03	P058	Medeiros	<i>Enterococcus faecalis</i>	93.0	2.8
EF04	P057	Medeiros	<i>Enterococcus faecalis</i>	100.0	1.4
EF05	P057	Medeiros	<i>Enterococcus faecalis</i>	100.0	7.0
G22	P047	São Roque de Minas	<i>Lactococcus lactis</i>	98.6	0.0
G29	P057	Medeiros	<i>Lactococcus lactis</i>	87.3	0.0
G30	P057	Medeiros	<i>Lactococcus lactis</i>	93.0	0.0
L019	P045	São Roque de Minas	<i>Leuconostoc</i> sp	97.2	1.4
L022	P047	São Roque de Minas	<i>Leuconostoc</i> sp	97.2	1.4
STREPTO	P058	Medeiros	<i>Streptococcus</i> sp	100.0	0.0

5.4. Análises dos genomas

Idealmente, a montagem do genoma resulta em um único contig para um cromossomo haploide e em dois contigs para um cromossomo diploide. No entanto, o que normalmente é obtido como resultado são vários contigs menores, e de comprimentos variados. Sendo assim faz-se necessária a verificação dos dados de qualidade da montagem dos genomas (*assembly*), que neste caso, foi realizada com o auxílio do programa QUAST para todos os genomas obtidos (GALLEGOS et al., 2020).

A estatística mais comum para a análise de comprimentos de contig é o N50, que representa o menor comprimento dos contigs, com pelo menos metade de cobertura do genoma. Para efetuar este cálculo é necessário ter o tamanho do genoma ou o comprimento total dos contigs.

Seguindo o mesmo raciocínio, é possível calcular o N75, cujo ponto de corte é 75% do genoma, ou seja, o N75 representa o menor comprimento de contigs que cobre pelo menos 75% do genoma. O QUAST apresenta as métricas mencionadas, além de fornecer dados como o percentual de GC. Todas as métricas estão representadas na Tabela 8.

Tabela 8 – Métricas de avaliação da qualidade do *assembly*.

Quast Metrics	EF01	EF02	EF03	EF04	EF05	G22	G29	G30	L019	L022	STREPTO	Ochrobac
# contigs (>= 0 bp)	92	147	133	149	135	167	36	108	47	72	167	18
# contigs (>= 1000 bp)	92	147	133	149	135	167	36	108	47	72	61	18
# contigs (>= 5000 bp)	60	86	106	95	84	71	25	53	34	38	43	17
# contigs (>= 10000 bp)	50	65	83	70	65	43	22	41	28	32	36	17
# contigs (>= 25000 bp)	32	41	42	37	41	33	18	29	19	19	25	15
# contigs (>= 50000 bp)	16	17	16	17	19	17	12	15	14	14	18	14
Total length (>= 0 bp)	2974653	3097750	2981872	3135360	3039017	2689089	1801160	2667423	1868427	2043242	2289901	3934159
Total length (>= 1000 bp)	2974653	3097750	2981872	3135360	3039017	2689089	1801160	2667423	1868427	2043242	2263972	3934159
Total length (>= 5000 bp)	2900172	2957140	2911179	3011009	2923222	2468173	1778773	2546992	1838565	1964996	2223082	3932478
Total length (>= 10000 bp)	2827521	2805417	2753740	2836882	2783769	2278574	1762739	2469647	1792326	1919882	2163942	3932478
Total length (>= 25000 bp)	2502012	2383056	2041228	2279720	2357773	2109171	1688332	2288523	1633509	1721130	1972280	3895439
Total length (>= 50000 bp)	1932405	1524864	1141046	1565118	1582067	1557969	1447048	1736034	1438073	1547677	1702638	3866739
# contigs	92	147	133	149	135	167	36	108	47	72	72	18
Largest contig	317596	176342	108567	240147	141858	212534	339656	339597	298282	202863	230791	763952
Total length	2974653	3097750	2981872	3135360	3039017	2689089	1801160	2667423	1868427	2043242	2272864	3934159
GC (%)	37.33	36.98	37.27	37.04	37.58	34.75	35.43	34.5	37.84	37.93	39.42	53.47
N50	86870	49160	36363	44727	54682	59255	99898	84557	82997	84617	75661	390319
N75	37069	28326	20627	23751	26451	26622	56888	40284	53393	58336	49767	215207
L50	9	18	25	18	18	14	5	10	7	8	9	4
L75	23	39	51	40	39	30	11	21	14	14	19	7
# N's per 100 kbp	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4.09	0

5.4.1. *Ochrobactrum* sp.

A amostra suspeita de *Ochrobactrum/Brucella* spp. foi identificada no sequenciamento WGS como *Ochrobactrum pseudogrignonense*. As espécies de *Ochrobactrum* são bacilos não-fermentativos, aeróbicos e Gram-negativos, ubíquos, e são outro gênero da família *Brucellaceae* (JÄCKEL et al., 2017).

O grupo possui uma alta similaridade entre suas espécies. *Ochrobactrum intermedium*, por exemplo compartilha 98.8% de similaridade do gene 16S rRNA com *Brucella* spp. No entanto, diferentemente de *Brucella* spp. que causam brucelose no homem e em muitas espécies de animais, as cepas de *Ochrobactrum*, são consideradas patógenas oportunistas para o homem, com baixa virulência, sendo reportadas infecções apenas em pacientes imunocomprometidos e/ou com doenças subjacentes (JÄCKEL et al., 2017).

5.4.2. Bacteriófagos

Bacteriófagos ou simplesmente fagos são vírus que infectam bactérias, e estão presentes em vários ecossistemas (MURPHY et al., 2017; SADIQ et al., 2018).

Os fagos lisogênicos infectam as células bacterianas com a eventual incorporação do genoma viral ao DNA da célula hospedeira (profago). Ao contrário de fagos líticos, que não se inserem no genoma bacteriano, e por consequência sequestram a fisiologia, metabolismo, funcionalidade e expressão de genes globais das células infectadas, fagos lisogênicos podem permanecer inativos por diversas gerações antes de produzir novas partículas virais (SADIQ et al., 2018).

Em produtos lácteos, industrializados, que dependem da fermentação bacteriana, a interrupção desse processo biológico por contaminação de fagos representa uma ameaça significativa à produção. A lise prematura de células das BAL, podem causar vários problemas de fermentação, com diferentes graus de severidade, variando desde a perda até a baixa qualidade dos produtos lácteos (MURPHY et al., 2017; SADIQ et al., 2018). Em todos os genomas analisados, não foi detectada a presença de bacteriófagos integrados, de acordo com os métodos usados.

5.4.3. Bacteriocinas

As bacteriocinas são peptídeos antimicrobianos produzidos tanto por bactérias Gram-positivas, quanto por Gram-negativas. Esses peptídeos apresentam como função inibir ou promover a morte de outras espécies bacterianas filogeneticamente próximas (TODOROV et al., 2019).

São de suma importância na competição entre espécies diferentes e relevantes para interações microbianas em culturas iniciadoras no queijo, podendo não somente impactar na qualidade do queijo, inibindo bactérias deteriorantes, como, por exemplo, *Clostridium* spp., mas também podem inibir patógenos como *Listeria monocytogenes* (PARENTE et al., 2017).

As bacteriocinas estão divididas em três classes principais:

- Classe I: inclui lantibióticos (ex: Nisina, lantibiótico classe Ia produzidos por algumas cepas de *Lactococcus lactis*);
- Classe II: pequenos peptídeos termoestáveis não modificados (apresentam 3 subdivisões);
- Classe III: peptídeos grandes, geralmente termolábeis, denominadas bacteriolisinas (COTTER et al., 2005; PARENTE et al., 2017).

De todos os genomas avaliados, apenas o genoma de *Enterococcus faecalis* (EF04) não apresentou genes para produção de bacteriocinas. Os genes de bacteriocinas identificados nos demais genomas estão presentes no Quadro 1.

Nota-se uma grande prevalência de enterocinas produzidas tanto por *Enterococcus faecalis* quanto por *Lactococcus lactis* e *Leuconostoc* spp. As enterocinas são bacteriocinas, eficazes contra *Listeria monocytogenes*, um patógeno comumente encontrado em carnes e laticínios, e associado a surtos de origem alimentar (RAHMEH et al., 2017).

O conteúdo GC de *Enterococcus faecalis* e *Listeria monocytogenes* é bastante próximo, resultando em uma relação filogenética, o que explica, em parte, a capacidade das espécies de *Enterococcus* agirem como bons agentes anti *Listeria*. (CAMPAGNOLLO, 2018). Embora o estudo de Rahmeh et al. (2017) tenha sido realizado com cepas de *Enterococcus faecium*, o mesmo representa um bom exemplo de isolados de leite cru (de camelo), produtoras de enterocinas, que quando testadas apresentaram estabilidade em uma ampla faixa de pH e temperatura, sensibilidade à protease e atividade contra *L. monocytogenes*.

Quadro 1 – Genes de bacteriocinas identificados nos genomas.

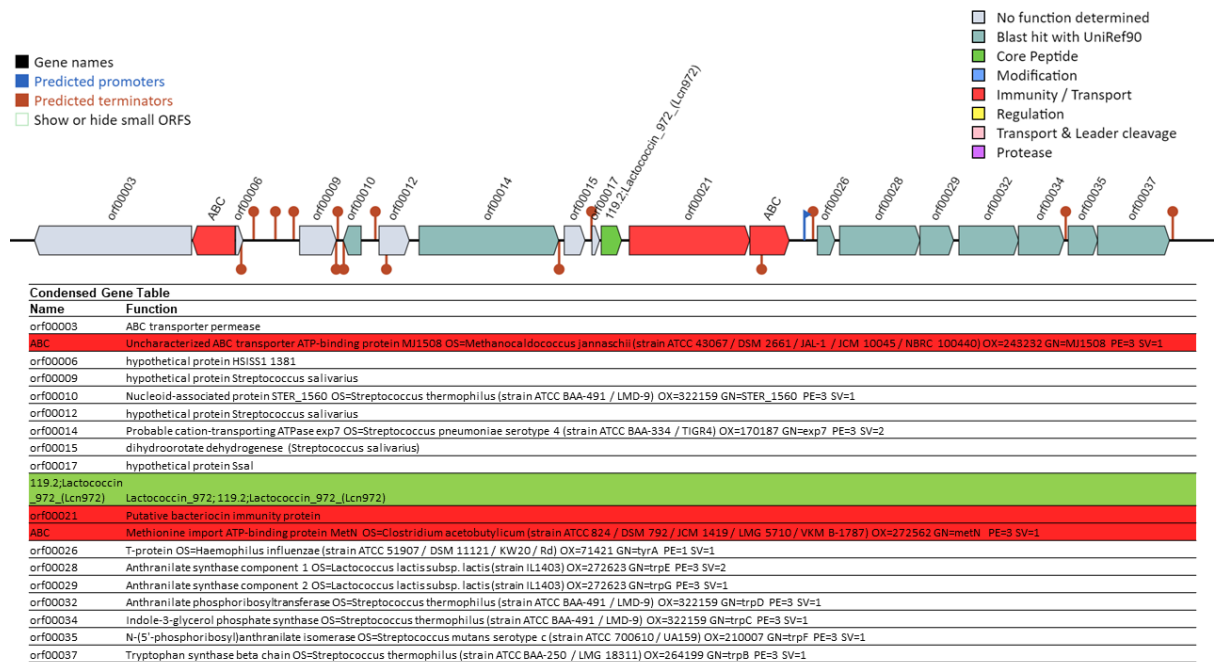
Presença de genes de bacteriocinas	Nome e identificação das bactérias									
	<i>Enterococcus faecalis</i>				<i>Lactococcus lactis</i>			<i>Leuconostoc</i> sp.		<i>Streptococcus</i> spp.
	EF01	EF02	EF03	EF05	G22	G29	G30	L019	L022	STREPTO
<i>Bicereucin</i>		X	X	X						
<i>BlpD</i>										X
<i>Enterolysin</i>	X									
<i>Enterocin</i>	X	X	X				X	X	X	
<i>Lactococcin</i>					X					X
<i>Lasso-peptide</i>			X							
<i>Listeriolysin</i>		X					X			
<i>Pneumolancidin</i>										X
<i>Propeptin</i>		X	X	X						
<i>Sactipeptides</i>						X	X			
<i>Streptide</i>										X
<i>Subtilosin</i>							X			
<i>Thiopeptide</i>										X

Não foi identificada nenhuma colônia de *Listeria monocytogenes* na coleção cultivada a partir do pingo. O mesmo ocorreu com o estudo de Isidorio (2019). Entretanto, um estudo que avaliou indicadores de higiene e segurança microbiológica dos queijos da Serra da Canastra, com foco em bactérias da família *Enterobacteriaceae*, coliformes totais, *Escherichia coli*, *Staphylococcus* coagulase positiva, *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* identificou a presença de *L. monocytogenes* em somente uma amostra de queijo Canastra, dentre 76 testadas (CAMPOS, 2019), indicando uma baixa prevalência deste patógeno na cadeia de produção do queijo Canastra. Ressalva-se que não foram testadas amostras de pingo para o isolamento de *L. monocytogenes*.

Não é possível afirmar que a presença de enterocinas ou de listeriolisina, teve efetiva contribuição para a ausência de *Listeria monocytogenes* tanto no pingo quanto no queijo. No entanto, este fato levanta uma hipótese interessante a respeito de um possível controle biológico.

A presença de alguns componentes necessários para a expressão de bacteriocinas foi identificada, conforme exemplificado com a Lactococcina na Figura 5, indicando a possível funcionalidade destes genes detectados.

Figura 5 – Localização da Lactococcina no genoma de *Lactococcus lactis*.



Fonte: BAGEL4 (adaptado).

As bacteriocinas geralmente são exportadas por um transportador ABC (*ATP-binding cassette transporter*), que também pode conter uma proteína domínio N-terminal, responsáveis pela clivagem do peptídeo líder. Para a classe II, a qual a lactococcina exemplificada na figura pertence, acredita-se que as proteínas acessórias facilitem a translocação de membrana e/ou clivagem do peptídeo líder (COTTER et al., 2005).

5.4.4. Resistência à antibióticos

Os antibióticos são uma classe de substâncias químicas que podem matar bactérias ou inibir seu crescimento, os mesmos foram desenvolvidos e aplicados (sobretudo em ambientes clínicos) desde a descoberta dos efeitos antibacterianos da penicilina (MATHUR e SINGH, 2005; JING e YAN, 2020). Antibióticos podem ser produzidos por diversos grupos microbianos, que por consequência podem apresentar mecanismos de resistência para sobreviverem ao efeito do antibiótico produzido (WANG et al., 2019).

Ao longo das últimas décadas, a antibiótico-terapia tem selecionado cada vez mais bactérias resistentes. As principais maneiras das bactérias adquirirem

resistência são por mutação direta, conjugação e transferência horizontal (WANG et al., 2019).

Nesse sentido, os produtos alimentares podem servir de canal de disseminação, particularmente, em alimentos fermentados. Nos queijos, por exemplo, é possível que o gene seja adquirido a partir de bactérias resistentes presentes no leite cru e, estas subsequentemente transferirem o gene móvel para outras bactérias durante a fabricação (WANG et al., 2019).

Nos genomas avaliados, foram identificados apenas genes de resistência a três classes de antibióticos (aminoglicosídeos, macrolídeos e tetraciclina), cujos genomas apresentaram resistência. As classes de antibióticos atuam inibindo a síntese de proteínas, interagindo com o ribossomo bacteriano, pois possuem afinidade com as subunidades ribossômicas 30S e 50S, específicas das bactérias, o que lhe confere seletividade de ação (KASPER e FAUCI, 2015).

Apenas cepas de *Enterococcus faecalis* e *Lactococcus lactis*, apresentaram resistência a antibióticos, conforme apresentado no Quadro 2.

Quadro 2 – Bactérias que apresentaram genes de resistência à antibióticos.

Resistência à antibióticos	Nome e identificação das bactérias					
	<i>Enterococcus faecalis</i>					<i>Lactococcus lactis</i>
	EF01	EF02	EF03	EF04	EF05	G30
Aminoglycoside					X	X
Macrolide	X	X	X	X	X	
Tetracycline					X	

O estudo de Tomazi e Santos (2020), demonstrou que os aminoglicosídeos em uso isolado ou em associação com a tetraciclina e polipeptídeo, representam a classe de antibióticos mais utilizada para tratar a mastite clínica. A mastite é uma doença infecciosa, que acomete rebanhos bovinos leiteiros, causada por vários patógenos. A terapia pode ser direcionada em três situações distintas, sendo que a primeira e segunda situações estão relacionados ao tratamento de casos clínicos durante a lactação, investigado pelo estudo mencionado, e ao tratamento da vaca seca. Já no terceiro caso, o tratamento é relacionado à mastite subclínica causada por *Streptococcus agalactiae* (SOUZA et al., 2015).

5.5. Pan-genoma e ANI

A palavra pan vêm do grego “παν” que significa todos, totalidade. O termo pan-genoma foi utilizado a primeira vez por Tettelin et al. (2005), no estudo que comparou os genomas de oito cepas de *Streptococcus agalactiae* e, notou que grande parte dos genes não eram compartilhados entre os isolados. Como resultado, o termo pan-genoma foi introduzido para descrever uma coleção de sequências genômicas encontradas em toda a espécie ou população, ao invés de um único indivíduo.

Para alguns indivíduos de uma determinada espécie, certos genes são dispensáveis, porém para outros são imprescindíveis, seja por causa do ambiente em que vivem ou por ancestralidade genética. Nesse sentido, o pan-genoma é dividido em: *core genome* (genomas centrais), genes encontrados em todos os indivíduos do estudo; e *dispensable, accessory ou variable genome* (genomas acessórios), genes que são encontrados em alguns indivíduos, mas não em outros (GOLICZ et al., 2020).

O tamanho dos genomas centrais e acessórios está fortemente correlacionado com o modo que as bactérias vivem. Espécies simpátricas (que estão em contato com outros organismos), tendem a ter pan-genomas abertos com genes centrais proporcionais. Já espécies alopátricas (que vivem isoladas), tendem a ter pan-genomas fechados, com menor número de genes acessórios (GOLICZ et al., 2020).

Nas bactérias, a maior parte dos genes acessórios são resultados de transferência de genes e do compartilhamento de ambiente com outros organismos, o que facilita essa transferência. Alguns dos genes acessórios conferem uma vantagem adaptativa ao meio, enquanto outros são responsáveis pela patogenicidade e resistência à antibióticos (GOLICZ et al., 2020).

Os estudos de pan-genomas bacterianos têm aplicações práticas, por exemplo, na seleção de organismos candidatos à vacina. Neste estudo, representa uma ferramenta fundamental para indicar os principais genes das cepas isoladas do pingo, e que podem estar costumeiramente presentes no metabolismo de queijos. Além disso, é possível demonstrar genes distintos em uma determinada cepa, e que podem representar um diferencial daquela cepa/espécie em contribuir de forma relevante com as características específicas em diferentes queijos da região da Serra da Canastra.

A ferramenta utilizada para fazer o pan-genoma (Anvi'o) permite a realização do cálculo do ANI, que representa a identidade média dos nucleotídeos de todos os genes ortólogos, compartilhados entre dois genomas. O cálculo do ANI é feito sempre entre dois genomas e essa medida reflete o conceito microbiológico de hibridação DNA-DNA para definir espécies, pois leva em consideração o *pool* genético bacteriano e, implicitamente a função compartilhada (JAIN et al., 2018).

A ferramenta pode ser aplicada a organismos procarióticos independente do seu conteúdo GC. Uma pontuação de corte superior ou igual a 95% indica que eles pertencem à mesma espécie, já um valor inferior à 75% não é considerado confiável (FIGUERAS et al., 2014).

5.5.1. *Enterococcus faecalis*

Em alimentos fermentados, *Enterococcus* desempenham um papel importante como culturas iniciadoras devido a algumas características metabólicas relacionadas à produção de enzimas proteolíticas e lipolíticas, além da produção de diacetil a partir de citrato, que influenciam positivamente na maturação de queijos (MARGALHO et al., 2020). Dos 11 genomas selecionados, 5 foram inicialmente identificados como *E. faecalis*, representando a maior parte dos genomas analisados. Todos os genomas apresentaram boa qualidade das sequências, com exceção de EF02, que apresentou valor de redundância de 21,1% (o ideal é inferior à 10%) (Tabela 7).

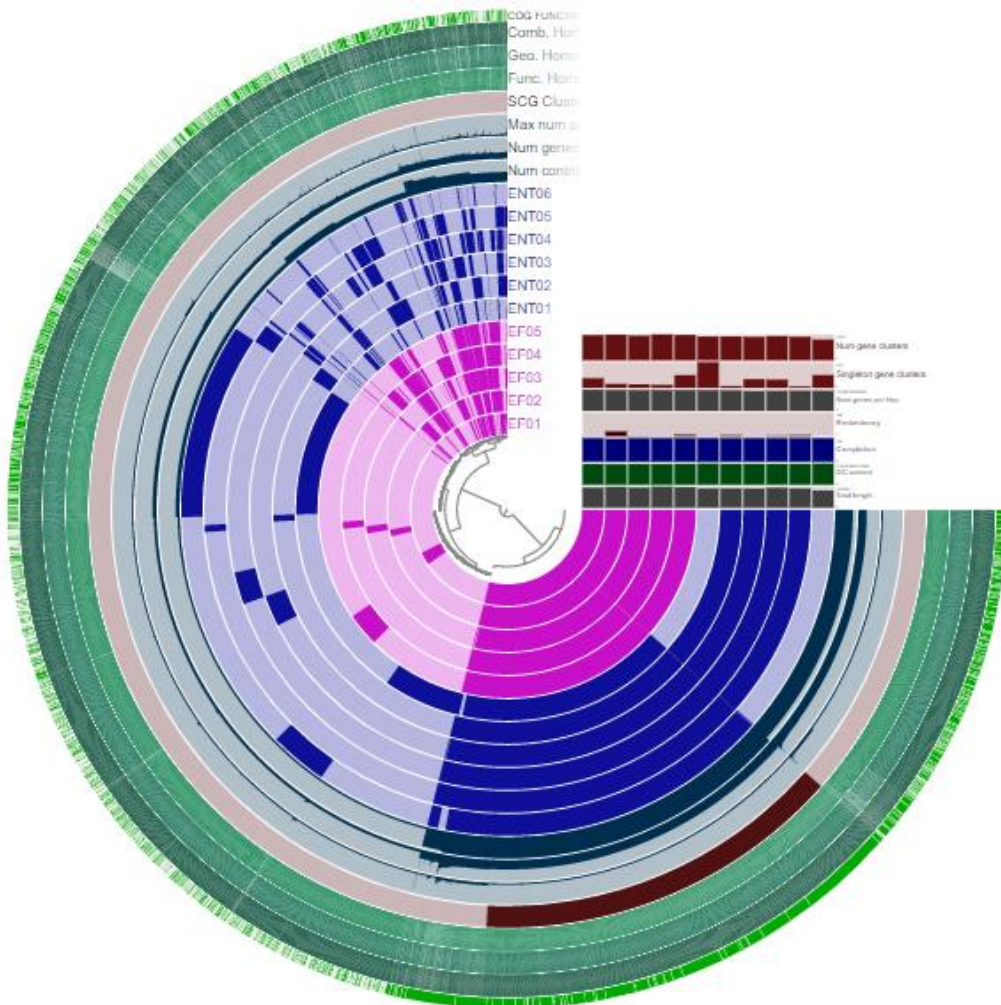
Para as análises comparativas (ANI e pan-genoma) foram selecionados do GenBank 6 genomas completos sendo apenas um de *E. lactis* (ENT01), e os demais de *E. faecalis* isolados de fontes distintas. Foram inclusos genomas provenientes de laticínios, de alimentos, bem como de estudos clínicos. A lista completa encontra-se no Quadro 1 do Apêndice A.

Todas as cepas foram identificadas inicialmente como *E. faecalis*, no entanto o cálculo do ANI entre os genomas isolados do pingo e os genomas de referência de *E. faecalis* foi inferior a 75% de similaridade, o que indica que há diferenças significativas entre os genomas estudados. Já em relação a análise, apenas entre os genomas isolados de pingo, o ANI apresentou valores superiores ao referido e inferiores a 95%. Destaca-se que mesmo os genomas EF02, EF04 e EF05 sendo

isolados da mesma amostra de pingo, o resultado da análise demonstra que as espécies são distintas.

Na análise do pan-genoma foram encontrados 5.675 *gene clusters* (grupo de 2 ou mais genes encontrados no DNA de um mesmo organismo). Destes, 1.320 *gene clusters* (23,3%) são compartilhados pelos 11 genomas (tanto do pingo, quanto de referência), provavelmente por conservação da espécie, formando os genomas centrais (*core genome*). Outros 871 *gene clusters* (15,3%) são compartilhados apenas por 9 genomas analisados, ainda considerados parte do core. Finalmente, os genomas acessórios constituem outros 3.484 (61,4%) dos *gene clusters* (Figura 6).

Figura 6 – Pan-genoma das cepas de *Enterococcus faecalis*.



Fonte: ANVI'O, 2020.

Legenda: Genomas do pingo (EF01; EF02; EF03; EF04 e EF05) localizados no centro do pan-genoma em rosa. Genomas de referência (GenBank) (ENT01; ENT02; ENT03; ENT04; ENT05; ENT06) em azul.

Através da anotação dos genomas mencionados (KEGG), foi possível identificar que os genes encontrados no *core* estão vinculados à metabolismos gerais, associados a funções como sinais de transdução e metabolismo, e transporte de aminoácidos e carboidratos, característicos deste gênero. Também foram identificados genes relacionados à biossíntese de metabólitos secundários, como flavonoides, bem como de cofatores e vitaminas, todas do complexo B, sendo elas: biotina (B7), cobalamina (B12), riboflavina (B2) e tiamina (B1). Os exemplos dos metabolismos relevantes mencionados, estão expressos no Quadro 5 – Apêndice A.

O gênero *Enterococcus* é controverso dentro do grupo das BAL, devido ao seu potencial biotecnológico, mas também ao aumento de sua associação com doenças graves envolvendo seres humanos e do seu comportamento frente aos antimicrobianos de uso terapêutico (MARGALHO et al., 2020). Embora a identificação das cepas de *E. faecalis* traga à tona questões sobre o emprego de boas práticas de produção, ressalta-se que este gênero está naturalmente e comumente presente em produtos lácteos, sendo mesmo uma BAL em alguns sistemas fermentativos (CAMPAGNOLLO et al., 2018).

5.5.2. *Lactococcus lactis*

Apesar de ser comumente associada à laticínios, *L. lactis* foi originalmente isolada de plantas. Acredita-se que após o consumo por ruminantes, a bactéria se multiplicou e tornou-se ativa no trato gastrointestinal dos animais (SONG et al., 2017). São bactérias Gram-positivas, não esporuladas, facultativas anaeróbias, geralmente reconhecidas como seguras (*GRAS – Generally Recognized As Safe*) pelo *Food and Drug Administration (FDA)* dos Estados Unidos.

Representa grande potencial tecnológico, pois além de conferirem sabor, produzem ácido láctico, industrialmente importante como um agente acidificante na preservação e como intensificador de sabor na indústria alimentícia. Algumas cepas ainda têm a propriedade de preservação de alimentos aumentada com a produção de bacteriocinas (SONG et al., 2017).

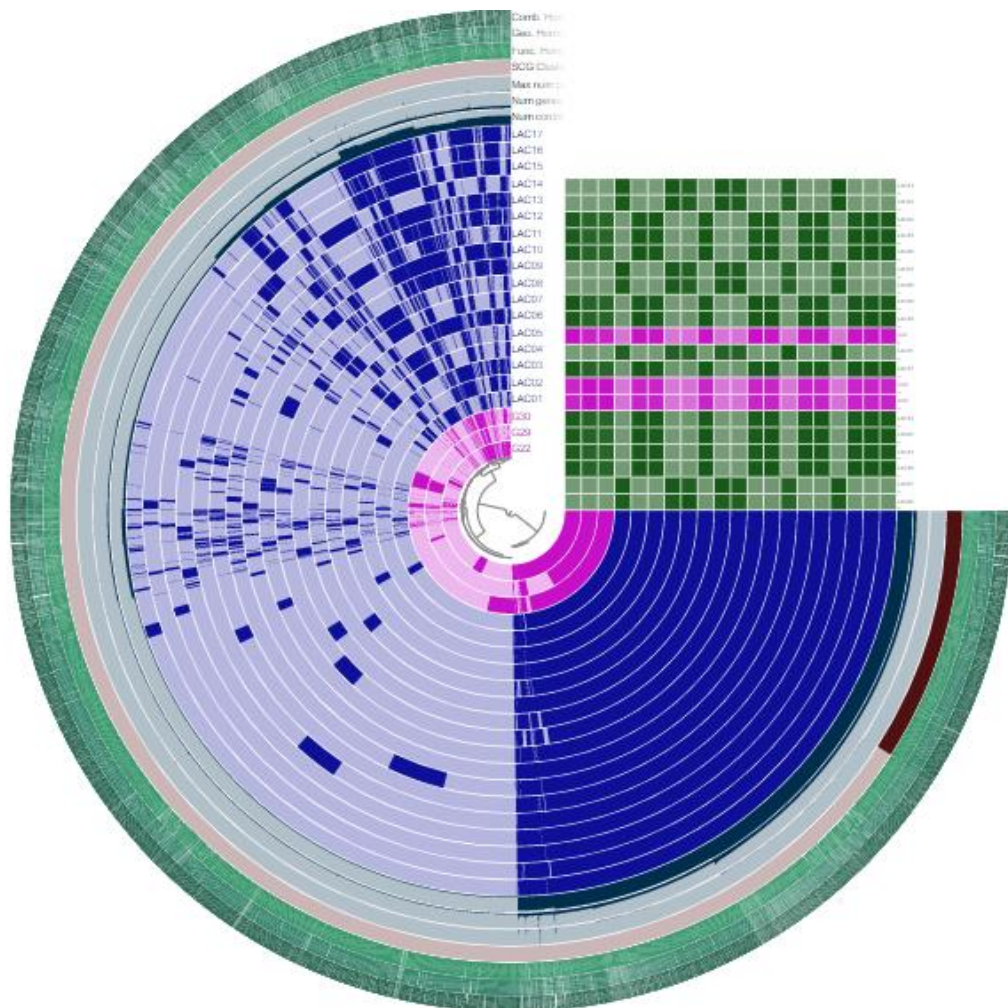
Foram selecionados 3 genomas de *L. lactis*, sendo que G29 e G30 são oriundas do mesmo pingo. A seleção de genomas de referência, contemplou apenas cepas de *L. lactis* provenientes de produtos lácteos e/ou culturas starters,

incluídas *subsp. L. lactis lactis* e *L. lactis cremoris*. Foram selecionados 17 genomas ao todo, representados no Quadro 3 – Apêndice A.

Lactococcus lactis é dividida em três subespécies, nomeadamente *L. lactis subsp. lactis*, *L. lactis subsp. cremoris* e *L. lactis subsp. hordniae*. Dentro da subespécie *lactis*, existe uma *diacetillactis*, que fermenta o citrato, produzindo diacetil e acetoína. Diacetil presente em pequenas quantidades, confere um aroma amanteigado e cremosidade ao queijo, sendo um composto essencial no Camembert, Emmental e Cheddar (CAVANAGH et al., 2014).

A análise pan-genômica entre os genomas de *Lactococcus* demonstrou um total de 5.124 *gene clusters*, sendo que destes 1.690 (33%) representam os genomas centrais, enquanto 3.434 *gene clusters* (67%) fazem parte do genoma acessório, conforme Figura 7.

Figura 7 – Pan-genoma das cepas de *Lactococcus lactis*.



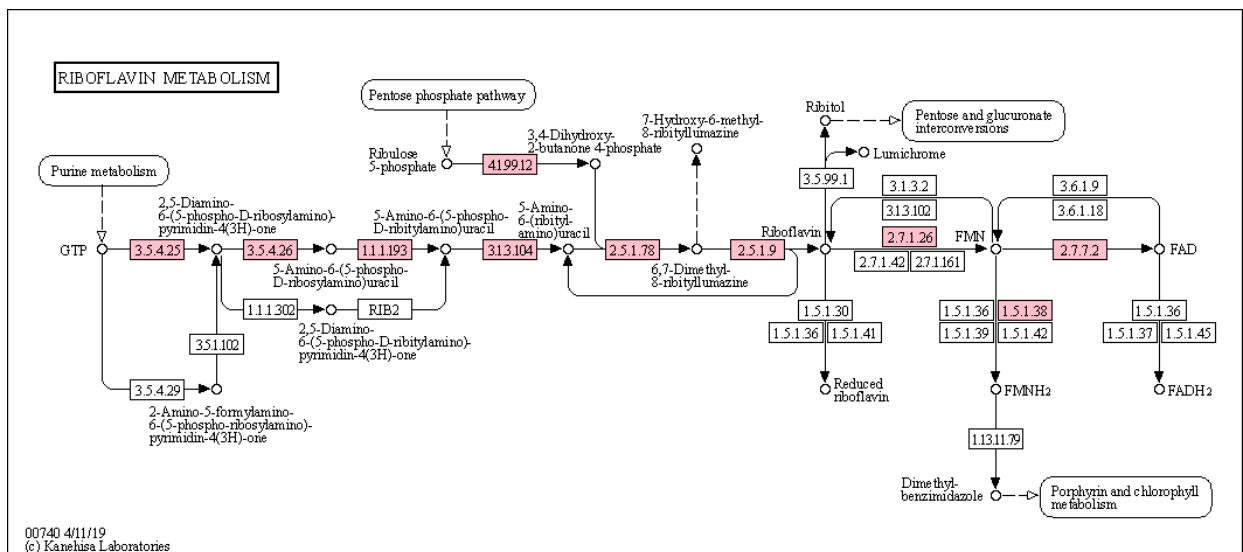
Fonte: ANVI'O, 2020.

Legenda: Os genomas usados estão apresentados em círculos concêntricos. Os genomas obtidos do pingo estão no interior (G22; G29 e G30, respectivamente), em rosa. Genomas de referência estão representados em azul (identificados em ordem numérica crescente do núcleo para as extremidades do pan-genoma). Representação gráfica do cálculo do ANI (*heatmap*), no qual os genomas de pingo continuam representados na mesma cor e os de referência estão representados em verde.

A anotação dos genomas de pingo (*KEGG*) demonstrou que, as principais vias metabólicas dos genomas centrais, estão relacionadas ao metabolismo de carboidratos, aminoácidos e ácidos graxos, além do metabolismo de cofatores e vitaminas como o triptofano e a riboflavina. *L. lactis* tem potencial para sintetizar folato (vitamina B11) e riboflavina (vitamina B2) (Quadro 6 – Apêndice A).

Cepas com esse potencial são de grande interesse na engenharia metabólica, pois modifica-se as vias metabólicas por mutagênese de seleção, seguida de seleção a fim de causar uma superprodução das vitaminas B11 e B2, para que alimentos enriquecidos pela fermentação com essas culturas iniciadoras produzam multivitamínicos, e possam compensar deficiências de vitamina B (SONG et al., 2017; SYBESMA et al., 2004). A via metabólica para síntese de riboflavina é completa, conforme representado na Figura 8, os genes encontrados estão marcados em rosa.

Figura 8 – Via metabólica identificada para síntese da vitamina B2 no genoma de *L. lactis* G29.



Fonte: KEGG pathway.

Outro destaque dos resultados da anotação para os genomas de pingo, é o metabolismo de cadeia ramificada como a serina, o que indica a potencial produção de outras substâncias aromatizantes importantes (MATARAGAS, 2019). Destaca-se, que esta via metabólica também foi encontrada completa. Também foram identificados alguns genes associados ao sistema de transporte de oligopeptídeos, peptídeos pequenos e aminoácidos, o que no queijo é extremamente relevante, devido às quebras de caseínas e outras proteínas.

5.5.3. *Leuconostoc* sp.

Leuconostoc sp. são bactérias ácido lácticas (BAL) que usam a lactose e o citrato para produzir ácido láctico, etanol, acetato e CO₂. Cepas pertencentes a este gênero são utilizadas como iniciadoras primárias (*primary starter*) em fermentações de produtos como manteiga (CICOTELLO et al., 2018).

São naturalmente presentes no leite cru e parecem ser versáteis, pois no leite são consideradas bactérias lácticas não iniciadoras e, em conjunto com bactérias do mesmo tipo (não iniciadoras), contribuem para com as principais características do queijo. Também podem atuar em conjunto com *Lactococcus*, dessa vez como iniciadoras primárias e contribuindo na formação de sabores distintos de queijos tradicionais (CICOTELLO et al., 2018).

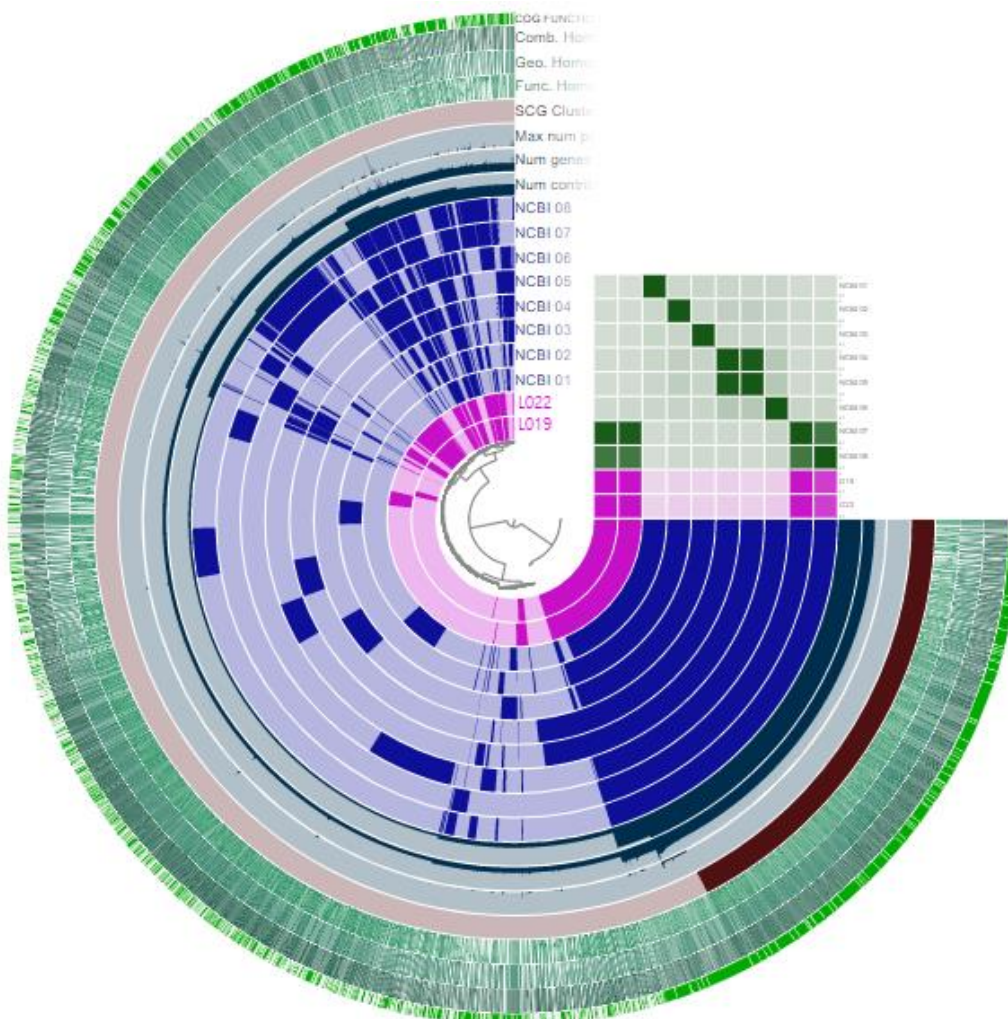
Embora, *Leuconostoc* seja reconhecidamente uma bactéria presente em produtos lácteos e haja dados sobre sua atuação no sistema, não há muitos genomas anotados nos principais banco de dados. Foram usados na análise os 8 genomas disponíveis, sendo a maior parte originários de produtos fermentados, como o kimchi. A lista dos genomas utilizados na análise de pan-genoma e ANI encontra-se disponível no Quadro 2 – Apêndice A.

Os dois genomas analisados são provenientes de duas amostras distintas de pingo, porém da mesma cidade de produção (São Roque de Minas). Apesar das sequências apresentarem boa qualidade, não foi possível identificar as espécies na análise taxonômica. A fim de identificar as espécies de *Leuconostoc*, foi feito o cálculo do ANI, que demonstrou similaridade superior a 95% entre os dois genomas isolados do pingo, o que indica que mesmo pertencendo a amostras distintas, é provável que representem a mesma espécie.

A análise de ANI contra os genomas de referência NCBI 07 e NCBI 08, respectivamente *Leuconostoc mesenteroides* (ANI: 83%) e *Leuconostoc suionicum* (ANI: 75%), demonstraram os maiores valores de similaridade. Com base nesses valores, os genomas isolados do pingo podem ser de *Leuconostoc mesenteroides*, no entanto são necessárias outras análises para verificar a qual espécie estes genomas de fato pertencem, e se podem ou não representar uma espécie nova, endêmica da região da Serra da Canastra.

Na análise do pan-genômica todas as sequências apresentaram boa qualidade, com dados de completude e redundância dentro dos parâmetros. Também foram identificados 4.062 *gene clusters*, contendo 1.092 (26,9%) *gene clusters* no genoma central e 2.970 (73,1%) *gene clusters* no genoma acessório, conforme Figura 9.

Figura 9 – Pan-genoma das cepas de *Leuconostoc* sp.



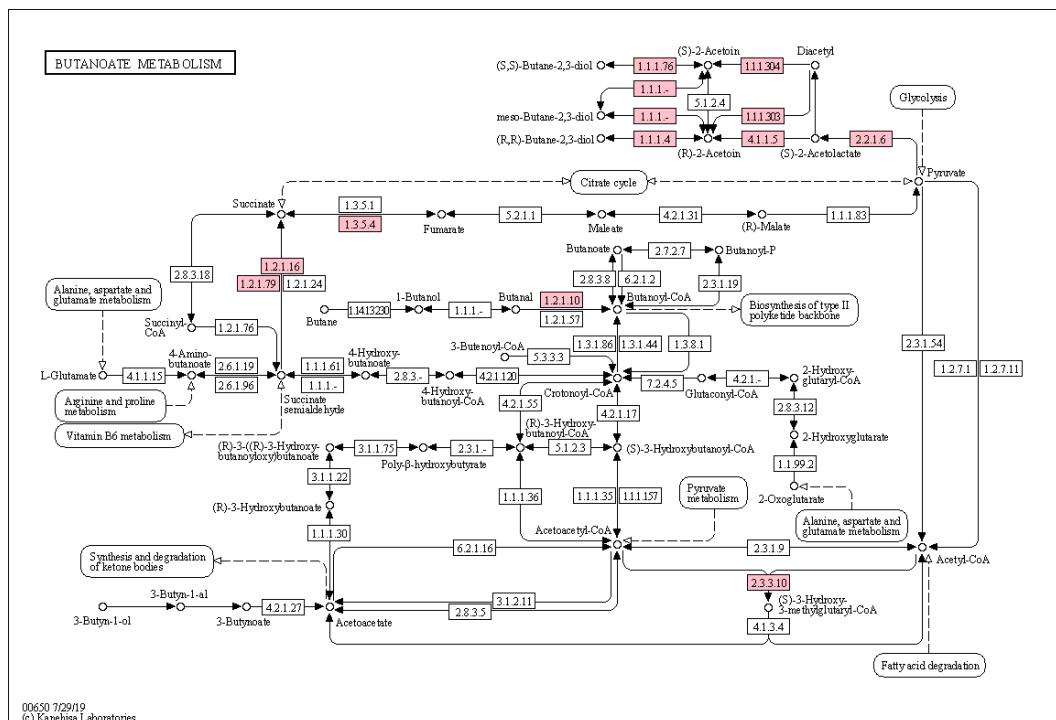
Fonte: ANVI'O, 2020.

Legenda: Genomas do pingo, no interior do pan-genoma (L019 e L022, em rosa). Genomas de referência representados em azul (NCBI01, NCBI02, NCBI03, NCBI04, NCBI05, NCBI06, NCBI07 e NCBI08). Representação gráfica do cálculo do ANI (*heatmap*), no qual os genomas de pingo continuam representados na mesma cor e os de referência estão representados em verde.

Os genomas centrais demonstraram na anotação ter relação com o metabolismo de carboidratos, aminoácidos e ácidos graxos. E, assim como relatado em *L. lactis*, também foi identificado metabolismo de triptofano e riboflavina. Destaca-se que uma das cepas de *Leuconostoc* foi isolada de um mesmo pingo, do qual veio um dos genomas de *L. lactis* (Quadro 7 – Apêndice A).

Dentre os genes do genoma acessório de uma das cepas isoladas do pingo, destaca-se a identificação de genes da via metabólica responsáveis pela produção de diacetil. O diacetil (2,3-butanodiona) é formado em uma reação oxidativa de acetolactato, que se origina do piruvato. Embora o piruvato seja um metabólito chave que pode ser derivado de açúcares, a produção de diacetil é frequentemente associada ao metabolismo de citrato, sendo *Leuconostoc spp.* uma das poucas BAL que produzem diacetil a partir de citrato (LO et al., 2018). A via metabólica envolvida na produção de diacetil encontrada está exemplificada Figura 10.

Figura 10 – Via metabólica de produção de diacetil. Os genes detectados no genoma *Leuconostoc sp. L019* estão marcados em rosa.



Fonte: KEGG pathway (adaptado).

O diacetil e a acetoína (3-hidroxi-2-butanona), conferem um aroma amanteigado desejável, ambos são essenciais ao aroma de diversos queijos, como o Cheddar. O diacetil está normalmente presente apenas em pequenas quantidades no queijo, variando de 0,02 a 13,68 ppm, sendo que de 1,5 a 5 ppm já é considerado suficiente para conferir sabor e aroma (LO et al., 2018). Estudos futuros podem tentar associar este perfil sensorial a presença desta bactéria nos queijos Canastra.

5.5.4. *Streptococcus* spp.

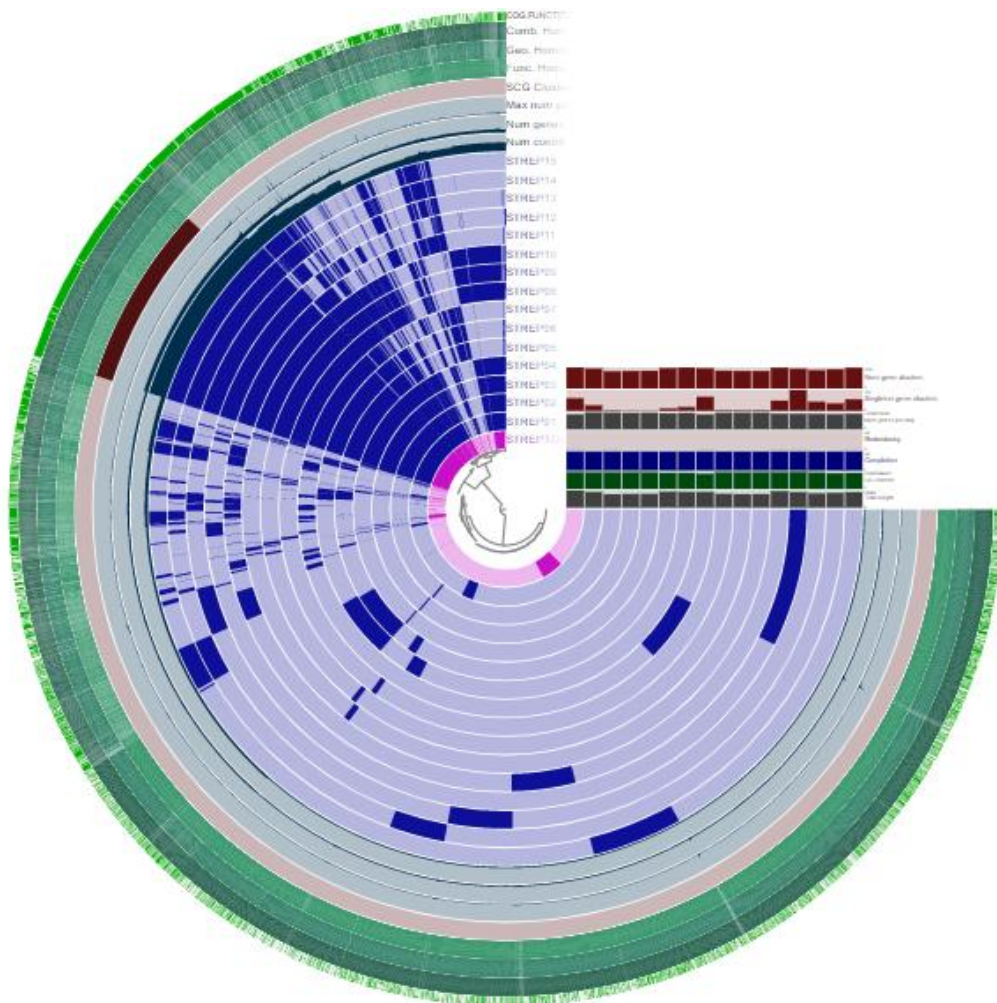
Assim como ocorre com *Enterococcus*, o gênero *Streptococcus* contempla diversas espécies, dentre elas algumas patogênicas como *S. bovis*, *S. pneumoniae* e *S. pyogenes*. Por outro lado, espécies como *S. macedonicus* e *S. thermophilus* são extensivamente utilizadas em produtos lácteos, como iogurte e queijos.

Foi obtido um genoma de *Streptococcus*, com sequências de boa qualidade. A identificação inicial não foi capaz de identificar a espécie. Foram selecionados do GenBank, genomas completos das espécies *S. thermophilus*, *S. macedonicus*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. uberis* e *S. bovimastitidis*, todas listadas no Quadro 4 – Apêndice A, para a realização das análises de pan-genoma e cálculo do ANI.

O resultado do cálculo do ANI não demonstrou similaridade com nenhuma das cepas de referência, todos os valores foram inferiores a 67%. No pan-genoma foram identificados 7.630 *gene clusters*, destes apenas 846 *gene clusters* (11%), representam efetivamente o *core genome*, sendo compartilhados por todas as 16 genomas de referência. Os demais, 1.146 *gene clusters* (15%) do *core* são compartilhados apenas entre 8 genomas, incluindo o oriundo do pingo (Figura 11).

A anotação do genoma de *Streptococcus* demonstrou, somente, que tanto os genes membros do core quanto os genes específicos contém genes para vias metabólicas vinculadas aos metabolismos central, tais como metabolismo de carboidratos, aminoácidos e ácidos graxos. Os principais genes e metabolismos mencionados estão disponíveis no Quadro 8 do Apêndice A. Os genes únicos do genoma isolado do pingo, nesta anotação, utilizando métodos também não demonstraram metabolismos distintos o suficiente para que fosse possível identificar a qual espécie o mesmo pertence, sendo necessária uma investigação maior para caracterizar este genoma.

Figura 11 – Pan-genoma da cepa de *Streptococcus* sp.



Fonte: ANVI'O, 2020.

Genoma de *Streptococcus* isolado do pingo, no interior do pan-genoma (STREPTO, em rosa). Genomas de referência representados em azul (identificados em ordem numérica crescente do núcleo para as extremidades do pan-genoma).

Não foi possível identificar todas as cepas selecionadas a nível de espécie, no entanto, os dados apresentados caracterizam o pingo frente à sua funcionalidade. A maior parte das vias metabólicas envolvidas na formação de sabor do queijo são provenientes do metabolismo de lactose (ou glicólise) e citrato, assim como proteólise e o subsequente metabolismo de aminoácidos. O metabolismo de ácidos graxos (lipólise) pode estar envolvido também, porém em menor extensão (BLAYA et al., 2018).

A proteólise no queijo, por exemplo, ocorre por meio de um sistema enzimático composto por proteases de diferentes origens: leite, coalho, microbiota do leite cru e cultura iniciadora. A quebra de caseínas por este sistema enzimático, leva à

formação de uma grande quantidade de peptídeos, a chamada fração solúvel de nitrogênio. Subsequentemente, estes peptídeos são degradados em peptídeos menores e aminoácidos livres (GIANNOGLOU et al., 2016; NIRO et al., 2017).

O catabolismo de aminoácidos é um dos principais fatores da formação de sabor no queijo, a arginina está relacionada ao amargor, enquanto a prolina, serina e asparagina estão relacionadas à doçura. A concentração dos diferentes aminoácidos depende da tecnologia de fabricação (tipo de coalho, adição de proteinases e/ou culturas iniciadoras, condições de maturação, dentre outros), tempo de maturação, bem como extensão e tipo de proteólise (intracelular ou extracelular) (GIANNOGLOU et al., 2016; NIRO et al., 2017).

Além da formação de sabor as BAL contribuem com a estrutura e textura do queijo. Responsáveis pela acidificação inicial do leite, que auxilia na coagulação do mesmo, devido sua capacidade de produzir ácido rapidamente, também contribuem indiretamente na sinérese da coalhada (dessoragem) e na solubilização do cálcio micelar (BUDELLI et al., 2014; HERREROS et al., 2003).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foram sequenciados 13 genomas de micro-organismos predominantes no fermento endógeno (pingo), sendo eles as bactérias lácticas iniciadoras dos gêneros *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* e *Leuconostoc*.

As análises de caracterização genômica incluíram a detecção de genes de bacteriocinas. É possível que estas bacteriocinas sejam responsáveis pela baixa frequência, reportada na literatura (CAMPOS, 2019) para *Listeria monocytogenes*, possivelmente indicando seu controle por enterocinas tais como as detectadas. Esta hipótese necessita ser investigada com maior profundidade no futuro.

Já em relação à resistência a antibióticos, dois fatos devem ser investigados: 1) o fato de todos os antibióticos identificados pertencerem à mesma classe e, portanto, terem o mesmo princípio ativo; 2) quais destes antibióticos são utilizados no gado leiteiro para produção do queijo Canastra. Tais estudos podem indicar se há uma relação entre o uso de antibióticos no gado leiteiro da região, e a possível transmissão destes genes de resistência através do consumo do queijo.

O presente estudo é o primeiro a caracterizar o genoma de cepas fundamentais para a fermentação láctica que ocorre na produção do queijo Canastra.

Ao caracterizar o potencial dessas estirpes, podemos levantar hipóteses mecanísticas de como os micro-organismos presentes no pingo podem contribuir para as características do queijo produzido. Tais estudos contribuem para a criação de uma identidade e/ou um padrão de origem dos queijos Canastra, além de contribuírem para a melhoria do produto e promoverem a descoberta de novas aplicações tecnológicas. Ao entender como funciona o sistema microbiano de produção do queijo Canastra, é possível adequá-lo ou aprimorá-lo, de maneira a evitar o aparecimento de fatores indesejáveis, sejam eles relacionados às características sensoriais e/ou presença de micro-organismos patogênicos.

7. REFERÊNCIAS

ALNEBERG, J.; BJARNASON, B. S.; BRUIJIN, I.; SCHIRMER, M.; QUICK, J.; IJAZ, U. Z.; LAHTI, L.; LOMAN, N. J.; ANDERSON, A. F.; QUINCE, C. Binning metagenomic contigs by coverage and composition. **Nature Methods**. 2014.

AMGARTEN, D.; BRAGA, L. P. P.; SILVA, A. M.; SETUBAL, J. C. MARVEL, a Tool for Prediction of Bacteriophage Sequences in Metagenomic Bins. **Frontiers in Genetics**. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00304>> Acesso em: 13 jun 2020.

APROCAN. Associação dos Produtores de Queijo Canastra. Disponível em: <<https://queijodacanastra.com.br/aprocan/>> Acesso em 15 jun 2020.

BANKEVICH, A.; NURK, S.; ANTIPOV, D.; GUREVICH, A. A.; DVORKIN, M.; KULIKOV, A. S.; LESIN, V. M.; NIKOLENKO, S. I.; PHAM, S.; PRJIBELSKI, A. D.; PYSHKIN, A. V.; SIROTKIN, A. V.; VYAHHI, N.; TESLER, G.; ALEKSEYEV, M. A.; PEVZNER, P. A. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. **Journal of Computational Biology**. v. 19. n. 5. p.455-477. 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3342519/>> Acesso em: 17 fev 2020.

BLAYA, J. BARZIDEH, Z.; LAPOINTE, G. Interaction of starter cultures and nonstarter lactic acid bacteria in the cheese environment. **Journal of Dairy Science**. v. 101. p. 1-19. 2018.

BORELLI, B. M.; FERREIRA, E. G.; LACERDA, I. C. A.; SANTOS, D. A.; CARMO, L. S.; DIAS, R. S.; SILVA, M. C. C.; ROSA, C. A. Enterotoxigenic *Staphylococcus* spp. and other microbial contaminants during production of Canastra cheese. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 37, n. 4, p. 545-550, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa

Agropecuária (2013). Instrução Normativa nº 30, de 7 de agosto de 2013.

BRASIL. Lei nº 13.680, de 14 de junho de 2018. Altera a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, para dispor sobre o processo de fiscalização de produtos alimentícios de origem animal produzidos de forma artesanal. Disponível em: <https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2015-2018/2018/lei/l13680.htm> Acesso em: 20 jul 2018.

BRUNO, L. M. **Manual de Curadores de Germoplasma - Micro-organismos: Bactérias Ácido-Láticas**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2011. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/documents/1355163/2005846/doc336-151.pdf/4c82dbc8-73bd-4689-a47e-5819e3f1ffc7>> Acesso em: 09 maio 2017.

BUDELLI, E., BERNALI, M., LEMA, P., FINK, M., NEGREIRA, C., TANTER, M., GENNISON, J. L., Use of shear wave elastography for monitoring enzymatic milk Coagulation. **Journal of Food Engineering**. v.136, p.73-79. 2014.

BURON-MOLES, G.; CHAILYAN, A.; DOLEJS, I.; FORSTER, J.; MIKS, M. H. "Uncovering carbohydrate metabolism through a genotype-phenotype association study of 56 lactic acid bacteria genomes". **Applied Microbiology and Biotechnology** 103, nº 7 (2019): 3135–52. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00253-019-09701-6>> Acesso em: 23 mar 2020.

BUSHNELL, B.; ROOD, J.; SINGER, E. BBMerge - accurate paired shotgun read merging via overlap. **PLoS ONE** 12. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0185056>> Acesso em: 17 fev 2020.

CAMPAGNOLLO, F.B; GONZALES-BARRON, U; CADAVEZ, V. A. P.; SANT'ANA, A.S.; SCHAFFNER, D. W. Quantitative risk assessment of *Listeria monocytogenes* in traditional Minas cheeses: The cases of artisanal semi-hard and fresh soft cheeses. **Food Control**. n. 92; p. 370-379. 2018.

CAMPOS, G. Z. Avaliação microbiológica de queijos minas artesanais provenientes da Serra da Canastra durante e após o período de maturação. 2019. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. 2019.

CARVALHO, M. P.; VENTURINI, C. E. P.; GALAN, V. B. **As grandes oportunidades do Mercado de queijos no Brasil**. Disponível em: <<https://www.milkpoint.com.br/industria/radartecnico/mercado/as-grandes-oportunidades-do-mercado-de-queijos-no-brasil-93301n.aspx>> Acesso em: 02 ago 2018.

CASTRO, R. D.; OLIVEIRA, L. G.; SANT'ANNA, F. M.; LUIZ, L. M. P.; SANDES, S. H. C.; SILVA, C. I. F.; SILVA, A. M.; NUNES, A. C.; PENNA, C. F. A. M.; SOUZA, M. R. Lactic acid microbiota identification in water, raw milk, endogenous starter culture, and a fresh Minas artisanal cheese from the Campo das Vertentes region of Brazil during the dry and rainy seasons. **Journal of Dairy Science**. v. 99. n. 8., 2016.

CAVANAGH, D.; FITZGERALD, G. F.; MCAULIFFE, O. From Field to Fermentation: The Origins of *Lactococcus Lactis* and Its Domestication to the Dairy Environment. **Food Microbiology** v.47 p.45–61. 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.11.001>> Acesso em 13 jul 2020.

CEUGNIEZ, A.; TAMINIAU, B.; COUCHENEY, F.; JACQUES, P.; DELCENSERIE, V.; DAUBE, G.; DRIDER, D. Use of a metagenetic approach to monitor the bacterial microbiota of “Tomme d’Orchies” cheese during the ripening process. **International Journal of Food Microbiology**. 2016. Disponível em: <[10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.034](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.034)> Acesso em: 17 jan 2020.

CICOTELLO, J. WOLF, I. V.; D’ANGELO, L.; GUGLIELMOTTI, D. M.; QUIBERONI, A. SUÁREZ, V. B. Response of *Leuconostoc* Strains against Technological Stress Factors: Growth Performance and Volatile Profiles. **Food Microbiology**. v.73. p.362–370. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.02.010>> Acesso em:18 jul 2020.

CHOI, J.; LEE, S. I.; RACKERBY, B.; GODDIK, L.; FROJEN, Robin; HA, S. D.; KIM, J. H.; PARK, S. H. Microbial Communities of a Variety of Cheeses and Comparison between Core and Rind Region of Cheeses. **Journal of Dairy Science**. v. 103, n. 5, p. 4026–4042. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.3168/jds.2019-17455>> Acesso em: 20 jul 2020.

COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, R. P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nature Reviews Microbiology**. v. 3. p. 777-788. 2005.

DALMASSO, M.; HENNEQUIN, D.; DUC, C.; DEMARIGNY, Y. Influence of backslopping on the acidifications curves of “Tomme” type cheeses made during 10 successive days. **Journal of Food Engineering**. v.92; p.50–55, 2008.

DELMONT, T. O.; EREN, A. M. Linking pangenomes and metagenomes: the *Prochlorococcus* metapangenome. **PeerJ**. (2018) Disponível em: <<https://peerj.com/articles/4320/>> Acesso em: 10 jan 2020.

DEMARIGNY, Y.; DALMASSO, M.; TONLEAU, A.; RIGOBELLO, V.; BEUVIER, E.; LY-CHATAIN, H.; BOUTON, Y. Influence of the Backslopping Practice on the Microbial Diversity of the *Lactococcus* Population in a Model Cheesemaking. **Food and Nutrition Sciences**. 2: 618-627. 2011. Disponível em: <http://file.scirp.org/pdf/FNS20110600011_11468505.pdf > Acesso em: 14 maio 2017.

DENIS, C.; GUEGUEN, M.; HENRY, E.; LEVERT, D. New media for the numeration of cheese surface bacteria. **Le Lait, INRA Editions**. n.81; v.3; p.365-379. 2001. <[10.1051/lait:2001138](https://doi.org/10.1051/lait:2001138)>. <hal-00895378>

DORES, M. T.; DIAS, R. S.; ARCURI, E. F.; NÓBREGA, J. E.; FERREIRA, C. L. L. F. Enterotoxigenic potential of *Staphylococcus aureus* isolated from Artisan Minas cheese from the Serra da Canastra - MG, Brazil. **Food Science and Technology**. Campinas, v.33. n.2; p.271-275, abr/jun 2013.

EMATER - Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Minas

Gerais. **Caracterização da microrregião da Canastra como produtora do Queijo Minas Artesanal.** 2004. Disponível em: <http://www.emater.mg.gov.br/doc/intranet/upload/queijo_historico/caracteriza%C3%A7%C3%A3o%20do%20queijo%20canastra.pdf> Acesso em: 04 maio 2017.

EMATER - Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Minas Gerais. **Mapa do Queijo Minas Artesanal.** Disponível em: <http://www.emater.mg.gov.br/portal.cgi?flagweb=site_pgn_downloads_vert&grupo=135&menu=59> Acesso em: 06 maio 2017.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Queijo Minas Artesanal agrega tradição cultural e valor para os produtores de leite.** Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/35193841/queijo-minas-artesanal-agrega-tradicao-cultural-e-valor-para-os-produtores-de-leite>> Acesso em: 16 jul 2018.

EREN, A.; ESEN, Ö. C.; QUINCE, C.; VINEIS, J. H.; MORRISON, H. G.; SOGIN, M. L.; DELMONT, T. O. Anvi'o: an advanced analysis and visualization for 'omics data. **PeerJ.** (2015). Disponível em: <<https://peerj.com/articles/1319/>> Acesso em: 10 jan 2020.

FAEMG - Federação da Agricultura e Pecuária do Estado de Minas Gerais. **Recordistas no cadastro de produtores do Queijo Minas Artesanal.** Disponível em: <<http://www.sistemafaemg.org.br/Noticia.aspx?Code=2907&Portal=1&PortalNews=1&ParentCode=139&ParentPath=None&ContentVersion=R>> Acesso em: 16 jul 2018.

FIGUERAS, M. J.; BEAZ-HIDALGO, R.; HOSSAIN, M. J.; LILES, M. R. Taxonomic Affiliation of New Genomes Should Be Verified Using Average Nucleotide Identity and Multilocus Phylogenetic Analysis. **Genome Announcements.** 2014. Disponível em: <10.1128/genomeA.00927-14> Acesso em: 13 jul 2020.

FILIPPIS, F.; PARENTE, E.; ERCOLINI, D. Metagenomics insights into food fermentations. **Microbial Biotechnology.** v.10; p. 91-102; 2016.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos.** São Paulo: Editora Atheneu, 2003.

GABARAL, J. I. Biodiversity and the survival of autochthonous fermented products. **International Microbiology.** v.10; p.1-3, 2007.

GALLEGOS, J. E.; HAYRYNEN, S.; ADAMES, N. R.; PECCOUD, J. Challenges and opportunities for strain verification by whole-genome sequencing. **Scientific Reports.** 10, 5873 (2020). Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-020-62364-6>> Disponível em: 21 jul 2020.

GATTI, M.; BOTTARI, B.; LAZZI, C.; NEVIANI, E.; MUCCHETTI, G. Microbial evolution in raw-milk, long-ripened cheeses produced using undefined natural whey starters. **Journal of Dairy Science** 97:573-591, 2014.

GIANNOGLOU, M.; KARRA, Z.; PLATAKOU, E.; KATSAROS, G.; MOATSOU, G.; TAOUKIS, P. Effect of high pressure treatment applied on starter culture or on semi-ripened cheese in the quality and ripening of cheese in brine. **Innovative Food**

Science and Emerging Technologies. 2016.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2016.07.024>.

GOLICZ, A. A.; BAYER, P. E.; BHALLA, P. L.; BATLEY, J.; EDWARDS, D. Pangenomics comes of age: from bacteria to plant and animal applications. **Trends in Genetics.** v. 36; n. 2. p. 132-145. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tig.2019.11.006>> Acesso em: 15 jul 2020.

GOVERNO DO ESTADO DE MINAS GERAIS. Instituto Mineiro de Agropecuária. **Portaria nº 1810, de 24 de abril de 2018.** Altera o artigo 1º da Portaria nº 694, de 17 de novembro de 2004, para incluir o município de Córrego D'Anta na microrregião da Canastra. Disponível em: < http://www.ima.mg.gov.br/material-curso-cfo-cfoc/doc_details/3649-portaria-no-1810 > Acesso em: 21 jun 2018.

HEEL, A. J. V.; JONG, A.; SONG, C.; VIEL, J. H.; KOK, J.; KUIPERS, O. P. BAGEL4: a user-friendly web server to thoroughly mine RiPPs and bacteriocins. **Nucleic Acids Research.** v.46. p.278-281. 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6030817/>> Acesso em: 03 mar 2020.

HERREROS, M. A.; FRESNO, J. M.; PRIETO, M. J. G.; TORNADIJO, M. E. Technological Characterization of Lac-tic Acid Bacteria Isolated from Armada Cheese (a Spanish Goats' Milk Cheese). **International Dairy Journal.** v. 13; n. 6; p. 469-479. 2003. doi:10.1016/S0958-6946(03)00054-2

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da Pecuária Municipal.** v. 43, p.1-49, 2015. Disponível em: < http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2015_v43_br.pdf > Acesso em: 14 maio 2017.

IEPHA. Decreto nº 42.505, de 15 de abril de 2002. Institui as formas de registros de bens culturais de natureza imaterial ou intangível que constituem patrimônio cultural de Minas Gerais. Disponível em: <https://www.almg.gov.br/consulte/legislacao/completa/completa.html?tipo=DEC&num=42505&comp=&ano=2002&aba=js_textoOriginal#texto> Acesso em: 13 jan 2020.

ILLUMINA. **16S Sample Metagenomic Sequencing Library Preparation.** Disponível em: < https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf > Acesso em: 23 jul 2018.

IMA. Instituto Mineiro de Agropecuária. **Queijo Minas Artesanal.** Disponível em: < <http://www.ima.mg.gov.br/queijo-minas-artesanal> > Acesso em: 21 jun 2018.

INPI. Instituto Nacional da Propriedade Industrial; SEBRAE. Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. **Indicações geográficas brasileiras.** Brasília: SEBRAE, INPI, 2016. Disponível em: < www.inpi.gov.br/arquivos/livro_indicacoes_geograficas_brasileiras.pdf > Acesso em: 06 maio 2017.

IPHAN. Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional. **Queijo artesanal de minas, patrimônio cultural do Brasil**. v. 1, 2006. 156p. Disponível em: <http://portal.iphan.gov.br/uploads/ckfinder/arquivos/Dossie_modos_fazer_queijo_minas.pdf> Acesso em: 04 maio 2017.

ISIDORIO, 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 (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. 2019.

JÄCKEL, C.; HERTWIG, S.; SCHOLZ, H. C.; NÖCKLER, K. REETZ, J. HAMMERL, J. A. Prevalence, Host Range, and Comparative Genomic Analysis of Temperate *Ochrobactrum* Phages. **Frontiers in Microbiology**. 2017. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.01207/full>> Acesso em: 20 jul 2020.

JAIN, C.; RODRIGUEZ-R, L. M.; PHILLIPPY, A. M.; KONSTANTINIDIS, K. T.; ALURU, S. High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries. **Nature Communications**. 2018. Disponível em: <[10.1038/s41467-018-07641-9](https://doi.org/10.1038/s41467-018-07641-9)> Acesso em: 13 jul 2020.

JING, R.; YAN, Y. Metagenomic Analysis Reveals Antibiotic Resistance Genes in the Bovine Rumen. **Microbial Pathogenesis**. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104350>> Acesso em: 12 jul 2020.

JONNALA, B. R. Y.; MCSWEENEY, P. L. H.; SHEEHAN, J. J.; COTTER, P. D. Sequencing of the Cheese Microbiome and Its Relevance to Industry. **Frontiers in Microbiology**. v. 9. 2018.

KAMIMURA, B. A.; MAGNANI, M.; LUCIANO, W. A.; CAMPAGNOLLO, F. B.; PIMENTEL, T. C.; ALVARENGA, V. O.; PELEGRINO, B. O.; CRUZ, A. G.; SANT'ANA, A. S. "Brazilian Artisanal Cheeses: An Overview of Their Characteristics, Main Types and Regulatory Aspects". **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety** 18, nº 5 (2019): 1636–57. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12486>> Acesso em: 10 maio 2020.

KAMIMURA, B. A.; CABRAL, L.; NORONHA, M. F.; BAPTISTA, R. C.; NASCIMENTO, H. M.; SANT'ANA, A. S. "Amplicon Sequencing Reveals the Bacterial Diversity in Milk, Dairy Premises and Serra Da Canastra Artisanal Cheeses Produced by Three Different Farms". **Food Microbiology** 89 (agosto de 2020): 103453. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103453>> Acesso em 15 jul 2020.

KANEHISA, M. SATO, Y. MORISHIMA, K. BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG tools for functional characterization of genome and metagenome sequences. **J. Mol. Biol.** v.428. p. 726-731. (2016).

KASPER, D.; FAUCI, A. **Doenças Infeciosas de Harrison**. AMGH Editora, 2015.

LIMA, C. D. L. C.; LIMA, L. A.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; FERREIRA, E. G.; ROSA, C. A.; Bactérias do ácido láctico e leveduras associadas com o queijo-de-minas artesanal produzido na região da Serra do Salitre, Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.61; n.1; Belo Horizonte: Feb. 2009.

LIMA, R. S.; DOULA, S. M. A tradição e a lei – o queijo minas artesanal e os impasses da legislação sanitária no impedimento de sua comercialização fora do Estado de MG. **Revista Faz Ciência**. v.14; n.19; p. 181-195; jan/jun, 2012.

LO, R.; HO, V. T. T.; BANSAL, N.; TURNER, M. S. The genetic basis underlying variation in production of the flavour compound diacetyl by *Lactobacillus rhamnosus* strains in milk. *International Journal of Food Microbiology*. v.265. p.30-39. 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168160517304713>> Acesso em: 17 jul 2020.

MARGALHO, L. P.; SCHALKWIJK, S. V.; BACHMANN, H.; SANT'ANA, A. S. Enterococcus Spp. in Brazilian Artisanal Cheeses: Occurrence and Assessment of Phenotypic and Safety Properties of a Large Set of Strains through the Use of High Throughput Tools Combined with Multivariate Statistics. **Food Control**. v.118. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107425>> Acesso em:12 jul 2020.

MATARAGAS, M. Investigation of genomic characteristics and carbohydrate metabolism activity of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* during ripening of a Swiss-type cheese. **Food Microbiology**. v.87. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103392>> Acesso em: 24 jun 2020.

MATHUR, S.; SINGH, R. Antibiotic Resistance in Food Lactic Acid Bacteria—a Review. **International Journal of Food Microbiology** v.105, n. 3. p. 281–95. 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.03.008>> Acesso em: 12 jul 2020.

MILLER, C.S.; BAKER, B. J.; THOMAS, B. C.; SINGER, S. W.; BANFIELD, J. F. (2011) EMIRGE: reconstruction of full-length ribosomal genes from microbial community short read sequencing data. **Genome biology** 12: R44. doi:10.1186/gb-2011-12-5-r44.

MINAS GERAIS (Estado). Lei nº 23.157, de 18 de dezembro de 2018. Dispõe sobre a produção e comercialização dos queijos artesanais de Minas Gerais. **Diário do Executivo**, Belo Horizonte, 2018. Disponível em: <<https://www.almg.gov.br/consulte/legislacao/completa/completa.html?tipo=LEI&num=23157&comp=&ano=2018>>. Acesso em: 15 jan 2020.

MINAS GERAIS (Estado). Lei nº 14.185, de 31 de janeiro de 2002. Dispõe sobre o processo de produção do Queijo Minas Artesanal e dá outras providências. **Diário do Executivo**, Belo Horizonte 2002. Disponível em: <<https://www.legisweb.com.br/legislacao/?id=140253>> Acesso em: 15 jan 2020.

MONTEIRO, R. P.; MATTA, V. M.; CHAVES, A. C. S. D.; MACHADO, R. L. P.; SÁ, D. G. C. F.; TAKEITI, C. Y.; MORAES, M. C.; PORTES, P. C. A. Queijo Minas Artesanal: Valorizando a Agroindústria Familiar. Brasília, DF: **Embrapa**; Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2018.

MOTTA, A. S.; GOMES, M. S. M. Technological and functional properties of lactic acid bacteria: the importance of these microorganisms for food. **Revista Instituto Laticínios Cândido Tostes**. Juiz de Fora, v. 70; n. 3; p. 172-184; mai/jun, 2015.

MURPHY, J.; MAHONY, J.; FITZGERALD, G. F.; SINDEREN, D. V. Bacteriophages Infecting Lactic Acid Bacteria. *In*: MCSWEENEY, P. L. H.; FOX, P. F.; COTTER, P. D.; EVERETT, D. W. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. 4. ed. Elsevier, 2017. p. 201-226. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/book/9780124170124/cheese>>. Acesso em: 26 jun 2020.

NIRO, S.; SUCCI, M.; TREMONTE, P.; SORRENTINO, E.; COPPOLA, R.; PANFILI, G.; FRATIANNI. Evolution of free amino acids during ripening of Caciocavallo cheeses made with different milks. **Journal of Dairy Science**. v. 100; n. 12; p. 1-9. 2017.

NÓBREGA, J. E.; FERREIRA, C. L. L. F.; DORES, M. T.; FERREIRA, E. M.; DOMINGO, E. C.; SANTOS, J. P. V. Diferenças sazonais no fermento endógeno utilizado na produção do queijo minas artesanal, fabricado na Serra da Canastra, Minas Gerais. **Revista Instituto Laticínios Cândido Tostes**. v.63; n.363; p. 26-30; jul/ago, 2008.

OKUMURA, F; CAVALHEIRO, E. T. G.; NÓBREGA, J. A. Experimentos simples usando fotometria de chama para ensino de princípios de espectrometria atômica em cursos de química analítica. **Química Nova**. v.27; n.5; p.832-836; 2004.

PARENTE, E.; COGAN, T. M.; POWELL, I. B. Starter Cultures: General Aspects. *In*: MCSWEENEY, P. L. H.; FOX, P. F.; COTTER, P. D.; EVERETT, D. W. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. 4. ed. Elsevier, 2017. p. 201-226. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/book/9780124170124/cheese>>. Acesso em: 26 jun 2020.

PRITCHARD et al. Genomics and taxonomy in diagnostics for food security: soft-rotting enterobacterial plant pathogens. **Anal. Methods**. v.8. p.12-24. 2016.

RAFAEL, V. C. **Fenótipos da microbiota predominante do fermento endógeno (pingo) relevantes para as características e segurança microbiológica do queijo Minas artesanal da Serra da Canastra**. 2017. R136f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2017.

RAHMEH, R.; AKBAR, A.; KISHK, M.; ONAIZI, T. A.; AL-SHATTI, A.; SHAIAN, A.; AKBAR, B.; AL-MUTAIRI, S.; YATEEM, A. Characterization of Semipurified Enterocins Produced by Enterococcus Faecium Strains Isolated from Raw Camel Milk. **Journal of Dairy Science**. v. 101, n. 6; p. 4944–52. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.3168/jds.2017-13996>> Acesso em: 15 jun 2020.

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

SADIQ, F. A.; HE, G.; SAKANDAR, H. A.; LI, Y.; OU, K. Lactococcus lactis phages from the perspective of their diversity, thermal and biocidal resistance. **International Dairy Journal**. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.11.001>> Acesso em: 10 jun 2020.

SEBRAE. Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. 2017. Disponível em: <<https://datasebrae.com.br/ig-canastra/>> Acesso em 15 jun 2020.

SILVA, N.C., TUNES, R.M.M. e CUNHA, M.F. Avaliação química de queijos Minas artesanais frescos e curados em Uberaba, MG. **PUBVET**, Londrina, v. 6, n. 16, Ed. 203, Art. 1358, 2012.

SILVA, J. G.; ABREU, L. R.; MAGALHÃES, F. A. R.; PICCOLI, R. H.; FERREIRA, E. B. Características físico-químicas do queijo minas artesanal da canastra. **Revista Instituto Laticínios Cândido Tostes**. v. 380; n.66: p. 16-22; mai/jun, 2011.

SONG, A. A. L.; IN, L. L. A.; LIM, S. H. E.; RAHIM, R. A. A review on Lactococcus lactis: from food to factory. **Microbial Cell Factories** v.16. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12934-017-0669-x>> Acesso em: 13 jul 2020.

SOUZA, G. N.; SILVA, M. R.; BRANDÃO, H. M.; GERN, J. C.; GUIMARÃES, A. S.; BARBOSA, L. A.; PEREIRA, O. A. N.; ROCHA, W. J. Avaliação de informações técnicas contidas nas bulas dos antimicrobianos indicados para mastite bovina como método auxiliar na definição de protocolos de tratamento. Juiz de Fora, MG: **Embrapa**; Juiz de Fora: Circular Técnica, 108. Junho, 2015. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/126045/1/CT-108-Aval-inf-bulas-antimicrobianos.pdf>> Acesso em: 15 jul 2020.

SYBESMA, W.; BURGESS, C.; STARRENBURG, M.; SINDEREN, D. V.; HUGENHOLTZ. Multivitamin production in Lactococcus lactis using metabolic engineering. **Metabolic Engineering**. v.6. n.2. p.109-115. 2004. Disponível em:<<https://doi.org/10.1016/j.ymben.2003.11.002>> Acesso em: 13 jul 2020.

TILOCCA, B.; COSTANZO, N.; MORITTU, V. M.; SPINA, A.; SOGGIU, A.; BRITTI, D.; RONCADA, P.; PIRAS, C. Milk Microbiota: Characterization Methods and Role in Cheese Production. **Journal of Proteomics**. v. 210. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.103534>> Acesso em: 25 jul 2020.

TETTELIN, H. et al. Genome analysis of multiple pathogenic isolates of Streptococcus agalactiae: implications for the microbial “pan-genome”. **Proc. Natl. Aca. Sci.** v. 102. p.13950-13955. 2005. Disponível em: <<https://www.pnas.org/content/102/39/13950>> Acesso em: 15 jul 2020.

TODOROV, S. D.; FRANCO, B. D. G. M.; TAGG, J. R. Bacteriocins of Gram-positive bacteria having activity spectra extending beyond closely-related species. **Benef Microbes**. v. 10; n. 3; p. 315-328. 2019. DOI: 10.3920/BM2018.0126.

TOMAZI, T.; SANTOS, M. V. Antimicrobial use for treatment of clinical mastitis in dairy herds from Brazil and its association with herd-level descriptors. **Preventive Veterinary Medicine**. V. 176. 2020. Disponível em: <

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167587719302594?via%3Dihub>> Acesso em: 15 jul 2020.

TOPISIROVIC, L.; KOJIC, M.; FIRA, D.; GOLIC, N.; STRAHINIC, I.; LOZO, J. Potential of Lactic Acid Bacteria Isolated from Specific Natural Niches in Food Production and Preservation. **International Journal of Food Microbiology**. v. 112; n. 3; p. 230-235. 2006. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.04.009

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. trad. atual por Roberta Marchiori Martins. - 8 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

USDA (United States Department of Agriculture). **Brazil Dairy and Products Annual**. Annual Dairy Report. 10/27/2017. BR1719. Disponível em: <<http://www.usdabrazil.org.br/pt-br/reports/dairy-and-products-annual-4.pdf>> Acesso em: 16 jul 2018.

VILJOEN, B. C. The interaction between yeasts and bacteria in dairy environments. **International Journal of Food Microbiology**. v.69; p.37-44; 2001.

WANG, K.; ZHANG, H.; FENG, J.; MA, L.; FUENTE-NÚÑEZ, C.; WANG, S.; LU, X. Antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from dairy products in Tianjin, China. **Journal of Agriculture and Food Research**. v. 1; 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jafr.2019.100006>> Acesso em: 20 jul 2020.

WILMOTTE, A.; VAN DER AUWERA, G; DE WACHTER, R. "Structure of the 16S ribosomal RNA of the thermophilic cyanobacterium *Chlorogloeopsis* HTF (*Mastigocladus laminosus*HTF) strain PCC7518, and phylogenetic analysis". **FEBS Letters** v. 317; p.96-100; 1993.

WOLFE, B. E.; BUTTON, J. E.; SANTARELLI, M.; DUTTON, R. Cheese Rind Communities Provide Tractable Systems for In Situ and In Vitro Studies of Microbial Diversity. **Cell**. v. 158; p.422-433, July 17, 2014.

ZAGO, M.; BARDELLI, T.; ROSETTI, L. NAZZICARI, N.; CARMINATI, D.; GALLI, A.; GIRAFFA, G. Evaluation of bacterial communities of Grana Padano cheese by DNA metabarcoding and DNA fingerprinting analysis. **Food Microbiology**. 2020. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103613>> Acesso em: 17 jul 2020.

ZANKARI, E.; HASMAN, H.; COSENTINO, S. VESTERGAARD, M.; RASMUSSEN, S.; LUND, O.; AARESTRUP, F. M.; LARSEN, M. V. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. **J Antimicrob Chemother**. 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3468078/>> Acesso em: 15 abr 2020.

APÊNDICE A

Quadro – Genomas retirados do NCBI para comparação com *Enterococcus faecalis*.

ID	STRAIN	PROJECT	BIOSAMPLE	SPECIE	ORIGIN	PAPER/SUBMISSION
ENT01	WOTS01	PRJNA592424	SAMN13426595	<i>Enterococcus lactis</i>	Raw cheese	China National Research Institute of Food Fermentation Industries
ENT02	NCTC8732	PRJEB6403	SAMEA3614265	<i>Enterococcus faecalis</i>	NA	Sanger Institute
ENT03	FDAARGOS_611	PRJNA231221	SAMN10346775	<i>Enterococcus faecalis</i>	Meat involved in food poisoning	FDA
ENT04	FDAARGOS_528	PRJNA231221	SAMN10163222	<i>Enterococcus faecalis</i>	Broviac blood	FDA
ENT05	FDAARGOS_338	PRJNA231221	SAMN06173351	<i>Enterococcus faecalis</i>	Urine catheter	FDA
ENT06	FDAARGOS_323	PRJNA231221	SAMN06173336	<i>Enterococcus faecalis</i>	Blood	FDA

NA= NOT AVAILABLE.

Quadro 2 – Genomas retirados do NCBI para comparação com *Leuconostoc* sp.

ID	STRAIN	PROJECT	BIOSAMPLE	SPECIE	ORIGIN	PAPER/SUBMISSION
NCBI01	WiKim40	PRJNA224116	SAMN05300424	<i>Leuconostoc lactis</i>	Cheese and fermented food production	Tatusova T et al.,
NCBI02	JB16	PRJNA224116	SAMN02603179	<i>Leuconostoc carnosum</i>	Kimchi	Jung JY et al.,
NCBI03	KM20	PRJNA224116	SAMN02603482	<i>Leuconostoc citreum</i>	Kimchi	Kim JF et al.,
NCBI04	KG16-1	PRJNA224116	SAMEA3608619	<i>Leuconostoc gelidum subsp. gasicomitatum</i>	Vacuum-packaged vegetable sausages	Andreevskaya M et al.,
NCBI05	LMG18811	PRJEA48123	SAMEA2272393	<i>Leuconostoc gelidum subsp. gasicomitatum</i>	Food spoilage lactic acid bacterium	Johansson P et al.,
NCBI06	IMSNU11154	PRJNA224116	SAMN02603394	<i>Leuconostoc kimchii</i>	Kimchi	Oh HM et al.,
NCBI07	ATCC8293	PRJNA224116	SAMN02598482	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	ATCC8293	Makarova K et al.,
NCBI08	DSM20241	PRJNA224116	SAMN04811211	<i>Leuconostoc suionicum</i>	Missing	DSM:20241

Quadro 3 – Genomas retirados do NCBI para comparação com *Lactococcus lactis*.

ID	STRAIN	PROJECT	BIOSAMPLE	SPECIE	ORIGIN	PAPER/SUBMISSION
LAC_01	C4	PRJDB6381	SAMD00098207	<i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i>	Dairy product	Industry
LAC_02	II 1403	PRJNA72	SAMN02603339	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	Cheese starter culture	Bolotin A et al
LAC_03	AGHX01	PRJNA67863	SAMN02436934	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	Fermented milk	McNulty NP et al.,
LAC_04	ASXF01	PRJNA175624	SAMN02472109	<i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i>	Propagated starter culture used in cheese manufacturing	Erkus O et al.,
LAC_05	ATBE01	PRJNA175671	SAMN02472107	<i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i>	Propagated starter culture used in cheese manufacturing	Erkus O et al.,
LAC_06	ATBD01	PRJNA175672	SAMN02472114	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	Propagated starter culture used in cheese manufacturing	Erkus O et al.,
LAC_07	ATBC01	PRJNA175673	SAMN02472112	<i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i>	Propagated starter culture used in cheese manufacturing	Erkus O et al.,
LAC_08	ATBB01	PRJNA175674	SAMN02472110	<i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i>	Propagated starter culture used in cheese manufacturing	Erkus O et al.,
LAC_09	JMMZ01	PRJNA235170	SAMN02585714	<i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i>	Polish raw milk	Radziwill-Bienkowska JM et al.,
LAC_10	AXZK01	PRJNA222498	SAMN02370934	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	Propagated starter culture used in cheese manufacturing	Erkus O et al.,
LAC_11	AZSI01	PRJNA225671	SAMN02899667	<i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i>	Cheese	Ladero V et al.,
LAC_12	JRKY01	PRJNA261703	SAMN03075524	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	Cheese	Tschoeke DA et al.,
LAC_13	275	PRJNA320696	SAMN04955252	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	Dairy fermentation	Kelleher P et al.,
LAC_14	LXWJ01	PRJNA321149	SAMN04966301	<i>Lactococcus lactis</i>	Cheese	Industry
LAC_15	FM03	PRJNA355067	SAMN06061939	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	Cheese	Industry
LAC_16	MUBH01	PRJNA369137	SAMN06277565	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	Starter culture	Industry
LAC_17	SD96	PRJNA558943	SAMN12502795	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	Laboratory isolate	Industry

Quadro 4 – Genomas retirados do NCBI para comparação com *Streptococcus* sp.

ID	STRAIN	PROJECT	BIOSAMPLE	SPECIE	ORIGIN	PAPER/SUBMISSION
STREP01	ATCC 19258	PRJNA528156	SAMN11175069	<i>Streptococcus thermophilus</i>	ATCC	ATCC:19258
STREP02	ST109	PRJNA482852	SAMN09715176	<i>Streptococcus thermophilus</i>	Raw milk	USDA
STREP03	N4L	PRJEB27286	SAMEA4729876	<i>Streptococcus thermophilus</i>	Dairy technology	INRA
STREP04	MN-BM-A02	PRJNA274301	SAMN03325854	<i>Streptococcus thermophilus</i>	Dairy products EPS	Shi Y et al
STREP05	ACA-DC 198	PRJEA76965	SAMEA2272145	<i>Streptococcus macedonicus</i>	Traditional greek kasseri cheese	Papadimitriou K et al
STREP06	FLZS01	PRJEB14906	SAMEA4354708	<i>Streptococcus macedonicus</i>	Uncooked semi-hard French cheese	Agricultural University of Athens
STREP07	LKPA01	PRJNA273437	SAMN03292190	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Milk from dairy cow with mastitis	Lanzhou Institute of Husbandry and Pharmaceutical Science of CAAS
STREP08	LMD-9	PRJNA224116	SAMN02598313	<i>Streptococcus thermophilus</i>	Dairy product	Makarova K et al.,
STREP09	EPS	PRJNA414518	SAMN07792329	<i>Streptococcus thermophilus</i>	Milk	Dairy Research Institute, Bright Dairy & Food Co.
STREP10	B59671	PRJNA395042	SAMN07369158	<i>Streptococcus thermophilus</i>	Raw milk	USDA
STREP11	NCTC4669	PRJEB6403	SAMEA3539719	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	NA	Sanger Institute
STREP12	NCTC11902	PRJEB6403	SAMEA3956100	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	NA	Sanger Institute
STREP13	NCTC8198	PRJEB6403	SAMEA2479569	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Throat	Sanger Institute
STREP14	NCTC3858	PRJEB6403	SAMEA3871780	<i>Streptococcus uberis</i>	NA	Sanger Institute
STREP15	NZ1587	PRJNA224116	SAMN05199910	<i>Streptococcus bovimastitidis</i>	Right rear gland	University of Cambridge

. NA= NOT AVAILABLE.

Quadro 5 – Principais metabolismos e genes encontrados em *Enterococcus faecalis*.

ID	Metabolism	Metabolism subcategory	KEGG number
EF02	<i>Glycolysis (Embden-Meyerhof pathway), glucose => pyruvate</i>	<i>Central carbohydrate metabolism</i>	K00845,K01834,K01810,K00850,K00873,K01624,K01689,K00134,K00927,K01803
EF02	<i>Glycolysis, core module involving three-carbon compounds</i>	<i>Central carbohydrate metabolism</i>	K01834,K00873,K01689,K00134,K00927,K01803
EF02	<i>Gluconeogenesis, oxaloacetate => fructose-6P</i>	<i>Central carbohydrate metabolism</i>	K01834,K04041,K01624,K01689,K00134,K00927,K01803
EF02	<i>Pyruvate oxidation, pyruvate => acetyl-CoA</i>	<i>Central carbohydrate metabolism</i>	K03737,K00627,K00382
EF02	<i>Ascorbate degradation, ascorbate => D-xylulose-5P</i>	<i>Other carbohydrate metabolism</i>	K02821,K03078,K03475,K03077,K03079,K03476,K02822
EF02	<i>Nucleotide sugar biosynthesis, glucose => UDP-glucose</i>	<i>Other carbohydrate metabolism</i>	K00845,K00963,K01835
EF02	<i>Fatty acid biosynthesis, initiation</i>	<i>Fatty acid metabolism</i>	K01962,K00645,K01963,K00648,K01961,K02160
EF02	<i>Fatty acid biosynthesis, elongation</i>	<i>Fatty acid metabolism</i>	K00059,K02372,K02371,K09458,K00208
EF02	<i>Threonine biosynthesis, aspartate => homoserine => threonine</i>	<i>Serine and threonine metabolism</i>	K01733,K00872,K00003,K00133
EF02	<i>Cysteine biosynthesis, serine => cysteine</i>	<i>Cysteine and methionine metabolism</i>	K00640,K01738
EF02	<i>Lysine biosynthesis, acetyl-DAP pathway, aspartate => lysine</i>	<i>Lysine metabolism</i>	K00841,K01778,K01586,K00133,K01714,K05823,K05822,K00215
EF02	<i>Proline biosynthesis, glutamate => proline</i>	<i>Arginine and proline metabolism</i>	K00147,K00286,K00931
EF02	<i>Shikimate pathway, phosphoenolpyruvate + erythrose-4P => chorismate</i>	<i>Aromatic amino acid metabolism</i>	K03785,K01735,K03856,K00014,K00800,K00891,K01736
EF02	<i>Tyrosine biosynthesis, chorismate => HPP => tyrosine</i>	<i>Aromatic amino acid metabolism</i>	K04517
EF02	<i>Thiamine biosynthesis, prokaryotes, AIR (+ DXP/tyrosine) => TMP/TPP</i>	<i>Cofactor and vitamin metabolism</i>	K00788,K00941,K03151
EF02	<i>Riboflavin biosynthesis, GTP => riboflavin/FMN/FAD</i>	<i>Cofactor and vitamin metabolism</i>	K21064,K11753

Quadro 6 - Principais metabolismos e genes encontrados em *Lactococcus lactis*.

ID	Metabolism	Metabolism subcategory	KEGG number
G22	<i>Glycolysis (Embden-Meyerhof pathway), glucose => pyruvate</i>	<i>Central carbohydrate metabolism</i>	K01689,K00927,K01803,K01810,K00134,K01834,K00845,K01624,K00850,K00873
G22	<i>Glycolysis, core module involving three-carbon compounds</i>	<i>Central carbohydrate metabolism</i>	K01689,K00927,K01803,K00134,K01834,K00873
G22	<i>Gluconeogenesis, oxaloacetate => fructose-6P</i>	<i>Central carbohydrate metabolism</i>	K01689,K04041,K00927,K01803,K00134,K01834,K01624
G22	<i>Pyruvate oxidation, pyruvate => acetyl-CoA</i>	<i>Central carbohydrate metabolism</i>	K00627,K00382,K03737
G22	<i>Galactose degradation, Leloir pathway, galactose => alpha-D-glucose-1P</i>	<i>Other carbohydrate metabolism</i>	K01785,K00849,K01784
G22	<i>Glycogen biosynthesis, glucose-1P => glycogen/starch</i>	<i>Other carbohydrate metabolism</i>	K00700,K00703,K00975,K00963
G22	<i>F-type ATPase, prokaryotes and chloroplasts</i>	<i>ATP synthesis</i>	K02111,K02109,K02110,K02108,K02113,K02114,K02115,K02112
G22	<i>Fatty acid biosynthesis, initiation</i>	<i>Fatty acid metabolism</i>	K01962,K00645,K01963,K00648,K01961,K02160
G22	<i>Fatty acid biosynthesis, elongation</i>	<i>Fatty acid metabolism</i>	K00059,K02372,K09458,K00208
G22	<i>Threonine biosynthesis, aspartate => homoserine => threonine</i>	<i>Serine and threonine metabolism</i>	K01733,K00872,K00003,K00133
G22	<i>Methionine biosynthesis, aspartate => homoserine => methionine</i>	<i>Cysteine and methionine metabolism</i>	K00651,K14155,K00003,K00133,K01739,K01760,K00549
G22	<i>Isoleucine biosynthesis, threonine => 2-oxobutanoate => isoleucine</i>	<i>Branched-chain amino acid metabolism</i>	K01687,K01754,K01653,K00053,K01652,K00826
G22	<i>Ornithine biosynthesis, glutamate => ornithine</i>	<i>Arginine and proline metabolism</i>	K00620,K00930,K00145
G22	<i>Proline biosynthesis, glutamate => proline</i>	<i>Arginine and proline metabolism</i>	K00286,K00147,K00931
G22	<i>Histidine biosynthesis, PRPP => histidine</i>	<i>Histidine metabolism</i>	K02502,K01496,K04486,K02500,K00765,K00013,K11755,K00817,K01814,K02501
G22	<i>Tryptophan biosynthesis, chorismate => tryptophan</i>	<i>Aromatic amino acid metabolism</i>	K01817,K01658,K01696,K00766,K01657,K01695
G22	<i>Riboflavin biosynthesis, GTP => riboflavin/FMN/FAD</i>	<i>Cofactor and vitamin metabolism</i>	K21064,K14652,K00793,K00794,K11752,K11753
G22	<i>Coenzyme A biosynthesis, pantothenate => CoA</i>	<i>Cofactor and vitamin metabolism</i>	K00954,K00867,K21977,K00859
G22	<i>Tetrahydrofolate biosynthesis, GTP => THF</i>	<i>Cofactor and vitamin metabolism</i>	K00287,K01633,K01495,K19965,K11754,K00950

Quadro 7 - Principais metabolismos e genes encontrados em *Leuconostoc* sp.

ID	Metabolism	Metabolism subcategory	KEGG number
L019	<i>Glycolysis (Embden-Meyerhof pathway), glucose => pyruvate</i>	<i>Central carbohydrate metabolism</i>	K01834,K00927,K00845,K01689,K01803,K00134,K00873,K01810
L019	<i>Glycolysis, core module involving three-carbon compounds</i>	<i>Central carbohydrate metabolism</i>	K01834,K00927,K01689,K01803,K00134,K00873
L019	<i>Pentose phosphate pathway (Pentose phosphate cycle)</i>	<i>Central carbohydrate metabolism</i>	K00036,K00615,K00033,K01807,K07404,K01783,K01810
L019	<i>Galactose degradation, Leloir pathway, galactose => alpha-D-glucose-1P</i>	<i>Other carbohydrate metabolism</i>	K00849,K01784,K01785
L019	<i>F-type ATPase, prokaryotes and chloroplasts</i>	<i>ATP synthesis</i>	K02111,K02109,K02110,K02108,K02113,K02114,K02115,K02112
L019	<i>Fatty acid biosynthesis, initiation</i>	<i>Fatty acid metabolism</i>	K00648,K00645,K01963,K02160
L019	<i>Fatty acid biosynthesis, elongation</i>	<i>Fatty acid metabolism</i>	K00059,K02372,K02371,K09458
L019	<i>Threonine biosynthesis, aspartate => homoserine => threonine</i>	<i>Serine and threonine metabolism</i>	K00133,K01733,K00872,K00003
L019	<i>Isoleucine biosynthesis, threonine => 2-oxobutanoate => isoleucine</i>	<i>Branched-chain amino acid metabolism</i>	K01687,K00826,K01754,K00053,K01652
L019	<i>Ornithine biosynthesis, glutamate => ornithine</i>	<i>Arginine and proline metabolism</i>	K00620,K00930,K00145
L019	<i>Arginine biosynthesis, ornithine => arginine</i>	<i>Arginine and proline metabolism</i>	K01940,K01755,K00611
L019	<i>Proline biosynthesis, glutamate => proline</i>	<i>Arginine and proline metabolism</i>	K00147,K00931,K00286
L019	<i>Histidine biosynthesis, PRPP => histidine</i>	<i>Histidine metabolism</i>	K02502,K04486,K02500,K00765,K00013,K00817,K01814,K02501
L019	<i>Shikimate pathway, phosphoenolpyruvate + erythrose-4P => chorismate</i>	<i>Aromatic amino acid metabolism</i>	K01735,K00014,K03785,K00800,K00891,K01736
L019	<i>Tryptophan biosynthesis, chorismate => tryptophan</i>	<i>Aromatic amino acid metabolism</i>	K01817,K01696,K01609,K00766,K01657,K01695
L019	<i>Riboflavin biosynthesis, GTP => riboflavin/FMN/FAD</i>	<i>Cofactor and vitamin metabolism</i>	K11753,K21064,K14652,K00793,K00794,K11752
L019	<i>Coenzyme A biosynthesis, pantothenate => CoA</i>	<i>Cofactor and vitamin metabolism</i>	K00954,K13038,K00867,K00859

Quadro 8 – Principais metabolismos e genes encontrados em *Streptococcus* spp.

ID	Metabolism	Metabolism subcategory	KEGG number
STREPTO	<i>Glycolysis (Embden-Meyerhof pathway), glucose => pyruvate</i>	<i>Central carbohydrate metabolism</i>	K01624,K01803,K01689,K00134,K00927,K00845,K01834,K00850,K00873,K01810
STREPTO	<i>Glycolysis, core module involving three-carbon compounds</i>	<i>Central carbohydrate metabolism</i>	K01803,K01689,K00134,K00927,K01834,K00873
STREPTO	<i>Gluconeogenesis, oxaloacetate => fructose-6P</i>	<i>Central carbohydrate metabolism</i>	K01624,K01803,K01689,K00134,K00927,K01834
STREPTO	<i>Citrate cycle, first carbon oxidation, oxaloacetate => 2-oxoglutarate</i>	<i>Central carbohydrate metabolism</i>	K01647,K01681,K00031
STREPTO	<i>Galactose degradation, Leloir pathway, galactose => alpha-D-glucose-1P</i>	<i>Other carbohydrate metabolism</i>	K01785,K00849,K01784
STREPTO	<i>Glycogen biosynthesis, glucose-1P => glycogen/starch</i>	<i>Other carbohydrate metabolism</i>	K00703,K00975,K00963,K00700
STREPTO	<i>Glycogen degradation, glycogen => glucose-6P</i>	<i>Other carbohydrate metabolism</i>	K00705,K00688,K01200,K01835
STREPTO	<i>Phosphate acetyltransferase-acetate kinase pathway, acetyl-CoA => acetate</i>	<i>Carbon fixation</i>	K00625,K00925
STREPTO	<i>F-type ATPase, prokaryotes and chloroplasts</i>	<i>ATP synthesis</i>	K02111,K02109,K02110,K02108,K02113,K02114,K02115,K02112
STREPTO	<i>Fatty acid biosynthesis, initiation</i>	<i>Fatty acid metabolism</i>	K01962,K00645,K01963,K00648,K01961,K02160
STREPTO	<i>Fatty acid biosynthesis, elongation</i>	<i>Fatty acid metabolism</i>	K00059,K02372,K02371,K09458
STREPTO	<i>Serine biosynthesis, glycerate-3P => serine</i>	<i>Serine and threonine metabolism</i>	K00058,K00831,K01079
STREPTO	<i>Threonine biosynthesis, aspartate => homoserine => threonine</i>	<i>Serine and threonine metabolism</i>	K00133,K00872,K00003,K01733
STREPTO	<i>Cysteine biosynthesis, serine => cysteine</i>	<i>Cysteine and methionine metabolism</i>	K00640,K01738
STREPTO	<i>Isoleucine biosynthesis, threonine => 2-oxobutanoate => isoleucine</i>	<i>Branched-chain amino acid metabolism</i>	K01687,K01653,K00053,K01652,K01754,K00826
STREPTO	<i>Leucine biosynthesis, 2-oxoisovalerate => 2-oxoisocaproate</i>	<i>Branched-chain amino acid metabolism</i>	K01649,K00052,K01703,K01704
STREPTO	<i>Ornithine biosynthesis, glutamate => ornithine</i>	<i>Arginine and proline metabolism</i>	K00620,K00930,K00821,K00145
STREPTO	<i>Shikimate pathway, phosphoenolpyruvate + erythrose-4P => chorismate</i>	<i>Aromatic amino acid metabolism</i>	K01626,K01735,K00014,K03785,K00800,K00891,K01736
STREPTO	<i>Tryptophan biosynthesis, chorismate => tryptophan</i>	<i>Aromatic amino acid metabolism</i>	K01817,K01658,K01696,K00766,K01657,K01695
STREPTO	<i>Coenzyme A biosynthesis, pantothenate => CoA</i>	<i>Cofactor and vitamin metabolism</i>	K00954,K00859,K21977,K01598,K00867
STREPTO	<i>Tetrahydrofolate biosynthesis, GTP => THF</i>	<i>Cofactor and vitamin metabolism</i>	K01633,K01495,K00796,K11754,K00950,

