

**JULIANA ESCARIÃO DA NÓBREGA**

**CARACTERIZAÇÃO DO FERMENTO ENDÓGENO  
UTILIZADO NA FABRICAÇÃO DO QUEIJO  
CANASTRA NO MUNICÍPIO DE MEDEIROS, MINAS  
GERAIS, COM ÊNFASE EM LEVEDURAS**

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

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2007**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

N754c  
2007

Nóbrega, Juliana Escarião da, 1976-  
Caracterização do fermento endógeno utilizado na  
fabricação do queijo Canastra no município de Medeiros,  
Minas Gerais, com ênfase em leveduras / Juliana Escarião  
da Nóbrega. – Viçosa, MG, 2007.  
xi, 82f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui apêndice.

Orientador: Célia Lúcia de Luces Fortes Ferreira.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 68-75.

1. Alimentos - Microbiologia. 2. Fermentação.  
3. Alimentos - Análise. 4. Soro de queijo. 5. Queijarias.  
6. Queijo - Brasil - Variedades. I. Universidade Federal de  
Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 664.001579

**JULIANA ESCARIÃO DA NÓBREGA**

**CARACTERIZAÇÃO DO FERMENTO ENDÓGENO  
UTILIZADO NA FABRICAÇÃO DO QUEIJO CANASTRA  
NO MUNICÍPIO DE MEDEIROS, MINAS GERAIS, COM  
ÊNFASE EM LEVEDURAS**

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

APROVADA: 14 de agosto de 2007.

---

Prof. Antônio Fernandes de Carvalho  
(Co-Orientador)

---

Prof. Regina Célia Santos Mendonça  
(Co-Orientadora)

---

Prof. Mauro Mansur Furtado

---

Prof. Daise Aparecida Rossi

---

Prof. Célia Lúcia de Luces Fortes Ferreira  
(Orientadora)

**Para ser grande, sê inteiro: nada**

**teu exagera ou exclui.**

**Sê todo em cada coisa. Põe quanto és**

**no mínimo que fazes.**

**Assim em cada lago a lua toda**

**brilha, porque alta vive.**

**Ricardo Reis**

*Aos meus pais,  
irmãos,  
sobrinhos e  
amigos.*

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por sua infinita presença em minha vida.

À professora Célia Lúcia de Luces Fortes Ferreira, pela orientação, amizade e apoio durante todo o período do curso.

À professora Regina Célia Santos Mendonça, pela imprescindível contribuição.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar o curso.

À Universidade Federal da Paraíba, por permitir que eu realizasse o curso e pela confiança.

A todos os amigos do Laboratório de Culturas Láticas, principalmente ao Célio Souza, Elisângela Domingo e Edimara Ferreira.

As amigas Ana Carolina Volp, Luciana Rodrigues e Milene das Dores pelo apoio e companhia.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Queijos artesanais em Minas Gerais e no Brasil.....	3
2.2 Queijo Minas Artesanal.....	3
2.3 Queijo Canastra.....	4
2.3.1 Processo de fabricação do queijo Canastra.....	6
2.4 Microbiota láctica em queijos artesanais.....	10
2.5 Leveduras.....	13
2.5.1 Leveduras em alimentos.....	18
2.5.1.1 Leveduras em produtos lácticos.....	22
3. OBJETIVOS.....	26
4. METODOLOGIA.....	27
4.1 Coleta das amostras.....	27
4.2 Análises físico-químicas.....	27
4.2.1 Determinação da acidez titulável e do pH.....	27
4.2.2 Determinação de cloreto de sódio.....	27
4.3 Análises microbiológicas.....	27
4.3.1 Contagem total e contagem de microrganismos indicadores.....	28
4.3.2 Contagem da microbiota láctica e leveduriforme.....	28
4.4 Isolamento e caracterização da microbiota láctica.....	28
4.5 Isolamento, caracterização e identificação das leveduras.....	29
4.5.1 Meios de cultura utilizados na identificação .....	30
4.5.2 Avaliações bioquímicas e físicas.....	32
4.5.2.1 Assimilação e fermentação de fontes de carbono.....	32
4.5.2.2 Crescimento a temperatura de 37 °C.....	33
4.5.2.3 Tolerância osmótica.....	33

4.5.2.4 Redução de nitrato.....	34
4.5.2.5 Hidrólise de amido.....	34
4.6 Análises estatísticas.....	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
5.1 Análises físico-químicas.....	35
5.2 Contagem total e de microrganismos indicadores.....	37
5.3 Contagem da microbiota láctica e leveduriforme.....	40
5.4 Isolamento e caracterização da microbiota láctica e leveduriforme.....	42
5.5 Caracterização e identificação da microbiota leveduriforme.....	43
5.5.1 Metodologia tradicional.....	43
5.5.2 Sistema API <sup>®</sup> 20 C AUX.....	57
5.5.3 Comparação dos resultados pela metodologia tradicional e pelo sistema API <sup>®</sup> 20 C AUX.....	59
5.5.4 Espécies leveduriformes predominantes nas unidades produtoras, nos dois períodos avaliados.....	62
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	67
7. REFERÊNCIAS.....	68
APÊNDICES .....	76

## RESUMO

NÓBREGA, Juliana Escarião da, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2007. **Caracterização do fermento endógeno utilizado na fabricação do queijo Canastra no município de Medeiros, Minas Gerais, com ênfase em leveduras.** Orientadora: Célia Lúcia de Luces Fortes Ferreira. Co-orientadores: Antônio Fernandes de Carvalho e Regina Célia Santos Mendonça.

Este trabalho teve por objetivo determinar parâmetros físico-químicos e caracterizar a microbiota presente no fermento endógeno utilizado na fabricação do queijo Canastra. O queijo Canastra é produzido na região da Serra da Canastra, Minas Gerais, de forma artesanal, com leite cru de vaca e utiliza como cultura iniciadora um fermento endógeno, preparado a partir do soro. Amostras do fermento endógeno, utilizado em oito unidades produtoras do queijo Canastra, foram coletadas assepticamente nas respectivas propriedades situadas na cidade de Medeiros, MG. As mesmas propriedades foram amostradas no período das águas (PA) e no período da seca (PS). Os valores de acidez e pH não sofreram alteração ( $P > 0,05$ ) nos dois períodos amostrados. A acidez média encontrada foi 0,56 % e 0,66 %, no PA e PS, respectivamente. O pH apresentou média de 5,02 no PA e de 5,07 no PS. O teor de NaCl foi superior ( $P < 0,05$ ) no PA, com média de 7,39 %, enquanto no PS, a média foi de 4,13 %. A contagem total de mesófilos aeróbios foi menor ( $P < 0,05$ ) no PA com mediana de 5,94 Log UFC.mL<sup>-1</sup>, no PS a mediana encontrada foi de 7,50 Log UFC.mL<sup>-1</sup>. As contagens de coliformes totais, *E. coli* e *S. aureus* não diferiram ( $P > 0,05$ ) nos dois períodos amostrados e as medianas encontradas foram respectivamente 2,30 Log UFC.mL<sup>-1</sup>, 1,50 Log UFC/ mL e 1,92 Log UFC.mL<sup>-1</sup> no PA e de 2,61 Log UFC.mL<sup>-1</sup>, 1,50 Log UFC.mL<sup>-1</sup> e 1,72 Log UFC.mL<sup>-1</sup> no PS. *Listeria* sp. não foi detectada nas amostras. *Salmonella* sp. foi detectada em uma das amostras analisadas no PA. Observaram-se elevadas contagens das bactérias do ácido lático, todos os grupos avaliados apresentaram contagens superiores a 5 ciclos logaritmos, 395 estirpes foram isoladas e estão em processo de identificação. As contagens de leveduras não diferiram ( $P > 0,05$ ) nos dois períodos avaliados e apresentaram medianas de 5,24

Log UFC.mL<sup>-1</sup> e 4,16 Log UFC.mL<sup>-1</sup> no PA e PS, respectivamente. As espécies de leveduras predominantes no PA foram *Debaryomyces hansenii*, *Torulaspota delbruekii* e *Kluyveromyces lactis* e, no PS, predominaram as espécies *Kluyveromyces lactis*, *Torulaspota delbruekii* e *Kluyveromyces marxianus*. Houve similaridade de 80,87 % nos resultados entre o método tradicional e o kit API<sup>®</sup> 20 C AUX, utilizados para a identificação das leveduras. Este trabalho representa uma das etapas iniciais acerca dos principais componentes físico-químicos e microbianos do fermento endógeno utilizado na fabricação do queijo Canastra. Estudos para uma melhor compreensão desses componentes, suas variações e interações, assim como a sua contribuição para as características e a qualidade do queijo Canastra precisam ser definidos.

## ABSTRACT

NÓBREGA, Juliana Escarião da, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2007. **Characterization of natural whey cultures used in the manufacture of the Canastra cheese in the city of Medeiros, Minas Gerais State, with emphasis in yeasts.** Adviser: Célia Lúcia de Luces Fortes Ferreira. Co-Advisers: Antônio Fernandes de Carvalho and Regina Célia Santos Mendonça.

This work had the objective to determine physicochemical parameters and to characterize the microbiota present in the natural whey cultures used in the manufacture of the Canastra cheese. The Canastra cheese is produced in the region of the Canastra Mountain range, Minas Gerais State, artisan made from raw cow's milk, and uses, as a culture starter, natural starters, prepared from the whey. The samples were collected in 8 properties, in the rain period, and in the dry period. The results demonstrated that the values of acidity and pH did not suffer alteration ( $P>0,05$ ) in the two sampled periods. The average acidity found was 0,56 % and 0,66 %, in the raining period and in dry period, respectively. The pH presented an average of 5,02 in the raining period, and of 5,07 in the dry period. The NaCl index was superior ( $P<0,05$ ) in the raining period, and it presented average of 7,39 %, while in the dry period, the average was of 4,13 %. The total counting of mesophile bacteria was smaller ( $P<0,05$ ) in the raining period, with average of 5,94 Log UFC.mL<sup>-1</sup>, in the dry period the average found was of 7,50 Log UFC.mL<sup>-1</sup>. The total coliform countings, *E. coli* and *S. aureus* did not differ ( $P>0,05$ ) in the two sampled periods, and the averages found were, respectively, 2,30 Log UFC.mL<sup>-1</sup>, 1,50 Log UFC/ mL and 1,92 Log UFC.mL<sup>-1</sup> in the raining period, and 2,61 Log UFC.mL<sup>-1</sup>, 1,50 Log UFC.mL<sup>-1</sup> and 1,72 Log UFC.mL<sup>-1</sup> in the dry period. *Listeria* sp. was not detected in any sample. *Salmonella* sp. was detected in 1 of the samples analyzed during the raining period. Great figures in the lactic acid bacteria countings were observed, all the evaluated groups presented countings superior than 5 logarithmic cycles, 395 lineages were isolated, and are in identification process. The average of the yeasts counting was of 5,24 Log UFC.mL<sup>-1</sup> in the raining period, and of 4,16 Log UFC.mL<sup>-1</sup> in the dry period. The predominant yeasts species during the raining period

were *Debaryomyces hansenii*, *Torulaspota delbruekii* and *Kluyveromyces lactis* and in the dry period, had predominantly the *Kluyveromyces lactis*, *Torulaspota delbruekii* and *Kluyveromyces marxianus* species. There was a similarity of 80,87 % in the results between the traditional method and the 20 API® C AUX kit, used for the yeasts identification. This work is the beginning of the understanding of the main physicochemical and microbial components of the natural whey cultures used in the manufacture of the Canastra cheese. Studies for a better understanding of these components, their variations and interactions, as well as their contribution for the Canastra cheese characteristics and quality must still be determined.

## 1. INTRODUÇÃO

A fabricação artesanal de queijos no Estado de Minas Gerais resulta de uma tradição secular, passada de pai para filho, como forma de aproveitamento da produção leiteira nas pequenas propriedades rurais. Dificuldades com transporte e comercialização do leite levaram os pequenos produtores das regiões montanhosas mineiras a produzir seu próprio queijo. As características geográficas dessas regiões forneceram condições para o desenvolvimento de um queijo com características sensoriais peculiares, a exemplo do queijo produzido na região da Serra da Canastra.

Os produtores artesanais dessa região utilizam a microbiota naturalmente presente no leite, como coadjuvante à produção do queijo. Diariamente, após enformagem e salga do queijo, parte do soro eliminado é coletado e adicionado à produção subsequente. Esse fermento endógeno, comumente conhecido como pingo, contém diversos grupos microbianos que direcionam a fermentação e maturação do queijo. Essa prática insere ao produto uma microbiota diversificada, representativa da região na qual o produto é fabricado e confere ao queijo características sensoriais diferenciadas e endêmicas.

Estudos demonstram que o sistema enzimático da microbiota presente nos queijos artesanais, fabricados a partir de leite cru, é mais complexo do que aquele presente na microbiota de queijos fabricados com leite pasteurizado, adicionados de fermentos selecionados, conduzindo a diferenças na qualidade sensorial entre esses dois tipos de queijo (GRAPPIN & BEUVIER, 1997; PELÁEZ & REQUENA, 2005; BALLESTEROS et al, 2006; CABEZAS et al, 2007).

Desde a década de 1950, com a adoção da pasteurização do leite para a produção de queijos (MARTLEY & CROW, 1993) tornou-se necessário a utilização de culturas iniciadoras para reposição da microbiota lática. Seu uso confere qualidade tecnológica aos produtos láticos, mas, em contra partida, limita a biodiversidade e, conseqüentemente as características sensoriais desses produtos (MARINO et al, 2003; PELÁEZ & REQUENA, 2005; ZAMFIR et al, 2005).

Existe uma reconhecida demanda por novas estirpes que substituam ou complementem os fermentos correntemente usados na indústria de produtos fermentados, pois o número limitado dessas estirpes, disponíveis para a indústria

lática, tem sido extensivamente utilizado, intensificando, com isso, problemas como infecção por bacteriófagos (SALAMA, 1995; POZNANSKI et al, 2004; PELÁEZ & REQUENA, 2005; ZAMFIR et al, 2005).

Culturas iniciadoras específicas a uma particular variedade de queijo, baseada na seleção de estirpes isoladas a partir do próprio produto, presumivelmente, estará mais bem adaptada, além de assegurar propriedades sensoriais semelhantes ao queijo original, quando fabricado com leite tratado termicamente (ESTEPAR et al, 1999). Para tanto, é necessário o conhecimento bioquímico e microbiológico desse ecossistema. A disponibilidade de culturas endógenas, adaptadas às condições locais, é uma necessidade econômica e um avanço tecnológico (CAVALCANTE, et al, 2003).

Fermentos naturais utilizados na fabricação de queijo constituem uma complexa associação microbiana, formada predominantemente por bactérias do ácido lático (BAL) e por uma microbiota não-lática como leveduras (COPOLA et al, 1988; REINHEIMER et al, 1995; PARENTE et al, 1997).

Apesar da extensiva utilização de fermento endógeno na fabricação de queijos artesanais em Minas Gerais, pouco se sabe a respeito da sua composição. A finalidade desse trabalho foi caracterizar o fermento endógeno utilizado na fabricação do queijo artesanal da Serra da Canastra, em diferentes períodos do ano. Este estudo contribuirá para melhor entendimento da composição físico-química e microbiana do fermento endógeno e do papel que este exerce nas características sensoriais do queijo Canastra, servindo de base para seleção de novas estirpes, que poderão ser utilizadas pela indústria ou pelo produtor de queijo artesanal, para manter as características desejáveis desses queijos.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Queijos artesanais em Minas Gerais e no Brasil**

Informações sobre queijos artesanais no Brasil são escassas. Além dos queijos tipo Minas, produzidos principalmente nas regiões mineiras de Araxá (ARAÚJO, 2004), Serra da Canastra (ORNELAS, 2005), Alto Paranaíba (FONSECA, 2005) e Serro (PINTO, 2004; MARTINS, 2006) podem ser citados os queijos produzidos no Nordeste: queijo Manteiga e queijo Coalho (AQUINO, 1983; GLOBO RURAL, 1999) e no Sul: queijo Serrano, também conhecido como queijo Colonial (SOUZA et al, 2003; ANDRADE et al, 2006). Após a promulgação da Lei Estadual nº 14.185, de 31 de janeiro de 2002, que estabelece os queijos artesanais das regiões mineiras, acima citadas, como patrimônio imaterial do Estado, aumentou a preocupação quanto à necessidade de se obterem informações acerca dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos, assim como de se estabelecerem ações com o intuito de proteger, os queijos artesanais produzidos em regiões tradicionais não só em Minas Gerais, como em outros Estados (PINTO, 2004; EMATER, 2007; SEBRAE, 2007).

### **2.2 Queijo Minas artesanal**

A produção de queijos em Minas Gerais é de aproximadamente 215 mil toneladas por ano, sendo 70 mil de queijo Minas artesanal, produzido em 519 dos 853 municípios mineiros. A produção caracteriza-se por ser em pequena escala, fabricado diretamente nas propriedades rurais. Ocupa 30 mil famílias de pequenos proprietários, totalizando aproximadamente 100 mil pessoas. Destes, 10.773 são produtores das quatro principais regiões do Estado (Serro, Alto Paranaíba, Serra da Canastra e Araxá), consideradas tradicionais e que produzem anualmente 33.570 toneladas de queijo em 46 municípios, gerando 26.870 empregos diretos (GLOBO RURAL, 2002; EMATER, 2004a).

### **2.3 Queijo Canastra**

A fabricação e o consumo de queijo na região da Serra da Canastra confundem-se com a história do povoamento local, iniciado com a busca de minerais e pedras preciosas. Relatos de naturalistas, contratados na época do império, são ricos em descrições detalhadas da vegetação, tipo de solo, serras, rios e seus habitantes. Dentre os costumes e hábitos alimentares descritos, o queijo, fabricado de forma artesanal, já era incluído (EMATER, 2004).

Localizada no sudoeste do Estado (Figura 1), a região abriga o Parque Nacional da Serra da Canastra, criado para proteger as nascentes do rio São Francisco. Sua altitude varia de 637 m a 1.485 m acima do nível do mar, com temperatura média anual de 22,2 °C e índice pluviométrico em torno de 1.390 mm anuais (EMATER, 2004). É formada pelos municípios de Bambuí, Delfinópolis, Medeiros, Piumhi, São Roque de Minas, Tapiraí e Vargem Bonita, com expressiva parte da sua população na zona rural, a exemplo de Medeiros (51,6 %) e Vargem Bonita (46,6 %) (Tabela 1). Estes municípios possuem várias particularidades naturais, sócio-culturais e econômicas em comum, entre elas o modo de fabricar o queijo artesanal (EMATER, 2004).

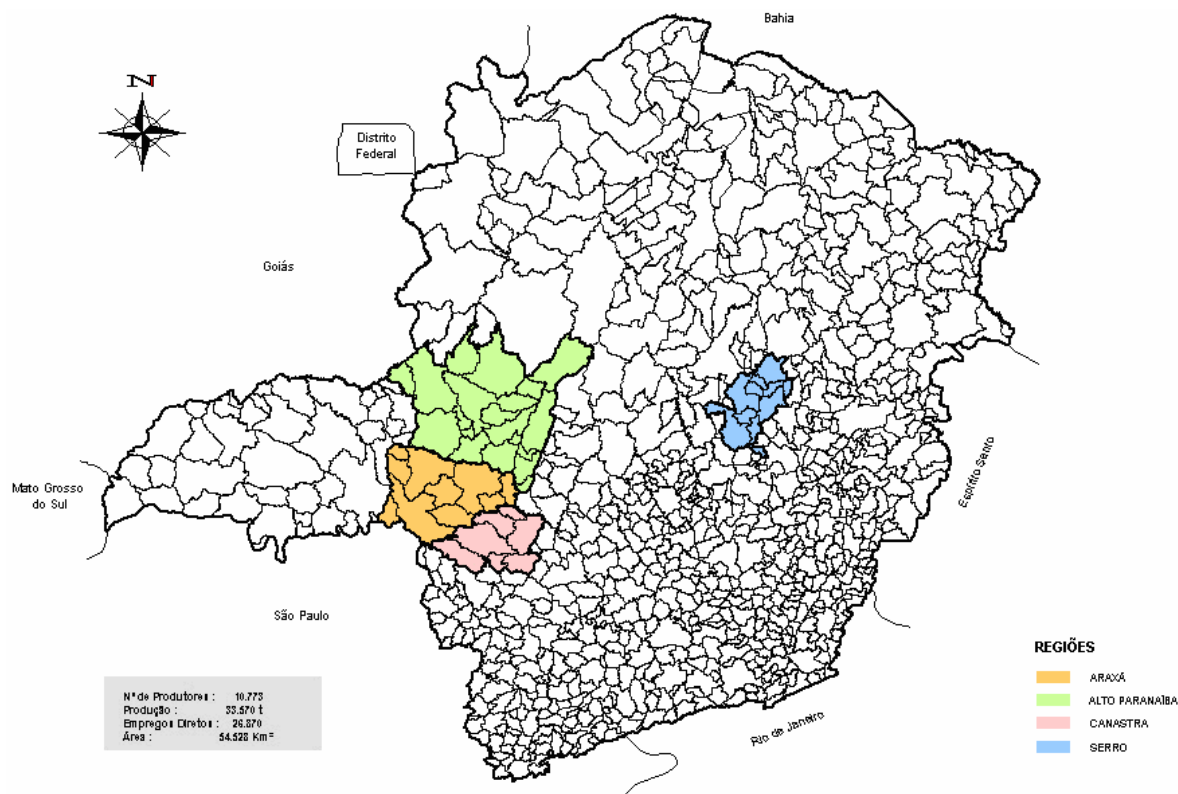


Figura 1. Regiões produtoras do queijo Minas artesanal.

Tabela 1. Características gerais dos municípios produtores do queijo Canastra

Município	Área (Km <sup>2</sup> )	População (n)	População Rural (%)
BambuÍ	1.457	21.682	18,50
Delfinópolis	1.171	6.572	29,00
<b>Medeiros</b>	<b>969</b>	<b>3.038</b>	<b>51,60</b>
Piumhi	905	28.757	12,30
São Roque de Minas	2.107	6.326	41,00
TapiraÍ	434	1.887	40,50
Vargem Bonita	409	2.206	46,60
<b>Total</b>	<b>7.452</b>	<b>70.468</b>	<b>21,90</b>

Fonte: EMATER-MG (2004).

Segundo dados da EMATER (2004), o queijo Minas artesanal da Serra da Canastra é produzido por 1.795 produtores, com uma produção anual de 4.470 toneladas (Tabela 2), sendo grande parte dessa produção comercializada nos mercados de Belo Horizonte e São Paulo. Emprega basicamente mão-de-obra familiar, caracterizada pelo baixo nível de escolaridade (ORNELAS, 2005). Não

existem, até o momento, cooperativas ou associações para a comercialização do queijo Canastra. Segundo Ornelas (2005), 92,5 % do queijo produzido na região é comercializado por atravessadores, conhecidos como queijeiros.

Tabela 2. Produção de leite e queijo artesanal pelos municípios da Região da Serra da Canastra

Município	Propriedades Rurais (n)	Rebanho (cabeças)	Prod. Leite ano (1000 Litros)	Produtor de queijo	Produção anual de queijo (ton.)
BambuÍ	1.438	74.323	36.537	149	576
Delfinópolis	484	80.000	15.000	25	70
<b>Medeiros</b>	<b>537</b>	<b>29.971</b>	<b>16.425</b>	<b>430</b>	<b>1.600</b>
Piumhi	956	30.394	21.600	50	165
São R. de Minas	933	18.811	7.560	852	1.537
TapiraÍ	258	18.320	4.438	89	162
Vargem Bonita	207	12.792	2.355	200	360
<b>Total</b>	<b>4.813</b>	<b>264.611</b>	<b>103.915</b>	<b>1.795</b>	<b>4.470</b>

Fonte: EMATER-MG (2004).

### 2.3.1 Processo de fabricação do queijo Canastra

A produção artesanal do queijo Canastra é realizada na própria fazenda onde o leite é produzido. As queijarias caracterizam-se por serem construções simples, localizadas próximas ao local da ordenha (Figura 2).



Figura 2. Queijaria da região da Serra da Canastra

O leite recém-ordenhado é filtrado e conduzido através de tubulação que interliga a recepção à sala de processamento da queijaria, onde é acondicionado em tanques plásticos para o seu processamento. O coalho e o fermento endógeno são adicionados e, após coagulação, a massa é quebrada com o auxílio de uma pá de madeira. A massa coagulada, coletada com o auxílio de peneira plástica, é colocada em fôrmas plásticas, onde a prensagem é realizada manualmente com a ajuda de um tecido. Após a prensagem, os queijos são recobertos com sal grosso. Passadas 24 horas, o excesso de sal é retirado, sendo os queijos transferidos para prateleiras, permanecendo nas fôrmas por mais 24 horas. Os queijos são virados diariamente, até a comercialização (Figura 3).



**1. Ordenha**



**2. Filtragem do leite**



**3. Tanque de processamento do leite**



**4. Dosagem do coalho e do pingo**



**5. Coagulação do leite**



**6. Corte da massa**

Continua...



**7. Dessoragem**



**8. Enformagem**



**9. Prensagem**



**10. Salga**



**Coleta do pingo durante a salga**



**11. Maturação dos queijos**

**Figura 3. Etapas da fabricação do queijo Canastra**

Pesquisas têm demonstrando que na região da Serra da Canastra não existe padronização no processo de fabricação. A quantidade de coalho e fermento endógeno utilizada assim como o tempo de coagulação variam entre os produtores (ORNELAS, 2005; BORELLI, 2006). Problema semelhante também foi observado em outras regiões produtoras do queijo Minas artesanal, a exemplo de Araxá e Serro (ARAÚJO, 2004; PINTO, 2004).

#### **2.4 Microbiota láctica em queijos artesanais**

Em muitos países, queijos fabricados em pequena escala, a partir de leite cru, ordenhados pelos próprios produtores, são produzidos artesanalmente, utilizando técnicas tradicionais. Na produção desses queijos, normalmente não se empregam culturas iniciadoras comerciais, sendo esta função desempenhada pelas BAL naturalmente presentes no leite (COGAN et al, 1997).

Alternativamente, tipos diferentes de culturas naturais são utilizadas, produzidas a partir do soro ou do próprio leite. Embora a composição e o desempenho desses fermentos endógenos sejam relativamente variáveis, possuem propriedades importantes, como relativa insensibilidade ao ataque de bacteriófagos e constituem uma rica e complexa associação microbiana, fonte de novas estirpes. (REINHEIMER et al, 1995; REINHEIMER et al, 1996; COGAN et al, 1997; PARENTE et al, 1997; BERESFORD et al, 2001).

A microbiota do queijo compreende o grupo de microrganismos iniciadores, composto pelas BAL e o grupo de microrganismos secundários. As BAL estão envolvidas no desenvolvimento da acidez durante a fabricação e também contribuem no processo de maturação. A microbiota secundária, embora não contribua para a acidez, geralmente tem papel significativo na fase de maturação do queijo. Esse grupo inclui as BAL não iniciadoras, como espécies mesofílicas dos gêneros *Pediococcus* e *Lactobacillus* e outros microrganismos a exemplo de *Micrococcus*, *Brevibacterium*, bactérias propiônicas, bactérias corineformes, fungos e leveduras (GOBBETTI et al, 1999; BERESFORD et al, 2001).

Pouco se sabe sobre as BAL envolvidas na fabricação e maturação de queijos artesanais, sendo que a maioria das informações encontrada na literatura, diz respeito aos queijos espanhóis (COGAN et al, 1997).

Pesquisas têm demonstrado que espécies de *Lactococcus* são de grande relevância na microbiota dos queijos artesanais espanhóis, por exemplo, o queijo Manchego é o mais popular e consumido, sendo fabricado na região de La Mancha, a partir de leite cru de ovelha e maturado por 15 a 60 dias. Em estudo realizado por Ballesteros et al (2004), a espécie predominantemente encontrada foi *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, seguida de *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* e *Lactobacillus platarum*. Os autores também consideraram que os atributos sensoriais no Manchego fabricado artesanalmente foram superiores aos apresentados pelo mesmo queijo, quando fabricado industrialmente.

Segundo Estepar et al (1999), o queijo Peñamellera, outro tradicional queijo artesanal espanhol, fabricado, ao norte do país, com leite cru de vaca, porém adicionado de leite de cabra e ovelha, apresentou predominância do gênero *Lactococcus*, com valores médios de  $10^9$  UFC.g<sup>-1</sup>, sendo a espécie *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* predominante. Os *Lactobacillus* apresentaram-se como o grupo subdominante, com contagens médias de  $5 \times 10^7$  UFC.g<sup>-1</sup>, e as espécies que se destacaram foram *Lactobacillus brevis* e *Lactobacillus plantarum*. O grupo *Lactococcus* também se destaca como o principal durante a maturação do queijo Ibores, fabricado com leite cru de cabra, na região sudoeste da Espanha e nos queijos Roncal e Idiazábal, fabricados com leite cru de ovelha na região de Navarra (ARIZCUN et al, 1997; MAS et al, 2002).

Cogan et al (1997) isolaram e caracterizaram 4.379 BAL em 35 produtos artesanais fabricados na Europa, incluindo 24 queijos. Além de queijos, foram avaliados fermentos endógenos, leites e leites fermentados. O estudo indicou consideráveis variações nos tipos de BAL presentes, bem como sua capacidade de produzir ácido, exopolissacarídeos, bacteriocinas e proteinases, o que sugere que cada tipo de queijo tem um ecossistema único. Dentre as BAL identificadas, foram mais frequentes *Lactococcus* (38 %), *Enterococcus* (17 %), *Streptococcus*

*thermophilus* (14 %), *Lactobacillus* mesófilicos (12 %), *Leuconostoc* (10 %) e *Lactobacillus* termofílicos (9 %).

Zamfir et al (2005) ao avaliarem a biodiversidade de BAL em 110 amostras de produtos lácteos artesanais produzidos na Romênia, entre estes, os queijos Branza Dulce, Telemea e Urda, observaram que há predominância de *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc* sp. e *Enterococcus* sp. Entre o grupo *Enterococcus*, uma nova espécie, *E. sacharominimus*, foi encontrada, o que demonstra a importância dos produtos artesanais como fonte potencial de microrganismos, cujas propriedades possam ser utilizadas para o desenvolvimento de novas culturas iniciadoras.

No México, assim como no Brasil, o queijo tipo “frescal” é uma das variedades populares mais consumidas. O queijo frescal mexicano é fabricado artesanalmente em várias propriedades rurais, com leite cru de vaca, utilizando-se de técnicas tradicionais, que inclui acidificação pelas BAL naturalmente presentes no leite (TORRES & CHANDAN, 1981). No trabalho realizado por Torres-Llanez et al (2006), a espécie predominante foi *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, seguida por *Enterococcus faecium* e *Lactobacillus casei*. No entanto, no queijo Jben, fabricado no Marrocos, com características semelhantes, *Lactobacillus* foi o gênero dominante (34 % dos isolados), com destaque para a espécie *Lactobacillus plantarum* (OUADGHIRI et al, 2005).

Estudo correlacionando a microbiota presente em queijos em diferentes épocas do ano demonstrou variações sazonais na qualidade do leite e queijo dentro do mesmo ano, bem como variações decorrentes da localização geográfica. (TAVARIA et al, 2000).

No Brasil, uma das raras literaturas sobre BAL em queijos artesanais aponta a espécie *Lactobacillus plantarum* como a predominante ao longo da fabricação do queijo Canastra (BORELLI, 2006). O autor assinala as espécies *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus casei* como os microrganismos que potencialmente poderiam ser utilizados como componentes da cultura iniciadora na fabricação desse produto.

## 2.5 Leveduras

Levedura, por definição, é um microrganismo unicelular, que se reproduz principalmente por brotamento. Não pertence a um grupo formal, o crescimento leveduriforme é exibido por grande número de microrganismos não relacionados entre si. Existem pelo menos 80 gêneros de leveduras com aproximadamente 600 espécies conhecidas (RAVEN et al, 2001) .

Ao microscópio, leveduras diferenciam-se de bactérias pela maior dimensão das suas células, podendo variar de 5 a 8  $\mu$ m de diâmetro. Crescem em uma ampla faixa de pH ácido, em até 18 % de etanol e em presença de 55 % a 60 % de sacarose. As colônias de leveduras são geralmente de consistência cremosa, brilhantes ou opacas, de cor branca a creme, mas podem apresentar coloração do marfim ao vermelho (JAY, 2005).

Leveduras produzem células simples, arredondadas, ovais ou alongadas, que se reproduzem quase sempre por brotamento, geralmente na região polar. Algumas leveduras podem produzir brotos, simultaneamente, em vários pontos. No processo de brotamento, a célula-mãe origina uma gêmula, o blastoconídio (ou blastóporo) (Figura 4). Os brotamentos são liberados da célula-mãe, formando células independentes, ou continuam unidos, formando células alongadas, chamadas pseudo-hifa, que se diferenciam das hifas verdadeiras, por apresentarem constrição nos septos. Dentre os esporos assexuais mais comuns ainda podem-se citar os artroconídios (Figura 5), que são células que se separam a partir de uma hifa em crescimento (típico do gênero *Trichosporon*) e os clamidoconídios (Figura 6), os quais podem ser reconhecidos pelas espessas paredes que apresentam e que são facilmente observados em *Candida albicans* (LARPENT et al, 1991; RAVEN et al, 2001; JAY, 2005).

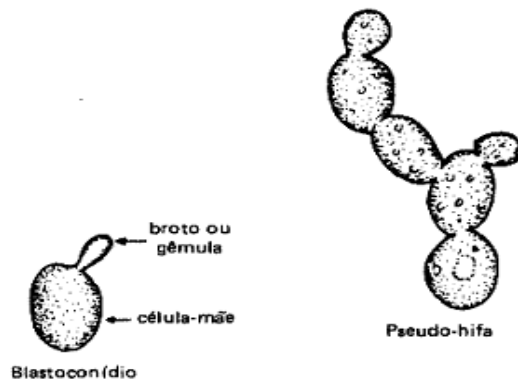


Figura 4. Blastoconídio e pseudo-hifa

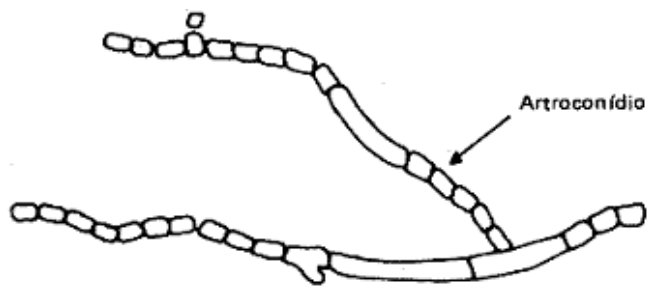


Figura 5. Artroconídio

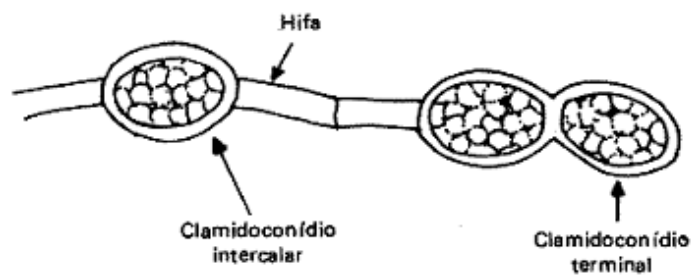


Figura 6. Clamidoconídio

As leveduras, segundo sua capacidade de reproduzir de forma sexuada, são agrupadas em duas grandes classes: *Ascomycetes*, também conhecidos como

“leveduras verdadeiras”, ou ainda, leveduras ascosporeogêneas, que formam em certas condições, ascósporos no interior da célula. Outras são capazes de elaborar esporos externos, essas são as leveduras pertencentes ao grupo *Basidiomycetes*. “Leveduras falsas”, nas quais somente a reprodução assexuada é conhecida, formam um conjunto artificial, conhecido por *Deuteromycetes*. Essas são incapazes de formar ascósporos ou basidiósporos em condições habituais de laboratório. Com base em suas características gerais, muitos deuteromicetos são ascomicetos ou basidiomicetos, reproduzindo-se somente assexuadamente, em uma condição também conhecida como estado anamorfo (LARPENT et al, 1991; RAVEN et al, 2001; JAY, 2005).

Várias espécies de leveduras têm sido descritas em seu estado anamorfo, devido ao desconhecimento do seu modo de reprodução sexual (estado teleomorfo). Em algumas leveduras, a habilidade de formar esporos sexuais ainda é desconhecida. Porém, uma vez descoberto o teleomorfo para uma espécie conhecida anteriormente como anamorfa, os nomes passam a ser sinônimos (DEÁK & BEUCHAT, 1986). Observam-se, na tabela 3, algumas leveduras presentes em alimentos e o respectivo sinônimo quando em estado anamorfo.

Tabela 3. Leveduras presentes em alimentos e seus anamorfos.

<b>Teleomorfo</b>	<b>Anamorfo</b>
<i>Citeromyces matritensis</i>	<i>Candida globosa</i> ( <i>C. globosa</i> )
<i>Clavispora lusitaniae</i>	<i>C. lusitaniae</i>
<i>Debaryomyces hansenii</i>	<i>C. famata</i>
<i>Dekkera anomala</i> ( <i>D. anomala</i> )	<i>Brettanomyces anomalus</i>
<i>D. bruxellensis</i>	<i>B. bruxellensis</i>
<i>D. intermedia</i>	<i>B. intermédia</i>
<i>Dipodascus geotrichum</i>	<i>Geotrichum candidum</i>
<i>Filobasidium capsuligenum</i> ( <i>F. capsuligenum</i> )	<i>Candida japonica</i>
<i>F. uniguttulatum</i>	<i>Cryptococcus uniguttulatus</i> ( <i>Cr. uniguttulatus</i> )

---

<i>Filobasidiella neoformans</i>	<i>Cr. neoformans</i>
<i>Hanseniaspora guilliermondi</i>	<i>Kloeckera apis</i>
( <i>H. guilliermondi</i> )	( <i>K. apis</i> )
<i>H. occidentalis</i>	<i>K. javanensis</i>
<i>H. osmophila</i>	<i>K. corticis</i>
<i>H. uvarum</i>	<i>K. apiculata</i>
<i>H. valbyensis</i>	<i>K. japonica</i>
<i>H. vinae</i>	<i>K. africana</i>
<i>Hyphopichia burtonii</i>	<i>Candida variabilis</i>
<i>Issatchenkia orientalis</i>	<i>C. krusei</i>
<i>Kuyveromyces lactis</i> ( <i>Kl. lactis</i> )	<i>C. sphaerica</i>
<i>Kl. marxianus</i>	<i>C. kefyri</i>
<i>Kl. thermotolerans</i>	<i>C. dattila</i>
<i>Leucosporidium scottii</i>	<i>C. scottii</i>
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	<i>C. pulcherrima</i>
<i>M. reukaufii</i>	<i>C. reukaufii</i>
<i>Pichia anomala</i> ( <i>P. anomala</i> )	<i>C. pelliculosa</i>
<i>P. canadensis</i>	<i>C. melinii</i>
<i>P. capisulata</i>	<i>C. molischiana</i>
<i>P. fabianii</i>	<i>C. fabianii</i>
<i>P. fermentans</i>	<i>C. lambica</i>
<i>P. guilliermondii</i>	<i>C. guilliermondii</i>
<i>P. holstii</i>	<i>C. silvicola</i>
<i>P. humboldtii</i>	<i>C. ingens</i>
<i>P. jadinii</i>	<i>C. utilis</i>
<i>P. membranaefaciens</i>	<i>C. valida</i>
<i>P. nakasei</i>	<i>C. citrea</i>
<i>P. norvegensis</i>	<i>C. norvegensis</i>
<i>P. stipitis</i>	<i>C. shehatae</i>
<i>Rhodospiridium infirmo- miniatum</i>	<i>Cr. infirmo-miniatus</i>
( <i>R. infirmo- miniatum</i> )	
<i>R. toruloides</i>	<i>Rhodotorula glutinis</i> ( <i>Rd. glutinis</i> )
<i>R. paludigenum</i>	<i>Rd. graminis</i>
<i>R. dacryoideum</i>	<i>Rd. minuta</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ( <i>S. cerevisiae</i> )	<i>Candida robusta</i>
<i>S. exiguus</i>	<i>C. holmii</i>

---

<i>Sporidiobolus pararoseus</i> ( <i>Sp. pararoseus</i> )	<i>Sporobolomyces shibatanus</i> ( <i>Sb. shibatanus</i> )
<i>Sp. salmonicor</i>	<i>Sb. laurentii</i>
<i>Tremela auratia</i>	<i>Cr. laurentii</i>
<i>Torulaspota delbruekii</i>	<i>C. colliculosa</i>
<i>Wickerhamiella domercqiae</i>	<i>C. domercqiae</i>
<i>Yarrowia lipolytica</i>	<i>C. lipolytica</i>
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	<i>C. mogii</i>

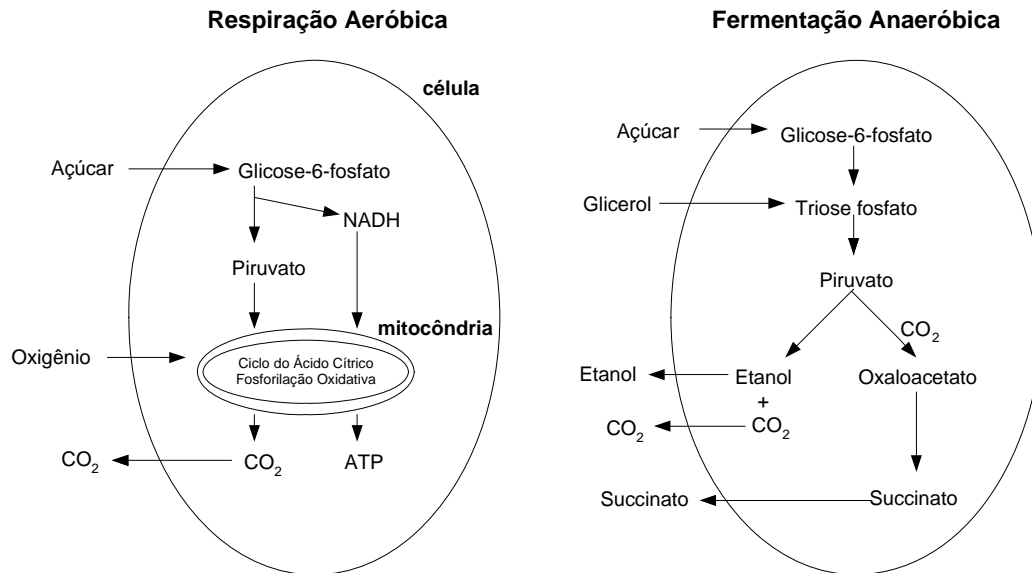
Fonte: DEÁK & BEUCHAT, 1986.

As fontes de carbono são de grande importância para as leveduras, pois propiciam a biossíntese de constituintes celulares variados como açúcares, lipídios, proteínas, ácidos nucléicos, entre outros, e a sua oxidação fornece energia para a célula (RAVEN et al, 2001). A via de degradação dos glicídios é a glicólise, onde a glicose é oxidada a piruvato. Segundo Larpent et al (1991), dependendo da forma como o piruvato é catabolizado, as leveduras podem ser divididas em dois grupos.

1. Aeróbios estritos: organismos que apresentam metabolismo exclusivamente respiratório, sendo o piruvato oxidado pelo ciclo de Krebs. A incapacidade desses organismos em fermentar pode ser explicada pela ausência da álcool desidrogenase, enzima catalisadora da redução de acetaldeído a etanol. São exemplos desse grupo os gêneros: *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Lipomyces*, *Saccharomycopsis*, *Cryptococcus* e *Sporobolomyces* e espécies como: *Candida famata*, *Pichia fluxuum*, *Debaryomyces hansenii* e *Hansenula canadensis*.

2. Anaeróbios facultativos: nesses organismos, o açúcar é metabolizado em etanol pela fermentação, quando em situação de anaerobiose. Durante o crescimento em aerobiose, tanto a respiração quanto a fermentação contribuem para a degradação da glicose. Segundo a importância dessas vias metabólicas, dois subgrupos podem ser observados: a) leveduras do tipo respiratório: durante o crescimento em presença de oxigênio, menos de 30 % da glicose é fermentada. A intensidade respiratória é elevada e a glicose é degradada em CO<sub>2</sub> e água, resultando em alto rendimento energético; b) leveduras do tipo fermentativa: durante o crescimento em presença de oxigênio, grande parte da glicose é fermentada (> 90 %) , a intensidade respiratória é fraca e os glicídios, incompletamente oxidados a etanol. O rendimento energético é pequeno e o crescimento é frequentemente mais lento que no caso precedente. Podem-se

observar, na Figura 7, pode-se observar as vias metabólicas utilizadas pelas leveduras em aerobiose e anaerobiose.



Adaptado de Larpent et al (1991).

Figura 7. Vias metabólicas em aerobiose e anaerobiose

### 2.5.1 Leveduras em alimentos

Leveduras apresentam grande significado em alimentos, devido a sua capacidade de causar deterioração ou conduzir a uma fermentação desejável. Tradicionalmente e do ponto de vista econômico, são os microrganismos mais importantes, explorados pelo homem. São utilizadas na produção de pão, cerveja, vinho e outras bebidas alcoólicas, assim como etanol para combustível, extrato de levedura, pigmentos, probióticos e outras substâncias específicas para uso em alimentos e pela indústria farmacêutica (FLEET, 1990; JAKOBSEN & NARVHUS, 1996).

Deák e Beuchat (1987), com base numa extensa pesquisa na literatura desde a década de 1950, compilaram uma lista com 215 espécies de leveduras já citadas em alimentos. Nessa lista, são representados 43 gêneros de leveduras. Quase a metade das espécies vem dos gêneros *Candida* e *Pichia* (73 e 31 espécies, respectivamente). Desse total, 50 espécies podem ser consideradas comumente

associadas com alimentos, sendo encontradas principalmente em deterioração. As 20 espécies mais frequentes de leveduras, difundidas em quase todos os tipos de alimento estão listadas na Tabela 4.

Tabela 4. Espécies de leveduras mais frequentes em alimentos

Espécies	Ocorrência <sup>a</sup>
<i>Candida glabrata</i> ( <i>C. glabrata</i> )	A, B, C, D, E, G, I
<i>C. sake</i>	A, D, E, F, G, I, K
<i>C. tropicalis</i>	A, B, C, D, E, F, G, H, I
<i>C. versatilis</i>	A, B, C, E, F, G, I
<i>Cryptococcus albidus</i>	A, D, E, G, H, I, K
<i>Debaryomyces hansenii</i>	A, B, C, D, E, F, G, H, I
<i>Issatchenkia orientalis</i>	A, B, C, D, E, F, G, H, I
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	A, C, D, E, F, H, I
<i>Pichia anomala</i> ( <i>P. anomala</i> )	A, B, C, D, E, F, G, K
<i>P. fermentans</i>	A, B, C, D, E, F, G, H, I, K
<i>P. guilliermondii</i>	A, B, C, D, E, F, G, H, I
<i>P. membranaefaciens</i>	A, B, C, D, E, F, G, H, I
<i>Rhodotorula glutinis</i> ( <i>R. glutinis</i> )	A, B, D, E, F, G, H, I, K
<i>R. mucilaginosa</i>	A, C, D, E, F, G, H, I, K
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ( <i>S. cerevisiae</i> )	A, B, C, D, E, F, G, I, K
<i>S. exiguus</i>	A, B, C, D, E, F, G, H, I
<i>Sporobolomyces roseus</i>	A, C, E, F, G, H, K
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	A, B, C, D, E, F, G, H, I, K
<i>Zygosaccharomyces bailii</i> ( <i>Z. bailii</i> )	A, C, D, E, F, I
<i>Z. rouxii</i>	A, B, C, D, E, F, H, I

Fonte: Deák e Beuchat (1987)

<sup>a</sup>Ocorrência: A: frutas, vegetais, saladas cruas; B: alimentos fermentados, salgados ; C: concentrados, xaropes, geléias, mel; D: bebidas, refrigerantes, sucos; E: mosto, vinho, cidra; F: cerveja, ale; G: carne, frango, derivados cárneos; H: leite, queijo, derivados lácticos; I: outros produtos alimentícios (ex: massas, pães, confeitarias, saladas,etc); K: ambiente da indústria alimentícia, ar, piso, esgoto.

Jay (2005) destaca 14 gêneros de leveduras de interesse em alimentos que serão descritos, sucintamente, a seguir:

***Brettanomyces***: Leveduras fermentativas. Brotamento multilateral. Pseudomicélio e micélio verdadeiro não septado possíveis. Produzem ácido acético a partir de glicose em condições de aerobiose. Causam deterioração em cerveja, vinho, refrigerante e conserva.

***Candida***: Fermentativas ou não. Brotamento multilateral ou polar. Pseudomicélio e micélio verdadeiro possíveis. Os membros desse gênero são as leveduras mais comuns em carne de gado crua moída e em carne de frango. *Candida tropicalis* é a levedura mais encontrada em alimentos em geral.

***Cryptococcus***: Não fermentativas. Brotamento multilateral. Pseudomicélio ausente ou rudimentar. Colônias mucosas, hialinas ou vermelho-alaranjadas, devido a pigmentos carotenóides. Representam o anamorfo da *Filobasidiella* e de outros *Basiodiomycetes*. São encontradas em plantas, solos, morangos e outras frutas, peixes marinhos, camarão e carne de gado crua e moída.

***Debaryomyces***: Fermentação fraca. Brotamento multilateral. Pseudomicélio pode estar presente. São também produtoras de esporos. Constituem um dos dois gêneros mais encontrados em produtos lácteos. Crescem em salmoura e em queijos e causam deterioração em suco de laranja concentrado e em iogurte.

***Hanseniaspora***: Leveduras fermentativas. Brotamento bipolar. São anamorfes das *Kloeckera* spp. Ascósporos em forma de chapéu. Podem ser encontradas em uma grande variedade de alimentos, principalmente figos, tomates, morangos, frutas cítricas e na fermentação dos grãos de cacau.

***Issatchenkia***: Leveduras fermentativas. Brotamento multilateral. Produzem pseudomicélios. Formam película em meio líquido. São comuns em grande variedade de alimentos.

***Kluyveromyces***: Fermentativas. Brotamento multilateral. Produzem ascósporos. A *Kluyveromyces marxianus* é uma das duas leveduras mais comuns em produtos lácteos. É encontrada em grande variedade de frutas, sendo responsável pela deterioração de queijos.

***Pichia***: Fermentação variável. Brotamento multilateral, pseudomicélio freqüentes e, às vezes, produzem hifas verdadeiras. Podem formar artrósporos. Ascospores normalmente contêm quatro esporos esféricos, em forma de chapéu, ou semelhante a saturno. Algumas são encontradas em peixes fresco e em camarão. Crescem em salmoura de azeitonas e causam deterioração de pickles e chucrute.

***Rhodotorula***: Não-fermentativas. Brotamento multilateral. Pseudo e verdadeiro micélio possível. Produzem pigmentos rosados ou vermelhos e a maioria possui cor laranja ou rosa-salmão. São anamorfias dos *Basidiomycetes*. Este gênero possui muitas espécies psicrotróficas, podem ser encontradas em carne de frango, camarão, peixes e carne de gado fresca. Algumas crescem na superfície da manteiga.

***Saccharomyces***: Apresentam rápida fermentação. Brotamento multilateral com a possibilidade de formação de pseudomicélio. Ascósporos esféricos ou ovulares. Todas as leveduras do pão, da cerveja, do vinho e do champanha são *S. cerevisiae*. São encontradas em grãos de Kefir e podem ser isoladas de uma grande variedade de alimentos, como salames secos e maturados e muitas frutas.

***Schizosaccharomyces***: Fermentativas e respiratórias. Multiplicação vegetativa por fissão. Presença de micélio e, ou, artrósporos. Formadoras de ascósporos esféricos, ovulares ou reniformes. Osmofílicas e resistentes a alguns conservantes químicos.

***Torulaspota***: Forte fermentação. Brotamento multilateral, sem formação de pseudomicélios. Ascósporos esféricos ou elipsóides. *Torulaspota delbruekii* é a espécie mais comum.

***Trichosporon***: Fermentação fraca ou ausente. Multiplicam-se por brotamento e por formação de arthroconídio. Pseudomicélios e micélio verdadeiro abundantes. Já foram isoladas de camarão fresco, carne de gado moída, frango, ovelha congelada, entre outros alimentos.

***Zygosaccharomyces***: Apresentam forte fermentação. Brotamento multilateral, pseudomicélio possível. Ascósporos em forma de feijão estão livres nos ascospores. Algumas estão envolvidas na fermentação do shoyo e do miso e outras deterioram maionese e molhos para saladas.

### **2.5.1.1 Leveduras em produtos lácticos**

Embora a atividade fermentativa e de deterioração das leveduras seja bem conhecida em muitos alimentos e bebidas, pouco se sabe a respeito da sua ocorrência e significância nos derivados lácteos (FLEET, 1990). Usualmente, são detectadas em grande quantidade, refletindo uma boa adaptação ao substrato rico em proteínas, lipídios, açúcar e ácidos orgânicos. Sua ampla distribuição é consequência da atividade lipolítica e proteolítica, da habilidade em fermentar/assimilar lactose, de utilizar ácidos orgânicos, da capacidade de crescimento em baixas temperaturas e da baixa atividade de água e resistência a compostos de limpeza e sanificação (FLEET, 1990; JAKOBSEN & NARVHUS, 1996; PRAPHAILONG & FLEET, 1997; FADDA et al, 2004).

Nesses produtos, as leveduras podem interagir com outros microrganismos de diferentes formas, inibindo ou eliminando microrganismos indesejáveis, causadores de defeitos ou potencialmente patogênicos; podem agir de forma a inibir as culturas iniciadoras; ou, ainda, contribuir positivamente em processos de fermentação ou maturação, apoiando a função das culturas iniciadoras (JAKOBSEN & NARVHUS, 1996).

Como parte da comunidade microbiana, juntamente com bactérias, leveduras podem contribuir para as características sensoriais do kefir, koumiss e de diferentes variedades de queijo, influenciando a biossíntese de compostos aromáticos (ZOURARI & ANIFANTAKIS, 1988; ROOSTITA & FLEET, 1996a). Por outro lado, leveduras podem causar a deterioração dos derivados lácticos, sendo os defeitos tipicamente observados: produção de gás, alteração no sabor e aroma, descoloração e mudança de textura (FLEET, 1990; JAKOBSEN & NARVHUS, 1996). Um aumento no índice de deterioração é observado quando os produtos são suplementados ou decorados com frutas, mel, açúcar, castanhas, que são fontes de contaminação, além de fornecerem nutrientes para o crescimento e fermentação das leveduras (JAKOBSEN & NARVHUS, 1996).

Leveduras podem estar presentes ao longo da cadeia produtiva do leite, da fazenda até o produto acabado. Como contaminantes naturais, as leveduras estão amplamente distribuídas no ambiente da ordenha, no leite cru e em utensílios

(LOPANDIC et al, 2006). Embora o leite cru e o leite pasteurizado sejam freqüentemente contaminados por leveduras, as populações são geralmente baixas ( $<10^4$  UFC.mL<sup>-1</sup>), quando comparadas com as das bactérias, sugerindo que o rápido crescimento das bactérias restringe o crescimento das leveduras (FLEET, 1990; ROOSTITA & FLEET, 1996).

Tudor e Board (1993) citados por Jakobsen e Narvhus (1996), apontam *Cryptococcus* sp. e, em particular, *Candida diffluens* e *Candida famata* (estádio imperfeito de *Debaryomyces hansenii*) como contaminantes comuns em leites pasteurizados. Fleet e Mian (1987), em uma pesquisa com 26 amostras de leite pasteurizado, descreveram, em ordem decrescente de freqüência, o isolamento de *Candida famata*, *Kluyveromyces marxianus*, *Cryptococcus flavus* e *Candida diffluens*. Em pesquisa realizada com leite pasteurizado, no interior de São Paulo, Gusmão (2005) verificou que, todos os isolados identificados pertenciam ao gênero *Debaryomyces*, sendo 96,77 % dessas *Debaryomyces hansenii* var. *fabryii* e 3,23 % *Debaryomyces hansenii* var. *hansenii*. Já para o leite cru, pouco foi relatado sobre sua diversidade em leveduras. Spanamberg et al (2004) encontraram os gêneros *Kluyveromyces*, *Rhodotorula*, *Candida*, *Geotrichum* e *Triscoporon* em 36 amostras coletadas em diferentes municípios do Rio Grande do Sul. Embora existam diversas fontes de contaminação possíveis para a contaminação do leite cru por leveduras, isso não acontece com o leite pasteurizado, sugerindo que sua freqüência em leite pasteurizado advenha de certo grau de tolerância ao processo de pasteurização (FLEET & MIAN, 1987; VADILLO et al, 1987).

A ocorrência de leveduras em queijos é esperada, devido ao baixo pH, baixa umidade, elevada concentração de sal e estocagem sob refrigeração desses produtos (FLEET, 1990). Entre as espécies encontradas, as mais freqüentes pertencem aos gêneros *Kluyveromyces*, *Debaryomyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis*, *Candida* e *Rhodotorula*, detectadas em diferentes estágios da fabricação e em diferentes tipos de queijos (LARPENT et al, 1991).

Hoje, já é reconhecida a importante contribuição das leveduras no processo de maturação de queijos, em que linhagens de *Debaryomyces hansenii*, *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces marxianus* e *Saccharomyces cerevisie*, freqüentemente estão presentes em concentrações elevadas. As leveduras contribuem para o

desenvolvimento do sabor, aroma e da textura, devido à proteólise, lipólise, utilização do ácido láctico, fermentação da lactose e autólise da sua biomassa (NUÑEZ et al, 1981; FLEET, 2007). *Debaryomyces hansenii* e *Yarrowia lipolytica* têm sido consideradas potenciais agentes de maturação em queijos. Ferreira e Viljoen (2003) propõem o uso destas como adjuntas da cultura iniciadora para a produção do queijo Cheddar.

Borelli et al (2006), ao pesquisarem as leveduras associadas à produção do queijo Canastra, identificaram *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis*, *Kodamea ohmeri* e *Torulaspota delbruekii* como as espécies mais frequentes no fermento endógeno, na massa coagulada e no queijo. Os autores ressaltam a notável ocorrência de *Kodamea ohmeri*, visto que é a primeira vez que tal espécie é reportada, associada à fabricação de queijos.

Nahabieh e Schmidt (1990) contribuíram para o estudo da microbiota leveduriforme em queijos artesanais franceses, fabricados com leite caprino. Esses autores isolaram 879 linhagens de leveduras dos queijos Bougon, Sainte-Maure, Chabichou, Crottin de Chavignol, Pouligny Saint-Pierre e Chevrotin e concluíram que a microbiota leveduriforme dos queijos de cabra é dominada por *Debaryomyces hansenii* e *Saccharomyces cerevisiae*, seguidos por *Kluyveromyces marxianus*. Porém, na maioria dos queijos estudados, uma parte importante da microbiota foi bem representada por espécies pouco encontradas nos queijos de leite de vaca, a exemplo de *Candida lipolytica* e *Candida intermedia*, evidenciando certa originalidade da microbiota dos queijos de cabra em relação àqueles fabricados com leite de vaca.

Leveduras são as maiores causas de contaminação em iogurte. Quando produzido sob boas condições, seguindo as boas práticas de fabricação, o produto não deve conter mais que  $10 \text{ UFC.g}^{-1}$ . A deterioração de iogurtes por leveduras é geralmente reconhecida por mudanças no sabor, aroma e na perda de textura, devido à produção de gás e à dilatação da embalagem. A presença desses microrganismos está associada à falta de higiene durante o processamento (FLEET, 1990). Moreira (1998), ao avaliar 72 amostras de iogurtes comercializados em Minas Gerais, identificou 11 espécies de leveduras, sendo *Debaryomyces hansenii* e *Saccharomyces cerevisiae* as mais frequentes.

Outros produtos fermentados, que têm parte de suas características derivada da atividade das leveduras, incluem kefir, koumiss e laben. São produzidos pela fermentação do leite por BAL, leveduras e outras bactérias, como as acéticas (FLEET, 1990). No caso do kefir, grãos compostos de polissacarídeos microbianos que apresentam estrutura complexa, onde as leveduras se localizam tanto interna quanto externamente, a variação da microbiota leveduriforme é resultante das diferentes origens do grão, porém as espécies *Kluyveromyces marxianus*, *Candida kefir*, *Candida pseudotropicalis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces exiguus* e *Torulopsis holmii* tem sido reportadas (ZOURARI & ANIFANTAKIS, 1988; FLEET, 1990).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

- ✓ Determinar os parâmetros físico-químicos e caracterizar a microbiota endógena do fermento utilizado na fabricação do queijo artesanal da microrregião de Medeiros, na Serra da Canastra, com ênfase em leveduras, nos períodos da água e da seca.

#### 3.2 Específicos

- ✓ Determinar pH, acidez titulável em ácido lático e cloreto de sódio do fermento endógeno.
- ✓ Determinar a contagem total de microrganismos mesófilos aeróbios, coliformes totais, *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Listeria* sp. e *Staphylococcus aureus*.
- ✓ Quantificar e isolar os principais grupos: *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* e leveduriformes.
- ✓ Caracterizar e identificar as espécies leveduriformes predominantes no fermento endógeno.

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1 Coleta das amostras**

Alíquotas contendo 100 mL do fermento endógeno, utilizado em oito unidades produtoras do queijo Canastra, foram coletadas assepticamente nas respectivas propriedades situadas na cidade de Medeiros, MG. As mesmas propriedades foram amostradas no período da seca (período de abril a setembro) e no período das águas (período de outubro a março) do ano de 2006. Após cada coleta, o material foi transportado sob refrigeração em caixas isotérmicas para os laboratórios do Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA) da Universidade Federal de Viçosa (UFV) onde foi utilizado para determinações físico-químicas e microbiológicas.

### **4.2 Análises físico-químicas**

Foram realizadas no Laboratório de Análises Físico-químicas de Leite e Derivados do DTA/UFV.

#### **4.2.1 Determinação da acidez titulável e do pH**

A acidez titulável foi determinada segundo o método oficial para a referida análise (BRASIL, 2006). Para a determinação do pH, uma alíquota de aproximadamente 40 mL do fermento endógeno foi transferida para um becker, ao qual foi inserido o eletrodo do medidor de pH digital (Tecnal modelo pH Meter-102), obtendo-se leitura direta.

#### **4.2.2 Determinação do cloreto de sódio**

O teor de cloreto de sódio (NaCl) foi determinado pelo método titrimétrico, segundo Pereira (2001).

### **4.3 Análises microbiológicas**

Foram realizadas no Laboratório de Culturas Láticas da UFV. Alíquotas de 10 mL das amostras de cada unidade produtora foram transferidas para 90 mL de

solução tampão fosfato estéril e homogeneizadas. Diluições decimais foram preparadas e plaqueadas em duplicata em diferentes meios.

#### **4.3.1 Contagem total e contagem de microrganismos indicadores**

- Contagem total de mesófilos aeróbios (APHA, 1992).
- Coliformes a 30 °C e *Escherichia coli* (*E. coli*): Método Rápido Petrifilm da 3M (AOAC 991.14 - Contagem de Coliformes e *E. coli* em alimentos, película reidratável seca).
- *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*): Método Rápido Petrifilm da 3M (AOAC 981.15 - Rapid *S. aureus* (RSA) Count Plate).
- *Salmonella* sp.: Test Reveal - *Salmonella* Test System (AOAC 960801).
- *Listeria* sp.: Test Reveal - *Listeria* Test System (AOAC 960701).

#### **4.3.2 Contagem da microbiota láctica e leveduriforme**

- *Lactobacillus* em MRS (De Man, Rogosa & Sharpe) (DE MAN et al, 1960) modificado com a adição de etanol (WITTHUHN et al, 2004).
- *Lactococcus* e *Streptococcus* em M17 (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) (ERCOLINI et al, 2003).
- *Leuconostoc* em MRS (DE MAN et al, 1960) modificado pela adição de vancomicina (WITTHUHN et al, 2004).
- *Enterococcus* em KF (Kenner fecal) (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra).
- Leveduras em PDA (Potato dextrose agar) (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra), acidificado com ácido tartárico a 10 % (pH 3,5) e adicionado de cloranfenicol (FADDA et al, 2004).

#### **4.4 Isolamento e caracterização da microbiota láctica**

A partir das placas com os respectivos meios para cada grupo avaliado, foram selecionadas colônias típicas em número correspondente à raiz quadrada da contagem obtida, de acordo com recomendação do Bacteriological Analytical Manual for Foods (FDA, 1972).

As estirpes de BAL isoladas foram submetidas ao teste morfológico e tintorial de Gram e ao teste de catalase. Os isolados que se apresentaram catalase negativos, Gram positivos, em forma de coco ou bacilo, foram repicados em LDR 10 % (leite desnatado reconstituído a 10 %), adicionados de 30 % de glicerol e armazenados à temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$ , para posterior caracterização e identificação.

#### **4.5 Isolamento, caracterização e identificação das leveduras**

As leveduras foram isoladas a partir das placas, em meio de cultura PDA, em número igual ao da raiz quadrada da contagem, segundo recomendação do Bacteriological Analytical Manual for Foods (FDA, 1972). As colônias selecionadas foram inoculadas em tubos (15 mm x 100 mm) contendo PDA inclinado estéril e incubadas a  $28^{\circ}\text{C}$ , por 48 h. Posteriormente, todos os isolados foram reespalhados em placas contendo PDA, caracterizados quanto às suas características macroscópicas e observados ao microscópio para verificação da sua morfologia e pureza.

No estudo taxonômico dos isolados leveduriformes, realizaram-se os testes de assimilação e fermentação propostos por Griffiths (1981). Os isolados foram submetidos aos testes de fermentação de sacarose, glicose, galactose e lactose. Para assimilação de fontes de carbono, foram crescidos na presença de maltose, galactose, lactose, eritritol, amido solúvel, ribitol, sacarose, inositol, celobiose, rafinose, nitrato, manitol, melibiose e xilose. Ainda, foram testados quanto à capacidade de crescerem em meio contendo 50 % de glicose, 10 % de NaCl e em temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$ . A identificação dos isolados foi realizada segundo as chaves descritas por Lodder (1970).

Os mesmos isolados foram caracterizados usando o *kit* API<sup>®</sup> 20 C AUX (BioMerieux<sup>®</sup> SA, Marcy-l'Étoile/França), seguindo as recomendações do fabricante. O *kit* API<sup>®</sup> 20 C AUX consiste em 19 cúpulas plásticas, contendo em cada uma delas diferente fonte de carbono, além de uma cúpula controle (negativo) (Figura 8). As cúpulas foram inoculadas com as leveduras suspensas em um meio mínimo e incubadas a  $29^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 2^{\circ}\text{C}$ ). A leitura dos resultados foi realizada após 48 h e 72 h, comparando-se o crescimento nas 19 cúpulas a cúpula controle. Realizaram-se teste morfológico para determinação da presença de hifa ou pseudo-hifa. Este teste constitui o vigésimo primeiro teste proposto pelo método. A identificação foi

obtida a partir do perfil numérico resultante do somatório dos resultados positivos processados em um programa de identificação (Apiweb™). A base de dados do API® 20 C AUX inclui 45 espécies.

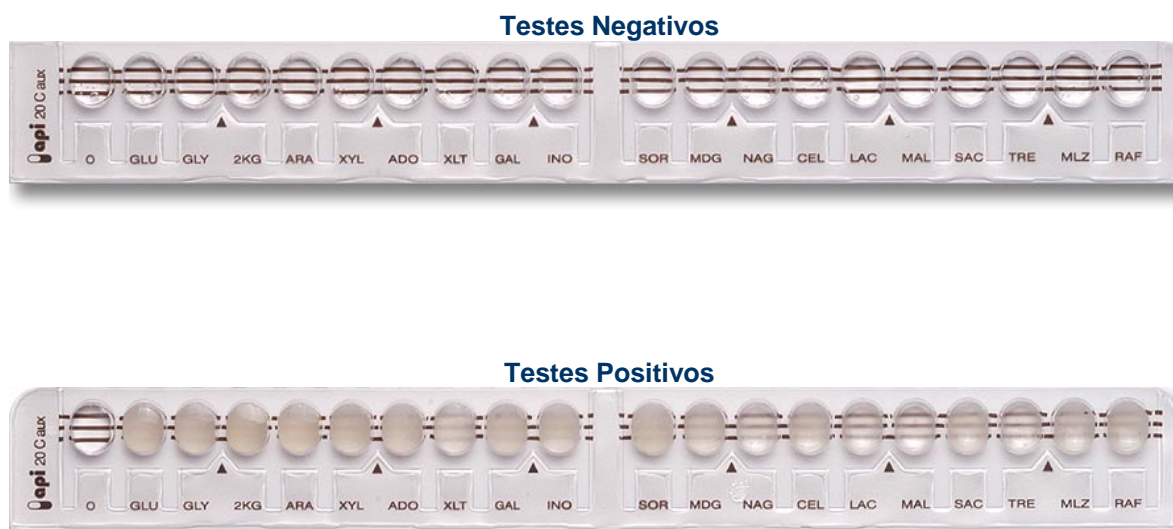


Figura 8. Cúpulas para testes de assimilação do kit API® 20 C AUX

#### 4.5.1 Meios de cultura utilizados na identificação

Meio basal para assimilação e fermentação de fontes de carbono (WICKERHAM, 1951).

Extrato de levedura	4,50 g
Peptona	7,50 g
Água destilada	1000 mL

Meio YEPD caldo com 50 % de glicose para teste de tolerância osmótica (BARNETT et al, 1983)

Extrato de levedura	10,00 g
---------------------	---------

Peptona	10,00 g
Dextrose	500,00 g
Água destilada	1000 mL

Meio YEPD caldo com 10 % de NaCl para teste de tolerância osmótica (KREGGER-VAN RIJ, 1984)

Extrato de levedura	10,00 g
Peptona	10,00 g
Dextrose	20,00 g
NaCl	100,00 g
Água destilada	1000 mL

Meio ágar amido para teste de hidrólise de amido (MENDONÇA, 2000)

Extrato de carne	3,00 g
Peptona	5,00 g
Amido	2,00 g
Ágar	15,00 g
Água destilada	1000 mL

Meio GPY para crescimento a temperatura de 37 °C ( KREGGER-VAN RIJ, 1984)

Glicose	20,00 g
Peptona	10,00 g
Extrato de levedura	5,00 g
Água destilada	1000 mL

Meio mínimo para esgotamento das reservas de açúcares (MENDONÇA, 2000)

Extrato de levedura	10,00 g
Peptona	20,00 g
Água destilada	1000 mL

## 4.5.2 Avaliações bioquímicas e físicas

### 4.5.2.1 Assimilação e fermentação de fontes de carbono

Para esses testes, os isolados foram crescidos em meio mínimo para o esgotamento das suas reservas nutritivas. Uma alíquota de 0,1 mL foi inoculada em tubos contendo o meio basal mais a fonte de carbono a ser testada, na proporção de 2 % (exceto para rafinose, para a qual se utilizou 4 %).

Nos testes de fermentação, utilizou-se o mesmo critério, porém foram acrescentados tubos de Durham. Nos testes de assimilação, tubos-testemunha foram preparados contendo meio basal e glicose (controle positivo) e apenas o meio basal (controle negativo) (Figura 9).

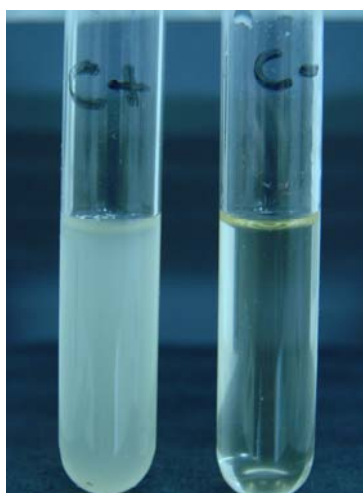
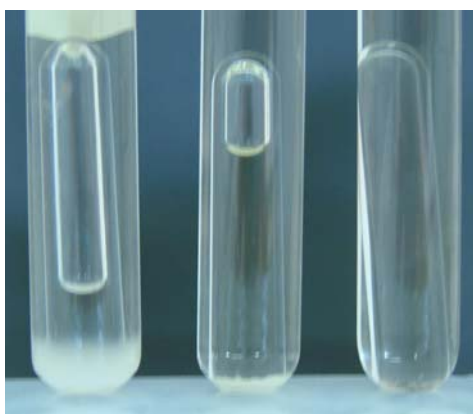


Figura 9. Controle positivo e negativo para o teste de assimilação.

Após inoculação, os isolados foram incubados à temperatura de 28 °C, por até 10 dias. A assimilação de cada uma das fontes de carbono testadas foi verificada,

comparando-se cada tubo testado com os respectivos tubos testemunhas, considerando-o positivo quando observada formação de massa celular ou turvação do meio, quando comparado ao controle negativo.

Para os testes de fermentação, observou-se a formação ou não de gás no interior dos tubos de Durham. Considerou-se resultado positivo as amostras com produção de gás em, pelo menos, 1/3 do volume do tubo de Durham (Figura 10)



+

+

-

Figura 10. Potencial fermentativo.

#### **4.5.2.2 Crescimento à temperatura de 37 °C**

Utilizando-se o meio GPY, alíquotas de 3,0 mL foram transferidas para tubos e inoculadas com o auxílio de uma alça de platina. Após 48 h a 72 h de incubação, os tubos que apresentaram massa celular ou turvação do meio, foram considerados positivos.

#### **4.5.2.3 Tolerância osmótica**

Tubos contendo 3,0 mL do meio YEPD – 50 % de glicose e YEPD – 10 % de NaCl foram inoculados com os isolados a serem testados e incubados a 28 °C , sendo as leituras realizadas após 48 h e 72 h de incubação. Os tubos que apresentaram massa celular ou turvação do meio foram considerados positivos.

#### **4.5.2.4 Redução de nitrato**

Alíquotas de 5,0 mL do meio basal, acrescidas com 0,78 g.L<sup>-1</sup> de nitrato de potássio, foram inoculadas com os isolados a serem testados e incubados a 28 °C. Após sete dias, inoculou-se um segundo tubo contendo o mesmo meio com 0,1 mL do tubo anterior, reincubando-se nas mesmas condições. O surgimento de turvação após sete dias foi interpretado como resultado positivo.

#### **4.5.2.5 Hidrólise de amido**

Os isolados foram inoculados em placas de petri com ágar amido, com o auxílio de uma alça de platina. Após incubação a 28 °C, por 48 h, adicionou-se solução de lugol sobre as colônias. O surgimento de um halo claro ao redor das colônias foi interpretado como resultado positivo.

#### **4.6 Análises estatísticas**

Foi realizada a análise de variância, considerando-se o delineamento experimental em blocos casualizados com oito repetições (unidades produtoras) em que se verificou o efeito do período de coleta (tratamentos) do fermento endógeno sobre as variáveis estudadas. Foram realizados o teste F, a 5 % de significância para os parâmetros físico-químicos e o teste Kruskal-Wallis, a 5 % para os parâmetros microbiológicos.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Análises Físico-químicas

Os resultados referentes às concentrações de NaCl, acidez titulável e ao pH das amostras de fermento endógeno coletados nas 8 propriedades amostradas, no período das águas (PA) e no período da seca (PS), são mostrados na tabela 5.

Tabela 5. Parâmetros físico-químicos do fermento endógeno coletado no município de Medeiros, região da Serra da Canastra/MG, nos períodos das águas (PA) e da seca (PS).

Unidades Produtoras	Acidez em Ácido Láctico (%)		pH		NaCl (%)	
	PA	PS	PA	PS	PA	PS
1	0,65	0,63	5,10	5,06	6,50	5,40
2	0,50	0,47	4,66	5,39	7,69	6,13
3	0,69	1,03	4,66	5,04	4,14	2,00
4	0,71	0,61	5,07	5,28	8,87	8,90
5	0,45	0,80	5,38	5,15	11,24	2,60
6	0,45	0,60	5,40	5,12	7,69	4,10
7	0,60	0,59	4,81	4,70	5,32	1,70
8	0,50	0,57	5,10	5,79	7,69	2,25
<b>Médias</b>	<b>0,56a</b>	<b>0,66a</b>	<b>5,02a</b>	<b>5,07a</b>	<b>7,39a</b>	<b>4,13b</b>

Médias para cada parâmetro, seguidas da mesma letra, não diferem entre si, pelo teste F a 5% de probabilidade ( $P < 0,05$ ).

Observa-se na Tabela 5 que os resultados de acidez e pH não apresentaram diferenças significativas entre os dois períodos avaliados. Os valores de acidez encontrados no PA variaram entre 0,45 % e 0,71 % e, no PS, entre 0,47 % e 1,03 %. Os resultados de pH, no PA, variaram entre 4,66 e 5,40 e no PS entre 4,70 e 5,79.

O fermento endógeno utilizado na fabricação do queijo Canastra permanece a temperatura ambiente até o momento da sua utilização. Essa prática, aliada a moderada temperatura encontrada na região, resultaram em valores médios de pH e acidez, que permitem o crescimento de uma gama de microrganismos, como BAL ,

BAL não-iniciadoras, mofos, leveduras e algumas bactérias patogênicas, a exemplo de *S. aureus* e *E. coli* (BETTS et al, 1998; GOBBETTI et al, 1999; JAY, 2005).

Fermentos naturais, fabricados a partir do soro, utilizados na Itália (PARENTE et al, 1997) e Argentina (REINHEIMER et al, 1994, 1996), são incubados até o momento da sua utilização e atingem baixos valores de pH e elevada acidez. No fermento endógeno obtido a partir do soro, utilizado na região de Santa Fé, Argentina, Reinheimer et al (1994), observaram altos níveis de acidez (1,2 % a 1,4 %) e valor médio do pH de 3,3. Os autores encontraram BAL termofílicas, cujas espécies dominantes foram *Lactobacillus helveticus* (*Lb. helveticus*) e *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* e leveduras, como únicos contaminantes naturais. Todos estes microrganismos apresentam boa tolerância a baixos valores de pH.

O teor de NaCl foi o único parâmetro físico-químico a apresentar diferença significativa entre os dois períodos amostrados. As concentrações de NaCl no PA foram mais elevadas ( $P < 0,05$ ) e variaram de 4,14 % a 11,24 %, enquanto no PS, variaram de 1,70 % a 8,90 %. Das oito unidades produtoras avaliadas, sete aumentaram a concentração de NaCl no PA e uma manteve o mesmo percentual. O teor de NaCl contribui de maneira expressiva para a modulação dos grupos microbianos. Sabe-se, por exemplo, que patógenos como *S. aureus* e *L. monocytogenes* apresentam alta tolerância ao sal e que as bactérias do ácido láctico, em geral, são pouco tolerantes.

A concentração de NaCl no fermento endógeno pode contribuir para modulação da microbiota presente e, conseqüentemente, da microbiota do queijo produzido com este fermento. A variação no teor de NaCl utilizado entre os diferentes produtores do queijo Minas artesanal, assim como nos diferentes períodos do ano, pode originar produtos com características distintas, mesmo quando produzidos na mesma região e em condições semelhantes. Pimentel Filho et al (2005), ao analisarem o fermento endógeno utilizado na fabricação do queijo artesanal da região do Alto Paranaíba, encontraram amplitude de variação no teor de NaCl ainda maior que a do presente trabalho, onde as concentrações variaram de 3,55 % a 22,38 %, em 15 amostras analisadas.

O conhecimento empírico dos produtores de queijo Minas artesanal assinala o PA como o período do ano em que ocorre com maior frequência a contaminação

dos queijos, caracterizado principalmente pelo estufamento precoce. Provavelmente, por essa razão, nesse período do ano adiciona-se maior quantidade de NaCl ao produto, na tentativa de inibir os causadores dessa contaminação.

A concentração de NaCl e o pH tem efeito sinérgico em relação ao crescimento dos microrganismos (BETTS et al, 1998; JAY, 2005). Especial importância deve ser dispensada a esses dois parâmetros, uma vez que podem ser os principais moduladores da microbiota presente no fermento endógeno utilizado na Serra da Canastra.

A falta de padronização ao longo do processamento dos queijos Minas artesanal exige maior atenção por parte das entidades e associações ligadas a este segmento. Variações no processamento refletirão nas características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais, dificultando o estabelecimento de descritores para estes produtos. Somente através do estabelecimento de descritores e, conseqüente caracterização dos queijos artesanais tradicionais mineiros, sua produção poderá ser fortalecida e preservada.

## **5.2 Contagem total e de microrganismos indicadores**

Na Tabela são mostrados os resultados da contagem total de mesófilos aeróbios e de microrganismos indicadores, avaliados nos fermentos endógenos provenientes do município de Medeiros, região da Serra da Canastra, MG, no PA e PS.

Tabela 6. Parâmetros microbiológicos do fermento endógeno coletado no município de Medeiros, região da Serra da Canastra/MG, nos períodos das águas (PA) e da seca (PS).

Unidades Produtoras	Mesófilos aeróbios*		Coliformes a 30°C*		<i>E. coli</i> *		<i>S. aureus</i> *	
	PA	PS	PA	PS	PA	PS	PA	PS
1	5,92	7,17	2,72	4,41	1,00	<1,00	1,77	1,60
2	5,85	7,27	1,47	<1,00	1,30	<1,00	2,14	2,23
3	6,11	7,99	4,20	3,61	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00
4	5,96	7,86	2,44	2,00	1,47	1,00	1,69	2,14
5	5,20	7,20	2,50	2,00	<1,00	2,00	2,07	1,84
6	4,14	7,73	1,60	2,30	1,30	2,30	1,00	2,75
7	6,39	7,80	3,04	2,77	<1,00	2,47	2,83	1,00
8	7,39	6,55	4,30	2,30	2,47	2,30	3,11	1,00
<b>Medianas</b>	<b>5,94a</b>	<b>7,50b</b>	<b>2,30a</b>	<b>2,61a</b>	<b>1,50a</b>	<b>1,50a</b>	<b>1,92a</b>	<b>1,72a</b>

Letras diferentes entre as colunas, para uma mesma característica, indicam que existem diferenças entre as amostras pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade (P<0,05).

\* Resultados em Log UFC. mL<sup>-1</sup>

Foram observadas no PA contagens de mesófilos aeróbios de  $1,4 \times 10^4$  UFC. mL<sup>-1</sup> a  $2,5 \times 10^7$  UFC. mL<sup>-1</sup> e, no PS, as contagens de  $3,6 \times 10^6$  UFC. mL<sup>-1</sup> a  $9,9 \times 10^7$  UFC. mL<sup>-1</sup>. Os resultados indicam variações de três ciclos logaritmos no PA e de um no PS. A contagem total de mesófilos aeróbios foi significativamente menor no PA, época na qual, como discutido no item anterior, os produtores adicionam uma maior quantidade de NaCl ao queijo, na tentativa de inibir as possíveis contaminações, mais frequentes nesse período do ano. Esse maior percentual de sal adicionado favoreceu a inibição da microbiota mais sensível, gerando, por consequência, a diminuição da contagem total de mesófilos.

Borelli (2006), ao avaliar o fermento endógeno da mesma região, encontrou em três propriedades pesquisadas os valores  $>1,0 \times 10^7$  UFC. mL<sup>-1</sup>,  $1,9 \times 10^5$  UFC. mL<sup>-1</sup> e  $8,6 \times 10^6$  UFC. mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Esses valores são semelhantes à média encontrada neste trabalho no período das águas; porém o autor não especificou o período em que realizou tais avaliações.

O grupo coliformes a 30<sup>0</sup> C e *E. coli* foi encontrado em praticamente todas as amostras analisadas em ambos os períodos avaliados. A determinação da concentração dos coliformes assume importância como parâmetro indicador da possibilidade de existência de microrganismos patogênicos. Essas contagens variaram de  $3,0 \times 10^1$  UFC. mL<sup>-1</sup> a  $2,0 \times 10^4$  UFC. mL<sup>-1</sup> e de  $< 1,0 \times 10^1$  UFC. mL<sup>-1</sup> a  $4,1 \times 10^3$  UFC. mL<sup>-1</sup>, no PA e no PS, respectivamente. Já para *E. coli*, os valores variaram de  $< 1,0 \times 10^1$  UFC. mL<sup>-1</sup> a  $3,0 \times 10^2$  UFC. mL<sup>-1</sup> em ambos os períodos.

Os resultados de coliformes a 30<sup>0</sup> C e de *E.coli*, em ambos os períodos avaliados, foram inferiores às médias encontradas por Borelli (2002) ao avaliar esses parâmetros em 10 propriedades na mesma região, no período das águas. É possível que a diminuição nas contagens seja reflexo das ações que vêm sendo desenvolvidas para melhoria da qualidade do queijo artesanal, iniciadas com a promulgação da Lei Estadual nº 14.185, de 31 de janeiro de 2002, específica para os queijos artesanais.

Resultados semelhantes ao deste trabalho foram encontrados no fermento endógeno utilizado para a fabricação do queijo Minas artesanal do Alto Paranaíba (Pimental Filho et al, 2005). Os autores detectaram para coliformes totais e *E. coli* contagens de até  $6,3 \times 10^2$  UFC. mL<sup>-1</sup> e  $1,0 \times 10^1$  UFC. mL<sup>-1</sup>, respectivamente, em 87 % das amostras analisadas.

As contagens de *S. aureus* foram numericamente superiores no PA, período em que, as concentrações de NaCl, em média estiveram maiores. Os resultados variaram de  $< 1,0 \times 10^1$  UFC. mL<sup>-1</sup> a  $1,3 \times 10^3$  UFC. mL<sup>-1</sup> e de  $< 1,0 \times 10^1$  UFC. mL<sup>-1</sup> a  $5,7 \times 10^2$  UFC. mL<sup>-1</sup>, no PA e no PS, respectivamente. O fermento endógeno do Alto Paranaíba apresentou concentrações na mesma faixa observada nesta avaliação (PIMENTAL FILHO et al, 2005). Porém, em pesquisa realizada por Borelli (2002), na região da Serra da Canastra, no PA, os valores detectados para *S. aureus* foram superiores ao do presente estudo, em ambos os períodos avaliados.

A legislação vigente para queijos artesanais preconiza a ausência de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* sp. em 25 g do produto. Apesar da falta de legislação para o fermento endógeno, esses dois microrganismos foram determinados e, a exceção do produtor 7, no PA, onde foi detectada a presença de *Salmonella* sp., todos os demais produtores apresentaram ausência para esses dois parâmetros. Embora o fermento endógeno do produtor 7, no PA, tenha indicado a presença de *Salmonella* sp., este microrganismo não estava presente no queijo fabricado a partir deste fermento, em análise realizada no produto com oito dias de maturação (dados não mostrados).

Borelli (2006), estudando a produção de substâncias antagonistas em BAL isoladas do queijo Canastra, constatou que vários desses isolados foram capazes de produzir substâncias antagonistas contra *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipo Typhimurium. Este fato infere importância à pesquisa com queijos artesanais mineiros, como uma promissora fonte de novas estirpes de interesse industrial, com capacidade antagonista frente à patógenos.

### **5.3 Contagem da microbiota láctica e leveduriforme**

Na Tabela 7 são mostrados os resultados das contagens dos grupos lácticos e leveduriformes avaliados no PA e PS, no município de Medeiros, região da Serra da Canastra, MG.

Tabela 7. Valores da contagem da microbiota láctica e leveduriforme do fermento endógeno coletado no município de Medeiros, região da Serra da Canastra/MG, nos períodos das águas (PA) e da seca (PS).

Unidades Produtoras	<i>Lactococcus/ Streptococcus*</i>		<i>Enterococcus*</i>		<i>Lactobacillus*</i>		<i>Leuconostoc*</i>		<i>Leveduras*</i>	
	PA	OS	PA	PS	PA	PS	PA	PS	PA	PS
1	6,32	7,00	5,65	5,94	5,44	6,20	6,04	6,27	2,41	5,89
2	6,86	5,66	5,90	5,14	4,91	8,72	5,41	6,77	2,66	2,47
3	7,49	7,04	5,17	4,54	5,98	5,11	5,83	5,27	5,75	2,54
4	7,07	6,47	7,11	4,92	6,04	6,38	6,95	5,27	5,75	4,60
5	7,23	4,97	6,89	< 4,00	5,79	4,44	6,76	4,49	6,14	2,17
6	6,25	7,34	6,07	6,69	5,07	7,38	4,44	7,27	2,68	5,14
7	7,14	6,99	7,17	< 4,00	6,34	6,76	5,97	7,56	5,90	6,59
8	7,07	8,14	6,92	6,51	5,61	6,41	6,23	6,75	4,73	3,72
<b>Medianas</b>	<b>7,07a</b>	<b>6,99a</b>	<b>6,48a</b>	<b>5,54a</b>	<b>5,70a</b>	<b>6,39a</b>	<b>6,00a</b>	<b>6,51a</b>	<b>5,24a</b>	<b>4,16a</b>

Letras diferentes entre as colunas, para uma mesma característica, indicam que existem diferenças entre as amostras pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade (P<0,05).

\* Resultados em Log UFC. mL<sup>-1</sup>.

Foram observadas altas contagens de BAL, ficando evidenciado que esse grupo compõe a microbiota dominante do fermento endógeno da Serra da Canastra. As contagens dos grupos de BAL avaliados foram estatisticamente iguais ( $P > 0,05$ ), nos dois períodos analisados. No entanto, as contagens de *Lactococcus/Streptococcus* e *Enterococcus* apresentaram valores numericamente superiores no PA. Do mesmo modo, os gêneros *Lactobacillus* e *Leuconostoc* foram numericamente superiores no PS. Borelli (2006), ao analisar o fermento endógeno da mesma região, encontrou elevadas populações de BAL, tendo como espécies mais frequentes *Lactobacillus plantarum* (*Lb. plantarum*) e *Lb. casei*.

Para leveduras, as contagens foram semelhantes ( $P > 0,05$ ) em ambos os períodos avaliados, embora no PA tenham apresentado valores numericamente superiores. Os resultados variaram de  $2,6 \times 10^2$  UFC. mL<sup>-1</sup> a  $1,4 \times 10^6$  UFC. mL<sup>-1</sup> no período das águas e de  $1,5 \times 10^2$  UFC. mL<sup>-1</sup> a  $3,9 \times 10^6$  UFC. mL<sup>-1</sup> no período da seca. Borelli (2006), ao analisar o fermento endógeno em três propriedades da Serra da Canastra, detectou leveduras na faixa de  $6,7 \times 10^3$  UFC. mL<sup>-1</sup> a  $2,3 \times 10^4$  UFC. mL<sup>-1</sup>.

No PA, os resultados da contagem de levedura foram um ciclo logaritmo maior que no PS, talvez devido ao aumento da concentração de sal, detectado no PA, visto que, leveduras apresentam boa tolerância a sal.

#### **5.4 Isolamento e caracterização preliminar da microbiota láctica e leveduriforme**

O número de isolados e a morfologia da microbiota láctica e leveduriforme isolados do fermento endógeno, em meios de cultura específicos, estão indicados na Tabela 8.

Dos 605 isolados em meios seletivos para isolamento de BAL, 400 sobreviveram a purificação e as condições de laboratório e foram submetidos a uma caracterização preliminar. Desses, 77,75 % corresponderam à morfologia de cocos e 22,25 % à morfologia de cocobacilos / bacilos. Todos apresentaram características Gram positivas e apenas cinco isolados no meio M17 foram positivos para teste de catalase. Os 118 isolados no meio PDA foram submetidos à caracterização e identificação por intermédio da metodologia tradicional (MT) e pelo kit API<sup>®</sup> 20 C AUX (API).

Tabela 8. Quantitativos e morfologias das estirpes isoladas a partir do fermento endógeno originado do município de Medeiros, região da Serra da Canastra/MG

Meios Utilizados no Isolamento / Grupo isolado	Morfologias					Total de Isolados
	Cocos	Bacilos/ Cocobacilos	Leveduras	Mais de uma Morfologia	Sem Crescimento*	
KF ( <i>Enterococcus</i> )	97	-	-	38	05	140
MRSE <sup>1</sup> ( <i>Lactobacillus</i> )	09	89	-	47	07	152
MRSV <sup>2</sup> ( <i>Leuconostoc</i> )	90	-	-	30	20	140
M17 ( <i>Lactococcus</i> / <i>Streptococcus</i> )	115	-	-	51	07	173
<b>PDA</b> (Leveduras)	-	-	<b>118</b>	-	<b>03</b>	<b>121</b>
Totais	311	89	118	166	42	726

\* Sem crescimento nas ativações precedentes a coloração de Gram.

<sup>1</sup> MRS modificado pela adição de etanol.

<sup>2</sup> MRS modificado pela adição de vancomicina.

## 5.5 Caracterização e identificação da microbiota leveduriforme

### 5.5.1 Metodologia Tradicional (MT)

Utilizando a MT, foram identificados 115 dos 118 isolados. Destes, 29 *Debaryomyces hansenii* (*D. hansenii*), 34 *Kluyveromyces lactis* (*K. lactis*), 5 *Candida kefir* (*C. kefir*), 38 *Torulaspora delbrueckii* (*T. delbrueckii*), 02 *Candida zeylanoides* (*C. zeylanoides*) e 7 *Kodamaea ohmeri* (*K. ohmeri*). As características bioquímicas e morfológicas desses isolados estão demonstradas na Tabela 9.

Tabela 9. Características de fermentação, assimilação e morfológicas apresentadas pelas leveduras presentes no fermento endógeno originado do município de Medeiros, região da Serra da Canastra/MG

<i>Debaryomyces hansenii</i>										
	A1-1	A1-2	A1-3	A1-4	A1-5	A2-1	A2-2	A2-3	A2-4	A2-5
Fermentação de:										
Sacarose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Galactose	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Glicose	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Assimilação de:										
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Eritritol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Amido	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ribitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sacarose	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Celobiose	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Rafinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melibiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Xilose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Crescimento a 37 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Crescimento em 50 % de glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Crescimento em 10 % de NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pigmento	C	C	C	C	C	L	L	L	L	C
Pseudo micélio	A	A	A	P	A	A	A	A	A	A

C= creme; L= alaranjado; A= ausente.

Continua...

<i>Debaryomyces hansenii</i>										
	A2-6	A2-7	A2-8	A2-9	A2-10	A2-11	A2-12	A2-13	A2-14	A2-15
Fermentação de:										
Sacarose	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Galactose	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Glicose	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Assimilação de:										
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
Nitrato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Eritritol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Amido	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ribitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sacarose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Celobiose	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
Rafinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melibiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Xilose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Crescimento a 37 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Crescimento em 50 % de glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Crescimento em 10 % de NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pigmento	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Pseudo micélio	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A

C= creme; A= ausente.

Continua...

*Debaryomyces hansenii*

	A2-16	A2-17	A2-18	A2-19	A2-20	A2-21	A8-4	A8-5	S3-1
Fermentação de:									
Sacarose	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Galactose	+	-	-	-	+	+	-	-	-
Glicose	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Assimilação de:									
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	-	-	-	-	-	-	-	+
Nitrato	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Eritritol	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Amido	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ribitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sacarose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Celobiose	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Rafinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melibiose	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Xilose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Crescimento a 37 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Crescimento em 50 % de glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Crescimento em 10 % de NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pigmento	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Pseudo micélio	A	A	A	A	A	A	A	A	A

C= creme; A= ausente.

Continua...

*Kluyveromyces lactis*

	A3-1	A3-3	A3-4	A3-5	A3-6	A3-7	A7-1	A7-2	A7-3	A7-4
Fermentação de:										
Sacarose	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+
Galactose	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+
Glicose	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Assimilação de:										
Maltose	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+
Galactose	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitrato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eritritol	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Amido	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ribitol	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Sacarose	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Celobiose	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
Rafinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Manitol	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xilose	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Crescimento a 37 °C	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+
Crescimento em 50 % de glicose	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+
Crescimento em 10 % de NaCl	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+
Pigmento	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Pseudo micélio	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A

C= creme; A= ausente.

Continua...

*Kluyveromyces lactis*

	A7-6	A7-8	A7-9	S1-1	S1-2	S1-3	S1-4	S1-5	S2-1	S2-4
Fermentação de:										
Sacarose	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-
Galactose	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Glicose	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Assimilação de:										
Maltose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitrato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eritritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amido	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ribitol	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Sacarose	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Celobiose	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+
Rafinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Manitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xilose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Crescimento a 37 °C	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+
Crescimento em 50 % de glicose	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
Crescimento em 10 % de NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pigmento	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Pseudo micélio	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A

C= creme; A= ausente.

Continua...

<i>Kluyveromyces lactis</i>										
	S2-7	S2-10	S3-2	S3-3	S4-2	S5-3	S6-5	S7-3	S7-5	S7-6
Fermentação de:										
Sacarose	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+
Galactose	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Glicose	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Assimilação de:										
Maltose	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Nitrato	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Eritritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amido	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ribitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sacarose	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Celobiose	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rafinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Manitol	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xilose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Crescimento a 37 °C	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+
Crescimento em 50 % de glicose	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+
Crescimento em 10 % de NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pigmento	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Pseudo micélio	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A

C= creme; A= ausente.

Continua...

	<i>Kluyveromyces lactis</i>				<i>Candida kefir</i>				
	S7-8	S8-1	S8-2	S8-3	A3-2	S2-6	S4-1	S4-3	S7-9
Fermentação de:									
Sacarose	+	+	+	+	-	+	-	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicose	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Assimilação de:									
Maltose	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitrato	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eritritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amido	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ribitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sacarose	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Celobiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rafinose	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Manitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xilose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Crescimento a 37 °C	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Crescimento em 50 % de glicose	-	+	+	+	-	-	-	-	-
Crescimento em 10 % de NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pigmento	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Pseudo micélio	A	A	A	A	A	A	A	A	A

C= creme; A= ausente.

Continua...

*Torulaspora delbruekii*

	A4-1	A4-2	A4-3	A4-4	A4-6	A4-7	A5-1	A5-2	A5-3	A5-4
Fermentação de:										
Sacarose	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Glicose	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Assimilação de:										
Maltose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eritritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amido	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ribitol	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Sacarose	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Celobiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rafinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Manitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xilose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Crescimento a 37 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Crescimento em 50 % de glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Crescimento em 10 % de NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pigmento	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Pseudo micélio	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A

C= creme; A= ausente.

Continua...

*Torulaspora delbruekii*

	A5-5	A5-6	A5-7	A5-8	A5-9	A6-1	A6-2	A6-3	A6-4	A6-5
Fermentação de:										
Sacarose	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+
Galactose	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
Glicose	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Assimilação de:										
Maltose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eritritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amido	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ribitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sacarose	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Celobiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rafinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Manitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Xilose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Crescimento a 37 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Crescimento em 50 % de glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Crescimento em 10 % de NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pigmento	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Pseudo micélio	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A

C= creme; A= ausente.

Continua...

*Torulaspora delbruekii*

	A6-7	A7-5	A7-7	A8-3	S5-1	S6-1	S6-2	S6-3	S6-4	S6-6
Fermentação de:										
Sacarose	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicose	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Assimilação de:										
Maltose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eritritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amido	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ribitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sacarose	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Celobiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rafinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Manitol	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
Xilose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Crescimento a 37 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Crescimento em 50 % de glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Crescimento em 10 % de NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pigmento	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Pseudo micélio	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A

C= creme; A= ausente.

Continua...

<i>Torulaspora delbruekii</i>								
	S6-7	S6-8	S6-9	S6-10	S7-1	S7-2	S7-4	S7-10
Fermentação de:								
Sacarose	-	-	+	-	-	+	-	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-
Assimilação de:								
Maltose	-	-	-	-	-	+	-	-
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrato	-	-	-	-	-	-	-	-
Eritritol	-	-	-	-	-	+	-	-
Amido	-	-	-	-	-	-	-	-
Ribitol	-	-	-	-	-	-	-	-
Sacarose	-	-	+	-	+	+	+	+
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-
Celobiose	-	-	-	-	-	-	-	-
Rafinose	+	+	+	+	+	+	+	+
Manitol	-	+	-	-	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	-
Xilose	-	-	-	-	-	-	-	-
Crescimento a 37 °C	+	+	+	+	+	+	+	+
Crescimento em 50 % de glicose	+	+	+	+	+	+	+	+
Crescimento em 10 % de NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+
Pigmento	C	C	C	C	C	C	C	C
Pseudo micélio	A	A	A	A	A	A	A	A

C= creme; A= ausente.

Continua...

	<i>Candida zeylanoides</i>				<i>Kodamaea ohmeri</i>				
	A4-5	S5-2	A8-1	A8-2	A8-6	A8-7	S2-3	S2-5	S2-8
Fermentação de:									
Sacarose	-	-	+	+	-	-	+	+	+
Galactose	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Glicose	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Assimilação de:									
Maltose	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrato	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Eritritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amido	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Ribitol	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Sacarose	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Celobiose	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Rafinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Manitol	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Melibiose	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Xilose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Crescimento a 37 °C	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Crescimento em 50 % de glicose	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Crescimento em 10 % de NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pigmento	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Pseudo micélio	P	P	P	P	P	P	P	P	P

C= creme; P= presente

Das espécies identificadas como *D. hansenii*, todas diferiram da descrição padrão (LODDER, 1970), por assimilarem nitrato e não assimilarem amido. Dessas, 25 também não assimilaram celobiose e 4 apresentaram pigmentação alaranjada. O isolado A2-14 diferiu da descrição padrão por fermentar lactose. Silva (2003), ao identificar leveduras em queijo Minas frescal, também isolou essa espécie com a capacidade de assimilar nitrato, fermentar lactose e de produzir de pigmentação.

Todos os isolados avaliados como *T. delbruekii* diferiram da descrição padrão por crescerem a 37 °C, assim como em 36 dos isolados, por não assimilarem manitol. Dentre esses, 5 (A4-6, A5-5, A5-7, A6-7 e A8-3) não fermentaram glicose; sendo que os isolados A4-6 e A5-5, também não fermentaram galactose; 1 (S7-2) fermentou maltose e eritritol e o isolado A5-8 não fermentou galactose.

Dos 34 isolados identificados como *Kl. lactis*, 30 não assimilaram manitol, diferindo, portanto, da descrição padrão. Desses, o isolado S7-5 não fermentou nem assimilou lactose; os isolados A3-6, A7-3, S2-10, S3-2, S5-3 e S7-3 não fermentaram glicose; e os isolados A3-3, S6-5 assimilaram nitrato. Dos três isolados que assimilaram manitol, A3-5 não fermentou galactose.

Os sete isolados, identificados como *Kodamea ohmeri*, diferiram da descrição padrão por assimilarem nitrato. O isolado A8-2, assimilou melibiose e os isolados A8-6 e A8-7 não fermentaram sacarose.

Apenas dois isolados foram identificados como *C. zeylanoides*. O isolado A4-5 diferiu dos padrões de identificação utilizado por assimilar nitrato, amido e rafinose, enquanto o isolado S5-2 diferiu por assimilar sacarose e rafinose e não assimilar manitol e por crescer a temperatura de 37 °C.

Dos cinco isolados identificados como *C. kefir*, todos diferiram da descrição padrão por crescerem em 10 % de NaCl e por não assimilarem celobiose. O A3-2 também diferiu por não assimilar sacarose e rafinose, assim como por não fermentar glicose e sacarose e o S4-1 por não fermentar sacarose.

### 5.5.2 Sistema API® 20 C AUX (API).

Utilizando o API, foram identificados os 118 isolados. Dentre estes, 16 *Candida famata* (*C. famata*), 13 *C. parapsilosis*, 01 *Cryptococcus laurenti* (*Cr. laurenti*), 33 *C. sphaerica*, 01 *Sacharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), 05 *C. kefir*, 38 *C. colliculosa*, 02 *C. zeylanoides*, 01 *C. guilliermondii*, 01 *Geotrichium capitatum* (*G. capitatum*) e 7 *Kodamaea ohmeri* (*K. ohmeri*). O perfil numérico encontrado, o percentual de acerto e a classificação da identificação, verificados segundo o programa Apiweb™, estão demonstradas na Tabela 10. A maioria das identificações (75,65 %) foi classificada como boa, muito boa e excelente.

Tabela 10. Espécies de leveduras encontradas no fermento endógeno originado do município de Medeiros, região da Serra da Canastra/MG, identificadas pelo API

Código	API® 20 C AUX			
	Perfil Numérico	Espécie	% de Acerto	Classificação
A1-1	6 7 5 6 1 7 3	<i>C. famata</i>	56,2	Muito boa identificação do gênero
A1-2	6 7 5 6 7 7 3	<i>C. famata</i>	98,2	Boa identificação
A1-3	6 7 5 6 1 7 1	<i>C. famata</i>	92,9	Boa identificação
A1-4	6 7 5 6 1 7 5	<i>C. parapsilosis</i>	99,9	Excelente identificação
A1-5	6 7 5 6 1 7 1	<i>C. parapsilosis</i>	92,9	Boa identificação
A2-1	6 7 5 6 1 7 3	<i>C. famata</i>	56,2	Muito boa identificação do gênero
A2-2	6 7 5 6 1 7 3	<i>C. famata</i>	56,2	Muito boa identificação do gênero
A2-3	6 7 5 6 1 7 3	<i>C. famata</i>	56,2	Muito boa identificação do gênero
A2-4	6 7 5 6 1 7 3	<i>C. famata</i>	56,2	Muito boa identificação do gênero
A2-5	6 7 5 6 1 7 1	<i>C. parapsilosis</i>	92,9	Boa identificação
A2-6	6 7 5 6 1 7 1	<i>C. parapsilosis</i>	92,9	Boa identificação
A2-7	6 7 5 6 1 7 3	<i>C. famata</i>	56,2	Muito boa identificação do gênero
A2-8	6 7 5 6 1 7 3	<i>C. famata</i>	56,2	Muito boa identificação do gênero
A2-9	6 7 5 6 1 7 3	<i>C. famata</i>	56,2	Muito boa identificação do gênero
A2-10	6 7 5 6 1 7 1	<i>C. parapsilosis</i>	92,9	Boa identificação
A2-11	6 7 5 6 1 7 1	<i>C. parapsilosis</i>	92,9	Boa identificação
A2-12	6 7 5 6 1 7 1	<i>C. parapsilosis</i>	92,9	Boa identificação
A2-13	6 7 5 6 1 7 3	<i>C. famata</i>	56,2	Muito boa identificação do gênero
A2-14	6 7 5 6 7 7 3	<i>C. famata</i>	98,2	Boa identificação
A2-15	6 7 5 2 1 7 1	<i>C. parapsilosis</i>	95,9	Boa identificação
A2-16	6 7 7 7 7 7 3	<i>Cr. laurentii</i>	46,1	Fraca discriminação
A2-17	6 7 5 6 1 7 3	<i>C. famata</i>	56,2	Muito boa identificação do gênero
A2-18	6 7 5 6 1 7 1	<i>C. parapsilosis</i>	92,9	Boa identificação
A2-19	6 7 5 6 1 7 1	<i>C. parapsilosis</i>	92,9	Boa identificação
A2-20	6 7 5 6 1 7 1	<i>C. parapsilosis</i>	92,9	Boa identificação
A2-21	6 7 5 6 1 7 1	<i>C. parapsilosis</i>	92,9	Boa identificação
A3-1	6 0 6 2 6 2 0	<i>C. sphaerica</i>	99,2	Muito boa identificação
A3-2	6 4 6 2 4 2 2	<i>C. kefir</i>	98,4	Boa identificação
A3-3	6 4 6 2 4 6 0	<i>C. sphaerica</i>	94,5	Identificação aceitável no gênero
A3-4	6 0 6 2 4 0 0	<i>C. sphaerica</i>	73,8	Perfil duvidoso
A3-5	6 0 6 2 4 0 0	<i>C. sphaerica</i>	73,8	Perfil duvidoso
A3-6	6 0 6 6 6 7 3	<i>C. sphaerica</i>	99,9	Excelente identificação

A3-7	6062673	<i>C. sphaerica</i>	99,9	Excelente identificação
A4-1	6142062	<i>C. colliculosa</i>	96,2	Boa identificação
A4-2	6142062	<i>C. colliculosa</i>	96,2	Boa identificação
A4-3	6142062	<i>C. colliculosa</i>	96,2	Boa identificação
A4-4	6142062	<i>C. colliculosa</i>	96,2	Boa identificação
A4-5	6102104	<i>C. zeylanoides</i>	99,9	Excelente identificação
A4-6	6140066	<i>C. colliculosa</i>	99,8	Muito boa identificação
A4-7	6142062	<i>C. colliculosa</i>	96,2	Boa identificação
A5-1	6142062	<i>C. colliculosa</i>	96,2	Boa identificação
A5-2	6140062	<i>C. colliculosa</i>	97,2	Boa identificação
A5-3	6142062	<i>C. colliculosa</i>	96,2	Boa identificação
A5-4	6142062	<i>C. colliculosa</i>	96,2	Boa identificação
A5-5	6342062	<i>C. colliculosa</i>	95,3	Perfil duvidoso
A5-6	6142062	<i>C. colliculosa</i>	96,2	Boa identificação
A5-7	6140066	<i>C. colliculosa</i>	99,8	Muito boa identificação
A5-8	6142062	<i>C. colliculosa</i>	96,2	Boa identificação
A5-9	6142062	<i>C. colliculosa</i>	96,2	Boa identificação
A6-1	6142062	<i>C. colliculosa</i>	96,2	Boa identificação
A6-2	6142062	<i>C. colliculosa</i>	96,2	Boa identificação
A6-3	6140060	<i>C. colliculosa</i>	86,2	Muito boa identificação do gênero
A6-4	6142060	<i>C. colliculosa</i>	85,4	Fraca discriminação
A6-5	6142062	<i>C. colliculosa</i>	96,2	Boa identificação
A6-6	6756173	<i>C. famata</i>	56,2	Muito boa identificação do gênero
A6-7	6142042	<i>C. colliculosa</i>	94,7	Boa identificação
A7-1	6062672	<i>C. sphaerica</i>	99,9	Excelente identificação
A7-2	6062673	<i>C. sphaerica</i>	99,9	Excelente identificação
A7-3	6162673	<i>C. sphaerica</i>	99,5	Muito boa identificação
A7-4	6162672	<i>C. sphaerica</i>	99,3	Boa identificação
A7-5	6142062	<i>C. colliculosa</i>	96,2	Boa identificação
A7-6	6162462	<i>C. sphaerica</i>	90,8	Boa identificação
A7-7	6142062	<i>C. colliculosa</i>	96,2	Boa identificação
A7-8	6162462	<i>C. sphaerica</i>	90,8	Boa identificação
A7-9	6162462	<i>C. sphaerica</i>	90,8	Boa identificação
A8-1	6156276	<i>K. ohmeri</i>	99,9	Muito boa identificação
A8-2	6156276	<i>K. ohmeri</i>	99,9	Muito boa identificação
A8-3	6142062	<i>C. colliculosa</i>	96,2	Boa identificação
A8-4	6176171	<i>C. famata</i>	57,3	Boa identificação do gênero
A8-5	6756171	<i>C. parapsilosis</i>	92,9	Boa identificação
A8-6	6156276	<i>K. ohmeri</i>	99,9	Muito boa identificação
A8-7	6156076	<i>K. ohmeri</i>	99,9	Muito boa identificação
S1-1	6062622	<i>C. sphaerica</i>	92,6	Muito boa identificação do gênero
S1-2	6062472	<i>C. sphaerica</i>	99,9	Excelente identificação
S1-3	6462463	<i>C. sphaerica</i>	99,5	Muito boa identificação
S1-4	6062473	<i>C. sphaerica</i>	99,9	Excelente identificação
S1-5	6462472	<i>C. sphaerica</i>	98,2	Boa identificação
S2-1	6066673	<i>C. sphaerica</i>	99,9	Excelente identificação
S2-3	6056376	<i>K. ohmeri</i>	99,9	Excelente identificação
S2-4	6062062	<i>C. sphaerica</i>	36,3	Perfil duvidoso
S2-5	6056376	<i>K. ohmeri</i>	99,9	Excelente identificação
S2-6	6062422	<i>C. kefyra</i>	76,2	Muito boa identificação do gênero
S2-7	6062473	<i>C. sphaerica</i>	99,9	Excelente identificação
S2-8	6056376	<i>K. ohmeri</i>	99,9	Excelente identificação
S2-9	6676377	<i>C. guilliermondii</i>	99,7	Muito boa identificação
S2-10	6042432	<i>C. sphaerica</i>	98,4	Boa identificação
S3-1	6756173	<i>C. famata</i>	56,2	Muito boa identificação do gênero
S3-2	6062473	<i>C. sphaerica</i>	99,9	Excelente identificação
S3-3	6062433	<i>C. sphaerica</i>	99,9	Excelente identificação
S4-1	6462422	<i>C. kefyra</i>	98,4	Boa identificação

S4-2	6 4 6 2 4 3 2	<i>C. sphaerica</i>	84,4	Boa identificação do gênero
S4-3	6 4 6 2 4 2 2	<i>C. kefyri</i>	98,4	Boa identificação
S5-1	6 1 4 2 0 6 2	<i>C. colliculosa</i>	96,2	Boa identificação
S5-2	6 1 0 2 1 0 4	<i>C. zeylanoides</i>	99,9	Excelente identificação
S5-3	6 4 6 2 4 3 2	<i>C. sphaerica</i>	84,4	Boa identificação do gênero
S6-1	6 1 4 2 0 6 0	<i>C. colliculosa</i>	85,4	Fraca discriminação
S6-2	6 1 6 2 0 6 2	<i>C. colliculosa</i>	99,8	Muito boa identificação
S6-3	6 1 4 2 0 4 2	<i>C. colliculosa</i>	94,7	Boa identificação
S6-4	6 1 4 2 0 6 2	<i>C. colliculosa</i>	96,2	Boa identificação
S6-5	6 1 6 2 4 6 2	<i>C. sphaerica</i>	90,8	Boa identificação
S6-6	6 1 4 2 0 6 2	<i>C. colliculosa</i>	96,2	Boa identificação
S6-7	6 1 4 2 0 4 2	<i>C. colliculosa</i>	94,7	Boa identificação
S6-8	6 1 4 2 0 6 2	<i>C. colliculosa</i>	96,2	Boa identificação
S6-9	6 1 4 2 0 6 2	<i>C. colliculosa</i>	96,2	Boa identificação
S6-10	6 1 4 0 0 6 0	<i>C. colliculosa</i>	86,2	Muito boa identificação do gênero
S7-1	6 1 4 2 0 6 2	<i>C. colliculosa</i>	96,2	Boa identificação
S7-2	6 1 4 2 0 6 2	<i>C. colliculosa</i>	96,2	Boa identificação
S7-3	6 1 6 2 4 3 3	<i>C. sphaerica</i>	99,9	Muito boa identificação
S7-4	6 1 4 2 0 6 2	<i>C. colliculosa</i>	96,2	Boa identificação
S7-5	2 0 4 0 0 0 0	<i>S. cerevisiae</i>	60,9	Fraca discriminação
S7-6	6 1 6 2 4 7 3	<i>C. sphaerica</i>	99,9	Muito boa identificação
S7-7	6 1 4 0 0 0 4	<i>G. capitatum</i>	80,4	Perfil duvidoso
S7-8	6 0 6 2 4 3 2	<i>C. sphaerica</i>	99,0	Muito boa identificação
S7-9	2 4 6 2 4 2 2	<i>C. kefyri</i>	99,9	Muito boa identificação
S7-10	6 1 4 2 0 6 0	<i>C. colliculosa</i>	85,4	Fraca discriminação
S8-1	6 0 4 2 4 3 1	<i>C. sphaerica</i>	99,9	Muito boa identificação
S8-2	6 0 4 2 4 3 1	<i>C. sphaerica</i>	99,9	Muito boa identificação
S8-3	6 0 4 2 4 3 1	<i>C. sphaerica</i>	99,9	Muito boa identificação

### 5.5.3 Comparação dos resultados pela metodologia tradicional e pelo sistema API<sup>®</sup> 20 C AUX

A comparação dos resultados obtidos na identificação da microbiota leveduriforme, utilizando a MT e o API, é demonstrada na Tabela 11.

Tabela 11. Comparação dos resultados da identificação, utilizando a metodologia tradicional (MT) e o sistema API® 20 C AUX (API).

MT		API	
Espécie	Quantitativos	Espécie	Quantitativos
<i>D. hansenii</i>	29	<i>C. famata</i>	15
		<i>C. parapsilosis</i>	13
		<i>Cr. laurentii</i>	01
<i>Kl. lactis</i>	34	<i>C. sphaerica</i>	33
		<i>S. cerevisae</i>	01
<i>C. kefir</i>	05	<i>C. kefir</i>	05
<i>T. delbruekii</i>	38	<i>C. colliculosa</i>	38
<i>C. zeylanoides</i>	02	<i>C. zeylanoides</i>	02
<i>K. ohmeri</i>	07	<i>K. ohmeri</i>	07
N.A.	03	<i>C. famata</i>	01
		<i>C. guilliermondii</i>	01
		<i>G. capitatum</i>	01

N.A.: não avaliado.

Do total de 118 isolados, 115 foram identificados por intermédio das duas metodologias utilizadas.

Dos 29 isolados identificados como *D. hansenii* pela MT, 15 foram identificados como *C. famata* (forma imperfeita de *D. hansenii*), 13 como *C. parapsilosis* e um como *Cr. laurentii*, utilizando o API. Observou-se certa dificuldade pelo método API em diferenciar a espécie *C. famata* e *C. parapsilosis*. Na maioria dos perfis encontrados, a assimilação (*C. famata*) ou não (*C. parapsilosis*) da rafinose foi o único parâmetro diferenciador entre essas 2 espécies. Porém, o próprio método ressalta que 25 % das estirpes *C. famata* não assimilam o referido açúcar. Essa pode ter sido a razão da incongruência entre os resultados pela MT e API.

Dos 34 isolados identificados como *Kl. lactis* por meio da MT, 33 foram identificados pelo API como *C. sphaerica* (forma imperfeita de *Kl. lactis*) e 1 como *S. cerevisae*.

Os 38 isolados identificados pela MT como *T. delbruekii* foram identificados como *C. colliculosa* (forma imperfeita de *T. delbruekii*).

As espécies *C. zeylanoides*, *C. kefyri* e *K. homeri*, que corresponderam a 2, 5 e 7 do total dos isolados, respectivamente, apresentaram a mesma identificação em ambos os métodos utilizados.

Três isolados foram identificados apenas pelo API pelas espécies *C. famata*, *C. guilliermondi* e *G. capitatum*.

A diferença entre a forma perfeita das espécies *D. hansenii*, *Kl. lactis* e *T. delbruekii* e suas respectivas formas imperfeitas *C. famata*, *C. sphaerica* e *C. colliculosa* advém da capacidade que essas espécies, quando em estado teleomorfo (perfeito), tem de se reproduzirem sexuadamente (produção de ascósporos), embora apresentem as mesmas características bioquímicas (LODDER, 1970; KREGGER-VAN RIJ, 1984, TORNADIJO et al, 1997). Portanto, foram consideradas, neste trabalho, como o mesmo microrganismo.

Dos 115 isolados testados por ambas as metodologias adotadas nesta pesquisa, os resultados coincidiram em 93 espécies (80,87 %).

Silva et al (2005), ao avaliarem leveduras de importância clínica, encontraram 92 % de similaridade entre as duas metodologias. Porém, Török e King (1991), ao avaliarem leveduras associadas a alimentos, encontraram similaridade inferior a 40 %, não considerando o *kit* apropriado para identificação de leveduras associadas a alimentos, principalmente pelo restrito número de espécies na sua base de dados.

Os métodos clássicos para identificação de leveduras ainda são bastante utilizados. Porém, são necessários um laboratório bem equipado, a utilização de várias técnicas e reagentes. A identificação tradicional é laboriosa e demanda tempo para sua realização. Por essas razões, métodos rápidos de identificação, inicialmente desenvolvidos para leveduras de origem clínica, têm sido utilizados para identificação de leveduras em alimentos. No entanto, ambas as metodologias são passíveis de problemas, principalmente quanto à leitura e interpretação dos resultados, gerando, em muitos casos, resultados duvidosos.

Neste estudo, o principal problema encontrado foi quanto à visualização dos resultados, principalmente quando se utilizou o API. Em vários isolados, a distinção entre a assimilação e a não-assimilação, das diferentes fontes de carbono testadas,

nem sempre era nítida. A adoção de indicadores, que sinalizem assimilação ou não, através da modificação da cor, certamente facilitará a utilização do *kit*.

Nas últimas décadas, progressos no estudo da biologia molecular têm possibilitado a caracterização de leveduras ao nível genômico. Técnicas baseadas em análises de fragmentos, como PFGE (Pulsefield gel electrophoresis), RFLP (restriction fragment length polymorphism) e RAPD (random amplified polymorphic DNA) têm sido reconhecidas como ferramentas mais seguras e rápidas para a identificação de leveduras quando comparadas com os testes bioquímicos e fisiológicos utilizados nas identificações fenotípicas (LOPANDIC et al, 2005).

#### 5.5.4 Espécies leveduriformes predominantes nas unidades produtoras, nos dois períodos avaliados

As espécies da microbiota leveduriforme isoladas do fermento endógeno nos dois períodos amostrados, bem como a sua frequência em cada unidade produtora avaliada, podem ser observadas nas Figuras 11 e 12, respectivamente. Nessas, constam as espécies identificadas de acordo com a MT, à exceção das que foram identificadas apenas pelo API.

Figura 11. Frequência das diferentes espécies leveduriformes identificadas no período das águas (PA) e no período da seca (PS).

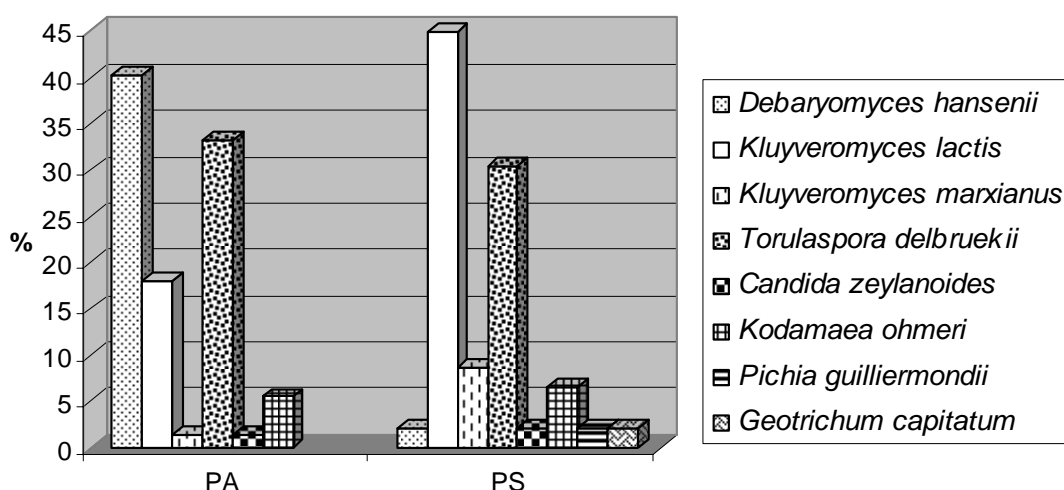
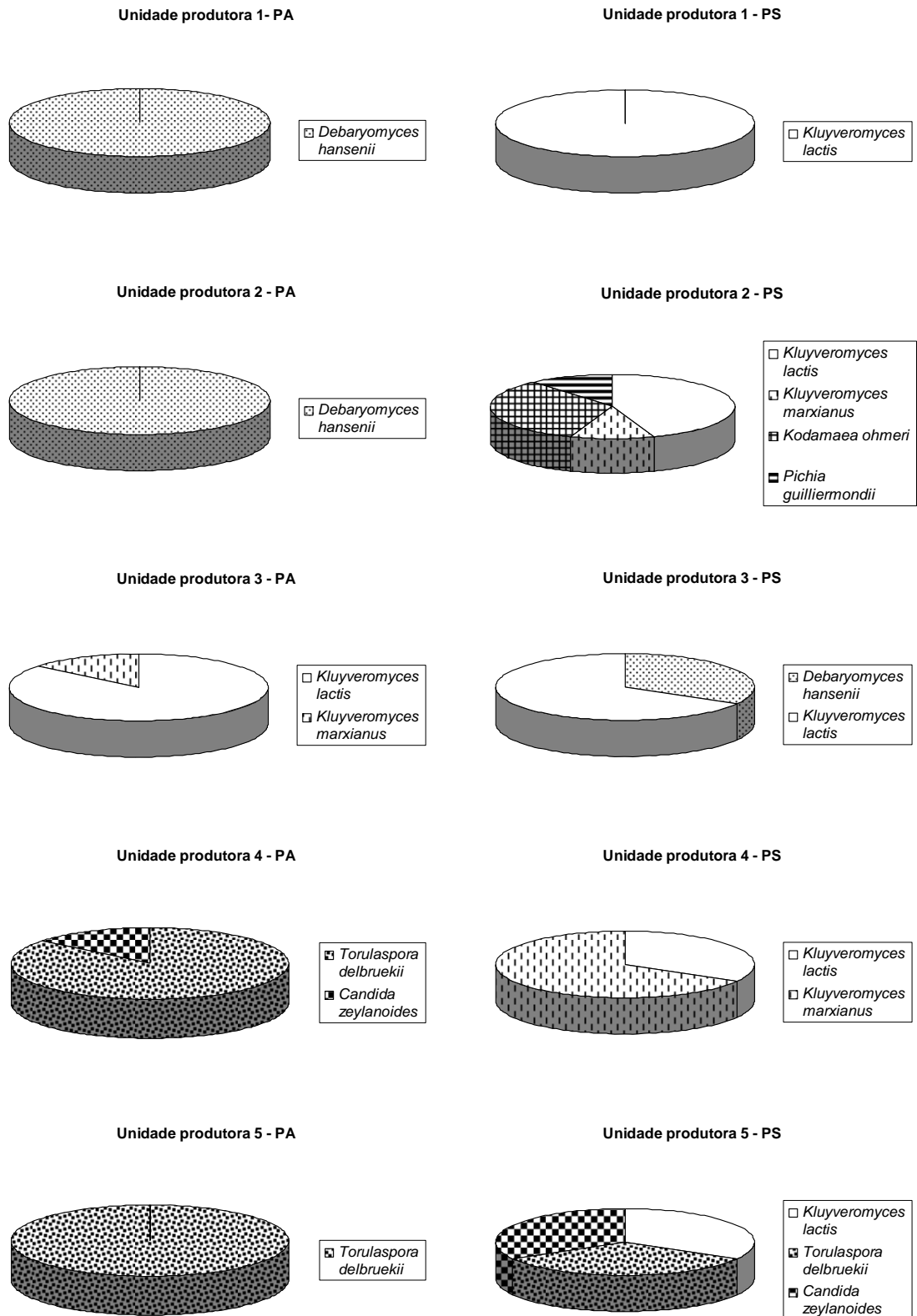
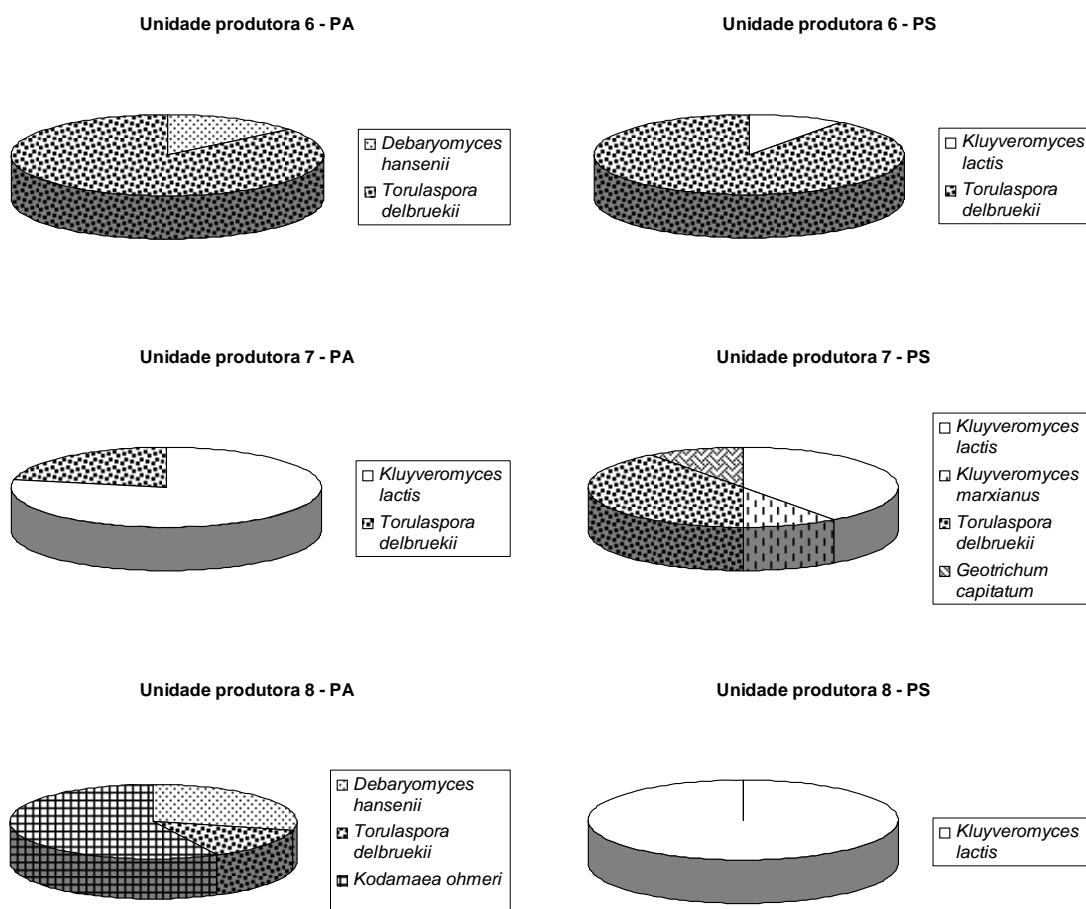


Figura 12. Freqüência das espécies de leveduras predominantes nas unidades produtoras, no período das águas (PA) e no período da seca (PS).





No PA, *D. hansenii* foi a espécie mais frequentemente encontrada dentre os isolados avaliados (40,28 %), seguida por *T. delbruekii* (33,34 %) e *Kl. lactis* (18,05 %). Essas três espécies corresponderam a 91,67 % do total de espécies isoladas nesse período. Todas estão associadas a produtos lácticos (FLEET, 1989; LARPENT et al, 1991).

O predomínio das espécies *D. hansenii* e *T. delbruekii* pode estar associado à concentração de NaCl do fermento endógeno. Aguiar e Lucas (2000) demonstraram que ambas crescem na presença de até 3M de NaCl, enquanto que espécies como *Kl. lactis* e *Kl. marxianus* conseguem crescer na presença de até 2M de NaCl .

*T. delbruekii*, isolada em 5 das 8 unidades produtoras foi a espécie encontrada em maior número de propriedades. Na propriedade 5 foi a única espécie isolada. *D. hansenii* foi detectada em 4 unidades produtoras, constituindo a única

espécie isolada em duas destas (1 e 2). *Kl. lactis*, a terceira espécie isolada em termos percentuais, foi encontrada somente em 2 das 8 unidades produtoras.

O fermento endógeno da unidade produtora 8 apresentou maior diversidade de espécies (3 espécies). Já nos fermentos endógenos das unidades produtoras 1, 2 e 5 detectou-se a presença de apenas uma espécie.

Borelli (2002), ao analisar o fermento endógeno dessa região, também no período das águas, encontrou a predominância de *T. delbruekii*, que apresentou maior distribuição entre os 10 fermentos endógenos avaliados. *D. hansenii* e *Kl. lactis* também foram isoladas de forma expressiva, figurando entre as quatro espécies mais frequentes.

As espécies *Kl. marxianus* e *C. zeylanoides* foram detectadas apenas nas unidades 3 e 4, respectivamente. Essas espécies, aliadas a *K. ohmeri*, constituíram as espécies encontradas em menor frequência no período das águas. No entanto, Borelli (2002) avaliou *K. ohmeri* como a segunda espécie mais frequentemente encontrada no fermento endógeno coletado em outro município (São Roque de Minas) da região.

No PS, foram isoladas as mesmas espécies identificadas na época das águas, porém em frequências diferentes (Figura 11) e ainda, as espécies *P. guilliermondii* e *G. capitatum*.

*Kl. lactis* foi a espécie que mais se destacou no PS. Além de corresponder a 45,65 % do total de isolados nesse período, foi encontrada no fermento endógeno de todas as unidades produtoras. Embora a grande maioria dos isolados identificados como *Kl. lactis* tenha crescido na presença de 10 % de sal (Tabela 9), observou-se uma tendência desse microrganismo em se destacar, nos fermentos endógenos com concentrações de NaCl de até 6,5 %. À exceção de uma estirpe, isolada no fermento endógeno da unidade produtora 4 (PS), cuja concentração de NaCl foi de 8,90 %.

A segunda espécie mais frequente foi *T. delbruekii*, apresentando uma frequência de 30,45 %, semelhante à encontrada no período das águas (33,34 %), porém com menor distribuição (presente em três propriedades).

A terceira espécie mais encontrada foi *C. kefir*. Sua frequência (8,70 %) foi superior à encontrada no período das águas, assim como sua distribuição (presente em três propriedades). As demais espécies ocorreram em frequências de 6,52 % para

K. ohmeri e de 2,17 % para *D. hansenii*, *Candida zeylanoides*, *P. guilliermondii* e *Geotrichum capitatum*.

O efeito de leveduras normalmente presentes em fermentos endógenos utilizados na fabricação de queijo ainda não está claro. É possível que, em moderado número, sua presença possa favorecer a produção de sabor e aroma em decorrência de uma moderada atividade proteolítica, por outro lado, a presença de leveduras em altas contagens ( $> 10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup>) pode acarretar formação de sabores e aromas desagradáveis devido, por exemplo, a uma indesejável fermentação alcoólica (REINHEIMER et al, 1994).

A microbiota leveduriforme presente no fermento endógeno na Serra da Canastra no período da seca está sendo avaliada pela primeira vez neste trabalho. Observa-se, pelos resultados, a presença das mesmas espécies em ambos os períodos, com diferença na frequência encontrada. Além disso, duas espécies (*G. capitatum* e *P. guilliermondii*) foram detectadas somente no período da seca. A ocorrência de um número reduzido de espécies indica que a composição do fermento endógeno, bem como as condições ambientais no qual é produzido, promove a seleção de uma microbiota que se mantém praticamente inalterada, em relação à diversidade de espécies, ao longo dos dois períodos avaliados, mas que varia na frequência com as quais são observadas.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dos parâmetros físico-químicos avaliados, o teor de NaCl foi o único que apresentou variações entre os dois períodos avaliados, sendo detectado em maior concentração no período das águas.

Entre os parâmetros microbiológicos avaliados, as bactérias do ácido láctico foram o grupo predominante no fermento endógeno. A contagem total de mesófilos aeróbios constituiu o único parâmetro que variou de acordo com o período avaliado e foi menor no período das águas. A variação na contagem dos indicadores higiênico-sanitários indica que há diferentes níveis de adequação às boas práticas de fabricação nas queijarias.

A diversidade de leveduras encontrada nos dois períodos avaliados foi praticamente a mesma, porém em frequências diferentes. O *kit* API<sup>®</sup> 20 C AUX apresentou as vantagens de facilidade de uso, armazenamento e rapidez, porém, em vários isolados os resultados foram de difícil visualização. As leveduras mais frequentemente isoladas no período das águas foram *D. hansenii*, *T. delbruekii* e *Kl. lactis*. No período da seca, destacaram-se as espécies *Kl. lactis*, *T. delbruekii* e *Kl. marxianus*.

Este trabalho refere-se ao início do conhecimento dos principais componentes físico-químicos e microbianos do fermento endógeno utilizado na fabricação do queijo Canastra. Estudos para uma melhor compreensão desses componentes, suas variações e interações, e a sua contribuição para as características e a qualidade do queijo Canastra precisam ser determinados.

## 7. REFERÊNCIAS

AGUIAR, C., LUCAS, C. Yeasts killer/sensitivity phenotypes and halotolerance. **Food Technology Biotechnology**, v. 38, n. 1, p. 39-46, 2000.

AQUINO, F. T. M. Produção de queijo de coalho no Estado da Paraíba: acompanhamento das características físico-químicas do processamento. João Pessoa: UFPB. 1983. 74 p. Dissertação de mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal da Paraíba.

ANDRADE, C.C.P., MANDELLI, F., DELAMARE, A.P.L., ECHEVERRIGARAY, S. Estudos de bactérias lácticas na produção de queijo Serrano. Anais da 58<sup>a</sup> Reunião Anual da SBPC, 2006.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 16 ed., Washington, D. C.: AOAC, 1995. 2v.

APHA (American Public Health Association) Standards Methods for the Examination of Dairy Products. 16 ed., Washington: APHA. 1992. 1217 p.

ARAÚJO, R. A. B. Diagnóstico socioeconômico, cultural e avaliação dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos do queijo Minas artesanal da região de Araxá. Viçosa: UFV. 2004. 121 p. Dissertação de mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa.

ARIZCUN, C., BARCINA, Y., TORRE, P. Identification of lactic acid bacteria isolated from Roncal and Idiazábal cheeses. **Le Lait**, v. 77, p. 729-736, 1997.

BALLESTEROS, C., POVEDA, J. M., GONZÁLEZ-VIÑAS, M. A., CABEZAS, L. Microbiological, biochemical and sensory characteristics of artisanal and industrial Manchego cheeses. **Food Control**, v. 17, p. 249-255, 2006.

BARNETT, J. A., PAYNE, R. W., YARROW, D. Yeasts: characteristics and identification. Cambridge. University Press, 1983. 811p.

BERESFORD, T. P., FITZSIMONS, N. A., BRENNAN, N. L., COGAN, T. M., Recent advances in cheese microbiology. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 259-274, 2001.

BETTS, G.D., LINTON, P., BETTERIDGE, R.J. Food spoilage yeasts: effects of pH, NaCl and temperature on growth. **Food Control**, v. 10, p. 27-33, 1999.

BORELLI, B. M., Quantificação dos indicadores higiênico-sanitários e da diversidade de leveduras durante a fabricação do queijo Minas curado produzido na Serra da Canastra, MG. Belo Horizonte: UFMG. 2002. 107p. Dissertação de mestrado em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

BORELLI, B. M., Caracterização das bactérias lácticas, leveduras e das populações de *Staphylococcus enterotoxigênicos* durante a fabricação do queijo Minas curado produzido na Serra da Canastra-MG. Belo Horizonte: UFMG. 2006. 119p. Tese de doutorado em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

BORELLI, B. M., FERREIRA, E. G., LACERDA, I. C. A., FRANCO, G. R., ROSA, C. A. Yeast populations associated with the artisanal cheese produced in the region of Serra da Canastra, Brazil. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 22, p. 1115-1119, 2006

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Serviço de Inspeção de Leite e Derivados. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006, Brasília, 2006.

CABEZAS, L. , SÁNCHEZ, I., POVEDA, J. M., SESENÁ, S., PALOP, M. L. L. Comparison of microflora, chemical and sensory characteristics of artisanal Manchego cheeses from two dairies. **Food Control**, v. 18, p. 11-17, 2007.

CAVALCANTE, J.F.M., FONSECA, C.R., ANDRADE, N.J., FERREIRA, C.L.L.F. Isolamento de bactérias lácticas de leite cru da região do Vale do Jaguaribe, Ceará, Brasil. Anais do XX Congresso Nacional de Laticínios, **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, p. 106-109, 2003.

COGAN, T. M., BARBOSA, M., BEUVIER, E., BIANCHI-SALVADOR, B... Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. **Journal of Dairy Research**, v. 64, p. 409-421, 1997.

COPOLA, S., PARENTE, E., DUMONTET, S., PECERELLA, A. The microflora of natural whey cultures utilized as starters in the manufacture of Mozzarella cheese from water-buffalo milk. **Le Lait**, v. 68, n. 3, 295-310, 1988.

DE MAN, J.C.; ROGOSA, M.; SHARPE, E.M. A medium for de cultivation of lactobacilli. **Journal Applied Bacteriology**, v. 23, p. 130-135, 1960.

DEÁK, T., BEUCHAT, L. R. Identification of foodborne yeasts. **Journal of Food Protection**, v. 50, n. 3, p. 243-264, 1987.

EMATER. Bovinocultura de leite em Minas Gerais, situações e perspectivas. 2003, 19p.

EMATER. Caracterização da microrregião da Canastra como produtora do queijo Minas artesanal. Relatório Técnico, 19 p., 2004.

EMATER. Queijos tradicionais de Minas com mais qualidade. Revista da EMATER – MG. Ano XXII, n. 80, p. 8 – 9, 2004a.

EMATER. Depois do café Cerrado, é a vez do queijo Minas garantir oficialmente uma identidade geográfica no Estado. Disponível em [http://www.emater.mg.gov.br/portal.cgi?flagweb=site\\_tpl\\_paginas\\_internas&id=846](http://www.emater.mg.gov.br/portal.cgi?flagweb=site_tpl_paginas_internas&id=846) Acessado em 01/10/2007.

ERCOLINI, D., HILL, P. J., DODD, C. E. R. Bacterial community structure and location in Stilton cheese. **Applied and Environmental Microbiology**, n. 6, v. 69, p. 3540-3548, 2003.

ESTEPAR, J., SÁNCHEZ, M. M., ALONSO, L., MAYO, B. Biochemical and microbiological characterization of artisanal ‘Peñamellera’ cheese: analysis of its indigenous lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v. 9, p. 737-746, 1999.

FADDA, M. E., MOSSA, V., PISANO, M. B., DEPLANO, M., COSENTINO, S. Occurrence and characterization of yeasts isolated from artisanal Fiore Sardo cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 95, p. 51-59, 2004.

FERREIRA, A. D., VILJOEN, B. C. Yeasts as adjunct starters in matured Cheddar cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 86, p.131-140, 2003.

FLEET, G.H. Yeasts in dairy products. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 68, p. 199-211, 1990.

FLEET, G. H., Yeasts in foods and beverages : impact on product quality and safety. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, p. 170-175, 2007.

FLEET, G.H., MIAN, M. A. The occurrence and growth of yeasts in dairy products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 4, p. 145-155, 1987.

FONSECA, C.H. Ação do estado na garantia de acesso a alimento seguro: um caso real de ação da pesquisa e da vigilância sanitária. Anais do II Simpósio Mineiro de Microbiologia de Alimentos. Viçosa, Minas Gerais, 2005.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Bacteriological analytical manual for foods. 3. ed. Washington. Department of Helth Education and Welfare, 1792. 114p.

FURTADO, M.M. A arte e a ciência do queijo. 2. ed. São Paulo: Editora Globo, 1990. 295 p.

GARCIA, S. Isolamento e seleção de culturas lácticas para a fabricação de queijos. Campinas: UNICAMP. 1984. 88 p. Dissertação de mestrado em Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

GLOBO RURAL. Artesãos do futuro. Revista Globo Rural. Ano 17 , n. 200, 2002.

GLOBO RURAL. A mensagem do Agreste. Revista Globo Rural. Ano 14 , n. 169, 1999.

GOBBETTI, M., LANCIOTTI, R., DE ANGELIS, M., CORBO, M.R., MASSINI, R., FOX, P.F. Study of the temperature pH and NaCl on the peptidase activities of non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) by quadratic response surface methodology. **International Dairy Journal**, v. 9, p. 865-875, 1999.

GRAPPIN, R., BEUVIER, E. Possible implications of milk pasteurization on the manufacture and sensory quality of ripened cheese. **International Dairy Journal**, v. 7, p. 751-761, 1997.

GRIFFITHS, A. J. A numerclature of the yeasts. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 47, p 547-563, 1981.

GUSMÃO, V.V. Qualidade microbiológica e ocorrência de leveduras em leite pasteurizado tipos A, B e C. São José do Rio Preto: UNESP. 2005. 102p. Dissertação de mestrado em Engenharia e Ciências de Alimentos, Universidade Estadual Paulista.

JAKOBSEN, M., NARVHUS, J., Yeasts and possible beneficial and negative effects on the quality of dairy products. **International Dairy Journal**, v. 6, p. 755-768, 1996.

JAY, J.M., Microbiologia de alimentos. 6 ed., Porto Alegre, Artmedia. 2005. 711p.

KREGER-VAN RIJ, N. J. W. The yeasts: A taxonomic study. 3. ed. Amsterdam. Elsevier Science, 1984. 1082p.

LARPENT, J.P., BERVAS, E., BEZENGER, M.C. et al. Biotechnologie des levures. Paris. Masson. 1991. 425p.

LODDER, J. The yeasts : A taxonomic study. Amsterdam. North-Holland Publishing Company, 1970. 1385p.

LOPANDIC, K., ZELGER, S., BÁNSZKY, L. K., ELISKASES-LECHNER, F., PRILLINGER, H. Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques. **Food Microbiology**, n. 23, p. 341-350, 2006.

MARTINS, J. M. Características físico-químicas e microbiológicas durante a maturação do queijo Minas Artesanal da região do Serro. Viçosa: UFV. 2006. 158p. Dissertação, Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal de Viçosa, 2006.

MAS, M., TABLA, R., MORICHE, J., ROA, I., CONZALEZ, J., REBOLLO, J. E., CÁCERES, P. Ibore goat's milk cheese: Microbiological and physicochemical changes throughout ripening. **Le Lait**, v. 202, p. 579-587, 2002.

MARINO, M., MAIFRENI, M., RONDININI, G. Microbiological characterization of artisanal Montasio cheese: analysis of its indigenous lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 229, p. 133-140, 2003.

MATLEY, F.G., CROW, V.L., Interactions between non-starter microorganisms during cheese manufacture and ripening. **Internacional Dairy Journal**, v.3, p. 461-483, 1993.

MENDONÇA, R. C. S., Aislamiento, selección y caracterización de levaduras de embutidos con vista a su utilización como coadyuvante en el proceso de curado. Valencia: Universidad de Valencia. 2000. 185p. Tese de doutorado, Universidad de Valencia.

MOREIRA, S. R., Caracterização microbiológica de iogurtes comercializados em Lavras – MG. Lavras: UFLA. 1998. 73p. Dissertação de mestrado em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras.

NAHABIEH, F., SCHMIDT, J.L. Contribution à l'étude de la flore levure de quelques grands types de fromages de chèvre. **Le Lait**, v. 70, p. 325-343, 1990.

NUÑES, M., MEDINA, M., GAYA, P., DIAS-AMADO, C., Les levures et les moisissures dans le fromage bleu de Cabrales. **Le Lait**, v. 61, p. 62-79, 1981.

ORNELAS, E. A., Diagnóstico preliminar para caracterização do processo e das condições de fabricação do queijo artesanal da Serra da Canastra-MG. Belo Horizonte: UFMG. 2005. 65p. Dissertação de mestrado em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais.

OUADGHIRI, M., AMAR, M., VANCANNEYT, M., SWINGS, J. Biodiversity of lactic acid bacteria in Moroccan soft white cheese (Jben), **FEMS Microbiology Letters**, v. 251, p. 267-271, 2005.

PARENTE, E., ROTA, M. A., RICCIARDI, A., CLEMENTI, F. Characterization of natural starter cultures used in the manufacture of Pasta Filata cheese in Basilicata (Southern Italy). **International Dairy Journal**, v. 7, p. 775-783, 1997.

PELÁEZ, C., REQUENA, T. Exploiting the potential of bacteria in the cheese ecosystem. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 831-844, 2005.

PEREIRA, D. B. C., SILVA, P. H. F., COSTA JÚNIOR, L. C. G., OLIVEIRA, L. L. Físico-química do leite e derivados – Métodos analíticos. 2 ed. Juiz de Fora. 2001. 234p.

PIMENTEL FILHO, N. J., MARTINS, J. E., CUNHA, L. R., LOPES, J. P., FERNANDES, P. E., FERREIRA, C. L. L. F. Modulação de parâmetros microbiológicos e do pH pelo cloreto de sódio, no fermento endógeno utilizado na produção de queijo Minas artesanal do Alto Paranaíba. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 6 , p. 295-298, 2005.

PINTO, M. S. Diagnóstico socioeconômico, cultural e avaliação dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos do queijo minas artesanal do Serro. Viçosa: UFV. 2004. 133 p. Dissertação de mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa.

POZNANSKI, E., CAVASSA, A., CAPPÀ, F., COCCONCELLI, P. S. Indigenous raw milk microbiota influences the bacterial development in traditional cheese from an alpine natural park. **International Journal of Food Microbiology**, v. 92, p. 141-151, 2004.

PRAPHAILONG, W., FLLET, G.H. The effect of pH, sodium chloride, sucrose, sorbate and benzoate on the growth of food spoilage yeasts. **Food Microbiology**, n. 14, p. 459-468, 1997.

RAVEN, P. H., EVERT, R. F., EICHHORN, S. E. *Biologia Vegetal*. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. 2001. 906p.

REINHEIMER, J.A., SUAREZ, V.B., BAILO, N.B., ZALAZAR, C.A. Microbiological and technological characteristics of natural whey cultures for Argentinian hard-cheese production. **Journal Food Protection**, v. 58, n. 7, p. 796-799, 1995.

REINHEIMER, J.A., QUIBERONI, A., TAILLIEZ, P., BINETTI, A.G., SUÁREZ, V.B. The lactic acid bacteria of natural whey starters used in Argetinian for hard cheese production. **International Dairy Journal**, v. 6, p. 869-879, 1996.

ROOSTITA, R., FLEET, G.H. Growth of yeasts in milk and associated changes to milk composition. **International Journal of Food Microbiology**, v. 31, p. 205-219, 1996.

ROOSTITA, R., FLEET, G.H. The occurrence and growth of yeasts in Camembert and Blue-veined cheeses. **International Journal of Food Microbiology**, v. 28, p. 393-404, 1996a.

SALAMA, M. S., MUSAFIJA-JEKNIC, T., SANDINE, W.E., GIOVANNONI, S. J. An ecological study of lactic acid bacteria: Isolation of new strains of *Lactococcus* including *Lactococcus lacits* subspecies *cremoris*. **Journal Dairy Science**, v.78, p. 1004-1017, 1995.

SEBRAE. Pernambuco trabalha na indicação geográfica do queijo Coalho. Disponível em [http://www.portal.sebrae.com.br/integra\\_noticia?noticia=6456246&Todos=1](http://www.portal.sebrae.com.br/integra_noticia?noticia=6456246&Todos=1). Acessado em 10/09/2007.

SILVA, J. O., CANDIDO, R. C. Avaliação do sistema API20C AUX na identificação de leveduras de interesse clínico. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 3, p. 261-263, 2005.

SILVA, V. S., Qualidade microbiológica e ocorrência de leveduras em diferentes amostras de queijo tipo “Minas frescal”. São José do Rio Preto: UNESP. 2003. 101p. Dissertação de mestrado em Engenharia e Ciências de Alimentos, Universidade Estadual Paulista.

SOUZA, C.F.V, ROSA, T.D., AYUB, M.A.Z. Change in the microbiological and physicochemical characteristics of *Serrano* cheese during manufacture and ripening. **Brazilian Journal Microbiology**, v. 34, p. 260-266, 2003

SPANAMBERG, A., HARTFELDER, C., FUENTEFRIA, A. M., VALENTE, P., Diversity and enzyme production by yeasts isolated from milk in Southern Brazil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32, n. 3, p. 195-199, 2004.

TAVARIA, F. K., MALCATA, F. X., On the microbiology of Serra da Estrela cheese: geographical and chronological considerations. **Food Microbiology**, v. 17, p. 293-304, 2000.

TORNADIJO, M. E., FRESNO, J. M., SARMIENTO, R. M., CARBALLO, J. Comparison of the classical methods and the API ATB 32 C system in the identification of yeasts isolated from goat cheese. **Food Research International**, v. 30, n. 9, p. 653-658, 1997.

TÖRÖK, T., KING JR, A. D. Comparative study on the identification of food-borne yeasts. **Applied Environmental Microbiology**, v. 57, n. 4, p. 1207-1212, 1991.

TORRES, N., CHANDAN, R.C. Latin American white cheese. A review. **Journal of Dairy Science**, v. 64, p. 552-557, 1981.

TORRES-LLANEZ, M. J., VALLEJO-CORDOBA, B., DÍAZ-CINCO, M. E., MAZORRA-MANZANO, M. A., GONZÁLEZ-CÓRDOVA, A. F., Characterization of the natural microflora of artisanal Mexican Fresco cheese. **Food Control**, n. 17, p. 683-690, 2006.

VADILLO, S., PAYA, M. J., CUTULI, M. T., SUAREZ, G. Mycoflora of milk after several types of pasteurization. **Le Lait**, v. 67, n. 2, p. 265-273, 1987.

WITTHUHN, R. C., SCHOEMAN, T., BRITZ, T. J. Isolation and characterization of the microbial population of different South African kefir grains. **International Journal of Dairy Technology**, v. 57, n. 1, p. 33-37, 2004.

ZAMFIR, M., VANCANNEYT, M., MAKRAS, L., VANINGELGEM, F., LEFEBVRE, K., POT, B., SWINGS, J., VUYST, L. Biodiversity of lactic acid bacteria in Romanian dairy products. **Systematic and Applied Microbiology**, 2005.

ZOURARI, A., ANIFANTAKIS, E. M., Le kéfir, caractères physico-chimiques, microbiologiques et nutritionnels. Technologie de Production. Une revue. **Le Lait**, v. 68, n. 4, p. 373-392, 1988.

# Apêndices

**Apêndice A.** Perfil de fermentação e assimilação apresentado pelas leveduras presentes no fermento endógeno originado do município de Medeiros, região da Serra da Canastra/MG

	<i>Debaryomyces hansenii</i>		<i>Kluyveromyces lactis</i>		<i>Candida kefyri</i>		<i>Torulasporea delbruekii</i>		<i>Candida zeylanoides</i>		<i>Kodamaea ohmeri</i>	
	Resultados Positivos	Padrão*	Resultados Positivos	Padrão*	Resultados Positivos	Padrão*	Resultados Positivos	Padrão*	Resultados Positivos	Padrão*	Resultados Positivos	Padrão*
Nº de isolados	29		34		05		38		02		07	
Fermentação:												
Sacarose	02	V	22	+ ou R-	03	+	28	- A	00	-	05	+
Galactose	05	V	29	+	05	+	35	+	00	-	07	+
Glicose	24	V	23	+	04	+	33	+	00	-	07	+
Lactose	01	-	32	+	05	+	00	-	00	-	00	-
Assimilação:												
Maltose	29	+	12	V	00	-	01	-	00	-	07	+
Galactose	29	+	33	+	05	+	38	+	01	V	07	+
Lactose	04	V	33	+	05	+	00	-	00	-	00	-
Nitrato	29	-	01	-	00	-	00	-	01	-	07	-
Eritritol	28	V	01	-	00	-	01	-	00	-	00	-
Amido	00	+	00	-	00	-	00	-	01	-	00	-
Ribitol	29	+	02	V	00	-	01	-	01	V	07	+ ou R-
Sacarose	28	+	28	+	04	+	31	- A	01	-	07	+
Inositol	00	-	00	-	00	-	00	-	00	-	00	-
Celobiose	04	+	09	+	00	+	00	-	00	-	07	+
Rafinose	29	+	34	+ ou R-	04	+	38	- A	02	-	07	+
Manitol	29	+	04	+	00	-	02	+	01	+	07	+
melibiose	28	+ ou R-	00	-	00	-	03	+	00	-	01	-
Xilose	29	+	01	V	00	-	00	-	00	-	00	-
Cresc. a 37 °C	29	V	18	V	05	+	38	-	01	-	07	+
Cresc. em 50 % de glicose	29	+	17	- ou R+	00	N.A.	38	+	00	N. A.	07	+
Cresc. em 10 % de NaCl	29	+	30	N. A.	05	-	38	N. A.	02	+	07	N. A.

\* LODDER (1970); + = positivo; - = negativo; V= variável; R= raramente; A= adquirido; N.A.= não avaliado.

**Apêndice B.** Leveduras predominantes no fermento endógeno originado do município de Medeiros, região da Serra da Canastra/MG, coletado no período das águas

Espécies	Unidades Produtoras								Total
	1	2	3	4	5	6	7	8	
<i>D. hansenii</i>	5	21	-	-	-	1	-	2	29 (40,28 %)
<i>C. famata</i> *	-	-	6	-	-	-	7	-	13 (18,05 %)
<i>Kl. lactis</i>	-	-	1	-	-	-	-	-	1 (1,39 %)
<i>C. sphaerica</i> *	-	-	-	6	9	6	2	1	24 (33,34 %)
<i>Kl. marxianus</i>	-	-	-	1	-	-	-	-	1 (1,39 %)
<i>C. kefyra</i> *	-	-	-	-	-	-	-	4	4 (5,55 %)
<i>T. delbruekii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. colliculosa</i> *	-	-	-	1	-	-	-	-	1 (1,39 %)
<i>C. zeylanoides</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>K. ohmeri</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. guilliermondii</i> <i>var. membranifaciens</i> *	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Total</b>	<b>5</b>	<b>21</b>	<b>7</b>	<b>7</b>	<b>9</b>	<b>7</b>	<b>9</b>	<b>7</b>	<b>72</b> <b>(100,00 %)</b>

\* Forma imperfeita.

**Apêndice C.** Leveduras predominantes no fermento endógeno originado do município de Medeiros, região da Serra da Canastra/MG, coletado no período da seca.

Espécies	Unidades produtoras								Total
	1	2	3	4	5	6	7	8	
<i>D. hansenii</i>	-	-	1	-	-	-	-	-	1 (2,17 %)
<i>C. famata</i> *	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Kl. lactis</i>	5	4	2	1	1	1	4	3	21 (45,65 %)
<i>C. sphaerica</i> *	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Kl. marxianus</i>	-	1	-	2	-	-	1	-	4 (8,70 %)
<i>C. kefyri</i> *	-	-	-	-	1	9	4	-	14 (30,45 %)
<i>T. delbruekii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. colliculosa</i> *	-	-	-	-	1	-	-	-	1 (2,17 %)
<i>C. zeylanoides</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>K. ohmeri</i>	-	3	-	-	-	-	-	-	3 (6,52 %)
<i>C. guilliermondii</i> <i>var. membranifaciens</i> *	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. guilliermondii</i>	-	1	-	-	-	-	-	-	1 (2,17%)
<i>C. guilliermondii</i> *	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>G. capitatum</i>	-	-	-	-	-	-	1	-	1 (2,17 %)
<b>Total</b>	<b>5</b>	<b>9</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>3</b>	<b>46</b> <b>(100,00 %)</b>

\* Forma imperfeita.

**Apêndice D.** Resultados microbiológicos do fermento endógeno originado do município de Medeiros, região da Serra da Canastra/MG, nos dois períodos avaliados

Grupos Avaliados	Período	Unidades Produtoras							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Contagem total de mesófilos*	Águas	$8,4 \times 10^5$	$7,2 \times 10^5$	$1,3 \times 10^6$	$9,3 \times 10^5$	$1,6 \times 10^5$	$1,4 \times 10^4$	$2,5 \times 10^6$	$2,5 \times 10^7$
	Seca	$1,5 \times 10^7$	$1,9 \times 10^7$	$9,9 \times 10^7$	$7,3 \times 10^7$	$1,6 \times 10^7$	$5,4 \times 10^7$	$6,4 \times 10^7$	$3,6 \times 10^6$
Coliformes totais*	Águas	$5,3 \times 10^2$	$3,0 \times 10^1$	$1,6 \times 10^4$	$2,8 \times 10^2$	$3,2 \times 10^2$	$4,0 \times 10^1$	$1,1 \times 10^3$	$2,0 \times 10^4$
	Seca	$2,6 \times 10^4$	$<1,0 \times 10^1$	$4,1 \times 10^3$	$1,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^2$	$2,0 \times 10^2$	$6,0 \times 10^2$	$2,0 \times 10^2$
<i>E. coli</i> *	Águas	$1,0 \times 10^1$	$2,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$	$3,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$	$2,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$	$3,0 \times 10^2$
	Seca	$<1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^2$	$2,0 \times 10^2$	$3,0 \times 10^2$	$2,0 \times 10^2$
<i>S. aureus</i> *	Águas	$6,0 \times 10^1$	$1,4 \times 10^2$	$<1,0 \times 10^1$	$5,0 \times 10^1$	$1,2 \times 10^2$	$1,0 \times 10^1$	$6,8 \times 10^2$	$1,3 \times 10^3$
	Seca	$4,0 \times 10^1$	$1,7 \times 10^2$	$<1,0 \times 10^1$	$1,4 \times 10^2$	$7,0 \times 10^1$	$5,7 \times 10^2$	$1,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^1$
<i>Listeria</i> sp.	Águas	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência
	Seca	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência
<i>Salmonella</i> sp.	Águas	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Presença	Ausência
	Seca	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência
Leveduras*	Águas	$2,6 \times 10^2$	$4,6 \times 10^2$	$5,7 \times 10^5$	$5,7 \times 10^5$	$1,4 \times 10^6$	$4,8 \times 10^2$	$8,0 \times 10^5$	$5,4 \times 10^4$
	Seca	$7,8 \times 10^5$	$3,0 \times 10^2$	$3,5 \times 10^2$	$4,0 \times 10^4$	$1,5 \times 10^2$	$1,4 \times 10^5$	$3,9 \times 10^6$	$5,3 \times 10^3$
<i>Lactococcus / Streptococcus</i> *	Águas	$2,1 \times 10^6$	$7,3 \times 10^6$	$3,1 \times 10^7$	$1,2 \times 10^7$	$1,7 \times 10^7$	$1,8 \times 10^6$	$1,4 \times 10^7$	$1,2 \times 10^7$
	Seca	$1,0 \times 10^7$	$4,6 \times 10^5$	$1,1 \times 10^7$	$3,0 \times 10^6$	$9,5 \times 10^4$	$2,2 \times 10^7$	$9,9 \times 10^6$	$1,4 \times 10^8$
<i>Enterococcus</i> *	Águas	$4,5 \times 10^5$	$8,0 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$	$1,3 \times 10^7$	$7,9 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6$	$1,5 \times 10^7$	$8,5 \times 10^6$
	Seca	$8,9 \times 10^5$	$1,4 \times 10^5$	$3,5 \times 10^4$	$8,5 \times 10^4$	$<1,0 \times 10^4$	$5,0 \times 10^6$	$<1,0 \times 10^4$	$3,3 \times 10^6$
<i>Lactobacillus</i> *	Águas	$2,8 \times 10^5$	$8,3 \times 10^4$	$9,7 \times 10^5$	$1,1 \times 10^6$	$6,2 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$	$2,2 \times 10^6$	$4,1 \times 10^5$
	Seca	$1,6 \times 10^6$	$5,3 \times 10^8$	$1,3 \times 10^5$	$2,4 \times 10^6$	$2,8 \times 10^4$	$2,4 \times 10^7$	$5,8 \times 10^6$	$2,6 \times 10^6$
<i>Leuconostoc</i> *	Águas	$1,1 \times 10^6$	$2,6 \times 10^5$	$6,9 \times 10^5$	$9,0 \times 10^6$	$5,8 \times 10^6$	$2,8 \times 10^4$	$9,5 \times 10^5$	$1,7 \times 10^6$
	Seca	$1,9 \times 10^6$	$5,9 \times 10^6$	$1,9 \times 10^5$	$1,9 \times 10^5$	$3,1 \times 10^4$	$1,9 \times 10^7$	$3,7 \times 10^7$	$5,7 \times 10^6$

\* Em UFC.mL<sup>-1</sup>

**Apêndice E.** Resultado da identificação da microbiota leveduriforme pela metodologia tradicional e pelo *kit* API® 20 C AUX.

<b>Código</b>	<b>Método Tradicional</b>	<b>API® 20 C AUX</b>	<b>Código</b>	<b>Método Tradicional</b>	<b>API® 20 C AUX</b>
<b>A1-1</b>	<i>D. hansenii</i>	<i>C. famata</i>	<b>A7-4</b>	<i>Kl. lactis</i>	<i>C. sphaerica</i>
<b>A1-2</b>	<i>D. hansenii</i>	<i>C. famata</i>	<b>A7-5</b>	<i>T. delbruekii</i>	<i>C. colliculosa</i>
<b>A1-3</b>	<i>D. hansenii</i>	<i>C. famata</i>	<b>A7-6</b>	<i>Kl. lactis</i>	<i>C. sphaerica</i>
<b>A1-4</b>	<i>D. hansenii</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<b>A7-7</b>	<i>T. delbruekii</i>	<i>C. colliculosa</i>
<b>A1-5</b>	<i>D. hansenii</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<b>A7-8</b>	<i>Kl. lactis</i>	<i>C. sphaerica</i>
<b>A2-1</b>	<i>D. hansenii</i>	<i>C. famata</i>	<b>A7-9</b>	<i>Kl. lactis</i>	<i>C. sphaerica</i>
<b>A2-2</b>	<i>D. hansenii</i>	<i>C. famata</i>	<b>A8-1</b>	<i>K. ohmeri</i>	<i>K. ohmeri</i>
<b>A2-3</b>	<i>D. hansenii</i>	<i>C. famata</i>	<b>A8-2</b>	<i>K. ohmeri</i>	<i>K. ohmeri</i>
<b>A2-4</b>	<i>D. hansenii</i>	<i>C. famata</i>	<b>A8-3</b>	<i>T. delbruekii</i>	<i>C. colliculosa</i>
<b>A2-5</b>	<i>D. hansenii</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<b>A8-4</b>	<i>D. hansenii</i>	<i>C. famata</i>
<b>A2-6</b>	<i>D. hansenii</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<b>A8-5</b>	<i>D. hansenii</i>	<i>C. parapsilosis</i>
<b>A2-7</b>	<i>D. hansenii</i>	<i>C. famata</i>	<b>A8-6</b>	<i>K. ohmeri</i>	<i>K. ohmeri</i>
<b>A2-8</b>	<i>D. hansenii</i>	<i>C. famata</i>	<b>A8-7</b>	<i>K. ohmeri</i>	<i>K. ohmeri</i>
<b>A2-9</b>	<i>D. hansenii</i>	<i>C. famata</i>	<b>S1-1</b>	<i>Kl. lactis</i>	<i>C. sphaerica</i>
<b>A2-10</b>	<i>D. hansenii</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<b>S1-2</b>	<i>Kl. lactis</i>	<i>C. sphaerica</i>
<b>A2-11</b>	<i>D. hansenii</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<b>S1-3</b>	<i>Kl. lactis</i>	<i>C. sphaerica</i>
<b>A2-12</b>	<i>D. hansenii</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<b>S1-4</b>	<i>Kl. lactis</i>	<i>C. sphaerica</i>
<b>A2-13</b>	<i>D. hansenii</i>	<i>C. famata</i>	<b>S1-5</b>	<i>Kl. lactis</i>	<i>C. sphaerica</i>
<b>A2-14</b>	<i>D. hansenii</i>	<i>C. famata</i>	<b>S2-1</b>	<i>Kl. lactis</i>	<i>C. sphaerica</i>
<b>A2-15</b>	<i>D. hansenii</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<b>S2-3</b>	<i>K. ohmeri</i>	<i>K. ohmeri</i>
<b>A2-16</b>	<i>D. hansenii</i>	<i>Cr. laurentii</i>	<b>S2-4</b>	<i>Kl. lactis</i>	<i>C. sphaerica</i>
<b>A2-17</b>	<i>D. hansenii</i>	<i>C. famata</i>	<b>S2-5</b>	<i>K. ohmeri</i>	<i>K. ohmeri</i>
<b>A2-18</b>	<i>D. hansenii</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<b>S2-6</b>	<i>C. kefir</i>	<i>C. kefir</i>
<b>A2-19</b>	<i>D. hansenii</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<b>S2-7</b>	<i>Kl. lactis</i>	<i>C. sphaerica</i>
<b>A2-20</b>	<i>D. hansenii</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<b>S2-8</b>	<i>K. ohmeri</i>	<i>K. ohmeri</i>
<b>A2-21</b>	<i>D. hansenii</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<b>S2-9</b>	NA	<i>C. guilliermondii</i>
<b>A3-1</b>	<i>Kl. lactis</i>	<i>C. sphaerica</i>	<b>S2-10</b>	<i>Kl. lactis</i>	<i>C. sphaerica</i>
<b>A3-2</b>	<i>C. kefir</i>	<i>C. kefir</i>	<b>S3-1</b>	<i>D. hansenii</i>	<i>C. famata</i>
<b>A3-3</b>	<i>Kl. lactis</i>	<i>C. sphaerica</i>	<b>S3-2</b>	<i>Kl. lactis</i>	<i>C. sphaerica</i>
<b>A3-4</b>	<i>Kl. lactis</i>	<i>C. sphaerica</i>	<b>S3-3</b>	<i>Kl. lactis</i>	<i>C. sphaerica</i>
<b>A3-5</b>	<i>Kl. lactis</i>	<i>C. sphaerica</i>	<b>S4-1</b>	<i>C. kefir</i>	<i>C. kefir</i>
<b>A3-6</b>	<i>Kl. lactis</i>	<i>C. sphaerica</i>	<b>S4-2</b>	<i>Kl. lactis</i>	<i>C. sphaerica</i>

<b>A3-7</b>	<i>Kl. lactis</i>	<i>C. sphaerica</i>	<b>S4-3</b>	<i>C. kefyr</i>	<i>C. kefyr</i>
<b>A4-1</b>	<i>T. delbruekii</i>	<i>C. colliculosa</i>	<b>S5-1</b>	<i>T. delbruekii</i>	<i>C. colliculosa</i>
<b>A4-2</b>	<i>T. delbruekii</i>	<i>C. colliculosa</i>	<b>S5-2</b>	<i>C. zeylanoides</i>	<i>C. zeylanoides</i>
<b>A4-3</b>	<i>T. delbruekii</i>	<i>C. colliculosa</i>	<b>S5-3</b>	<i>Kl. lactis</i>	<i>C. sphaerica</i>
<b>A4-4</b>	<i>T. delbruekii</i>	<i>C. colliculosa</i>	<b>S6-1</b>	<i>T. delbruekii</i>	<i>C. colliculosa</i>
<b>A4-5</b>	<i>C. zeylanoides</i>	<i>C. zeylanoides</i>	<b>S6-2</b>	<i>T. delbruekii</i>	<i>C. colliculosa</i>
<b>A4-6</b>	<i>T. delbruekii</i>	<i>C. colliculosa</i>	<b>S6-3</b>	<i>T. delbruekii</i>	<i>C. colliculosa</i>
<b>A4-7</b>	<i>T. delbruekii</i>	<i>C. colliculosa</i>	<b>S6-4</b>	<i>T. delbruekii</i>	<i>C. colliculosa</i>
<b>A5-1</b>	<i>T. delbruekii</i>	<i>C. colliculosa</i>	<b>S6-5</b>	<i>Kl. lactis</i>	<i>C. sphaerica</i>
<b>A5-2</b>	<i>T. delbruekii</i>	<i>C. colliculosa</i>	<b>S6-6</b>	<i>T. delbruekii</i>	<i>C. colliculosa</i>
<b>A5-3</b>	<i>T. delbruekii</i>	<i>C. colliculosa</i>	<b>S6-7</b>	<i>T. delbruekii</i>	<i>C. colliculosa</i>
<b>A5-4</b>	<i>T. delbruekii</i>	<i>C. colliculosa</i>	<b>S6-8</b>	<i>T. delbruekii</i>	<i>C. colliculosa</i>
<b>A5-5</b>	<i>T. delbruekii</i>	<i>C. colliculosa</i>	<b>S6-9</b>	<i>T. delbruekii</i>	<i>C. colliculosa</i>
<b>A5-6</b>	<i>T. delbruekii</i>	<i>C. colliculosa</i>	<b>S6-10</b>	<i>T. delbruekii</i>	<i>C. colliculosa</i>
<b>A5-7</b>	<i>T. delbruekii</i>	<i>C. colliculosa</i>	<b>S7-1</b>	<i>T. delbruekii</i>	<i>C. colliculosa</i>
<b>A5-8</b>	<i>T. delbruekii</i>	<i>C. colliculosa</i>	<b>S7-2</b>	<i>T. delbruekii</i>	<i>C. colliculosa</i>
<b>A5-9</b>	<i>T. delbruekii</i>	<i>C. colliculosa</i>	<b>S7-3</b>	<i>Kl. lactis</i>	<i>C. sphaerica</i>
<b>A6-1</b>	<i>T. delbruekii</i>	<i>C. colliculosa</i>	<b>S7-4</b>	<i>T. delbruekii</i>	<i>C. colliculosa</i>
<b>A6-2</b>	<i>T. delbruekii</i>	<i>C. colliculosa</i>	<b>S7-5</b>	<i>Kl. lactis</i>	<i>S. cerevisiae</i>
<b>A6-3</b>	<i>T. delbruekii</i>	<i>C. colliculosa</i>	<b>S7-6</b>	<i>Kl. lactis</i>	<i>C. sphaerica</i>
<b>A6-4</b>	<i>T. delbruekii</i>	<i>C. colliculosa</i>	<b>S7-7</b>	NA	<i>G. capitatum</i>
<b>A6-5</b>	<i>T. delbruekii</i>	<i>C. colliculosa</i>	<b>S7-8</b>	<i>Kl. lactis</i>	<i>C. sphaerica</i>
<b>A6-6</b>	NA	<i>C. famata</i>	<b>S7-9</b>	<i>C. kefyr</i>	<i>C. kefyr</i>
<b>A6-7</b>	<i>T. delbruekii</i>	<i>C. colliculosa</i>	<b>S7-10</b>	<i>T. delbruekii</i>	<i>C. colliculosa</i>
<b>A7-1</b>	<i>Kl. lactis</i>	<i>C. sphaerica</i>	<b>S8-1</b>	<i>Kl. lactis</i>	<i>C. sphaerica</i>
<b>A7-2</b>	<i>Kl. lactis</i>	<i>C. sphaerica</i>	<b>S8-2</b>	<i>Kl. lactis</i>	<i>C. sphaerica</i>
<b>A7-3</b>	<i>Kl. lactis</i>	<i>C. sphaerica</i>	<b>S8-3</b>	<i>Kl. lactis</i>	<i>C. sphaerica</i>

NA – não avaliado