

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
NÍVEL MESTRADO ACADÊMICO**

**JANAÍNA SCHUELER**

**PRODUÇÃO DE ENTEROCINA EM SORO DE LEITE PARCIALMENTE  
DESMINERALIZADO E ÁGUA DE MACERAÇÃO DE MILHO**

**DISSERTAÇÃO**

**CAMPO MOURÃO**

**2018**

**JANAÍNA SCHUELER**

**PRODUÇÃO DE ENTEROCINA EM SORO DE LEITE PARCIALMENTE  
DESMINERALIZADO E ÁGUA DE MACERAÇÃO DE MILHO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, UTFPR, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup>. Luciana Furlaneto Maia.

**CAMPO MOURÃO**

**2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

S385p Schueler, Janaina

Produção de enterocina em soro de leite parcialmente desmineralizado e água de maceração de milho / Janaina Schueler – 2018.

43 f.: il.; 30 cm.

Orientadora: Luciana Furlaneto Maia

Dissertação (Mestrado) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. Campo Mourão, 2018.

Inclui bibliografias.

1. Bacteriocinas. 2. Bactérias 3. Alimentos – Dissertações. I. Maia, Luciana Furlaneto, orient. II. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. IV. Título.

CDD: 664

Biblioteca Câmpus Medianeira  
Marci Lucia Nicodem Fischborn CRB 9/1219



## TERMO DE APROVAÇÃO

### PRODUÇÃO DE ENTEROCINA EM SORO DE LEITE PARCIALMENTE DESMINERALIZADO E ÁGUA DE MACERAÇÃO DE MILHO

Por:

**JANAINA SCHUELER**

Essa dissertação foi apresentada às quatorze horas, do dia nove de fevereiro de dois mil de dezoito, como requisito para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos, Linha de Pesquisa Processos Tecnológicos na Indústria de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos – PPGTA, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelas professoras abaixo assinadas. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

---

Profa. Dra. Luciana Furlaneto Maia (Orientador - PPGTA)

---

Profa. Dra. Marcia Cristina Furlaneto (Membro Externo - UEL)

---

Profa. Dra. Wilma Aparecida Spinosa (Membro Externo - UEL)

A via original com as assinaturas encontra-se na secretaria do programa.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, por estar sempre ao meu lado guiando e iluminando meus passos.

Queria e agradecer aos meus pais, Gilberto e Neiva Schueler, por tudo que me ensinaram de mais precioso neste mundo e que me deixarão as heranças mais valiosas da vida, o amor, os estudos, a educação, a família, o respeito e por acreditarem sempre no meu potencial e nos meus sonhos.

Ao meu esposo Adriano, pelo amor, incentivo, companheirismo e suporte emocional.

Queria agradecer aos membros da Banca Dra. Marcia Cristina Furlaneto e Dra. Wilma Aparecida Spinosa, que foram muito atenciosas e aceitaram participar como membros avaliadores da minha banca de dissertação, fazendo com que eu tenha a oportunidade que compartilhar de seus conhecimentos e ensinamentos, por isso saiba que eu tenho um eterno agradecimento, admiração e respeito pelas senhoras.

Gostaria de agradecer a Kátia Rocha Real, que me ensinou a enxergar todos os detalhes mais importantes, com sua dedicação e respeito pela Universidade e o trabalho, sabendo ser amiga e orientar, conversar e ouvir, paciente e auxiliadora.

Agradeço também a equipe de laboratório (Hugo, Geovana, Alisson, Alane)

Por último, porém uma dos mais importantes queria, agradecer imensamente a minha orientadora a professora Dra. Luciana Furlaneto Maia, pela orientação desta pesquisa, ensinamentos e compreensão. Obrigada por estar do meu lado em todos os momentos e por traçar todo o caminho desta dissertação.

## RESUMO

SCHUELER, Janaina. **Produção de enterocina em soro de leite parcialmente desmineralizado e água de maceração de milho**. 2018. 43 f. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão - PR, 2018.

A produção de bacteriocina por Bactérias Ácido Lácticas tem atraído grande atenção por causa do seu status GRAS (*Generally Recognized as Safe*), e seu uso potencial como aditivo seguro para a conservação de alimentos. Em função de suas características antimicrobianas, as bacteriocinas têm sido testadas como bioconservadores em diversos produtos, mostrando atividade contra microrganismos patogênicos. Porém, o elevado custo de produção ainda tem sido um fator relevante para ampla utilização deste tipo de conservante. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade da produção de enterocinas, utilizando soro de leite parcialmente desmineralizado e água de maceração de milho (milhocina) como substrato. Foram avaliados 5 isolados de enterococos (Efm20, Efm22, Efm24, Efm25 e Efs27) produtores de enterocina em meio MRS frente a bactéria *Listeria innocua* CLIP 12612 e *Listeria monocytogenes* 2032. O meio de cultura MRS foi substituído na concentração de 25% por soro de leite ou milhocina. O ensaio da ação da enterocina foi realizado pelo método de difusão em poços. O caráter proteico da bacteriocina foi confirmado após incubação com enzimas proteolíticas  $\alpha$ -quimiotripsina, protease e proteinase-K. A produção de peróxido de hidrogênio e ácido láctico foram descartadas pela utilização de catalase e neutralização com NaOH. O sobrenadante livre de células (CFS) obtido em ambos substratos foram tratados a 80 °C e 100 °C, apresentando termoestabilidade. Os CFS obtidos em MRS com milhocina pelo isolado Efm22 (24 horas) atingiu 6400 UA/mL frente às duas bactérias indicadoras. Já os isolados Efm24 (24 horas) e Efm20 (18 horas) chegaram a 6400 UA/mL frente a *Listeria innocua* CLIP 12612. Em soro de leite, os maiores valores de UA/mL ocorreram pelos isolados Efm20, Efm25 e Efs27 (24 horas). Em conclusão, constatou-se que os substratos testados apresentam potencial para serem aplicados na fabricação de bioconservantes de produtos alimentícios.

**Palavra-chave:** bacteriocinas, *Enterococcus*, bactéria ácido láctica.

## ABSTRATC

SCHUELER, Janaina. **Production of enterocin in partially demineralized whey and corn steep liquor**. 2018. 43 f. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão - PR, 2018.

The production of bacteriocin by Lactic Acid Bacteria has attracted great attention because of its GRAS (Generally Recognized as Safe) status, and its potential use as a safe additive for food preservation. Due to their antimicrobial characteristics, bacteriocins have been tested as bioconservatives in several products, showing activity against pathogenic microorganisms. However, the high cost of production has still been a relevant factor for the wide use of this type of preservative. Therefore, the objective of this work was to evaluate the viability of enterocin production using partially demineralized whey and corn steep liquor as substrate. Five *Enterococcus* isolates (Efm20, Efm22, Efm24, Efm25 and Efs27) were tested on MRS medium against *Listeria innocua* CLIP 12612 bacterium and *Listeria monocytogenes* 2032. The MRS culture medium was replaced at 25% concentration by whey or corn steep liquor. The assay of the action of enterocin was performed by the well diffusion method. The proteinic character of bacteriocina was confirmed after incubation with proteolytic enzymes  $\alpha$ -chymotrypsin, protease and proteinase-K. The production of hydrogen peroxide and lactic acid were discarded by the use of catalase and neutralization with NaOH. The cell free supernatant (CFS) obtained on both substrates were treated at 80 ° C and 100 ° C, exhibiting thermostability. The CFS obtained in MRS with corn steep liquor by the Efm22 isolate (24 hours) reached 6400 AU / mL against the two indicator bacteria. On the other hand, the isolates Efm24 (24 hours) and Efm20 (18 hours) reached 6400 AU / mL compared to *Listeria innocua* CLIP 12612. In whey, the highest values of UA / mL occurred with the isolates Efm20, Efm25 and Efs27 (24 hours). In conclusion, it was verified that the substrates tested have potential to be applied in the manufacture of food product bioconservants.

**Key words:** bacteriocins, *Enterococcus*, lactic acid bacteria.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Classificações cronológicas de bacteriocinas ..... 18

Figura 2 - Representação do mecanismo de ação de bacteriocinas. a) Inibição de bactérias Gram-positivas; b) Inibição de bactérias Gram-negativas. .... 19

Figura 3 - Unidade arbitrária (UA/mL) da enterocina nos diferentes substratos após 18 horas e 24 de inoculação, frente a *L innocua* (A) e *L monocytogenes* (B). ..... 30



## LISTA DE TABELA

Tabela 1- Aplicação de bacteriocinas na bioconservação de alimentos. ....	17
Tabela 2 - Contagem de UFC nos tempos 18 e 24 horas de incubação nos substratos milhocina e soro de leite. ....	26
Tabela 3 - Halo de inibição da atividade do CFS obtido nos tempos (18 e 24 horas) em diferentes substratos contra <i>Listeria monocytogenes</i> e <i>Listeria innocua</i> . ....	27
Tabela 4 - Inibição do crescimento de <i>Listeria innocua</i> após tratamento enzimático de CFS obtidos em 18 e 24 horas de incubação. ....	28
Tabela 5 - Atividade antimicrobiana dos sobrenadantes de cultivo de enterococos em diferentes substratos ao tratamento 80°C por 10 minutos e 100°C por 20 minutos frente a <i>L. innocua</i> . ....	29

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>BAL</b>	Bactérias ácido lácticas;
<b>BHI</b>	Brain Heart Infusion Broth;
<b>CFS</b>	Sobrenadante livre de células;
<b>Da</b>	Dalton;
<b>DBO</b>	Demanda Bioquímica de Oxigênio;
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico;
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration (Administração de comidas e remédios);
<b>g</b>	Grama;
<b>GRAS</b>	Generally Recognized as Safe (Geralmente reconhecido como seguro);
<b>h</b>	Hora;
<b>kDa</b>	kiloDalton;
<b>L</b>	Litro;
<b>mg</b>	Miligrama;
<b>mL</b>	Mililitro;
<b>mm</b>	Milímetro;
<b>m/v</b>	massa por volume;
<b>MRS</b>	Man, Rogosa e Sharpe;
<b>N</b>	Normal;
<b>NaCl</b>	Cloreto de sódio;
<b>NaOH</b>	Hidróxido de Sódio;
<b>pH</b>	Potencial Hidrogênio iônico;
<b>RNA</b>	Ácido Ribonucleico;
<b>rpm</b>	Rotação por minuto;
<b>UA</b>	Unidades arbitrária;
<b>UFC</b>	Unidade Formadora de Colônia;
<b>v</b>	Volume;
<b>v/v</b>	Volume por volume;
<b>µm</b>	Micrómetro;
<b>µL</b>	Microlitro;
<b>° C</b>	Grau Celsius;
<b>%</b>	Porcentagem.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2. OBJETIVO .....</b>	<b>13</b>
2.1 Objetivo geral .....	13
2.2 Objetivo específico .....	13
<b>3. REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>14</b>
3.1 Características gerais do <i>Enterococcus spp.</i> .....	14
3.2 Bacteriocinas.....	15
3.2.1 Classificação e mecanismo de ação das bacteriocinas.....	17
3.3 Caracterização do substrato para produção de bacteriocina .....	20
3.3.1 Soro de leite .....	20
3.3.2 Milhocina .....	21
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>23</b>
4.1 Linhagens bacterianas .....	23
4.2 Produção de enterocina em soro de leite e milhocina .....	23
4.3 Obtenção do sobrenadante livre de células (CFS) e contagem de células.....	23
4.4 Ensaio da atividade antagônica.....	24
4.5 Sensibilidade a enzimas proteolíticas e ao tratamento térmico .....	24
4.6 Quantificação da atividade bacteriocinogênica .....	24
4.7 Análise estatística.....	25
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>26</b>
5.1 Produção de enterocina em substrato milhocina e soro de leite .....	26
5.2 Efeito do tratamento enzimático e estabilidade térmica na atividade antagônica do CFS.....	27
5.3 Quantificação da atividade bacteriocinogênica .....	29
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>30</b>
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>34</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>35</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Bacteriocinas são peptídeos sintetizados nos ribossomos que inibem o crescimento de muitas bactérias Gram-positivas, incluindo vários agentes patogênicos como a *Listeria monocytogenes* (GHRAIRI et al., 2008). Acredita-se que a produção da bacteriocina esteja relacionada a um mecanismo de defesa de algumas bactérias, no qual inclui-se o grupo de Bactérias Ácido Lácticas (BAL) (GHRAIRI et al., 2008; OZDEMIR et al., 2011).

A produção de bacteriocina por BAL tem atraído grande atenção por causa do seu status GRAS e seu uso potencial como aditivo seguro para a conservação de alimentos (DIOP et al., 2007). O gênero *Enterococcus*, pertence ao grupo BAL cujas características são: bactérias Gram-positivas, catalase negativas, anaeróbias facultativas, produtoras de ácido láctico, podendo ser isolados de alimentos, água, nascente, solo, animais e vegetais (GHRAIRI et al., 2008; OZDEMIR et al., 2011; GALVEZ et al., 2011; WILLIAMS; CHANOS, 2012; SANTOS et al., 2014).

As bacteriocinas podem ser utilizadas nos alimentos de duas formas: pela inoculação do isolado bacteriocinogênico como uma cultura bioprotetora; ou pela adição de bacteriocina produzida e concentrada. Neste último caso, é importante encontrar um substrato de crescimento de qualidade alimentar para que a cepa bacteriocinogênica produza bacteriocina (ANANOU et al., 2008).

A utilização de subprodutos da indústria pode apresentar-se como uma alternativa para diminuir o custo da produção da enterocina. Subprodutos são resíduos gerados do processamento industrial (MENEGUETTI; DOMINGUES, 2008).

Pelo disposto acima e enfatizando a crescente utilização de bacteriocinas na conservação de alimentos, objetivou-se avaliar a viabilidade da produção de enterocinas, utilizando os subprodutos agroindustriais soro de leite parcialmente desmineralizado e milhocina como substrato.

## **2. OBJETIVO**

### **2.1 Objetivo geral**

Produzir enterocinas utilizando meio de cultura resultante de subproduto industrial.

### **2.2 Objetivo específico**

- Verificar a produção de enterocina a partir do cultivo dos microrganismos utilizando os substratos água de maceração de milho e soro de leite, em substituição ao meio MRS;
- Avaliar a estabilidade térmica da enterocina em diferentes temperaturas;
- Confirmar a constituição proteica da enterocina produzida nos dois substratos através de tratamento enzimático;
- Quantificar a atividade bacteriocinogênica através do teste de diluição seriada;

### 3. REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Características gerais do *Enterococcus spp.*

*Enterococcus* são bactérias Gram-positivas em forma de cocos que podem ocorrer isolados, aos pares ou em cadeias curtas, cujo principal produto do metabolismo fermentativo da glicose é o ácido láctico, por isso são pertencentes a um grupo de microrganismos conhecido como bactérias ácido láctico (BAL). São homofermentativos, sendo capazes de fermentar uma variedade de carboidratos incluindo a sacarose, L-arabinose, sorbose, dentre outros (FRANZ et al., 2007). São bactérias anaeróbias facultativas, catalase negativas, oxidase negativas, hidrolisam a esculina na presença de 40 % de sais biliares. A temperatura ótima de crescimento situa-se entre 35 °C a 37 °C, no entanto, podem crescer a temperaturas de 10 °C e 45 °C. É uma característica deste gênero a capacidade de sobreviver a várias condições ambientais adversas, tais como, elevadas concentrações salinas, como 6,5 % (p/v) de cloreto de sódio; valores extremos de pH (4 a 9,6) e elevadas temperaturas, sendo capazes de sobreviver a 60 °C durante 30 minutos (MORRISON; WOODFORD; COOKSON, 1997; MARTÍN-PLATERO et al., 2009; FOULQUIÉ-MORENO et al., 2006, revisado por FISHER; PHILIPS, 2009).

São conhecidas 57 espécies de enterococos, e 2 subespécies citadas em periódicos: *E. alcedinis*, *E. aquimarinus*, *E. asini*, *E. avium*, *E. bulliens*, *E. caccae*, *E. camalliae*, *E. canintestini*, *E. canis*, *E. casseliflavus*, *E. cecorum*, *E. columbae*, *E. crotali*, *E. devriesei*, *E. diestrammenae*, *E. dispar*, *E. durans*, *E. eurekensis*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. flavescens*, *E. gallinarum*, *E. gilvus*, *E. haemoperoxidus*, *E. hermanniensis*, *E. hirae*, *E. italicus*, *E. lactis*, *E. lemanii*, *E. malodoratus*, *E. moraviensis*, *E. munditi*, *E. olivae*, *E. pallens*, *E. phoeniculicola*, *E. plantarum*, *E. porcinus*, *E. pseudoavium*, *E. quebecensis*, *E. raffinosus*, *E. ratti*, *E. rivorum*, *E. rotai*, *E. saccharolyticus*, *E. saccharolyticus* sub sp. *saccharolyticus*, *E. saccharolyticus* sub sp. *taiwanensis*, *E. saccharominimus*, *E. saigonensis*, *E. seriolicida*, *E. silesiacus*, *E. solitarius*, *E. sulfureus*, *E. termitis*, *E. thailandicus*, *E. ureasiticus*, *E. ureilyticus*, *E. viikkiensis*, *E. villorum*, *E. xiangfangensis* (LPSN, 2018).

Enterococos constituem a microbiota do trato gastrointestinal de humanos e animais, podendo também colonizar a cavidade oral, o sistema gênito-urinário e a pele (SOOD et al., 2008). Também são encontrados colonizando outros nichos como solo, água, plantas e alimentos (EATON; GASSON, 2001; GIRRAFA, 2002; STROMPFOVA et al., 2008; SANTOS et al., 2014). Alguns são quase exclusivamente de origem agrícola ou veterinária (LEVISON; MALLELA, 2000).

Devido a suas características fisiológicas, os enterococos podem sobreviver em vários sistemas alimentares (SANTOS et al., 2014). Na indústria de alimentos podem ser utilizados como culturas “starter” na fabricação de queijos e salames (GIRAFFA, 2003), apresentando um papel importante na maturação de queijos, conferindo características de sabor e aroma (GIRAFFA, 2003; FOULQUIÉ-MORENO et al., 2006; KHAN; FLINT; YU, 2010).

Ainda, os enterococos são conhecidos produtores de peptídeos antimicrobianos (enterocinas). As enterocinas despertam interesse pelo seu potencial como biopreservadores de alimentos (STROMPFOVA et al., 2008).

### **3.2 Bacteriocinas**

As bacteriocinas são definidas como peptídeos produzidos por bactérias com atividade bactericida ou bacteriostática, que podem inibir ou eliminar o crescimento de espécies relacionadas (EIJSSINK et al., 2002). Tais substâncias podem ser produzidas por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, diferindo-se em termos de tamanho, alvo microbiano, modo de ação, liberação, e mecanismos de imunidade. Embora haja um entendimento básico de suas estruturas, funções, biossíntese e modo de ação, muitos aspectos destes compostos ainda são desconhecidos (GILLOR; VRIEZEN; RILEY, 2008).

Em relação às bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-positivas, as típicas de BAL são, termoestáveis e de espectro antibacteriano restrito, porém outras bacteriocinas possuem amplo espectro antibacteriano, portanto, podem inibir o crescimento de bactérias patogênicas Gram-positivas, leveduras, e também de algumas espécies de bactérias Gram-negativas (DIOP et al., 2007).

Ozdemir et al. (2011) apontaram que não há correlação entre a origem dos isolados e o seu espectro inibitório.

A produção de bacteriocinas ocorre em todas as fases de crescimento da bactéria produtora e cessa no final da fase exponencial, não sendo considerados metabolitos secundários (SAVADOGO et al., 2006; RILEY, 2011).

Varias condições ambientais podem induzir, ou afetar a produção das bacteriocinas, o que muitas vezes ocorre em condições de estresse, como o aumento populacional e a escassez de nutrientes, podendo ser afetada pelo tipo de fonte de carbono, nitrogênio e fosfato presentes no meio, temperatura, aeração, tempo de incubação ou até mesmo por cátions surfactantes e outros inibidores (LEWUS; MONTVILLE, 1991; SAVADOGO et al., 2006; RILEY, 2011).

Acredita-se que a produção da bacteriocina esteja relacionada aos mecanismos de defesa de algumas bactérias, conferindo a bactéria produtora imunidade (COOTER; HILL; ROSS, 2005).

O exemplo mais conhecido de bacteriocina é a nisina, descoberta em 1928, a qual é produzida por cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, sendo aprovada em 1988 pela *Food and Drug Administration* (FDA), recebendo a denominação de *Generally Recognized as Safe* (GRAS), sendo sua utilização testada (Tabela 1) e permitida para muitos alimentos processados (GALVEZ et al., 2008).

Diversas espécies de BAL já foram testadas quanto ao seu potencial de produção de bacteriocinas, tais como *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. mundtii*, *Lactobacillus* sp., *Lactococcus* sp., *Pediococcus* sp., *Carnobacterium piscícola*, entre outras (CLEVELAND et al., 2001; DIOP et al., 2007; GALVEZ et al., 2011; DHEWA, 2012). Bacteriocinas produzidas por BAL apresentam grande aspecto como bioconservantes de alimento (GALVEZ et al., 2011).

A aplicação das bacteriocinas no biocontrole de alimentos pode se dar de duas formas: 1) o uso da própria célula produtora de bacteriocina ou 2) bacteriocinas, sintéticas ou purificada, de um sobrenadante de cultura da cepa produtora (HUGAS et al., 2003; SIMHA et al., 2012).



**Tabela 1-** Aplicação de bacteriocinas na bioconservação de alimentos.

Bacteriocina	Bacteria alvo	Produto	Referência
Nisina	<i>Brochothrix thermosphacta</i>	Carne suína	Nattress, Yost, Baker, (2001)
Nisina	<i>Listeria monocytogenes</i>	Leite fermentado	Benkerroum et al. (2002)
Pediocina	<i>Listeria monocytogenes</i>	Queijo	Loessner et al. (2003)
Enterocina	<i>Listeria monocytogenes</i>	Leite	Elotmani et al. (2002)
Nisina Z	<i>Staphylococcus aureus</i>	Queijo <i>Afuega'l Pitu</i>	Rilla, Martinez, Rodriguez, (2004)
Enterocina	<i>Staphylococcus aureus</i>	Salsicha	Ananou et al. (2005)
Enterocina AS-48	<i>L. monocytogenes, Bacillus cereus e Saccharomyces. Aureus</i>	Sucos naturais de vegetais e sucos de frutas comerciais	Grande et al. (2005)
Enterocina AS-48	<i>L. monocytogenes e S. aureus</i>	Presunto cozido	Ananou et al. (2010)
Nisina	<i>L. monocytogenes</i>	Presunto de peru	Ruiz et al. (2010)
Bacteriocina HKT-9	<i>Aeromonas hydrophilia e S. aureus</i>	Vegetais	Kumar et al. (2012)
BLS 34 de <i>Bacillus</i> sp. P34	<i>L. monocytogenes</i>	Salsicha de frango	Sant'Anna et al. (2014)

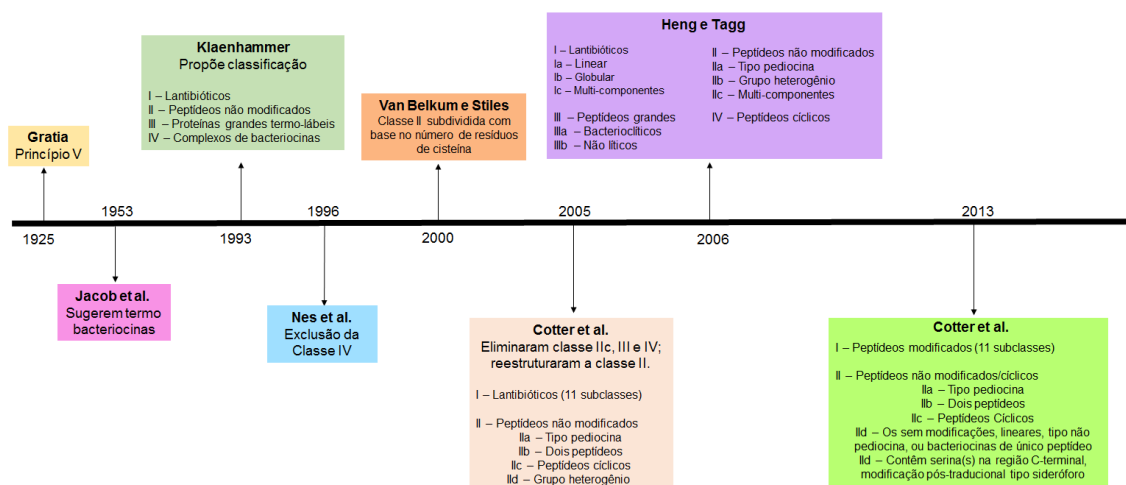
**Fonte:** Produção do próprio autor.

### 3.2.1 Classificação e mecanismo de ação das bacteriocinas

Os primeiros registros observados sobre bacteriocinas datam do ano de 1925. Desde então, a classificação das bacteriocinas ainda é bastante controversa, sendo comum duas designações para a mesma bacteriocina, dependendo do autor.

Uma classificação simplificada de bacteriocinas foi sugerida por Cotter et al. (2005), dividindo em três grupos principais: Classe I, os lantibióticos (bacteriocinas que contêm lantionina); Classe II, os não lantibióticos (bacteriocinas que não contêm lantionina); e Classe III, as bacteriolisinas (peptídeos líticos). A Classe IV (bacteriocinas com porções não proteicas) não foi incluída nesta classificação (Figura 1).

**Figura 1** - Classificações cronológicas de bacteriocinas



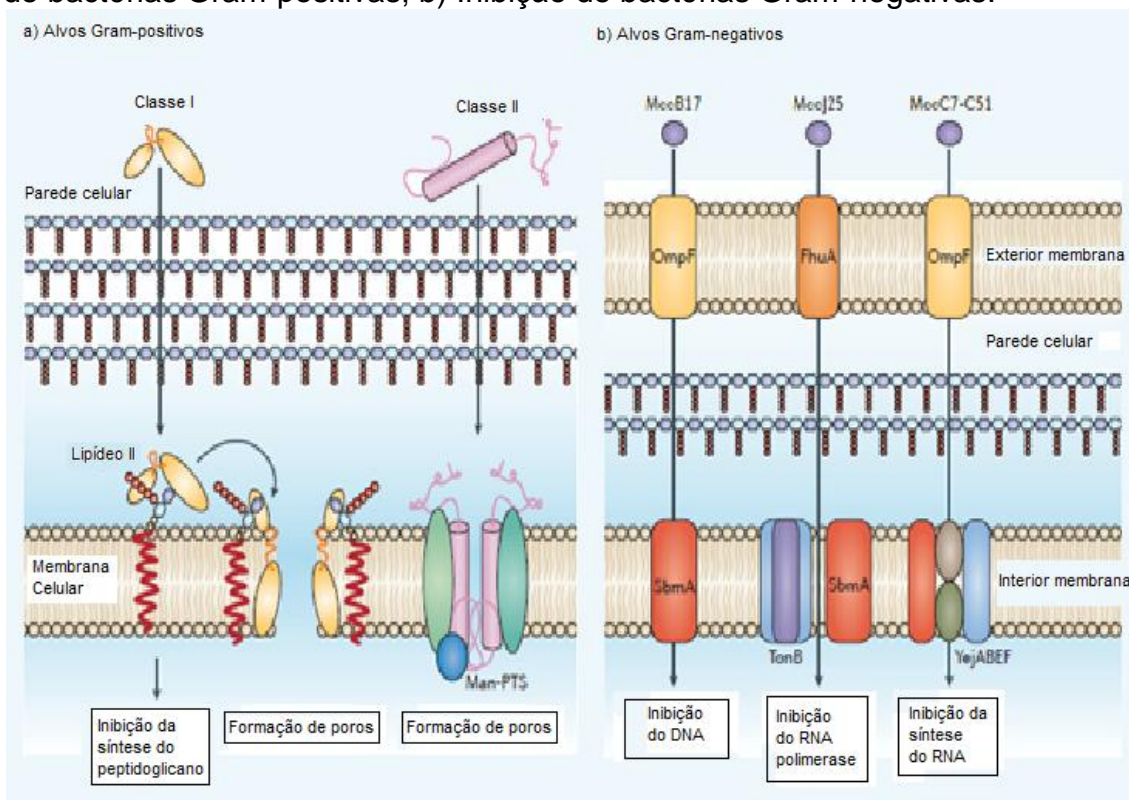
Fonte: (OGAKI; FURLANETO; MAIA, 2015).

Devido aos seus efeitos antimicrobianos, frequentemente as bacteriocinas são confundidas como antibióticos, podendo inviabilizar seu uso em alimentos. Duas características principais as distinguem dos antibióticos: o fato de serem sintetizadas nos ribossomos e por possuírem um espectro bactericida relativamente restrito (HURST, 1981; GILLOR; VRIEZEN; RILEY, 2008). Além destas, apresentam outras diferenças em relação aos antibióticos quanto à síntese, ao modo de ação, ao espectro antimicrobiano, à toxicidade e aos mecanismos de resistência.

As enterocinas são geralmente de baixo peso molecular, que entram nas células alvo através da ligação a receptores de superfície celular, são catiônicas e exibem características anfipáticas, em geral seu mecanismo de ação inclui a formação de poros na membrana e a inibição da síntese peptidoglicano (COOTER; HILL; ROSS, 2005).

Cooter, Ross, Hill (2013) dividem os mecanismos de ação das bacteriocinas em: aqueles que funcionam principalmente na parede celular e aqueles que são ativos no interior da célula, afetando a expressão gênica e a produção de proteínas. Na figura 2 estão apresentados os mecanismos de ação das bacteriocinas perante microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos.

**Figura 2** - Representação do mecanismo de ação de bacteriocinas. a) Inibição de bactérias Gram-positivas; b) Inibição de bactérias Gram-negativas.



**Fonte:** Adaptado de COOTER; ROSS; HILL, 2013

No mecanismo que envolve a parede celular, embora a formação de poros seja uma característica geral, o tamanho, a estabilidade e condutividade desses poros, diferem consideravelmente entre as bacteriocinas (HERRANZ et al., 2001). Para formar poros a bacteriocina tem que interagir com a membrana alvo. Esse processo é em parte governado por interações eletrostáticas entre cargas positivas de peptídeos e lipídios aniônicos presentes em grande quantidade na membrana de bactérias Gram-positivas. A ligação da bacteriocina na membrana pode ser afetada por fatores como potencial de membrana da célula alvo e o pH. O potencial de membrana supostamente aumenta a inserção da bacteriocina na membrana e também pode afetar a associação das moléculas de bacteriocinas (EIJSINK et al., 2002).

Bacteriocinas que agem no interior da célula podem matar suas células-alvo interferindo com o DNA, RNA e metabolismo de proteínas (COOTER; ROSS; HILL, 2013).

A capacidade de inibição das bacteriocinas é bastante variada. Em geral, as bacteriocinas de classe I, incluindo lantibióticos e tiopeptídeos, são

mais ativas contra agentes patogênicos Gram-positivos, no entanto, algumas bacteriocinas exibem atividade contra microrganismos Gram-negativos (KUWANO et al., 2005; COOTER; ROSS; HILL, 2013).

Bactérias Gram-negativas são mais resistentes a ação das bacteriocinas. Estes microrganismos possuem uma barreira adicional, a membrana externa, que é impermeável à grande maioria das moléculas, porém a presença de poros permite a difusão das moléculas com massa molecular menor de 600 Da. As bacteriocinas produzidas por BAL possuem tamanho médio de 3 kDa, muito grandes para atravessar a membrana (ABEE; KROCKEL; HILL, 1995).

### **3.3 Caracterização do substrato para produção de bacteriocina**

A determinação dos parâmetros ideais para a produção de bacteriocina está entre os pré-requisitos para seu emprego na indústria de alimentos (HERRANZ et al., 2001). López et al. (2007) afirmam que diferentes substratos, a composição do meio e a concentração de nutrientes têm uma grande influência na produção de enterocina, apontando como um dos problemas principais para estudar a eficácia de bacteriocina em alimentos, a preparação de concentrados com atividade suficiente e baratos para o cultivo de cepas produtoras de modo a diminuir os custos de produção de bacteriocina.

Vários pesquisadores têm tentado aperfeiçoar a produção de bacteriocinas tanto em meios de cultura comerciais, quanto em substratos de grau alimentar, tal como leite (ANANOU et al., 2008), soro de leite (ANANOU et al., 2008; GALVEZ et al., 2011) e resíduos de produtos da pesca (VÁZQUEZ; GONZÁLEZ; MURADO, 2006).

#### **3.3.1 Soro de leite**

O soro de leite é considerado o principal subproduto da indústria de laticínios, sendo o líquido remanescente da precipitação da gordura e das caseínas do leite durante a fabricação de queijos e apresenta em sua composição proteínas, lactose e minerais (ALVES et al., 2014).

O soro de leite é considerado um produto de alto valor nutricional por conter aproximadamente 55% dos nutrientes presentes no leite (ALVES et al., 2014). Representa de 80 a 90% do volume total do leite que é utilizado na produção de queijos (NASCIMENTO; MORENO; KUAYE, 2009) sendo grande parte descartada, tornando-se fonte de poluição.

As proteínas do soro possuem um alto valor biológico em comparação a outras fontes de proteínas, consistindo principalmente de lactose (70 a 75%) e proteínas solúveis (10 a 15%), sendo grande fonte de aminoácidos essenciais, contendo níveis elevados de leucina e lisina, além de constituir uma boa fonte de cisteína e metionina (DALLAS, 1999).

Apesar de soro de leite fresco ser um substrato mais econômico, que o soro de leite em pó, sua utilização como substrato para produção de enterocina já foi descartado em outros estudos, devido à sua baixa estabilidade, como resultado da sua elevada carga microbiana (ANANOU, et al., 2008).

O soro de leite em pó parcialmente desmineralizado é produto obtido da fabricação do queijo sem adição de sal, concentrado por meio de membranas de nanofiltração, pasteurizado, concentrado a vácuo e seco através do processo tipo *spray dryer*.

O processo de secagem do soro por *spray dryer* consiste em pulverizar o produto no interior de uma câmara de secagem, na forma de pequenas gotículas, em uma corrente de ar quente para obtenção de um pó em um curto período. Neste processo, os nutrientes são preservados quase que completamente (VALDUGA et al., 2006).

### **3.3.2 Milhocina**

A milhocina é um subproduto que apresenta baixo custo de obtenção e está amplamente disponível, contém elevada quantidade de nitrogênio, aminoácidos, vitaminas, minerais entre outros nutrientes (FONTES et al., 2008), é resultante do processamento do milho por via úmida, sendo considerado um resíduo altamente poluente, caracterizado por elevados valores de Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) (LOSS, et al., 2009).

A composição da água de maceração de milho é muito variável e depende de fatores regionais. Pode ser utilizado como uma fonte de nitrogênio, pois 30% do nitrogênio do milho são encontrados na milhocina, o que pode dar origem a biomassas ricas em proteínas e pobres em polissacarídeos ácidos (LIGGETT; KOFFLER, 1998).

Independente da origem da milhocina sua composição compreende uma mistura de açúcares redutores, dos quais glicose e frutose são predominantes. Constitui uma fonte, equilibrada de carbono, nitrogênio, enxofre, e sais minerais tendo como características físico-químicas pH de 4,1 a 4,5, concentração de nitrogênio total 1026 mg/L e teores de açúcares (glicose) de 1000 mg/L (LOSS, et al., 2009).

Na milhocina os aminoácidos encontram-se em na maior parte na forma de aminoácidos livres, sendo os principais, a prolina, cisteína, ácido aspártico e ácido glutâmico. Em relação aos elementos potássio, fósforo, enxofre, sódio e silício, sua composição depende fortemente dos processos de tratamento do milho (AMARTEY; LEUNG, 2000).

A aplicação da milhocina como fonte de nutrientes tem sido uma alternativa barata, principalmente na substituição da peptona nos métodos de produção microbiológicas em larga escala (RIVAS et al., 2004), incluindo a produção de proteínas recombinantes em *Escherichia coli*, cultura de alta densidade de *Saccharomyces cerevisiae* e produção fermentativa de ácido láctico.

Também, há estudos utilizando a milhocina na produção de biosurfatantes microbianos (LUNA et al., 2008; FONTES et al., 2008) e no complemento alimentar de aves e ruminantes (AMARTEY; LEUNG, 2000).

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Linhagens bacterianas

Neste estudo foram utilizados os isolados de *E. faecium* (Efm20, Efm22, Efm24, Efm25), e *E. faecalis* (Efs27), por apresentam genes produtores de enterocina (Ogaki et al. 2016). As culturas estavam estocadas em BHI (Brain Heart Infusion - Acumedia) com 20% de glicerol à -20 °C. *Listeria innocua* CLIP 12612 e *Listeria monocytogenes* 2032 foram utilizadas como bactérias indicadoras.

### 4.2 Produção de enterocina em soro de leite e milhocina

Foram testados os seguintes substratos/concentração para a produção de enterocinas: substituição do meio caldo MRS (Himedia, Mumbai, India) por 25% (m/v) de soro de leite em pó parcialmente desmineralizado (S) (Sooro, lote:160056DMAT2 ), e por água de maceração de milho (M) (Sigma-Aldrich, lote: MKBS9847V). O caldo MRS foi utilizado como controle.

O cultivo foi realizado em frascos de 250 mL contendo 100 mL de cada substrato a ser testado, separadamente. O inóculo celular foi realizado na concentração de  $10^6$  células/mL, seguido de incubação a 37 °C, sem agitação. Após 18 e 24h de incubação, o CFS foi obtido e determinou-se a atividade antagonista pela técnica do *spot on lawn*.

### 4.3 Obtenção do sobrenadante livre de células (CFS) e contagem de células

A obtenção dos CFS seguiu como descrito por Ogaki et al. (2015). O cultivo celular de 18 e 24 h de incubação foi centrifugado a 10000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante esterilizado por filtração em membrana com poros de 0,22  $\mu\text{m}$  (*Millipore*). O pH do sobrenadante foi ajustado para 6,5 com NaOH 1N, para inibir a ação do ácido láctico, e o sobrenadante também foi tratado com catalase (300 U.mL<sup>-1</sup>) com objetivo de anular a inibição por peróxido de hidrogênio (AMMOR et al., 2006).

Nos mesmos tempos/condição de incubação, uma alíquota da cultura foi retirada e procedeu-se a contagem de unidade formadora de colônia (UFC).

#### **4.4 Ensaio da atividade antagônica**

A ação antagônica da enterocina foi observada pelo ensaio de difusão em poços, conforme descrito por Garriga et al. (1993), com modificações. Para tanto, 20mL de BHI ágar semi-sólido 0,8%, contendo a *Listeria innocua* CLIP 12612 ou *Listeria monocytogenes* 2032 na concentração final correspondente à escala 0,5 de McFarland ( $1,5 \times 10^8$  células/mL), foi transferido para uma placa de Petri. Após solidificação, poços de 5 mm de diâmetro foram cortados no ágar e em cada poço, foi adicionado 30  $\mu$ L do CFS neutralizado. As placas foram mantidas a 20°C por 4 h, e posteriormente incubadas a 37 °C por 24 h (FOULQUIÉ-MORENO et al., 2006). A presença de halo foi indicativo de atividade antagônica do CFS e este foi mensurado em milímetros.

#### **4.5 Sensibilidade a enzimas proteolíticas e ao tratamento térmico**

Para avaliar a sensibilidade do possível composto com atividade antagônica frente a enzimas proteolíticas, o CFS obtido foi tratado com as enzimas  $\alpha$ -quimiotripsina (Sigma), protease (Sigma) e proteinase-K (Invitrogen) em concentração final de 1 mg.mL<sup>-1</sup> em tampão fosfato (pH 6,5). As amostras foram incubadas a 37 °C por 1 hora e a atividade residual foi determinada pelo ensaio de difusão em poços (GARRIGA et al., 1993).

A termoestabilidade do composto antimicrobiano foi avaliada tratando os sobrenadantes a 80 °C por 10 minutos e a 100 °C por 20 minutos (HUGAS et al., 2003; AMMOR et al., 2006). A atividade residual foi avaliada pelo ensaio de difusão em poço.

#### **4.6 Quantificação da atividade bacteriocinogênica**

A quantificação da atividade bacteriocinogênica foi realizada pelo ensaio de diluição crítica, descrito por Mayr-Harting, Hedges e Berkley (1972), com modificações. O sobrenadante foi diluído sucessivamente na razão de 1:2 (v/v)



até 1:64 (v/v), utilizando solução de NaCl 0,85%. Em seguida, procedeu-se o ensaio de difusão em poço contra *Listeria innocua* CLIP 12612 ou a *Listeria monocytogenes* 2032. As placas foram mantidas em temperatura ambiente por 1 hora e, em seguida, incubadas a 37 °C por 24 h e o título da bacteriocina foi expresso em unidade arbitrária de bacteriocina (UA/mL), definido como sendo a recíproca da maior diluição que apresentou halo de inibição, multiplicada por 100 (BROMBERG et al., 2006).

#### **4.7 Análise estatística**

Os valores médios dos halos foram avaliados usando análise de variância one-way (ANOVA) e teste de Tukey, considerando  $p < 0,05$  para estipular diferenças significativas entre a atividade antagônica dos isolados e o controle. Todos os testes foram realizados em triplicata.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Produção de enterocina em substrato milhocina e soro de leite

Afim de determinar a produção de enterocinas em substratos da indústria alimentícia, foram comparados a atividade antagônica do CFS proveniente do soro de leite em pó parcialmente desmineralizado e água de maceração de milho, ambos na concentração em substituição de 25% (m/v) do meio MRS. O meio de cultura MRS foi utilizado como controle. A contagem celular mostrou que o substrato utilizado interferiu no desenvolvimento bacteriano (tabela 2), mostrando assim serem viáveis a sua utilização para obtenção desse produto.

**Tabela 2** - Contagem de UFC nos tempos 18 e 24 horas de incubação nos substratos milhocina e soro de leite.

Isolado	18 horas			24 horas		
	MRS	M	S	MRS	M	S
	UFC/mL	UFC/mL	UFC/mL	UFC/mL	UFC/mL	UFC/mL
Efm 20	1,77x10 <sup>8</sup>	3,23x10 <sup>9</sup>	1,0x10 <sup>9</sup>	3,0x10 <sup>8</sup>	2,93x10 <sup>11</sup>	1,5x10 <sup>11</sup>
Efm 22	4,27x10 <sup>8</sup>	3,13x10 <sup>9</sup>	7,8x10 <sup>9</sup>	3,3x10 <sup>8</sup>	6,83x10 <sup>11</sup>	1,2x10 <sup>12</sup>
Efm 24	3,6x10 <sup>8</sup>	5,5x10 <sup>9</sup>	3,5x10 <sup>9</sup>	5,1x10 <sup>8</sup>	4,27x10 <sup>11</sup>	3,9x10 <sup>11</sup>
Efm 25	3,1x10 <sup>8</sup>	7,7x10 <sup>9</sup>	1,17x10 <sup>10</sup>	2,5x10 <sup>8</sup>	3,83x10 <sup>11</sup>	3,2x10 <sup>11</sup>
Efs 27	2,6x10 <sup>8</sup>	9,6x10 <sup>9</sup>	1,35x10 <sup>10</sup>	2,5x10 <sup>8</sup>	6,0x10 <sup>11</sup>	1,2x10 <sup>11</sup>

(MRS) de Man, Rogosa e Sharpe; (M) Milhocina; (S) Soro.

**Fonte:** Produção do próprio autor.

Não foi observada diferença significativa na inibição por CFS obtidos pelo cultivo dos isolados de *E. faecium* e *E. faecalis* por 18 horas. Já em cultivo de 24 horas foram observadas variações nas atividades de CFS, principalmente os obtidos em meio contendo 25% de milhocina como substrato (tabela 3).

**Tabela 3** - Halo de inibição da atividade do CFS obtido nos tempos (18 e 24 horas) em diferentes substratos contra *Listeria monocytogenes* e *Listeria innocua*.

<i>Listeria monocytogenes</i> *						
Isolado	18 horas			24 horas		
	MRS	M	S	MRS	M	S
Efm 20	8,0±0,5 <sup>aA</sup>	8,5±0,2 <sup>aA</sup>	8,5±0,2 <sup>aA</sup>	9,2±0,2 <sup>aA</sup>	10,0±0,0 <sup>bA</sup>	7,5±0,5 <sup>aA</sup>
Efm 22	8,3±0,3 <sup>aA</sup>	8,2±0,2 <sup>aA</sup>	8,2±0,7 <sup>aA</sup>	10,0±0,0 <sup>aA</sup>	9,3±0,7 <sup>aB</sup>	10,0±0,0 <sup>aB</sup>
Efm 24	9,2±0,2 <sup>aA</sup>	8,8±0,2 <sup>aA</sup>	8,3±0,2 <sup>aA</sup>	10,0±0,0 <sup>aA</sup>	8,5±0,5 <sup>aB</sup>	7,2±0,2 <sup>bA</sup>
Efm 25	7,7±0,7 <sup>aA</sup>	8,0±0,0 <sup>aA</sup>	7,7±0,0 <sup>aA</sup>	7,5±0,5 <sup>aC</sup>	10,0±0,0 <sup>bA</sup>	7,2±0,2 <sup>aA</sup>
Efs 27	8,0±0,0 <sup>aA</sup>	9,2±0,1 <sup>aA</sup>	8,0±0,0 <sup>aA</sup>	8,0±0,0 <sup>aB</sup>	7,7±0,0 <sup>aB</sup>	7,5±0,2 <sup>aA</sup>
<i>Listeria innocua</i> *						
Isolado	18 horas			24 horas		
	MRS	M	S	MRS	M	S
Efm 20	7,3±0,7 <sup>aA</sup>	7,0±0,0 <sup>aA</sup>	7,4±0,6 <sup>aA</sup>	6,7±0,5 <sup>aA</sup>	7,0±0,0 <sup>aA</sup>	7,3±0,3 <sup>aA</sup>
Efm 22	7,2±0,2 <sup>aA</sup>	7,1±0,6 <sup>aA</sup>	7,9±0,4 <sup>aA</sup>	7,9±0,6 <sup>aA</sup>	9,3±0,3 <sup>bB</sup>	7,9±0,4 <sup>aA</sup>
Efm 24	7,6±0,6 <sup>aA</sup>	7,6±0,6 <sup>aA</sup>	7,9±0,4 <sup>aA</sup>	7,2±0,3 <sup>aA</sup>	7,4±0,2 <sup>aA</sup>	8,0±0,0 <sup>aA</sup>
Efm 25	7,4±0,3 <sup>aA</sup>	7,0±0,0 <sup>aA</sup>	7,0±0,0 <sup>aA</sup>	7,0±0,0 <sup>aA</sup>	7,1±0,2 <sup>aA</sup>	7,0±0,0 <sup>aA</sup>
Efs 27	7,3±0,5 <sup>aA</sup>	7,6±0,4 <sup>aA</sup>	8,0±0,7 <sup>aA</sup>	7,3±0,5 <sup>aA</sup>	8,1±0,4 <sup>aC</sup>	8,2±0,9 <sup>aA</sup>

(MRS) de Man, Rogosa e Sharpe; (M) Milhocina; (S) Soro de leite. Letras minúsculas diferentes nas linhas indicam diferença pelo teste Tukey ( $p < 0,05$ ) entre substratos.

Letras maiúsculas diferentes nas colunas indicam diferença pelo teste Tukey ( $p < 0,05$ ) entre isolados. Letras iguais não diferem entre si significativamente.

\* halo de inibição mensurada em milímetros.

**Fonte:** Produção do próprio autor.

A atividade inibitória dos CFS obtidos em milhocina dos isolado Efm 20 e Efm 25 em 24 horas de cultivo, frente ao microrganismo *L. monocytogenes* foi significativamente superior ao observados nos demais meios de cultivos testados ( $p < 0,05$ ), enquanto que em soro de leite, o isolado Efm 24 foi inferior ao observado nos demais meios ( $p < 0,05$ ).

Destaca-se a atividade antagônica do isolado Efm 22, o qual apresentou CFS (obtido em milhocina) com atividade significante contra *L. innocua* superior aos demais isolados e quando obtido em soro de leite apresentou atividade significativamente superior contra a *L. monocytogenes*.

## 5.2 Efeito do tratamento enzimático e estabilidade térmica na atividade antagônica do CFS

Após tratamento com  $\alpha$ -quimiotripsina, protease e proteinase K a atividade da enterocina foi completamente inibida, o que leva a confirmação de

que os compostos antimicrobianos presentes no CFS são de natureza proteica (tabela 4). Ainda, os CFS não foram inibidos quando tratados com catalase, sugerindo que a atividade da enterocina não está relacionada com a presença de peróxido de hidrogênio.

**Tabela 4** - Inibição do crescimento de *Listeria innocua* após tratamento enzimático de CFS obtidos em 18 e 24 horas de incubação.

18 horas																
Tratamento	Efm 20			Efm 22			Efm 24			Efm 25			Efs 27			
	MR	M	S	MR	M	S	MR	M	S	MR	M	S	MR	M	S	
α- quimiotripsina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Protease	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Proteinase K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Controle Positivo*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
24 horas																
Tratamento	Efm 20			Efm 22			Efm 24			Efm 25			Efs 27			
	MR	M	S	MR	M	S	MR	M	S	MR	M	S	MR	M	S	
α- quimiotripsina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Protease	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Proteinase K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Controle Positivo*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

(\*) CFS sem tratamento com enzima; (+) Inibição de crescimento; (-) Sem inibição; (MR) MRS; (M) Milhocina; (S) Soro.

**Fonte:** Produção do próprio autor.

Como esperado, não foi observado diferença significativa na ação antagonista da enterocina após tratamento térmico a 80 °C e 100 °C, mostrando ser peptídeos termoestáveis (tabela 5).

**Tabela 5** - Atividade antimicrobiana dos sobrenadantes de cultivo de enterococos em diferentes substratos ao tratamento 80°C por 10 minutos e 100°C por 20 minutos frente a *L. innocua*.

Isolado	80°C por 10 minutos*					
	18 horas			24 horas		
	MRS	M	S	MRS	M	S
Efm 20	7,3±0,4 <sup>aA</sup>	7,7±0,3 <sup>aA</sup>	8,1±0,1 <sup>aA</sup>	7,3±0,2 <sup>aA</sup>	7,6±0,4 <sup>aA</sup>	7,6±0,4 <sup>aA</sup>
Efm 22	8,6±0,4 <sup>aA</sup>	8,0±0,8 <sup>aA</sup>	8,5±0,6 <sup>aA</sup>	7,8±0,1 <sup>aA</sup>	8,0±0,8 <sup>aA</sup>	8,0±0,4 <sup>aA</sup>
Efm 24	8,0±0,5 <sup>aA</sup>	7,5±0,5 <sup>aA</sup>	8,1±0,4 <sup>aA</sup>	7,4±0,1 <sup>aA</sup>	7,2±0,3 <sup>aA</sup>	8,1±0,4 <sup>aA</sup>
Efm 25	7,6±0,4 <sup>aA</sup>	6,3±0,2 <sup>aA</sup>	6,8±0,4 <sup>aA</sup>	6,6±0,9 <sup>aA</sup>	6,3±0,4 <sup>aA</sup>	6,4±0,4 <sup>aA</sup>
Efs 27	73±1,2 <sup>aA</sup>	7,1±0,8 <sup>aA</sup>	8,3±0,4 <sup>aA</sup>	6,4±0,4 <sup>aA</sup>	7,3±0,4 <sup>aA</sup>	8,0±0,7 <sup>aA</sup>
Isolado	100°C por 20 minutos*					
Efm 20	6,5±0,4 <sup>aA</sup>	6,6±0,4 <sup>aA</sup>	6,7±0,4 <sup>aA</sup>	6,0±0,0 <sup>aA</sup>	6,1±0,1 <sup>aA</sup>	7,1±0,6 <sup>aA</sup>
Efm 22	6,4±0,4 <sup>aA</sup>	6,7±0,3 <sup>aA</sup>	7,4±0,4 <sup>aA</sup>	7,6±0,9 <sup>aA</sup>	6,6±0,4 <sup>aA</sup>	7,0±0,8 <sup>aA</sup>
Efm 24	6,4±0,4 <sup>aA</sup>	7,4±0,4 <sup>aA</sup>	8,6±0,4 <sup>aA</sup>	6,4±0,4 <sup>aA</sup>	6,6±0,2 <sup>aA</sup>	7,8±0,1 <sup>aA</sup>
Efm 25	6,1±0,1 <sup>aA</sup>	6,1±0,1 <sup>aA</sup>	6,1±0,1 <sup>aA</sup>	6,0±0,0 <sup>aA</sup>	6,2±0,3 <sup>aA</sup>	6,4±0,1 <sup>aA</sup>
Efs 27	6,0±0,0 <sup>aA</sup>	6,6±0,4 <sup>aA</sup>	7,2±0,3 <sup>aA</sup>	6,0±0,0 <sup>aA</sup>	6,0±0,0 <sup>aA</sup>	6,5±0,4 <sup>aA</sup>

(MRS) de Man, Rogosa e Sharpe (M) Milhocina; (S) Soro. Letras minúsculas diferentes nas linhas indicam diferença pelo teste Tukey ( $p < 0,05$ ). Letras maiúsculas diferentes nas colunas indicam diferença pelo teste Tukey ( $p < 0,05$ ). Letras iguais não diferem entre si significativamente.

\* halo de inibição mensurada em milímetros.

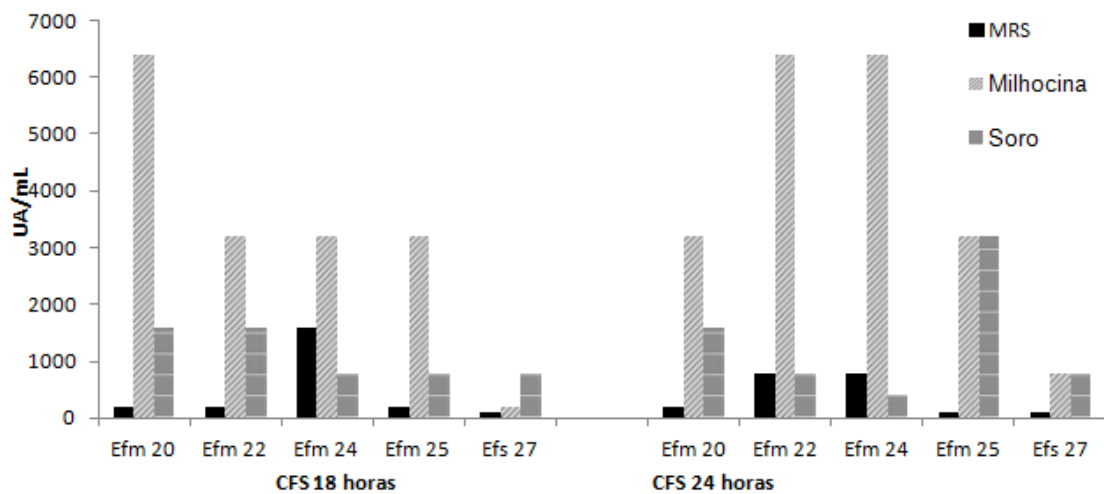
**Fonte:** Produção do próprio autor.

### 5.3 Quantificação da atividade bacteriocinogênica

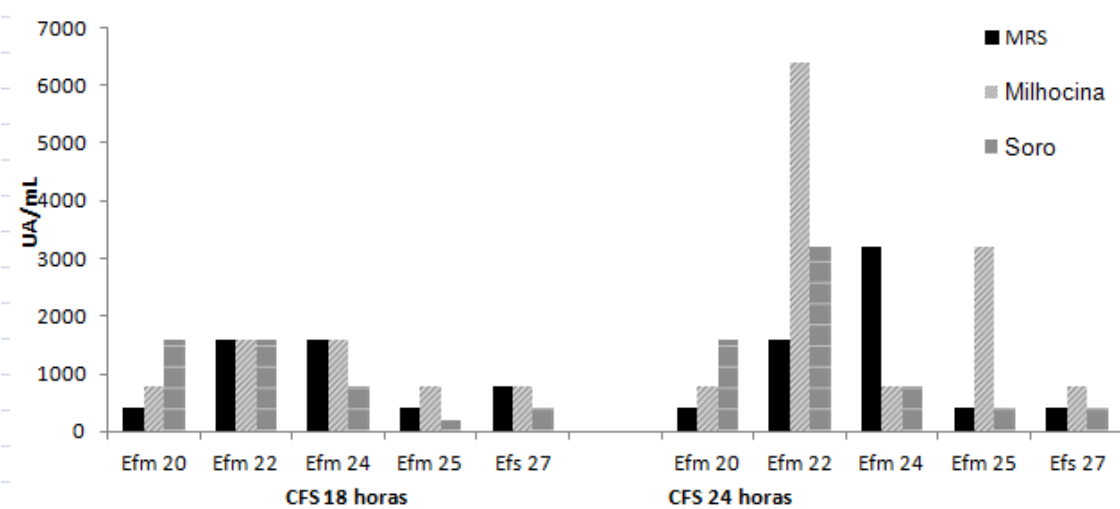
A figura 3 apresenta os resultados de atividade da enterocina expressa em unidades arbitrária (UA/mL), a qual é definida como sendo a recíproca da maior diluição que apresentou halo de inibição, multiplicado por 100.

Ao quantificar a atividade bacteriocinogênica contra a *L. innocua* observou maiores valores de unidade arbitrária para os CFS dos isolados Efm20, Efm22, Efm24 e Efm25 obtidos do meio com milhocina (Figura 3A), chegando a 6400 UA/mL. Já a ação contra *L. monocytogenes* (Figura 3B) chegaram a 6400 UA/mL para o CFS do isolado Efm 22 produzido em milhocina com 24 horas de incubação. Ressaltamos que a enterocina utilizada neste estudo encontrava-se diluída no meio de cultura.

**Figura 3** - Unidade arbitrária (UA/mL) da enterocina nos diferentes substratos após 18 horas e 24 de inoculação, frente a *L. innocua* (A) e *L. monocytogenes* (B).



A



B

Fonte: Produção do próprio autor.

## 6. DISCUSSÃO

Os enterococos são um grupo de bactérias complexas e industrialmente importantes, que podem ser encontradas em diversos produtos alimentícios, como leite, queijo, carne e vegetais (GOMES et al., 2008). Bacteriocinas isoladas em enterococos comumente apresentam atividade anti-listerial, propriedade muito requisitada pela indústria, uma vez que a *Listeria* é um importante patógeno alimentar (FOULQUIÉ-MORENO et al., 2003; KHAN; FLINT; YU, 2010).

Neste estudo, verificamos a potencial produção de enterocinas em substratos provenientes da indústria agrícola, sendo soro de leite e milhocina. A contagem de células bacterianas (UFC/mL) atingiu log de  $10^9$  a  $10^{11}$  UFC/mL, em ambos substratos; valores superiores quando comparado à contagem em meio MRS. Ferreira et al. (2007), afirmam que ao atingir um elevado número de microrganismos, a produção da bacteriocina pode ser inibida devido à presença de proteases, baixo pH do substrato, ou reabsorção do peptídeo pela célula produtora.

O pH final do cultivo celular não foi mensurado neste estudo; contudo, o CFS foi ajustado ao pH de 6,5 com NaOH, eliminando a possibilidade de interferência de ácido no teste de antagonismo. Ainda, a ação de peróxido de hidrogênio foi eliminada com o tratamento do CFS por catalase. A presença de peróxido de hidrogênio pode neutralizar o potencial eletroquímico da membrana citoplasmática, aumentando a permeabilidade e eventual morte de bactérias (DALIÉ et al., 2010).

O caráter proteico da substância bacteriocina foi confirmado após tratamento com proteases, conforme observado por Foulquié-Moreno et al. (2003) e Yang, et al. (2012). As enterocinas se mostraram termoestáveis. Esses resultados também foram obtidos por Ogaki et al. (2015) quando trabalhados com os mesmos isolados deste estudo, porém, apenas utilizando caldo MRS.

As bacteriocinas são compostos proteicos responsáveis pela inibição dos microrganismos. A perda da atividade antagônica após um tratamento enzimático indica a sensibilidade dos compostos ativos secretados pela linhagem bacteriana (FOULQUIÉ-MORENO et al., 2003).

Essas características de tolerância ao calor e serem degradadas por enzimas proteolíticas, fazem das enterocinas uma alternativa aos preservativos químicos utilizados em alimento, uma vez que não causam danos a células eucarióticas, podendo ser facilmente degradadas no estômago (KHAN; FLINT; YU, 2010).

Destacamos que a ação antagônica da enterocina produzida em meio MRS e nos substratos milhocina e soro de leite não diferiram estatisticamente, mostrando ser viável a substituição do meio por estes substratos. Vários autores elencam o meio MRS como sendo bom produtor de bacteriocinas, por ser rico em carbono orgânico e fontes de nitrogênio (MATARAGAS et al., 2004; GALVEZ et al., 2011; AHMAD et al., 2014; GOH E PHILIP, 2015). Em estudo realizado por Ogaki et al. (2016), utilizando-se dos mesmos isolados, constatou que o meio ágar MRS suplementado com 2% (p/ v) de extrato de levedura (fonte de nitrogênio) foi o melhor meio para produção de enterocina.

Neste estudo, observamos que a ação da enterocina foi isolado-produtor-dependente; contudo, de forma geral, a enterocina formada em milhocina como substrato apresentou valores superiores de UA, seguida do soro de leite, quando comparado ao meio de cultura (MRS) contra *L. innocua*, em ambos tempos de incubação (Figura 3A). Já para *L. monocytogenes* a UA apresentou variações nas enterocinas produzidas após 24 horas de incubação, apresentando para a maioria dos isolados melhores resultados quando produzida em milhocina (Figura 3B).

Em visão geral, os CFS obtidos em ambos substratos apresentaram atividade anti-listerial bastante significativas, mostrando que a substituição do meio de cultura com milhocina e soro de leite é uma opção viável para a produção de bacteriocinas.

Segundo Bromberg et al. (2006), os níveis de bacteriocina nos sobrenadantes raramente excedem 5.000 UA/mL, sendo que, em geral, na ausência de condições controladas de pH estes se encontram abaixo de 1.000 UA/mL.

Os resultados elevados de UA/mL no substrato milhocina podem ser explicados, pelo fato da milhocina ser uma fonte de nitrogênio ao meio cultura, o que pode dar origem a biomassas que são ricas em proteínas e pobres em polissacáridos ácidos. Fontes et al. (2008) utilizou a milhocina como fonte de



nitrogênio para o crescimento de leveduras. Alguns trabalhos relacionados com a produção de peptídeos sugerem que aumentando a concentração de fontes de nitrogênio obtêm-se níveis mais elevados de atividade (KANMANI et al., 2011).

O aumento ou diminuição da produção de enterocina indicam que a produção depende diretamente da cepa e / ou a concentração de hidratos de carbono, o que interfere na osmolaridade e disponibilidade de fontes de nutrientes dos meios, conseqüentemente, promove condições estressantes que alteraram a produção da enterocina por isolados de enterococos (OGAKI et al., 2016).

Bromberg et al. (2006), afirma que um dos pré-requisitos para a caracterização de bacteriocinas se baseia no fato de que os níveis de bacteriocinas produzidos devem ser elevados para a obtenção de teores suficientes de proteína para sua purificação. Os resultados apresentados aqui se mostraram eficazes na inibição da *L. innocua* e *L. monocytogenes* sem a purificação do CFS.

## 7. CONCLUSÕES

A condição de crescimento da bactéria é fundamental para a produção de enterocinas, modificações nos componentes dos substratos influenciam a quantidade e na atividade das enterocinas. A substituição parcial do meio MRS por milhocina ou soro de leite mostrou efeito anti-listerial o pode ser uma ferramenta poderosa para a proteção de alimentos.

A estabilidade térmica e a constituição proteica da enterocina produzida nos meios MRS substituído por milhocina e soro de leite foram confirmadas.

Estudos para se otimizar a produção, assim como para se obter o mesmo em sua forma purificada, devem ser desenvolvidos.

Em conclusão, constatou-se que os substratos testados neste estudo apresentam grande potencial para serem aplicados na produção de enterocinas para a bioconservação de produtos alimentícios.

## REFERÊNCIAS

ABEE, T.; KROCKEL, L.; HILL, C. Bactericins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. **International Journal of Food Microbiology**, v.28, p. 169-195, 1995.

AHMAD V.; et al. Antimicrobial potential of bacteriocin producing *Lysinibacillus* jx416856 against foodborne bacterial and fungal pathogens, isolated from fruits and vegetable waste. **Anaerobe**, v.27, p.87–95, 2014.

ALVES, M. P.; et al. Whey: technologies for coproducts production. **Revista Instituto Laticínios Cândido Tostes**, v.69, n.3, p. 212-226, 2014.

AMARTEY A.; LEUNG J. Corn steep liquor as a source of nutrients for ethanologic fermentation by *Bacillus stearothermophilus* t-13. **Bulletin of the Chemists and Technologists**, v.19, 2000.

AMMOR, S.; et al. Antibacterial Activity of Lactic Acid Bacteria against Spoilage and Pathogenic Bacteria Isolated from the Same Meat Small-Scale Facility. 1 - Screening and Characterization of the Antibacterial Compounds. **Food Control**, v.17, n.6, p. 454–461, 2006.

ANANOUE, S.; et al. E. Control of *Staphylococcus aureus* in sausage by enterocin AS-48. **Meat Science**, v. 71, n. 3, p. 549-556, 2005.

ANANOUE, S.; et al. Optimization of Enterocin AS-48 Production on a Whey-Based Substrate. **International Dairy Journal**, v.18, n.9, p. 923–927, 2008.

ANANOUE, S.; et al. Effect of combined physico-chemical treatments based on enterocin AS-48 on the control of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in a model cooked ham. **Food Control**, v.21, n.4, p. 478-486, 2010.

BENKERROUM, N.; et al. Biocontrol of *Listeria monocytogenes* in model cultured milk by in situ bacteriocin production from *Lactococcus lactis lactis*. **International Journal of Dairy Technology**, v.55, n.3, p. 145-151, 2002.

BROMBERG, R.; et al. Características da bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis* sp. *hordniae* CTC 484 e seu efeito sobre *Listeria monocytogenes* em carne bovina. **Ciência Tecnologia Alimentos**, v.26, n.1, p. 135-144, 2006.

CLEVELAND, J.; et al. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 71, n. 1, p. 1-20, 2001.

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

COTTER, P. D.; ROSS, R. P.; HILL, C. Bacteriocins – a viable alternative to antibiotics? **Nature Reviews Microbiology**, n.11, p. 95-105, 2013.

DALIÉ D. K. D. Deschamps AM, Richard-Forget F: Bactérias de ácido láctico - Potencial para controle do crescimento de fungos e micotoxinas: Uma revisão. **Food Control**, v. 21 p. 370-380, 2010.

DALLAS, P. O uso de derivados de soro em aplicações de produtos de consumo. **Leite e Derivados**, v.8, n.46, p. 48-50, 1999.

DHEWA, T. Screening, production purification and potential use of bacteriocins from lactic acid bacteria of meat and dairy food origin. **International Conference on Nutrition and Food Sciences**, v. 39, p. 35-41, 2012.

DIOP M.B; et al. Bacteriocin from traditional food products. **Biotechnologie Agronomie Société et Environnement**, v.11, p. 275-281, 2007.

EATON, T. J.; GASSON, M. J. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 4, p. 1628-1635, 2001.

EIJSINK, V.; et al. Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria: an example of biological warfare and communication. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.81, p. 639-654, 2002.

ELOTMANI, F.; et al. Characterization of anti-*Listeria monocytogenes* bacteriocins from *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* and *Lactococcus lactis* strains isolated from Raib, a Moroccan traditional fermented milk. **Current Microbiology**, v.44, n.1, p. 10-17, 2002.

FERREIRA, A.; et al. Characterization of enterocins produced by *Enterococcus mundtii* isolated from humans feces. **Brazilian Archive of Biology and Technology**, v.2, n.50, p. 249–258, 2007.

FISHER, K.; PHILIPS, C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. **Microbiology**, v.155, p.1749-1757, 2009.

FONTES G. C; et al. Produção de biosurfactante por leveduras. **Química Nova**, v.31, 2008.

FOULQUIÉ-MORENO, M.R.; et al. Isolation and biochemical characterisation of enterocins produced by enterococci from different sources. **Journal of Applied Microbiology**, v.94, p. 214–229, 2003.

FOULQUIÉ-MORENO, M. R.; et al. The role and application of enterococci in food and health. **International Journal of Food Microbiology**, v.106, n.1, p. 1–24, 2006.

FRANZ, C. M. A P.; et al. Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. **FEMS Microbiology Reviews**, v.31, n.3, p.293–310, 2007.

GALVEZ, A. ; et al. control of foodborne pathogenic and spoilage bacteria. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.28, p. 125–152, 2008.

GALVEZ, A. A.; et al. The influence of growth conditions on enterocin-like production by *Enterococcus faecium* CWBI-B1430 and *Enterococcus mundtii* CWBI-B1431 isolates from artisanal peruvian cheeses. **Annals of Microbiology**, v.61, n.4, p. 955–964, 2011.

GARRIGA, M.; et al. Bacteriocinogenic activity of lactobacilli from fermented sausages. **Journal of Applied Microbiology**, v.75, p. 142-148, 1993.

GHRAIRI, T.; et al. Purification and characterisation of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* from tunisian rigouta cheese. **Food Control**, v.19, n.2, p. 162–169, 2008.

GILLOR, O.; VRIEZEN, J. A.C; RILEY, M. A. The role of SOS boxes in enteric bacteriocin regulation. **Microbiology**, v. 154, n. 6, p. 1783-1792, 2008.

GIRAFFA, G. Enterococci from foods. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, n. 2, p. 163-171, 2002.

GIRAFFA, G. Functionality of enterococci in dairy products. **International Journal of Food Microbiology**, n.88, p. 215–222, 2003.

GOH, H.F.; PHILIP, K.; Purification and Characterization of Bacteriocin Produced by *Weissella confusa* A3 of Dairy Origin. **Plos One**, 2015.

GOMES, B.C.; et al. Prevalence and characterization of *Enterococcus spp.* isolated from Brazilian food. **Food Microbiology**, v.25, n.5, p.668-675, 2008.

GRANDE, M. J.; et al. Stability of enterocin AS-48 in fruit and vegetable juices. **Journal of Food Protection**, v.10, n.10, p. 2085-2094, 2005.

HERRANZ, C.; et al. Optimization of enterocin P production by batch fermentation of *Enterococcus faecium* P13 at constant pH. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.56, n.3–4, p. 378–383, 2001.

HUGAS, M. Functionality of enterococci in meat products. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 88. p. 223-233, 2003.

HURST, A. Nisin. **Advances in Applied Microbiology**, v. 27, p. 85-123, 1981.

KANMANI; P.; et al. The role of environmental factors and medium composition on bacteriocin production by an aquaculture probiotic *Enterococcus faecium* MC13 isolated from fish intestine. **Korean Journal of Chemical Engineering**, n.28, p. 860-866, 2011.

KHAN, H.; FLINT, S.; YU, P.L. Enterocins in food preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v.141, p. 1-10, 2010.

KUMAR, M.; et al. Potential application of an anti-aeromonas bacteriocin of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* in the preservation of vegetable salad. **Journal of Food Safety**, v.32, n.3, p. 369-378, 2012.

KUWANO, K. et al. Dual antibacterial mechanisms of nisin Z against Gram-positive and Gram-negative bacteria. **International Journal Antimicrob. Agents**, v.26, p. 396–402, 2005.

LEVISON, M. E.; MALLELA, S. Increasing antimicrobial resistance: therapeutic implications for enterococcal infections. **Current Infectious Disease Reports**, v. 2, n. 5, p.417–423, 2000.

LEWUS, C.B.; MONTVILLE, T.J. Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **Journal Microbiology Methods**, v.13, p.145-150, 1991.

LIGGETT, W. R., KOFFLER, H.; Corn steep in microbiology. **Bacteriology Reviews**. 12, p. 297–312, 1998.

LOESSNER, M.; et al. A pediocin-producing *Lactobacillus plantarum* strain inhibits *Listeria monocytogenes* in a multispecies cheese surface microbial ripening consortium. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, n.3, p. 1854-1857, 2003.

LÓPEZ, R. S.; et al. Semi-preparative scale purification of enterococcal bacteriocin enterocin EJ97, and evaluation of substrates for Its Production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.34, n.12, p. 779–785, 2007.

LOSS, E.; et al. Use of maize wastewater for the cultivation of the *Pleurotus* spp. mushroom and optimization of its biological efficiency. **Journal of Hazardous Materials**, v.166, n. 2, p.1522-1525, 2009.

LPSN. List of prokaryotic name with standing in nomenclature; <http://www.bacterio.net/>; Acessado em 17/02/2018.

LUNA, J. M.; et al. Produção de biossurfactante em meio de baixo custo formulado com água do mar. **Exacta**, v.6, n.2, p. 209 - 215, 2008.

MATARAGAS M.; et al. Influence of nutrients on growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *Lactobacillus curvatus* L442. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 85 p. 191–198, 2004.

MAYR-HARTING, A.; HEDGES, A.J.; BERKELEY, R.C.W. Methods for studying bacteriocins. **Methods in Microbiology**, 7A, v.4, p. 315-422, 1972.

MARTÍN-PLATERO, A.M.; et al. Characterization and safety evaluation of enterococci isolated from Spanish goats' milk cheeses. **International Journal of Food Microbiology**, n.132, p. 24–32, 2009.



MENEGUETTI C. C.; DOMINGUES J. L. Características nutricionais e uso de subprodutos da agroindústria na alimentação de bovinos. **Nutritime**, v.5, n.2, p. 512-536, 2008.

MORRISON, D.; WOODFORD, N.; COOKSON, B. Enterococci as emerging pathogens of humans. **Society for Applied Symposium**, n.83, p. 89–99, 1997.

NASCIMENTO, M.S.; MORENO I.; KUAYE A. Y. Determinação da compatibilidade de desenvolvimento de culturas bacteriocinogênicas e fermento láctico. **Food Science and Technology**, v.29, n.1, p.165–170, 2009.

NATTRESS, F. M.; YOST, C. K.; BAKER, L. P. Evaluation of ability of lysozyme and nisin to control meat spoilage bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v.70, n.1-2, p. 111-119, 2001.

OGAKI, M. B.; FURLANETO, M. C., MAIA, L. F. Revisão: Aspectos gerais das bacteriocinas. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.18, n.4, p. 267-276, 2015.

OGAKI, M. B. Avaliação da atividade antimicrobiana de enterocinas produzidas por isolados de *Enterococcus sp.* 2015 185 f. Dissertação (Mestre em Microbiologia) - Universidade estadual de Londrina, Londrina, 2015.

OGAKI, M. B.; et al. Screening of the enterocin-encoding genes and antimicrobial activity in enterococcus species. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.26, n.6, p. 1026–1034, 2016.

OZDEMIR, G. B.; et al. Phenotypic and genotypic characterization of bacteriocins in enterococcal isolates of different sources. **Indian Journal of Microbiology**, v.51, n.2, p. 182–187, 2011.

RILEY, M. A. Bacteriocin-mediated competitive interactions of bacterial populations and communities. **Prokaryotic Antimicrobial Peptides**. p. 13-26,

2011.

RILLA, N.; MARTINEZ, B.; RODRIGUEZ, A. Inhibition of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain in Afuega'l Pitu cheese by the nisin Z producing strain *Lactococcus lactis lactis* IPLA 729. **Journal of Food Protection**, v.67, n.5, p. 928-933, 2004.

RIVAS, B.; et al. Development of culture media containing spent yeast cells of *debaryomyces hansenii* and corn steep liquor for lactic acid production with *Lactobacillus rhamnosus*. **International Journal of Food Microbiology**, v.97, n.1, p. 93–98, 2004.

RUIZ, A.; et al. Nisin affects the growth of *Listeria monocytogenes* on ready-to-eat turkey ham stored at four degrees Celsius for sixty-three days. **Poultry Science**, v.89, n.2, p. 353-358, 2010.

SANT'ANNA, V.; et al. Antibacterial activity of bacteriocin-like substance P34 on *Listeria monocytogenes* in chicken sausage. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.44, n.4, p. 1163-1167, 2014.

SANTOS, K. M. O. et al. Brazilian artisanal cheeses as a source of beneficial *Enterococcus faecium* Strains: characterization of the bacteriocinogenic potential. **Annals of Microbiology**, v. 64 n. 4, p. 1463–1471, 2014.

SAVADOGO, A.; et al. Bacteriocins and lactic acid bacteria-a minireview. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 9, 2006.

SIMHA, B. V.; et al. Simple and rapid purification of perodiocin PA-1 from *Pediococcus pentasaceus* (NCDC 273 subtable for industrial application. **Micrological Research**, 2012.

SOOD, S.; et al. Enterococcal infections & antimicrobial resistance. **Indian Journal of Medical Research**, v. 128, n. 2, p. 111, 2008.

STROMPFOVA, V.; et al. Occurrence of the structural enterocin A, P, B, L50B genes in enterococci of different origin. **Veterinary Microbiology**, n.132, p. 293–301, 2008.

VALDUGA, E.; et al. Aplicação do soro de leite em pó na panificação. **Alimento Nutrição**, v.17, n.4, p.393-400, 2006.

VÁZQUEZ, J. A.; GONZÁLEZ, M. P.; MURADO, M. A. Preliminary tests on nisin and pediocin production using waste protein sources: factorial and kinetic studies. **Bioresource Technology** , v.97, n.4, p. 605–613, 2006.

WILLIAMS, D. R.; CHANOS, P. Application of anti-Listerial bacteriocins: monitoring enterocin expression by multiplex relative reverse transcription-PCR. **Biochemical Society Transactions**, v.40, n.6, p. 1544–48, 2012.

YANG, E.; et al. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas isoladas de queijos e iogurtes. **AMB Express**, v.2, 2012.

YOUNG, S. O uso de produtos de soro em sorvetes e sobremesas congeladas. **Leite e Derivados**. v. 9, n.51, p. 66-77, 2000.