

Área: Ciência de Alimentos

PRODUÇÃO DE COMPOSTOS ANTIMICROBIANOS A PARTIR DE *Lactobacillus acidophilus*

Mariane Zanatta, Michele Cristina de Costa, Simone Paula Montagna, Tamires Zuleica
Folle, Luciane Maria Colla*

Laboratório de Fermentações, Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade de Passo Fundo

*E-mail: lmcolla@upf.br

RESUMO

As bactérias ácido-láticas realizam a fermentação de monossacarídeos e dissacarídeos produzindo ácidos como o lático, o acético e o propiônico, além de peróxido de hidrogênio, bacteriocinas e peptídeos bacterianos. Estes metabólitos despertam interesse pelo potencial antimicrobiano que podem apresentar, atuando na membrana celular de microrganismos patogênicos indicadores de Boas Práticas de Fabricação (BPF) na indústria de alimentos, interferindo na permeabilidade e inibindo o transporte ativo de sua membrana citoplasmática. Objetivou-se produzir e avaliar o potencial antimicrobiano de compostos produzidos por bactérias lácticas frente aos microrganismos patogênicos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella sp.* O microrganismo *Lactobacillus acidophilus* foi cultivado em três diferentes meios de cultivos: MRS, leite e soro de leite. A fermentação foi realizada no período de 72 h na temperatura de 42 °C. Ao final do processo fermentativo, os cultivos foram centrifugados e o extrato simples obtido foi testado quanto ao seu potencial antimicrobiano. Com o extrato simples, realizou-se a precipitação das proteínas com sulfato de amônia, e a ressuspensão do precipitado com EDTA, sendo o extrato purificado testado quanto ao seu potencial antimicrobiano utilizando o teste de difusão em discos. Os extratos antimicrobianos purificados, obtidos das fermentações com o *Lactobacillus acidophilus* nos três meios de cultivo, apresentaram atividade antimicrobiana frente às culturas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella sp.*, utilizados como microrganismos alvo.

Palavras-chave: Antimicrobianos; bacteriocinas; conservação de alimentos.

1 INTRODUÇÃO

A utilização de antimicrobianos produzidos por bactérias lácticas tais como bacteriocinas, tem sido sugerida como uma alternativa para a preservação de alimentos. Estas substâncias produzidas por microrganismos possuem atividade bactericida ou bacteriostática

contra membros da mesma espécie ou espécies muito próximas à linhagem produtora. A produção de antimicrobianos, como as bacteriocinas, é um fator de proteção utilizado por muitos microrganismos.

As bacteriocinas são proteínas ou complexos de proteínas com atividade antibiótica, produzidas por determinadas linhagens de bactérias lácticas que se caracterizam por apresentarem espectro de ação restrito aos microrganismos Gram positivos (SOCCOL et al., 2007).

As bactérias lácticas são cocos ou bacilos Gram-positivos e catalase negativos, capazes de fazer a conversão de carboidratos do meio fermentativo em ácido láctico, sendo sua principal função nos alimentos a acidificação destes produtos até um pH próximo a 4,0 o que impede o desenvolvimento de bactérias indesejáveis pela produção de ácidos orgânicos (BROCK et al., 1994). As espécies com esta capacidade pertencem aos gêneros *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Heterococcus*, *Vandococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leconostoc* e *Carnobacterium*. Dentro de cada gênero que contém linhagens filogeneticamente próximas, existem linhagens não patogênicas e patogênicas. Por exemplo, *Streptococcus thermophilus* e *Lactococcus lactis* são usadas na produção de iogurte e queijo, respectivamente, enquanto *Streptococcus pneumoniae* e *Lactococcus garviae* são agentes da pneumonia e da mastite, respectivamente.

As bactérias lácticas do gênero *Lactobacillus* são estudadas pela produção de compostos com atividade de inibição de bactérias patogênicas, como ácidos orgânicos (como o ácido láctico), peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, diacetil, acetaldeído e bacteriocinas (substâncias antimicrobianas de natureza protéica) (CLOSE, 2000).

As propriedades inibidoras das bactérias ácido-láticas, aliado ao seu uso histórico em produtos fermentados, tornam estes microrganismos atrativos para serem utilizados como biopreservativos, que consistem em compostos produzidos por microrganismos benéficos e que apresentam atividade antimicrobiana contra microrganismos patogênicos (SOCCOL et al., 2007). Os antibióticos apresentam restrições para uso em alimentos, e as bacteriocinas produzidas pelas bactérias lácticas são um grupo interessante de biomoléculas com atividade antimicrobiana, podendo representar uma alternativa de uso viável (SOCCOL et al., 2007).

Os microrganismos probióticos são extensivamente utilizados na indústria alimentícia, veiculados em produtos lácteos. O gênero *Lactobacillus* é o mais amplo dos gêneros incluídos dentro deste grupo, sendo que diversas espécies são consideradas produtoras de substâncias

antimicrobianas. Tais substâncias ajudam na manutenção da qualidade do produto lácteo processado, suprimindo o crescimento tanto de microrganismos deteriorantes, quanto de bactérias potencialmente patogênicas. Sobre este aspecto, alguns ácidos, como ácido láctico e acético, têm sido utilizados como conservantes de alimentos, junto com a queda do pH, inibindo o crescimento de microrganismos contaminantes e patogênicos. Com isso, torna-se de grande interesse prático a continuidade de pesquisas, que visam a identificação de culturas lácticas para a produção de compostos antimicrobianos, considerando sua aplicação na preservação dos alimentos.

Objetivou-se produzir e avaliar o potencial antimicrobiano de compostos produzidos por bactérias lácticas, frente aos microrganismos patogênicos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella sp*, indicadores de BPF na indústria de alimentos.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Microrganismos

Os microrganismos utilizados foram:

- a) Bactérias lácticas probióticas do gênero *Lactobacillus*, cedidas pela empresa Globalfood;
- b) microrganismos patogênicos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella sp* obtidos do banco de cepas do Laboratório de Microbiologia do curso de Farmácia da UPF.

2.2.2 Testes preliminares: determinação da cinética da fermentação

A fim de determinar-se o tempo necessário para a acidificação do meio e conseqüente produção de ácidos orgânicos com atividade antimicrobiana, foi determinada a cinética de produção destes compostos. Os cultivos foram conduzidos a 42°C durante 14 h e determinados durante o processo o pH, a acidez e a concentração de açúcares redutores. A

cinética de fermentação foi conduzida utilizando os meios MRS (Man-Rogosa-Sharpe) e soro de leite.

2.2.2.1 Preparo do inóculo

O preparo do inóculo foi realizado em erlenmeyer, contendo 100 mL de leite estéril, ao qual adicionou-se o microrganismo liofilizado na concentração de 1×10^6 UFC/mL. O inóculo foi incubado por 24 h a temperatura de 42 °C para a ativação das células.

2.2.2.2 Preparo do meio de cultivo

O caldo MRS foi preparado pesando-se 10 g/L de peptona, 10 g/L de extrato de carne, 5 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de glicose, 1 g/L de Tween 80, 2 g/L de fosfato de potássio, 5 g/L de acetato de sódio, 0,05 g/L de sulfato de magnésio, 0,05 g/L de sulfato de manganês e 2 g/L de citrato tri-amônio. O meio foi esterilizado em autoclave a 121 °C por 20 min.

O soro de leite foi proveniente de uma indústria de laticínios da região de Passo Fundo.

2.2.2.3 Fermentação láctica

Os meios de cultivo foram inoculados na razão de 10 % (volume de inóculo/volume de meio) e incubados a 42 °C durante 14 h.

2.2.2.4 Determinações analíticas

2.2.2.4.1 Determinação do pH do meio

O pH foi determinado através de leitura em peagâmetro, retirando-se alíquotas em tempos pré-estabelecidos.

2.2.2.4.2 Determinação de acidez

Para a determinação da acidez foram pesadas 10 g do meio fermentativo em um erlenmeyer de 125 mL previamente tarado. Foram adicionados 10 mL de água destilada, 3 gotas de fenolftaleína e titulados com NaOH 0,1 N. Este procedimento foi realizado em

duplicata.

2.2.2.4.3 Determinação de açúcares redutores

Os açúcares redutores (glicose ou lactose) foram determinados ao longo do processo fermentativo a fim de estimar o consumo do substrato para a geração de ácido láctico pelos microrganismos.

A curva padrão de glicose foi obtida com concentrações de 0,02 mg.mL⁻¹ a 0,2 mg.mL⁻¹. A glicose foi seca previamente por 1 h em estufa a 60 °C. A leitura foi realizada a 546 nm em espectrofotômetro.

Em cada tempo de amostragem foi coletado 1 mL de amostra em balão volumétrico de 25 mL, ao qual foi adicionado 1 mL de Carrez I e 1 mL de Carrez II (precipitação de interferentes). A seguir o volume do balão volumétrico foi completado com água destilada. O conteúdo foi filtrado em papel filtro. A partir do filtrado foi realizada a determinação de açúcares redutores em duplicata, adicionando-se em tubos de ensaio 1 mL do filtrado, 1 mL de NaOH 1 M e 1 mL de DNS. Os tubos foram levados ao banho-maria a 100 °C por 5 min e a seguir, adicionados de 7 mL de água destilada. Após foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 546 nm.

2.2.3 Produção de compostos com atividade antimicrobiana

O microrganismo *Lactobacillus acidophilus* foi cultivado em três meios de cultivos diferentes, MRS, leite e soro de leite. O preparo do inóculo e a fermentação láctica foram conduzidos conforme descrito previamente. A fermentação foi realizada durante 72 h.

Ao final do processo fermentativo, os cultivos foram centrifugados 3000 rpm por 20 min e o extrato simples obtido foi testado quanto ao seu potencial antimicrobiano frente a microrganismos indicadores.

2.2.4 Obtenção dos extratos antimicrobianos purificados

Após a obtenção do extrato simples, realizou-se a precipitação das proteínas com sulfato de amônia, e a ressuspensão do precipitado com EDTA, o extrato purificado foi testado quanto ao seu potencial antimicrobiano frente a microrganismos indicadores.

2.2.5 Atividade antimicrobiana dos extratos

A determinação da atividade antimicrobiana dos extratos da fermentação foi realizada utilizando o teste de difusão em discos segundo Norma M2 – A8, aprovada pelo Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2003).

Para a realização da atividade antimicrobiana foram utilizadas placas de Petri contendo o Ágar BHI (Brain Heart Infusion Broth), previamente esterilizado, com espessura homogênea de 3 a 4 mm por placa. Com auxílio de uma alça estéril foram coletadas 3 a 4 colônias bacterianas isoladas em um meio de cultura e estas foram transferidas para tubos de ensaio contendo de 3 mL a 5 mL de caldo BHI para preparar as suspensões das bactérias a serem testadas, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella*. Estas suspensões foram lidas em espectrofotômetro, num comprimento de onda de 625 nm, sendo que as absorvâncias das mesmas deveriam estar entre 0,08 a 0,10.

Após 15 min do ajuste das suspensões foi realizada a imersão de um swab estéril promovendo rotações contra a parede do tubo para retirar o excesso de líquido. Realizou-se a semeadura na superfície do Ágar BHI com o auxílio de uma alça de drigalski. Após 15 min da semeadura, os discos impregnados com os extratos da fermentação foram adicionados às placas contendo os microrganismos indicadores inoculados.

As placas foram incubadas em estufa, a $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 18 h – 24 h. A inibição foi detectada pela presença de halos ao redor dos discos. As leituras dos diâmetros dos halos de inibição foram efetuadas por meio de um paquímetro.

2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Testes preliminares de cinética da fermentação

As Tabelas 1 e 2 apresentam o pH, a acidez e o aumento da absorvância versus tempo de incubação do *L. acidophilus* nos meios soro de leite e MRS durante 14 horas de incubação.

A cinética das fermentações demonstrou que independente do meio de cultivo utilizado (soro de leite ou MRS), os cultivos apresentaram pH final de 3,2 a 3,6 no tempo de

14 h a 42 °C. Entretanto, o tempo de fermentação de 14 h foi insuficiente para a formação de compostos antimicrobianos em concentração adequada para inibir os microrganismos patogênicos. Assim realizaram-se fermentações para a produção dos compostos antimicrobianos durante 72 h.

Tabela 1: Resultados de pH, acidez e absorvância para o cultivo do *L. acidophilus* em soro de leite

Tempo (h)	pH		% acidez (g _{ac.lático} /100g)		Abs	
	Média	DP*	Média	DP*	Média	DP*
0	6,33	0,24	0,205	0,007	0,495	0,036
1	5,7	0,06	0,195	0,021	0,502	0,006
2	5,69	0,17	0,215	0,007	0,449	0,069
3	5,32	0,01	0,23	0	0,471	0,007
4	5,01	0,02	0,275	0,007	0,483	0,013
5	4,62	0,01	0,35	0	0,483	0,003
6	4,33	0	0,43	0,014	0,447	0,013
7	4,17	0,01	0,445	0,007	0,432	0,013
8	3,92	0,01	0,475	0,007	0,429	0,025
9	3,84	0,05	0,57	0	0,436	0,016
10	3,63	0,21	0,645	0,035	0,418	0,018
11	3,47	0,06	0,705	0,007	0,38	0,005
12	3,42	0,03	0,8	0,028	0,334	0,061
13	3,34	0,01	1,615	0,007	0,337	0,008
14	3,22	0,01	1,875	0,007	-	-

*DP: desvio padrão

Abs: absorvância

Tabela 2: Resultados de pH, acidez e absorbância para o cultivo do *L. acidophilus* em MRS

Tempo (h)	pH		% acidez (g _{ac.lático} /100g)		Abs	
	Média	DP*	Média	DP*	Média	DP*
0	6,1	0,97	0,545	0,021	0,194	0,02
1	5,8	0,94	0,575	0,007	0,247	0,018
2	5,63	0,95	0,535	0,007	0,248	0,065
3	5,52	0,95	0,575	0,035	0,271	0,019
4	5,68	0,96	0,575	0,007	0,244	0,049
5	5,29	1,01	0,605	0,007	0,257	0,067
6	5,14	1,03	0,695	0,021	0,212	0,011
7	4,93	1,04	0,72	0,014	0,24	0,018
8	4,7	1,04	0,675	0,064	0,23	0,003
9	4,48	1,02	0,845	0,007	0,225	0,011
10	4,18	1	0,92	0,085	0,19	0,007
11	4,02	0,97	0,74	0	0,161	0,024
12	3,9	0,94	1,15	0,014	0,142	0,002
13	3,79	0,9	1,265	0,064	0,078	0,004
14	3,6	0,85	1,61	0,014	-	-

*DP: desvio padrão

Abs: absorbância

2.3.2 Produção de compostos antimicrobianos

A Tabela 3 apresenta os diâmetros dos halos formados pelos extratos antimicrobianos obtidos durante as fermentações do *L. acidophilus* nos meios leite, soro de leite e MRS, frente ao crescimento dos microrganismos patogênicos.

Através da Tabela 3 pode-se avaliar que os extratos purificados apresentaram halos de inibição superiores aos formados com os extratos simples. Os extratos simples apresentam em sua composição ácidos orgânicos formados durante o processo fermentativo, entre eles, ácido láctico, acético e propiônico. Estes ácidos possuem atividade antimicrobiana conhecida e são

utilizados como conservantes de alimentos. A formação destes ácidos ocasiona a queda do pH, inibindo o crescimento de microrganismos contaminantes e patogênicos.

Tabela 3: Halos formados pelos extratos antimicrobianos obtidos durante as fermentações do *L. acidophilus* nos meios leite, soro de leite e MRS, frente ao crescimento dos microrganismos patogênicos

Extrato	Meio de cultivo	Microrganismo patogênico	Halos de inibição (mm)	
			Média	DP*
Purificado	Leite	<i>Escherichia coli</i>	2,81	2,51
Purificado	Leite	<i>Salmonella sp</i>	1,50	0,52
Purificado	Leite	<i>Staphylococcus aureus</i>	4,13	0,89
Purificado	Soro	<i>Salmonella sp</i>	3,00	1,03
Purificado	Soro	<i>Staphylococcus aureus</i>	3,50	0,82
Purificado	Soro	<i>Escherichia coli</i>	5,13	1,45
Purificado	MRS	<i>Salmonella sp</i>	3,31	1,25
Purificado	MRS	<i>Staphylococcus aureus</i>	4,75	0,86
Purificado	MRS	<i>Escherichia coli</i>	4,25	1,18
Simples	Soro	<i>Escherichia coli</i>	3,63	1,15
Simples	Soro	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-
Simples	Soro	<i>Salmonella sp</i>	1,50	0,73
Simples	MRS	<i>Salmonella sp</i>	1,00	0,00
Simples	MRS	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-
Simples	MRS	<i>Escherichia coli</i>	2,81	1,17
Simples	Leite	<i>Escherichia coli</i>	-	-
Simples	Leite	<i>Salmonella sp</i>	-	-
Simples	Leite	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-

*DP: desvio padrão

-: sem halo de inibição

Os extratos purificados foram obtidos após a remoção das células dos microrganismos, seguida da precipitação fracionada de proteínas da cultura sobrenadante pela adição do sulfato de amônio. Segundo Soccol et al. (2007) os compostos separados através desta metodologia podem ser bacteriocinas, proteínas biologicamente ativas que exibem propriedades antimicrobianas.

Os extratos purificados obtidos a partir do *L. acidophilus* em leite apresentaram potencial antimicrobiano frente aos três microrganismos patogênicos, com maior halo de inibição frente ao *Staphylococcus aureus* (4,13 mm). Utilizando o soro de leite como meio de cultivo o maior halo de inibição foi obtido frente à *Escherichia coli* (5,13 mm). Com o meio MRS, os maiores halos de inibição foram obtidos frente ao *Staphylococcus aureus* (4,75 mm).

Os extratos simples, obtidos com meio de cultivo MRS e soro de leite apresentaram halos de inibição contra os microrganismos *Escherichia coli* e *Salmonella sp.* Para o *Staphylococcus aureus* não foi possível a leitura dos halos formados.

As Figuras 1 e 2 apresentam os halos de inibição formados com os extratos purificados obtidos utilizando os meios MRS e soro de leite, frente à *E. coli*.

As médias dos halos de inibição obtidos com os extratos purificados frente à inibição dos microrganismos patogênicos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella sp* variaram de $1,50 \pm 0,73$ a $5,13 \pm 1$ mm. No estudo realizado por Passos (2009), utilizando a mesma metodologia usada neste trabalho, foram obtidos halos de $6,90 \pm 1$ mm frente a *E.coli* utilizando os extrato simples da fermentação. Isto indica que, no presente trabalho, halos de inibição maiores poderiam ter sido formados. Isto pode ter ocorrido devido a problemas na incubação das placas contendo os microrganismos patogênicos.

Já no estudo realizado por Chioda et al. (2007), foram obtidos halos de 12 a 15 mm de diâmetro. Para tanto, foi utilizado o teste de inibição através do método de dupla camada em triplicata para avaliar zonas de inibição de crescimento. Segundo os autores a inibição do crescimento e atividade bactericida de *L. acidophilus* sobre *E.coli* ocorreu devido à produção de ácido lático e à redução do pH.

Com relação aos meios de cultivo utilizados, o soro de leite possibilitou a formação de halos de inibição superiores ao meio sintético (MRS), o que contribui para a diminuição dos custos de produção .



Figura 1: Halos de inibição do extrato purificado obtido no cultivo de *L. acidophilus* em meio MRS, frente à *Escherichia coli*



Figura 2: Halos de inibição do extrato purificado obtido no cultivo de *L. acidophilus* em meio soro de leite, frente à *Escherichia coli*

3 CONCLUSÃO

Todos os meios de cultivo utilizados para o crescimento da bactéria láctica demonstraram ser eficientes para a produção de compostos antimicrobianos. Os maiores halos de inibição foram obtidos após o processo de purificação dos extratos, caracterizando a presença da atividade antimicrobiana de bacteriocinas.

O *Lactobacillus acidophilus* produziu substâncias que apresentaram ação inibidora sobre culturas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella sp* utilizados como microrganismos alvo.

REFERÊNCIAS

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n° 368, de 4 de setembro de 1997: Regulamento Técnico Sobre as Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Elaboração para Estabelecimentos Elaboradores/ Industrializadores de Alimentos.

BROCK, T.D.; MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M. et al. Biology of Microorganisms. New Jersey: Prentice-Hall, 1994.

CAMARGO, Rodolpho et al., Tecnologia dos Produtos Agropecuários, Editora Nobel, São Paulo (1984).

CAPLICE, E.; FITZGERALD, G.F. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal Food Microbiology*, v.50, n. 1-2, p.131-149, 1999.

CEBECI, A.; GURAKAN, C. Properties of potencial probiotic *Lactobacillus plantarum* strains, *Food Microbiology*, v.20, p.511-518, 2003.

CHIODA, T.P., et.al. Inibição do crescimento de *Escherichia coli* isolada de Queijo *Minas Frescal* por *Lactobacillus acidophilus*. *Ciência Rural*, v. 37, n. 2, p. 583-585, 2007.

CLOSE, W.H. Producing pigs without antibiotic growth promoters. *Advances in Pork production*, v.11, p.47-56, 2000.

GARDNER, W.H., Acidulants in food processing. In: *Handbo of Food Additives*. 2. Ed., Thomas E. Furia, CRC Press, 1972.

HOEFLER, R; VIDOTTI, C. C. F.; MENEZES, E. S.; PINHEIRO S. Ações que estimulam o uso racional de antimicrobianos. *Boletim farmacoterapêutica Informativo do Centro Brasileiro de Informação sobre Medicamentos – Cebrim*, ano XI, n. 4, 2006.

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

KAYSER, V. L., Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de embutidos curados frente à *S. Aureus*, *L. Monocytogenes* e *Salmonella spp*, URI - Frederico Westphalen, 2007.

LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA, Instruções para coleta de amostras de swab de superfície e do ar de ambientes, UPF, Passo Fundo – RS.

LOPES, E.A Guia para elaboração dos procedimentos operacionais padronizados exigidos pela RDC nº 275 da ANVISA. São Paulo: Livraria Varela, 2004.

MENEZES, T. J. B. Fabricação de pickles. *Boletim do Centro Tropical de Pesquisas e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v.8, 1973.

PASSOS, C. B.; SILVA, F. S.; RODRIGUES, E. F.; COLLA, L. M. Potencial antimicrobiano do microrganismo Probiótico *lactobacillus acidophilus* sobre a bactéria *Escherichia coli*. UPF, 2009.

PEREIRA, V. G.; GÓMEZ, R. J. H. C. Atividade antimicrobiana de *Lactobacillus acidophilus*, contra microrganismos patogênicos veiculados por alimentos. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 28, n. 2. p. 229-240, 2007.

PINTO, M. E. Antimicrobianos. Disponível em:

<<http://www.med.uchile.cl/apuntes/archivos/2006/medicina/antimicrobianos.pdf>>

RIBEIRO, M.; SOARES, M. M. Microbiologia prática roteiro e manual - Bactérias e fungos. 1. ed. São Paulo, Rio de Janeiro, Belo Horizonte: Editora Atheneu, 2000.

SILVA JUNIOR, E. A., Manual de Controle higiênico-sanitário em alimentos. São Paulo: Livraria Varela, 1995.

SOCOL, C. R.; PARADA, J. L.; CARON, R. C.; MEDEIROS, A. B.P., Bacteriocins from Lactic acid bacteria: Purification, properties and use as biopreservativos, Universidade Federal do Paraná, 2007.

TAMINI, A. Y. & R. K. ROBINSON, Yoghurt Science and Technologie, Bergamon Press LTD, Inglaterra (1985).

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F., Microbiologia. 4 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2005.

VIEIRA, G. R. T. Otimização das condições de cultivo de Polyporus tricholoma Mont. Visando a produção de substâncias antibacterianas. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

WOOD, Brian J.B., Microbiology of Fermented Foods, Elsevier Applied Science Publishers LTD (1985).