

10. VALORIZACIÓN DE LACTOSUEROS DE QUESERÍA PARA SU EMPLEO COMO BIOPESTICIDA

*Francisco Pérez Nevado
Ignacio Amaro Blanco
Marcos Hernández Suárez
María de Guía Córdoba Ramos*

1. INTRODUCCIÓN

El sector de elaboración de quesos tiene una gran importancia económica en España. Según datos del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, en el año 2011 la producción de quesos estuvo por encima de las 300.000 toneladas; la producción de queso de oveja representó un 14,1% del total de queso nacional. Nuestro país tiene una gran tradición quesera, pudiéndose encontrar más de 100 tipos de queso diferentes, una gran cantidad de los cuales están acogidos a las 27 Denominaciones de Calidad Diferenciada de quesos que existen. Extremadura cuenta con 3 Denominaciones de Origen (Torta del Casar, Torta de la Serena y Queso de los Ibores), dos de ellas de queso de oveja, de sobra conocidas a nivel internacional por la elevada calidad de sus quesos.

Durante el proceso de coagulación de la leche para la obtención de queso, se generan grandes volúmenes de un subproducto líquido, el lactosuero de quesería. Éste es el principal subproducto de la industria quesera y su producción representa entre el 80 y 90% del volumen total de leche empleado en el procesado, aunque esto depende en gran medida del tipo de queso elaborado. Es en esta fracción líquida de la leche en la que se concentra la mayor parte del agua contenida en la leche; además, en ella nos encontramos alrededor del 55% de los nutrientes de la leche, la mayoría de las sustancias solubles, como la lactosa, proteínas solubles, sales minerales o vitaminas, además de bajas concentraciones de grasa. Tradicionalmente, un elevado porcentaje se desechaba, eliminándose a ríos, lagos o suelos; hoy día, debido a su elevada concentración en materia orgánica, el lactosuero se considera un residuo altamente contaminante si se vierte directamente al medio ambiente. Además, la legislación medioambiental es cada vez más estricta, exigiéndoles a las industrias la gestión del lacto-

suero que producen; para ello, tendrán que tratarlo o reutilizarlo en sus propias instalaciones. Sin embargo, la mayoría de las empresas no cuentan con sistemas de tratamiento adecuados, por lo que tienen que entregarlo a otra empresa para su empleo o transformación. Desarrollar nuevos métodos para el tratamiento y aprovechamiento de los subproductos de una empresa para utilizarlos en otro proceso industrial, no sólo facilitaría la protección del medio ambiente, sino que además conllevaría un ahorro económico significativo para el sector.

En los últimos años se han realizado diversos estudios enfocados al aprovechamiento del lactosuero, entre los que están los enfocados a la recuperación de la lactosa del lactosuero y de otros compuestos para su empleo en la síntesis de productos químicos, farmacéuticos y para la industria alimentaria. Algunos de los productos alimentarios desarrollados tienen una gran aceptación popular por su calidad y sabor, como ciertas bebidas refrescantes; e incluso se han desarrollado bebidas funcionales, menos alergénicas y con una mayor concentración de aminoácidos esenciales (Pescuma *et al.*, 2010). A partir del lactosuero se han obtenido también ácidos orgánicos, exopolisacáridos e incluso nuevos cultivos iniciadores lácteos (Pescuma *et al.*, 2010). Un posible uso alternativo del lactosuero de quesería sería su empleo como biopesticida; de este modo se daría salida a este subproducto, le aportaría un valor añadido y además, se evitarían los problemas de contaminación medioambiental y riesgo para el hombre que plantean los pesticidas químicos. Con este trabajo se ha pretendido desarrollar un método que permita revalorizar este subproducto de la elaboración de quesos, y obtener, a partir del lactosuero de quesería, un producto antimicrobiano que se pueda emplear frente a diversos microorganismos patógenos, vegetales y humanos. Para ello, se determinó la capacidad de inhibición frente a microorganismos patógenos de tres compuestos que pueden estar presentes en el lactosuero fermentado (Ácido Láctico, Nisina y Lactoferrina). Asimismo, se realizó una evaluación de la actividad antimicrobiana de los lactosueros fermentados, se optimizó la producción de Nisina y Ácido Láctico y se realizó una fermentación a escala piloto.

2. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE COMPUESTOS PRESENTES EN EL LACTOSUERO “IN VITRO”

Se realizaron estudios de inhibición de tres biocidas comerciales que se encuentran presentes en el lactosuero de quesería no fermentado (Lactoferrina) y fermentado (Ácido láctico y Nisina). Se analizó su efecto sobre microorganismos patógenos de humanos (6 bacterias: *B. cereus*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *C. coli* y *C. jejuni*) y patógenos de vegetales (1 bacteria: *Pseudomonas savastanoi*; y 2 mohos: *V. dahliae* y *B. fuckeliana*). Para ello, se sembró un césped de cada uno de los microorganismos problema sobre medio sólido, inoculándose con soluciones de cada uno de los compuestos antimicrobianos a diferentes concentraciones y determinándose la presencia de halo de inhibición sobre el césped de microorganismo. A partir de los resultados de inhibición obtenidos se obtuvo la Mínima Concentración Inhibitoria (MIC) para cada microorganismo y compuesto (ver cuadro 1). La MIC se definió como la concentración más baja de biocida capaz de inhibir el desarrollo de un microorganismo.

CUADRO 1: Mínima Concentración Inhibitoria (MIC) de los compuestos biocidas usados en este estudio

Microorganismo	MIC		
	Lactoferrina	Ácido Láctico	Nisina
Patógenos de humanos			
<i>Campylobacter jejuni</i>	>0,5%	>5%	2,5 mM
<i>Campylobacter coli</i>	0,5%	5%	2,5 mM
<i>Listeria monocytogenes</i>	>0,5%	5%	>2,5 mM
<i>Escherichia coli</i>	>0,5%	2,5%	>2,5 mM
<i>Staphylococcus aureus</i>	>0,5%	5%	>2,5 mM
<i>Bacillus cereus</i>	>0,5%	2,5%	>2,5 mM
Patógenos de vegetales			
<i>Pseudomonas savastanoi</i>	>0,5%	0,25%	>2,5 mM
<i>Verticillium dahliae</i>	0,25%	1,25%	0,25 µM
<i>Botryotinia fuckeliana</i>	0,5%	>5%	25 µM

La actividad antimicrobiana de diferentes compuestos aislados de la leche o productos lácteos, como proteínas, péptidos o ácidos ha sido analizada en diversos trabajos. La Nisina es un péptido conocido por su elevada actividad antibacteriana frente a bacterias Gram-positivas, aunque también hay estudios en los que se muestra su efecto frente a bacterias Gram-negativas, como *Salmonella*, *Enterobacter*, *Shigella*, *Escherichia*, *Citrobacter* o *Listeria* (Stevens *et al.*, 1991). Algunos autores (Akerey *et al.*, 2009) sugieren que la Nisina Z puede ser útil incluso como antifúngico frente a *C. albicans*.

De los tres biocidas ensayados, el Ácido Láctico fue considerado el de mayor actividad antimicrobiana; todos los microorganismos, salvo *B. fuckeliana*, fueron sensibles a alguna de las concentraciones de Ácido Láctico ensayadas. El microorganismo más sensible fue *Ps. savastanoi*, inhibiéndose con 0,25% de Ác. Láctico. En cuanto a la Lactoferrina y la Nisina, las menores MIC fueron las de esos compuestos al inhibir el crecimiento de *V. dahliae* (0,25% y 0,25 µM, respectivamente). Es bien conocido que la Lactoferrina muestra actividad antimicrobiana frente a diferentes microorganismos, incluyendo bacterias Gram-negativas, como *Listeria*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Vibrio* o *Escherichia* (Del Olmo *et al.*, 2010; Yekta *et al.*, 2010). También se ha encontrado que la Lactoferrina presenta actividad antifúngica frente a varias especies de *Candida* aisladas de muestras clínicas (Kuipers *et al.*, 1999). Por otro lado, se sabe que el Ácido Láctico exhibe efectos antagonistas frente a varias bacterias Gram-negativas, entre las que se encuentran *Salmonella*, *Campylobacter*, *Listeria*, *Escherichia*, *Brochothrix*, *Yersinia*, *Pseudomonas*, o *Aeromonas* (Rouse *et al.*, 2008). Analizando el crecimiento y muerte de *B. cereus* en leche fermentada con bacterias ácido lácticas, Røssland *et al.* (2003) llegaron a la conclusión que la inhibición del crecimiento de ese microorganismo se debe principalmente a la disminución del pH como consecuencia de los ácidos producidos durante la fermentación. Además, se ha demostrado que muchas bacterias lácticas son capaces de producir diversos metabolitos antifúngicos (Rouse *et al.*, 2008). Sin embargo, en otros casos la activi-

dad inhibidora de las bacterias ácido lácticas frente a mohos se ha relacionado con la producción de otros compuestos diferentes al Ácido Láctico (Gourama, 1997).

3. ENSAYOS DE PRODUCCIÓN DE ANTIMICROBIANOS POR FERMENTACIÓN DE LACTOSUEROS A ESCALA DE LABORATORIO

Se realizaron fermentaciones de lactosuero con 4 cepas bacterianas (*E. faecium* 248, *L. casei* 245, *L. lactis* CECT188 y *E. faecium* 238), caracterizadas por su capacidad fermentativa, su resistencia a condiciones adversas y la producción de sustancias antimicrobianas (Ruiz-Moyano *et al.*, 2009). A lo largo de las 24 horas de fermentación se realizó un control microbiológico mediante recuentos en placa para analizar la evolución de los microorganismos. Asimismo, se determinaron las concentraciones de Ácido Láctico, Lactoferrina y Nisina en los lactosueros fermentados. En el gráfico 1 se muestran los resultados del control microbiológico de los lactosueros fermentados. Se puede observar que los 4 microorganismos utilizados fueron capaces de desarrollarse en el lactosuero, manteniéndose siempre a concentraciones superiores a 10^7 UFC/mL.

Se analizó la influencia de la fermentación sobre la concentración de Lactoferrina en el lactosuero fermentado. Para determinar la Lactoferrina, se realizó una separación de las proteínas del lactosuero mediante geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) al 12% (gráfico 2); la concentración de Lactoferrina se determinó mediante un analizador de imágenes utilizando un patrón de Lactoferrina al 0,1%.

GRÁFICO 1: Evolución del desarrollo de las bacterias inoculadas en el lactosuero de quesería

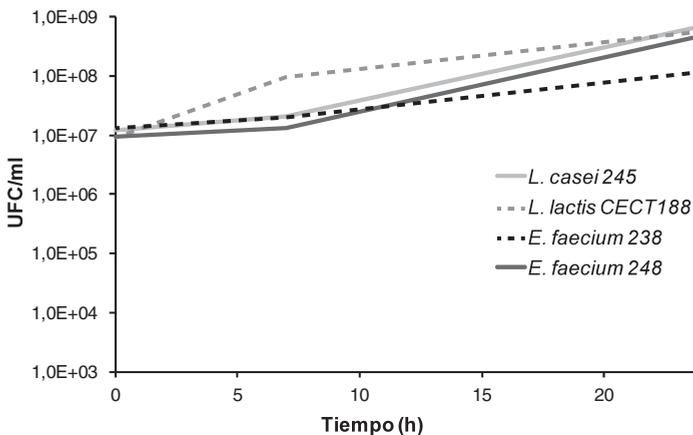
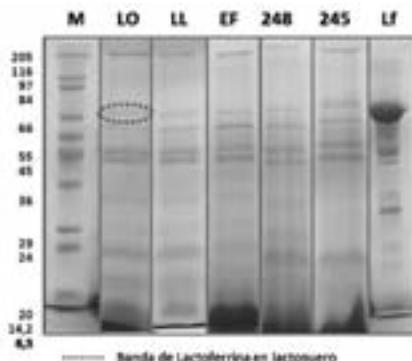


GRÁFICO 2: SDS-PAGE de los lactosueros fermentados. M, Marcador de peso molecular (kDa); LL, *L. lactis* CECT188; EF, *E. faecium* 238; 248, *E. faecium* 248; 245, *L. casei* 245; Lf, Lactoferrina



En el cuadro 2 se exponen los resultados de las concentraciones de Lactoferrina en los lactosueros fermentados y sin fermentar. La concentración de Lactoferrina en los diferentes lactosueros se encontraba en un rango de 0,0087-0,0140%. Al realizar un análisis estadístico de los datos utilizando un análisis de varianza (ANOVA), siguiendo los procedimientos de una vía y realizando un test de comparación de medias por el método Tukey, no se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) en las concentraciones de Lactoferrina entre los lactosueros sin fermentar y fermentados. Parece, por tanto, que la fermentación no afecta a la concentración de Lactoferrina en el suero.

También se determinó la capacidad de las cepas seleccionadas para producir Ácido Láctico por fermentación de los lactosueros de quesería. Todas las cepas produjeron un aumento en la concentración de Ácido Láctico en el lactosuero; obteniéndose las mayores concentraciones fermentando el lactosuero con *E. faecium* 248 (0,56%) y *L. casei* 245 (0,63%).

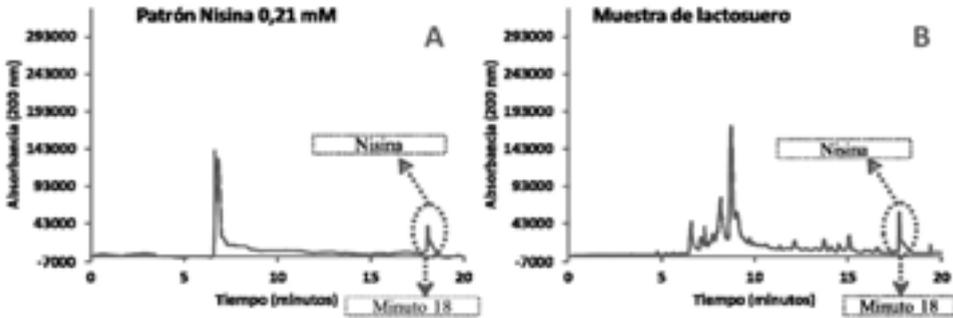
CUADRO 2: Concentración de Lactoferrina en lactosueros sin fermentar y fermentados ($X \pm SD$)

Tipo de lactosuero	Lactoferrina (%)
Lactosuero sin fermentar	0,0087 \pm 0,0033
<i>L. casei</i> 245	0,0105 \pm 0,0019
<i>L. lactis</i> CECT188	0,0140 \pm 0,0046
<i>E. faecium</i> 238	0,0074 \pm 0,0049
<i>E. faecium</i> 248	0,0100 \pm 0,0024

Por último, se optimizó un método para determinar la producción de Nisina en lactosueros fermentados basado en la utilización de la Electroforesis Capilar. Al analizar los electroferogramas de soluciones patrón de Nisina con diferentes concentraciones, en todos los casos se observó un pico en el minuto 18 que correspondía a la Nisina (gráfico 3.A). El área de ese pico se utilizó para elaborar la recta patrón empleada para estimar las concentraciones de Nisina en los lactosueros. Ese mismo pico apareció en lactosueros fer-

mentados (gráfico 3.B); mientras que en ningún caso se encontró en el lactosuero sin fermentar. En los lactosueros fermentados por *L. lactis* CECT188 y por *E. faecium* 238 la concentración media de Nisina fue muy similar (0,56%).

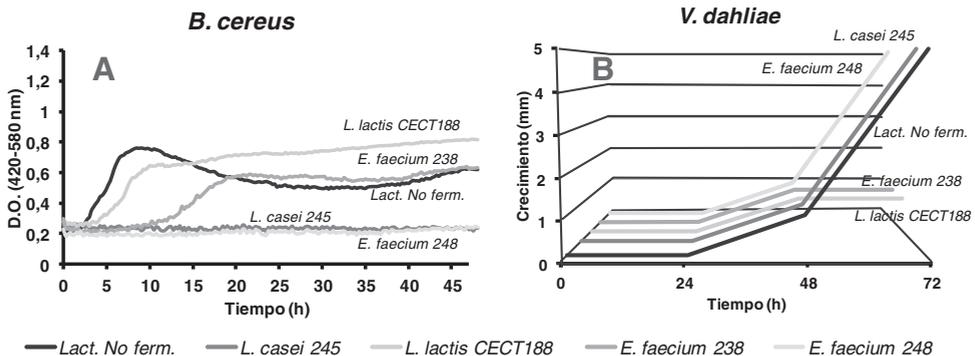
GRÁFICO 3: Identificación del pico asociado a la Nisina en el patrón (A) y en lactosuero fermentado (B)



4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS LACTOSUEROS “IN VITRO”

Se analizó la capacidad inhibitoria de los lactosueros fermentados con bacterias ácido-lácticas sobre el crecimiento de bacterias y mohos patógenos. Para ello, las bacterias patógenas se incubaron en medio líquido al que se adicionaron los lactosueros fermentados, analizándose el crecimiento con un lector de cinética microbiana (Bioscreen C) basándose en la medida de la DO de 420 a 580 nm. Se estudió también la capacidad inhibitoria de los lactosueros fermentados sobre dos mohos patógenos, *V. dahliae* y *B. fuceliana*; debido al crecimiento miceliar de los mohos, el análisis de su crecimiento se realizó visualmente.

GRÁFICO 4: Capacidad de inhibición de los lactosueros frente a *B. cereus* y *V. dahliae*



En general, observamos que los lactosueros fermentados con las cepas de *L. casei* 245 y *E. faecium* 248 mostraron mayor inhibición de las bacterias patógenas ensayadas que las cepas de *L. lactis* CECT188 y *E. faecium* 238. La única cepa no inhibida por *L. casei* 245 fue *S. aureus*, aunque sí provocó un evidente retraso en su desarrollo. Por su parte, *E. faecium* 238 inhibió el desarrollo de *E. coli*, *L. monocytogenes*, *C. coli* y *P. savastanoi*, y provocó un retraso en el crecimiento del resto. *L. lactis* CECT188 aunque no inhibió completamente a ninguna de las bacterias, afectó a su desarrollo, con excepción de *S. aureus*. En el gráfico 4.A se muestra el crecimiento de *B. cereus* en presencia de los diferentes lactosueros, en él se observa la capacidad inhibitoria del lactosuero fermentado por *L. casei* 245 y *E. faecium* 248. Al analizar la capacidad inhibitoria sobre los mohos patógenos, en ningún caso se observó inhibición del crecimiento, encontrándose únicamente un retraso en el desarrollo de *V. dahliae* con extractos de *L. lactis* CECT188 y *E. faecium* 238 (gráfico 4.B). Existen diversos estudios en los que se analiza el efecto de la inoculación de bacterias ácido lácticas en leche sobre diferentes bacterias patógenas. Røssland *et al.*, (2003) trabajando con leche desnatada fermentada con varias cepas de *Lactobacillus* y *Lactococcus*, determinaron que la mayoría eran capaces de inhibir el crecimiento de *Bacillus*, aunque fueron las fermentaciones con *Lactococcus* las que presentaron mayor inhibición. Rodríguez *et al.*, (2005) demostraron que, durante la elaboración del queso, la inoculación con cepas de *L. lactis* productoras de bacteriocinas era capaz de inhibir el desarrollo de *Listeria*, *Escherichia* y *Staphylococcus*.

De los resultados obtenidos del análisis de la capacidad antimicrobiana de los lactosueros en medio líquido, podemos decir que la fermentación de los lactosueros permite obtener un producto con una mayor capacidad inhibitoria que el original, ya que el lactosuero sin fermentar apenas tiene poder antimicrobiano.

5. OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO Y NISINA A ESCALA DE LABORATORIO

Una vez comprobada la capacidad inhibitoria de los lactosueros de quesería fermentados, nos planteamos optimizar la producción de los compuestos antimicrobianos (Ácido Láctico y Nisina) mediante fermentación. Para ello, se realizaron varias fermentaciones en laboratorio utilizando las bacterias ácido-lácticas seleccionadas (*E. faecium* 248, *L. casei* 245, *L. lactis* CECT188 y *E. faecium* 238). Se ensayaron dos pH diferentes (5 y 5,5) y varios suplementos de extracto de levadura y peptona carne (0/0, 1/0,5, 1,5/1, 2/1,5 y 3/2, % extracto levadura/% peptona).

En el gráfico 5 se muestran las concentraciones de Nisina y Ácido Láctico, producidos por los microorganismos inoculados. De las dos bacterias ácido lácticas utilizadas para la producción de Ácido Láctico, la que produjo mayores concentraciones fue *E. faecium* 248; las diferencias entre ambos microorganismos fueron estadísticamente significativas. En las fermentaciones para producir Nisina también se encontraron diferencias significativas, siendo *E. faecium* 238 el que mayores concentraciones produjo.

GRÁFICO 5: Concentraciones de Nisina y Ácido Láctico en fermentaciones con diferentes inóculos

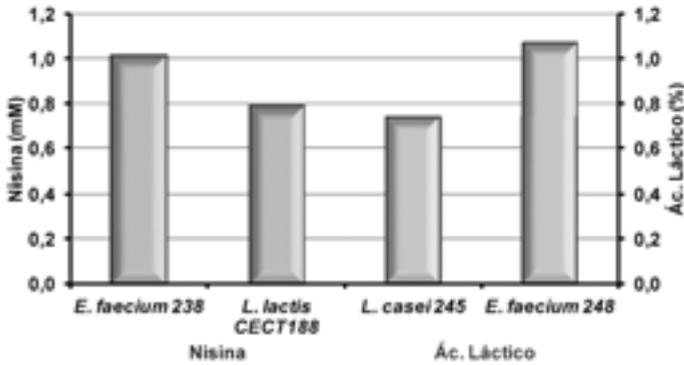
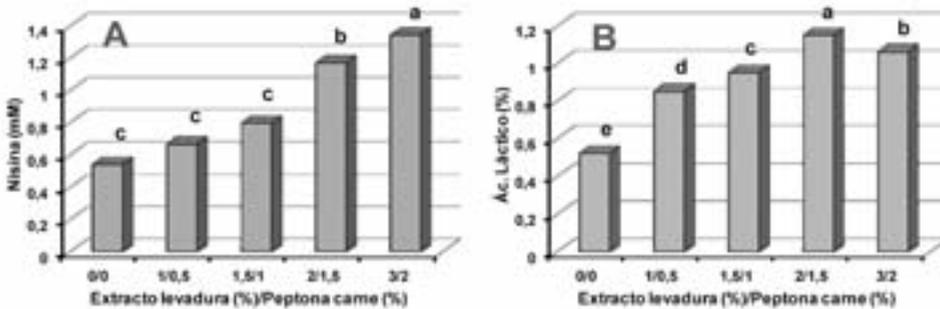


GRÁFICO 6: Concentraciones de Nisina y Ácido Láctico en fermentaciones con diferentes suplementos

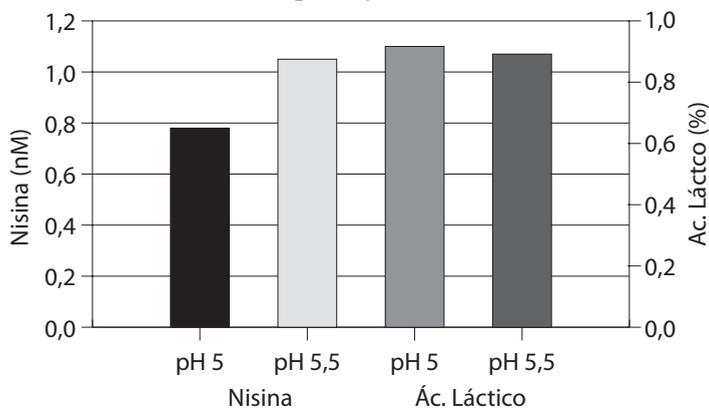


Al analizar el efecto de suplementar el lactosuero con Extracto de levadura y Peptona de carne (gráfico 6), se observaron diferencias significativas en función del suplemento utilizado (diferentes letras indican grupos estadísticamente diferentes según el Test de Tukey). Las mayores producciones de Nisina se obtuvieron con el lactosuero suplementado con 3% de Extracto de levadura y 2% de Peptona de carne (gráfico 6.A); mientras que la mayor concentración de Ácido Láctico se alcanzó suplementando con 2% de Extracto de levadura y 1,5% de Peptona carne (gráfico 6.B).

Por último, se encontraron diferencias en función del pH dependiendo del tipo de compuesto a producir. Mientras que la producción de Nisina era superior a pH 5,5, se obtuvieron mayores concentraciones de Ácido Láctico a pH 5 (gráfico 7).

Otros autores como Panesar *et al.*, (2010), analizaron la influencia de diferentes parámetros durante la fermentación de lactosuero con *L. casei* sobre la producción de Ácido Láctico, incluyendo la temperatura, el pH y el tamaño de inóculo. Estos autores justifican las diferencias en la producción debido al uso de distintas cepas y composición del medio. En cuanto a la producción de bacteriocinas, al igual que los nuestros, los resultados de Mirhosseini y Emtiazi (2011) muestran que el lactosuero de quesería se puede utilizar para la producción de una bacteriocina por *E. faecium*. Según estos autores, la fuente de nitrógeno, el pH, la aireación y la temperatura tienen una gran importancia en esta producción.

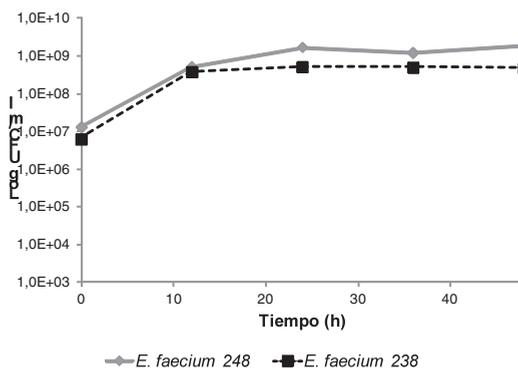
GRÁFICO 7: Producción media de Nisina y Ác. Láctico en lactosuero ajustado a pH 5 y 5,5



6. PRODUCCIÓN DE BIOPESTICIDAS EN FERMENTACIONES A ESCALA PILOTO

Basándonos en los resultados obtenidos en las microfermentaciones en laboratorio, se seleccionaron las cepas y condiciones de cultivo más adecuadas para las producciones de Nisina y de Ácido Láctico, y se llevaron a cabo fermentaciones en un fermentador a escala piloto para conseguir lactosueros enriquecidos en los biocidas Ácido Láctico y Nisina. Se realizaron dos tipos de fermentaciones; unas para producir Ácido Láctico, con lactosuero ajustado a pH 5 y suplementado con 2% de extracto de levadura y 1,5% de peptona carne, inoculando con *E. faecium* 248. El otro tipo de fermentación se realizó inoculando con *E. faecium* 238 para producir Nisina, ajustando el pH del lactosuero a 5,5 y suplementando con 3% de extracto de levadura y 2% de peptona. En ambos casos se utilizaron 2 L de lactosuero de quesería que se pasterizó antes de inocular con los cultivos iniciadores. La fermentación se realizó durante 48 h, llevándose a cabo controles periódicos del crecimiento de los microorganismos. Como puede observarse en el gráfico 8, el crecimiento de los microorganismos fue similar en ambos tipos de fermentaciones, alcanzando niveles superiores a 10^8 UFC/ml a partir de las 12 horas.

GRÁFICO 8: Crecimiento de las cepas seleccionadas en fermentaciones de lactosuero a escala piloto



En el gráfico 9 se muestra la producción de Ácido Láctico y de Nisina a lo largo del tiempo. En la fermentación para la producción de Ácido Láctico este compuesto fue aumentando su concentración de forma progresiva a lo largo del tiempo, aunque a partir de las 36 horas de fermentación no se observó un aumento notable de la acidez; al final de la fermentación se alcanzó una concentración de 1,5%. En cuanto a la producción de Nisina por *E. faecium* 238, se observó un aumento significativo en su concentración en el lactosuero durante las primeras 12 horas; a partir de ese momento apenas hubo diferencias en su producción.

Tras finalizar la fermentación, se realizó una liofilización de los lactosueros producidos para su almacenamiento y posterior utilización en ensayos de campo. En la figura 1 se muestra uno de los biopesticidas tras su liofilización.

Una vez liofilizado, se determinaron las concentraciones de Ácido Láctico y Nisina en los biopesticidas obtenidos con *E. faecium* 248 y *E. faecium* 238. Comparando con los lactosueros sin liofilizar, encontramos que los liofilizados presentaban una concentración de los compuestos antimicrobianos muy superior a la del lactosuero original. En el caso del lactosuero fermentado con *E. faecium* 248, el liofilizado presentaba una concentración de Ácido Láctico de 13,1%. Por su parte, el lactosuero fermentado por *E. faecium* 238 y liofilizado tenía una riqueza de 5,12 mM de Nisina. La liofilización de los lactosueros fermentados podría ser utilizada con una doble función; permitiría obtener un producto fácil de almacenar y conservar y, por otra parte, resultaría eficaz para aumentar la concentración de ambos biocidas en el lactosuero, permitiendo incrementar su capacidad biocida de una forma sencilla y rápida. De este modo, se ha obtenido un producto que estaría listo para su comercialización y empleo en campo para eliminar y proteger diversos cultivos de patógenos vegetales. Para potenciar aún más su efecto biocida se podrían emplear los biopesticidas obtenidos de forma conjunta, como un solo producto.

GRÁFICO 9: Evolución de la concentración de Ácido láctico y Nisina durante las fermentaciones piloto

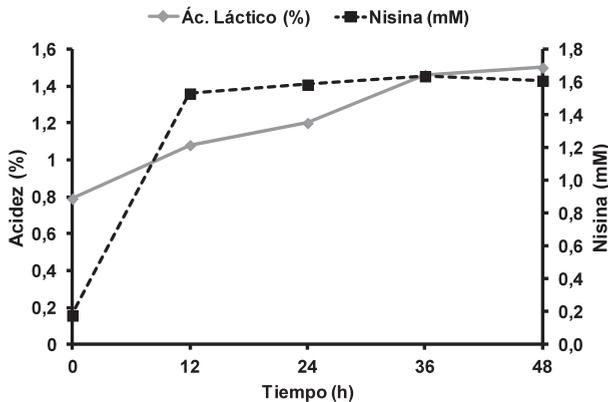


FIGURA 1: Biopesticida liofilizado



Para concluir, podemos decir que los tres biocidas ensayados (Lactoferrina, Nisina y Ácido Láctico) fueron capaces de inhibir el desarrollo de uno o más de los microorganismos patógenos utilizados en este estudio. Las MIC fueron diferentes para cada microorganismo y biocida, siendo el más efectivo el Ácido Láctico, seguido de la Nisina. Además, se determinaron las condiciones óptimas de pH y suplementos a añadir al lactosuero para la producción de Ácido Láctico y de Nisina en función de la cepa de bacteria a emplear. Y por último, se realizó una fermentación a escala piloto, tras la cual se obtuvieron dos tipos de biopesticidas, uno con elevadas concentraciones de Ácido Láctico y otro rico en Nisina. Ambos productos se liofilizaron para facilitar su conservación durante un tiempo largo, así como para su posterior utilización como biopesticidas comerciales en campo.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer su colaboración al *Centro Tecnológico Agroalimentario de Extremadura (CTAEX)*, así como a su directora, Carmen González Ramos, por su apoyo durante el desarrollo de este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- Akerey, B., Le-Lay, C., Fliss, I., Subirade, M., Rouabhia, M. (2009): *In vitro* efficacy of nisin Z against *Candida albicans* adhesion and transition following contact with normal human gingival cells. *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 107, Issue 4, pages 1298–1307.
- Del Olmo, A., Calzada, J., Nuñez, M. (2010): Short communication: Antimicrobial effect of lactoferrin and its amidated and pepsin-digested derivatives against *Salmonella enteritidis* and *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Dairy Science*, Vol. 93, Issue 9, Pages 3965-3969.

- Gourama, H. (1997): Inhibition of Growth and Mycotoxin Production of *Penicillium* by *Lactobacillus* Species. *LWT - Food Science and Technology*, Vol. 30, Issue 3, Pages 279-283.
- Kuipers, M.E., de Vries, H.G., Eikelboom, M.C., Meijer, D.K.F., Swart, P.J. (1999): Synergistic fungistatic effects of lactoferrin in combination with antifungal drugs against clinical *Candida* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 43, 2635–2641.
- Mirhosseini, M. y Emtiazi, G. (2011): Optimisation of Enterocin A Production on a Whey-Based Substrate. *World Appl. Sci. J.*, 14 (10): 1493-1499, 2011.
- Panesar, P., Kennedy, J., Knill, C.J. and Kosseva, M. (2010): Production of L(+) Lactic Acid using *Lactobacillus casei* from Whey. *Brazilian archives of Biology and Technology.*, 53(1): 219-226.
- Pescuma, M., Hébet, E., Mozzi F. and Font, G. (2008): Functional fermented whey-based beverage using lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 141, Issues 1–2, 30 June 2010, Pages 73-81.
- Rodríguez, E., Calzada, J., Arqués, J.L., Rodríguez, J.M., Nuñez, M., Medina, M. (2005): Antimicrobial activity of pediocin-producing *Lactococcus lactis* on *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7 in cheese. *International Dairy Journal*, 15: 51–57.
- Røssland, E., Andersen, G.I., Langsrud, T., Sørhaug, T. (2003): Inhibition of *Bacillus cereus* by strains of *Lactobacillus* and *Lactococcus* in milk. *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 89, Issues 2–3, 31 December 2003, Pages 205-212.
- Rouse, S. y Van Sinderen, D. (2008): Bioprotective Potential of Lactic Acid Bacteria in Malting and Brewing. *Journal of Food Protection*, Vol. 71, No. 8, Pages 1724–1733.
- Ruiz-Moyano, S., Martín, A., Benito, M.J., Hernández, A., Casquete, R., Serradilla, M.J. and Córdoba, M.G. (2009). Safety and functional aspects of pre-selected lactobacilli for probiotic use in Iberian dry-fermented sausages. *Meat Science*, 83: 460–467.
- Stevens, K.A., Sheldon, B.W., Klapes, N.A., Klaenhammer, T.R. (1991): Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other gram-negative bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57:3613–3615.
- Yekta, M.A., Verdonck, F., Van Den Broeck, W., Goddeeris, B.M., Cox, E., Vanrompay, D. (2010): Lactoferrin inhibits *E. coli* O157:H7 growth and attachment to intestinal epithelial cells. *Veterinarni Medicina*, 55 (8): 359-368.