

Validación del método de PCR para la detección de las bacteriocinas Nisina y Lactococcina provenientes de *Lactococcus lactis*, aisladas de quesos frescos producidos a pequeña escala en los predios no certificados de los municipios del departamento de Risaralda

**María Camila Cataño Castaño
Cristian Camilo Cañas Toro
Laura Daniela Duque Ramírez**

**Universidad Libre Seccional Pereira
Ciencias de la salud
Microbiología
Pereira
2015**

Validación del método de PCR para la detección de las bacteriocinas Nisina y Lactococcina provenientes de *Lactococcus lactis*, aisladas de quesos frescos producidos a pequeña escala en los predios no certificados de los municipios del departamento de Risaralda

**María Camila Cataño Castaño
Cristian Camilo Cañas Toro
Laura Daniela Duque Ramírez**

Proyecto de Grado

Docente

Elizabeth Castaño Moreno

**Universidad Libre Seccional Pereira
Ciencias de la salud
Microbiología
Pereira
2015**

Nota de aceptación:

Firma del Presidente del jurado

Firma del jurado

Firma del jurado

Pereira 27 de julio de 2015

DEDICATORIA

A Dios, por permitirnos el suficiente entendimiento para llegar a este punto de nuestras vidas. Por concedernos salud para disfrutar de este gran momento, brindándonos sabiduría, amor y paciencia que nos fortalecieron no solo como trabajo de grupo, sino como personas.

A nuestros padres que nos han brindado el apoyo incondicional, la fortaleza en el desarrollo de todo nuestro proceso de vida y la motivación constante que nos ha permitido ser personas de bien. Por el valor y el amor que nos han mostrado para seguir adelante, ayudándonos en los momentos más difíciles para concluir satisfactoriamente nuestro proyecto.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo de investigación fue realizado bajo la supervisión de la docente Elizabeth Castaño Moreno, a quién le expresamos nuestros más sinceros agradecimientos por su paciencia, tiempo y dedicación, haciendo posible la realización de este estudio.

Ante todo, agradecemos a nuestros padres por creer en nosotros y en nuestros sueños. Ellos son la base de la calidad de persona que somos. Con sus enseñanzas hemos crecido con los valores y la fortaleza suficiente para asumir cualquier obstáculo de la vida, teniendo siempre presente el deseo de salir adelante.

Finalmente agradecemos a la universidad, porque sembraron en nosotros un amor infinito por nuestra profesión y nos brindaron oportunidades que permitieron desarrollarnos con una buena formación académica.

CONTENIDO

	pág.
1. INTRODUCCIÓN	
1.1. PROBLEMA QUE MOTIVÓ EL ESTUDIO.....	8
1.2. PREGUNTA QUE GUIÓ EL ESTUDIO.....	9
2. ANTECEDENTES	10
3. JUSTIFICACIÓN	13
4. MARCO TEÓRICO	16
4.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL QUESO FRESCO.....	18
4.1.1. Propiedades del queso	18
4.2. VALIDACIÓN.....	20
4.3. INCERTIDUMBRE.....	21
4.4. NORMA GENERAL DEL CODEX (CODEX STAN 283-1978).....	22
4.4.1. Factores de calidad	22
4.5. POLITICA NACIONAL PARA MEJORAR LA COMPETITIVIDAD DEL SECTOR LACTEO COLOMBIANO (Conpes 3675).....	24
4.6. EXTRACCIÓN DE BACTERIOCINAS.....	25
4.6.1. Nisina	25

4.6.2. Lactococcina	25
5. OBJETIVOS DEL PROYECTO	27
5.1. GENERAL.....	27
5.2. ESPECÍFICOS.....	27
6. METODOLOGÍA	28
6.1. PCR (REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA).....	28
7. RESULTADOS.....	30
8. CONCLUSIONES.....	31
9. RECOMENDACIONES.....	32
10. BIBLIOGRAFÍA.....	33

1. INTRODUCCIÓN

1.1. PROBLEMA QUE MOTIVÓ EL ESTUDIO

Los pequeños predios productores de quesos no certificados que hay en todos los municipios del departamento de Risaralda, se encuentran con la gran dificultad de obtener un buen procedimiento de calidad en la fabricación de los quesos, ya que puede ser muy costoso cumplir con todos los requisitos, y por motivos económicos no están al alcance de ellos para llevar a cabo dicha calidad.

Al conocer este problema y el conpes 3675 que describe la política de gobierno nacional para mejorar la competitividad del sector colombiano, a partir del desarrollo de estrategias que permitan disminuir los costos de producción e incrementar la productividad; nos motivó a estudiar una solución hacedera y económica que nos puede ayudar a dar la alternativa apropiada a los productores para fabricar quesos de calidad con el uso de bioactivos, los cuales son sintetizados por bacterias ácido lácticas, con el fin de disminuir la carga microbiana de los quesos.

El subsector lácteo colombiano se encuentra ante una serie de retos para articularse exitosamente en los mercados internacionales y consolidar el mercado interno, por lo que presenta altos costos de producción, baja productividad en relación con los principales internacionales, dispersión en la producción primaria, alta informalidad en la comercialización y transformación de la leche y sus derivados, y un deficiente estatus sanitario en relación con las exigencias de los mercados, por lo cual se requiere la creación de nuevas estrategias para consolidar la competitividad del subsector, tanto en el mercado interno como externo.

El desarrollo de esta nueva estrategia será con el fin de mejorar la calidad del queso, aumentando la productividad de este en bajos costos y cumplir con las exigencias de los mercados en el estatus sanitario.

1.2. PREGUNTA QUE GUIÓ EL ESTUDIO

¿Cuál es la importancia de validar los métodos de PCR y cromatografía para el uso de las bacteriocinas nisina y lactococcina provenientes de *Lactococcus lactis* como bioactivos en los quesos frescos producidos por pequeños productores?

2. ANTECEDENTES

Las bacteriocinas son sustancias antimicrobianas de naturaleza peptídica y activas, que están generalmente relacionadas con la taxonomía del microorganismo productor.¹ La primera vez que se describieron fue en *E.coli*² y posteriormente se describieron en bacterias gram positivas.³ Estas bacteriocinas se caracterizan no solamente por su naturaleza proteica ni por su acción bactericida sino que además tienen unos receptores celulares que hacen que estas se vuelvan específicas para ejercer su acción. La *E. coli* por ser un microorganismo modelo se le han realizado estudios en profundidad acerca de las bacteriocinas que producen, por lo que ha logrado determinar que normalmente su biosíntesis es producida por la muerte de la célula reproductora. Por otra parte hay un grupo estructural, funcionalmente más amplia y muy heterogéneo, este grupo de bacteriocinas son las producidas por la bacterias gram positivas y su espectro de inhibición puede ser bastante amplio⁴. Dentro de este grupo de las bacterias gram positivas se encuentran las ácido lácticas que tienen gran variedad de cepas con la capacidad de alta producción de bacteriocinas. Todo empezó por el descubrimiento de la Nisina⁵ y desde entonces se ha descrito la producción de estas en todos los géneros de las bacterias lácticas. La primera bacteriocina fue identificada por Gratia en 1925 como una proteína antimicrobiana producida por *Escherichia coli* y nombrada Colicina⁶.

La Nisina es una bacteriocina producida por diversas cepas de *Lactococcus lactis* sub spp. *Lactis*, fue la primera bacteriocina aislada a partir de esta bacteria ácido láctica. Rogers la descubrió en 1928, luego de observar que durante la maduración de unos quesos, determinadas cepas de *Lactococcus lactis* inhibían el crecimiento de otras bacterias lácticas patógenas y que ésta además no era perjudicial para la salud⁷.

Las primeras referencias bibliográficas sobre la producción de bacteriocinas por el género *Lactobacillus* datan de los años 60, cuando De Klerk y Coetzee en 1961 analizaron 189 cepas de lactobacilos homo y heterofermentativos y observaron que, aproximadamente, el 6% producían sustancias bactericidas frente a otros miembros de la familia *Lactobacillaceae*. Desde entonces se han identificado más de 40 bacteriocinas, producidas por especies homofermentativas obligadas (*L. acidophilus*, *L. johnsonii*, *L. amylovorus*, *L. helveticus*), heterofermentativas facultativas (*L. casei*, *L. plantarum*, *L. curvatus* y *L. sake*) y heterofermentativas obligadas (*L. fermentum*), muchas de ellas aisladas de productos cárnicos,

encurtidos y bebidas. Por ejemplo, *Lactobacillus plantarum* es la cepa más frecuentemente productora de bacteriocinas, lo cual explica su habilidad para controlar otros microorganismos, incluyendo patógenos. Una de las bacteriocinas producidas por *L. plantarum* aislada de productos lácteos es plantaricina C que mata células sensibles a nivel de membrana citoplasmática. Las plantaricinas S y T de *L. plantarum* aisladas de aceitunas verdes fermentadas tienen acción contra varias bacterias Gram positivas incluyendo clostridios y propionibacterias⁸.

En la actualidad las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas son las que encierran un mayor interés ya que tienen el estatus de QPS (*qualified presumption of safety*), es decir, son consideradas como microorganismos seguros para la salud, ya que tanto ellas como sus metabolitos han sido consumidos en alimentos fermentados por innumerables generaciones sin que hubiera efectos adversos en la población⁹.

Desde 1951 la Nisina juega un papel importante en la conservación de los alimentos. Reportes indican que la primera preparación comercial de este conservante se obtuvo en Inglaterra en 1953¹⁰.

Los primeros estudios de aplicación de las bacteriocinas en quesos se remontan a los años 50, utilizándose junto con los indicadores cepas productoras de Nisina para prevenir la presencia de clostridios en la fabricación del queso Gruyere, también se ha estudiado la inhibición de la *Listeria monocytogenes* por la producción in situ de Nisina durante la elaboración de queso Camembert y de adición directa de Nisina en el caso de los quesos frescos. La inhibición de la *Listeria monocytogenes* también se ha observado con otras bacteriocinas como la enterocina, que se utiliza como iniciadora en la elaboración del queso Italiano Taleggio o por la adición de pediocina PA-1¹¹.

Han usado una cepa productora de lacticina 3147 como iniciador en queso Cottage al cual se le inoculó 104 ufc/g de *L. monocytogenes*, la actividad de la lacticina 3147 fue detectada a lo largo de los 6 días de almacenamiento y fue asociada con una reducción de 10³ en el número de listerias en queso almacenado a 4°C y la velocidad de muerte fue mayor en quesos almacenados a temperaturas mayores. Esos resultados demostraron la efectividad de la lacticina 3147 como un inhibidor de *L. monocytogenes* en un sistema alimenticio donde la contaminación postmanufactura por este microorganismo puede ocurrir. También comprobaron la efectividad de una cepa productora de lacticina 3147 en inhibir *L. monocytogenes* en quesos madurados por mohos. Esta cepa se inoculó sobre la

superficie de los quesos, los cuales pueden constituir un riesgo de contaminación con listeria y permitir el crecimiento, ya que el pH de la superficie de los quesos madurados puede exceder a 7¹².

Es importante validar las bacteriocinas Nisina y Lactococcina, porque son las más apropiadas para la conservación de los quesos, ya que evita la hinchazón tardía de éstos debido a la producción de gas por *Clostridium* spp., e inhibir el crecimiento de *S. aureus*. Se aplica con éxito en distintos productos y sistemas alimentarios, con especial referencia a la inhibición de Listeria y otros patógenos psicótrofos. La nisina también se utiliza para disminuir la intensidad del tratamiento térmico de los alimentos enlatados¹³. La Nisina se produce de forma natural en algunos productos lácteos y se utiliza en la transformación de alimentos como aditivo para prevenir la descomposición ocasionada por bacterias Gram positivas¹⁴. Son asimiladas fácilmente en el cuerpo humano por lo que su naturaleza peptídica permite su degradación por las enzimas digestivas, es inactivada rápidamente en el intestino y no puede detectarse en la saliva de humanos diez minutos después de haber consumido un líquido que la contenga, resultando así presuntivamente inocua para el consumidor y su microbiota intestinal y no produce cambios en las características organolépticas de los alimentos. Además la Nisina tiene la ventaja de ser la única bacteriocina incluida en la lista positiva de aditivos alimentarios, Codex Alimentarius, en su norma estándar para quesos, Puede ser usada a una concentración de 12,5 mg/Kg (Codex Stan 283 – 1978)¹⁵, esto la hace mucho más interesante e importante para nosotros por su fácil aplicación en nuestro proyecto.

3. JUSTIFICACIÓN

El hombre a lo largo de la historia, se ha preocupado por conservar los alimentos ya sea por medio de métodos físicos, como el calentamiento, la deshidratación, la irradiación, la congelación, o por métodos químicos como la adición de sustancias tales como ácido sórbico, sorbato sódico, sorbato de potasio, entre otros; con el fin de causar la muerte de los microorganismos o inhibir su crecimiento¹⁶. Por esta razón la industria de alimentos utiliza conservantes químicos con capacidades bactericidas como los sulfatos y los nitritos; sin embargo, estos bactericidas presentan ciertos riesgos, ya que al estar presentes en la mayoría de los alimentos puede sobrepasar el límite de ingesta diaria y entrar a ser tóxicos, ocasionando enfermedades degenerativas en el sistema metabólico como el cáncer¹⁷.

Actualmente las personas están siendo más conscientes de la alimentación y sus implicaciones para la salud, de allí que se haya asociado a los aditivos químicos como factores que pueden desencadenar problemas en el ser humano. Por estos y otros factores, la tendencia se está inclinando a consumir alimentos sin conservantes o que contengan aditivos naturales, eliminando el empleo de conservantes químicos en determinados alimentos y utilizando solo refrigeración como mecanismo de conservación, esto supone un riesgo potencial para el consumidor, especialmente si se considera la posibilidad de que se rompa la cadena de frío durante el proceso, la manipulación, la distribución y el almacenamiento de este tipo de productos. Por lo tanto, la creciente demanda de productos mínimamente procesados y listos para el consumo, los cuales son obtenidos generalmente sin el uso de aditivos, plantea un importante reto para la seguridad alimentaria ya que se requiere inhibir el crecimiento microbiano propio de productos crudos, manteniendo la calidad y la frescura de los alimentos. Por ello está adquiriendo más importancia el uso combinado de barreras contra el crecimiento de microorganismos que permitan obtener alimentos seguros sin afectar las propiedades organolépticas.

La inocuidad, como factor imprescindible de la calidad de los alimentos y por ende de la seguridad alimentaria, comprende el conocimiento y manejo de las causas de su deterioro. Una de las causas principales se da por el ataque microbiano (bacterias, levaduras y mohos), lo cual tiene implicaciones económicas evidentes, tanto para los fabricantes, como para distribuidores y consumidores.

Las investigaciones a través de los años han llevado a descubrir sustancias naturales capaces de inhibir o controlar el crecimiento y el desarrollo microbiano en los alimentos. Uno de estos descubrimientos son las bacteriocinas, las cuales poseen actividad antimicrobiana, letal o inhibidora, frente a grupos bacterianos estrechamente relacionados con los que las producen. Su naturaleza química permite que puedan ser consideradas conservantes naturales por ser producto de las bacterias ácido lácticas, que han desarrollado gran importancia por su capacidad de conservar alimentos y a su vez provienen de un grupo bacteriano excelentemente saludable.

Debido a que los productores a pequeña escala de leche y quesos son un gran campo importante de empleo, es necesario aumentar su competitividad frente al mercado nacional, por lo tanto es muy importante prolongar la vida útil de sus productos para que tengan un mayor tiempo de conservación, y el usar las bacteriocinas como conservante natural sería una manera viable para que el producto permanezca fresco por más tiempo y su distribución estará más sencilla, contando también con que el consumo será más provechoso ya que no será perjudicial para la salud por lo que la carga microbiana se encontrara demasiado baja y así se podrá disfrutar de las características nutricionales del queso y la leche.

El propósito principal de este proyecto es aprovechar las bacteriocinas Nisina y lactococcina producidas por la bacteria *Lactococcus lactis* para que puedan ser empleadas en la industria de alimentos, y así aumentar la conservación de productos derivados de los lácteos producidos a pequeña escala, ya que son las mejor caracterizadas como conservante natural y podrán ser empleadas para prolongar la vida útil de diversos productos lácteos, evitando la alteración de las conservas por microorganismos termófilos, además pueden contribuir disminuyendo la intensidad del tratamiento térmico de los alimentos enlatados, ayudaría en la conservación de alimentos de pH ácido, en productos de panadería con humedad elevada, huevo líquido pasteurizado, además de inhibir el crecimiento de *Clostridium* en los quesos de pasta cocida y en los quesos fundidos donde este crecimiento es responsable de hinchazones tardías.

Aunque actualmente el tema de las bacteriocinas es de mucho interés tanto para el sector industrial como para el investigativo, la información aún sigue estando muy corta y fragmentada en documentos como artículos científicos y tesis doctorales, lo cual hace dispendioso el proceso de investigación y la realización del proyecto. Entonces una de las intenciones de este trabajo es generar un

documento que compile información notable sobre las bacteriocinas, su producción y aplicación en los alimentos, específicamente en quesos frescos producidos a pequeña escala en los predios no certificados de los municipios del departamento de Risaralda.

4. MARCO TEÓRICO

El queso es un producto elaborado con cuajada de leche de vaca o de otras especies animales, este es producido por la coagulación de la caseína con cuajo, cultivos lácticos o enzimáticos, ácidos orgánicos comestibles con o sin tratamiento térmico, drenada, prensada o no, con o sin adición de fermentos de maduración, mohos especiales, sales e ingredientes comestibles opcionales¹⁸.

El queso fresco además de cumplir en general con las características anteriormente descritas también posee: alto contenido de humedad, no tiene corteza, vida útil corta, sabor suave, con o sin adición de ingredientes opcionales. Sobra decir que tanto el queso como todos los productos lácteos son de las contribuciones más importantes de la naturaleza a la población humana.

Con el paso de los tiempos, estos derivados les han dado la posibilidad de supervivencia a las comunidades cuando se encontraban en periodos de escasez, esto es logrado gracias a la alta concentración de nutrientes que nos suministran los elementos vitales para mantener bien el estado de salud del organismo y son indispensables para vivir. Los productos derivados de la leche se pueden hacer de casi todos los mamíferos, pero el sabor, textura y apariencia pueden tener grandes diferencias.

Es importante tener en cuenta que para consumir este derivado de la leche, debe ser inocuo y para esto deben tener aditivos que le otorguen mayor conservación, pero en los consumidores ha crecido cada vez más el rechazo hacia los aditivos químicos por lo que la industria láctea ha tenido que estudiar nuevas estrategias de conservación. Una de esas estrategias es la del uso de sustancias antimicrobianas producidas por las bacterias lácticas.

Desde el punto de vista tecnológico las bacteriocinas son las más adecuadas para su uso como conservantes de grado alimentario. Debido a su naturaleza peptídica se da la degradación por las enzimas digestivas, dando como resultado un producto inocuo para el consumidor y su microbiota intestinal que lo ocupa, en algunas ocasiones el espectro de acción de las bacteriocinas incluye a patógenos potenciales y alterantes asociados a los alimentos. También sus propiedades fisicoquímicas juegan un papel fundamental en la resistencia a los tratamientos térmicos y cambios de pH a los que están expuestos los alimentos al momento de su elaboración y almacenamiento¹⁹.

Al momento de hacer la identificación de las bacteriocinas se utiliza el método de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa). Este método consiste en crear un número de copias de un segmento de ADN, que utiliza ciclos de desnaturalización, apareamiento con cebadores y extensión por una ADN polimerasa termo resistente.

Durante el proceso la mezcla de reacción se somete a ciclos sucesivos, cada uno correspondiente de una fase de desnaturalización, una de hibridación o alineación y una de elongación. Durante la elongación la mezcla se calienta a 72°C y la enzima taq ADN polimerasa se usa para replicar las cebras de ADN, esta comienza el proceso de extensión de la cadena complementaria a partir del extremo 3´ de los cebadores. Al finalizar cada ciclo, la cantidad de ADN molde disponible para el ciclo siguiente aumenta al doble²⁰.

4.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL QUESO FRESCO

El queso fresco es un producto alimenticio derivado de la leche, ya que este se obtiene de realizar un conjunto de operaciones con el objetivo de lograr características específicas deseadas.

El queso en general se caracteriza por tener un valor nutritivo alto, similar al de la leche, por lo que es posible su consumo sin problema alguno. Ayuda a la formación de dientes y huesos por su aporte de calcio, proteínas y demás sustancias, contribuyendo también a las defensas ante ciertas enfermedades.

Este producto se obtiene por medio de la coagulación de la leche y es donde se concentra la parte más valiosa de esta en forma concentrada. Se caracteriza por tener un elevado contenido de humedad, sabor suave y un periodo de vida corto, por lo que se debe conservar en refrigeración²¹.

4.1.1. Propiedades del queso

El proceso de elaboración, la materia prima utilizada y el tiempo de maduración de los quesos tienen una importante implicación en el valor nutritivo de este.

Las proteínas; lípidos; minerales como el fósforo y el calcio; vitaminas A, B y C hacen que los quesos sean un alimento muy completo, de hecho una persona puede mantener la vida basando su dieta alimentaria en pan, frutas y queso²².

Al consumir queso este nos permite disfrutar de muchos beneficios para nuestra salud debido a sus propiedades:

- El queso aporta al organismo calcio y fósforo que son elementos imprescindibles para un buen desarrollo.
- El queso contiene factores específicos que protegen a los dientes de las caries.

- El consumo de queso reduce el aumento perjudicial de la acidez de la placa que rodea los dientes.
- Los minerales que aporta el queso ayudan a evitar la desmineralización.
- La caseína que se encuentra en el queso forma una película sobre la superficie del diente protegiendo al esmalte del mismo.
- Es un alimento rico en nutrientes.
- Contiene menos lactosa que la leche, lo que hace que sea más fácil de digerir.
- Es rico en proteínas de alta calidad ya que proporciona muchos de los aminoácidos que el cuerpo necesita para su buen funcionamiento.
- Este proporciona a nuestro organismo calcio, fosforo, yodo, magnesio y zinc. Nos aporta vitaminas A, B Y D.

4.2. VALIDACIÓN

Este es un método analítico fundamental para asegurar que los resultados entregados por dicho método son confiables. Cuando realizamos una validación de un método por parte del laboratorio, lo que se busca es poder determinar con fundamento estadístico que el método es adecuado para los fines previstos.

Por lo tanto es importante la asignación de un responsable para el proceso de validación, de manera que se efectúe de manera metódica, ordenada trazada y confiable. Es de gran importancia tener claridad antes de dar inicio a la validación, saber cuáles son que requiere el método para establecer un alcance de validación satisfactoria.

Cuando se trata de un método empleado tradicionalmente por el laboratorio que no esté normalizado, se puede realizar una Validación Retrospectiva, es decir, en base a los datos experimentales que el laboratorio dispone, para la cual se realizará la recopilación de la mayor cantidad de datos históricos disponibles, para luego realizar un proceso de ordenamiento y selección de los datos recopilados, estos datos pueden ser: curvas de calibración, resultados de ensayos, cartas de control, ensayos de aptitud, etc. A través de estos, se deberán determinar los parámetros de validación, y evaluar si los resultados obtenidos para los fines de la son aceptable²³.

4.3. INCERTIDUMBRE

La incertidumbre de una medición es el parámetro asociado al resultado, esto quiere decir que la principal característica que tiene es la de dispersión de valores que razonablemente pueden ser atribuidos al mesurando.

Es importante que se realicen la determinación de las diferentes fuentes o componentes de la incertidumbre de la medición presentes en métodos validados o verificados por el laboratorio.

Los componentes de la incertidumbre son:

- Muestreo
- Efecto de la muestra: tipo de matriz, almacenamiento, etc.
- Sesgos instrumentales: Características de equipos utilizados para realizar medidas tales como: deriva, resolución, magnitudes de influencia.
- Pureza de reactivos: Materiales de referencia y preparación e estándares.
- Analista: Las debidas a la serie de mediciones: variaciones en observaciones repetidas bajo condiciones aparentemente iguales.
- Condiciones de medición: Las debidas al certificado de calibración: en él se establecen las correcciones y las incertidumbres asociadas a ellas, para un valor de k determinado, en las condiciones de calibración. Ejemplo: material volumétrico.
- Condiciones de medición: temperatura, humedad.
- Otras: Método (por ejemplo al interpolar en una recta), tablas (por ejemplo las constantes), pesada, alícuota, efectos computacionales.
- Para estos análisis de la incertidumbre se utiliza por lo general un diagrama de espina de pescado ya que permite con facilidad identificar las fuentes e incertidumbre presentes durante el proceso analítico.

4.4. NORMA GENERAL DEL CODEX (CODEX STAN 283-1978)

En esta Norma se muestran las disposiciones que se aplican de manera general a todos los productos desinados al consumo directo o a ulterior elaboración. Se entiende por queso el producto blando, semiduro, duro y extra duro, madurado o no madurado, y que puede estar recubierto, en el que la proporción entre las proteínas del suero y la caseína no sea superior a la de la leche, obtenido mediante²⁴:

- Coagulación total o parcial de la proteína de la leche.
- Técnicas de elaboración que comportan la coagulación de la proteína de la leche y/o de productos obtenidos de la leche.

4.4.1. Factores de calidad

Materias primas:

Leche y/o productos obtenidos de la leche.

Ingredientes autorizados:

- Cultivos de fermentos de bacterias inocuas productoras de ácido láctico y/o modificador del sabor y aroma, y cultivos de otros microorganismos inocuos
- Enzimas inocuas e idóneas
- Cloruro de sodio
- Agua potable

Contaminantes:

Estos productos a los cuales se les aplica la presente Norma deberán cumplir con los niveles máximos de contaminantes especificados para el producto en la Norma General para los Contaminantes y las Toxinas presentes en los Alimentos y Piensos (Codex Stan 193.-1995).

La leche utilizada en la elaboración de los productos a los cuales se aplica la presente norma deberá cumplir con los niveles máximos de

contaminantes y toxinas especificados para la leche en la Norma General para los Contaminantes y las Toxinas presentes en los Alimentos y Pinos (Codex Stan 193-1995), y con los límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios y plaguicidas establecidos para la leche por la CAC.

Higiene:

Se recomienda que los productos abarcados por las disposiciones de esta norma se preparen y manipulen de acuerdo a los Principios generales de Higiene de los Alimentos, el Código de Prácticas de Higiene para la Leche y los Productos Lácteos y otros textos pertinentes al Codex, como los Códigos de Prácticas de Higiene y los Códigos de Prácticas. Los productos deberán cumplir cualesquiera criterios microbiológicos establecidos de conformidad con los Principios para el Establecimiento y la Aplicación de Criterios Microbiológicos a los Alimentos.

4.5. POLITICA NACIONAL PARA MEJORAR LA COMPETITIVIDAD DEL SECTOR LACTEO COLOMBIANO (Conpes 3675)

A través del fomento de alternativas alimenticias, mejoramientos genéticos y la investigación e innovación tecnología se ha logrado tener considerable disminución de los costos de producción y esto a su vez tiene efecto la mejora de la productividad en el eslabón primario de la cadena.

Además de esto, se han conformado y acreditado una red de laboratorios que estan encargados de determinar la calidad de la leche y sus derivados, y la oferta de instrumentos que puedan permitir mejorar la infraestructura de producción, acopio, transporte, higienización, transformación y comercialización de leche, derivados y subproductos, todo esto permitirá disminuir la informalidad en el sector.

Es necesariamente para la industria mejorar en el estatus sanitario para poder entrar en los nuevos mercados y la distinción de la producción nacional a través del fomento del uso de sellos de calidad, esto contribuirá a que el país aproveche las oportunidades que se presentan en el mercado y a su vez permitirán desarrollar el potencial lácteo del país²⁵.

4.6. EXTRACCIÓN DE BACTERIOCINAS

4.6.1. Nisina

Se ha realizado estudios de la adición de Nisina en queso fresco haciendo uso de dos concentraciones de estas sobre la población de *Staphylococcus aureus* presente en el queso fresco para determinar, el queso sin Nisina fue utilizado como control. Se analizaron las muestras a las semanas 0, 1, 2, 3 y 4 de su almacenamiento y se les determinó la población de *S. aureus*, la actividad de agua y el PH, como resultado se pudo observar un incremento en la población del microorganismo con el tiempo de almacenamiento en las muestras control, en cambio en el queso fresco con la adición de Nisina se redujo significativamente el número de células viables a las 2 semanas de almacenamiento. El efecto inhibitorio de la Nisina sobre *Staphylococcus aureus* fue dependiente de la cantidad de Nisina agregada y de la carga microbiana inicial del microorganismo presente en el queso.

Se concluyó que la adición de Nisina al queso disminuye la supervivencia de *Staphylococcus aureus* por lo cual podría ser utilizado como un agente antimicrobiano de origen natural que mejoraría la calidad microbiológica del queso fresco elaborado siguiendo las buenas prácticas de manufactura (BPM)

4.6.2. Lactococcina

Su espectro de acción se restringe al género *Lactococcus*. Esta bacteriocina se purificó y se obtuvo su extremo amino terminal. No se detectaron ninguna homología con otros péptidos en la base de datos. Su formación activa es un Homodímero cuyos monómeros carecen de actividad inhibitoria. El estudio de su modo de acción ha revelado que no se trata de un péptido permeabilizador de membranas. Su blanco de actuación está relacionado con la síntesis de pared, en concreto inhibe la formación de septos de inhibición en las células sensibles, el determinante genético de Lactococcina se encuentra en un plásmido de 11 KPB, la secuencia del gen

estructural ha revelado que esta bacteriocina se sintetiza como una pre-bacteriocina con un péptido señal típico, este gen presenta un promotor funcional y se encuentra acompañado de otros probablemente implicándose la inmunidad y/o regulación.²⁶

5. OBJETIVOS DEL PROYECTO

5.1. GENERAL

Identificar los métodos apropiados para validar la detección de las bacteriocinas Nisina y Lactococcina provenientes de *Lactococcus lactis* aisladas de queso fresco.

5.2. ESPECÍFICOS

Especificar el método de PCR para usarlo en la detección de las bacteriocinas Nisina y Lactocina provenientes de *Lactococcus lactis*

Establecer los protocolos del diseño experimental que se van a llevar a cabo en el laboratorio para verificar la validación del métodos de PCR

Ejecución y validación del método para sacar límites de repetibilidad y reproducibilidad.

6. METODOLOGÍA

6.1. PCR (REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA)

Amplificación de los genes mediante la técnica de PCR

Se prepara la mezcla de reacción con:

- 34.95 uL de agua destilada estéril,
- 2.5 uL de MgCl₂ 50mM,
- 0.25 uL de la mezcla de dNTP,
- 2.5 uL de cada primer,
- 0.3 uL de *Taq*polimerasa
- 2 uL de la solución que contiene el ADN.
- Volumen total: 43 uL

Las reacciones se realizan en un termociclador de la marca que tengamos preferencia.

Método:

Preparación de la muestra. En un tubo para PCR se agregan los siguientes reactivos:

El ADN molde, los iniciadores, los nucleótidos o dNTPs, la solución amortiguadora, el cloruro de magnesio (MgCl₂), el agua y la ADN polimerasa, se pueden agregar otros compuestos que ayudan a la estabilidad de la polimerasa.

Paso 1. Mezclar los componentes de la reacción con un vórtex durante 4 segundos o dando unos golpecitos con el dedo o invirtiendo el tubo varias veces.

Después se debe centrifugar brevemente para reunir la mezcla en el fondo del tubo.

2. Amplificación.

Para este paso se deben colocar las muestras en el termociclador programado con las condiciones de amplificación que deben estar definidas previamente.

2.1. Desnaturalización inicial.

La temperatura y el tiempo se determinan de acuerdo a las características del ADN y de la ADN polimerasa utilizada, por lo general es entre 94 y 96 °C durante 5-10 minutos y es la que utilizaríamos.

2.2. Ciclos de la PCR. Se realizan ciclos sucesivos de desnaturalización, alineamiento y extensión, generalmente estas etapas se repiten 30 veces.

2.2.1. Desnaturalización, para que se dé correctamente se recomiendan temperaturas de 94 °C durante 30 segundos.

2.2.2. Alineamiento. Al disminuir la temperatura de incubación los iniciadores se unen al ADN molde en las zonas 3' complementarias. La temperatura y el tiempo van a depender de 3 factores relacionados con los iniciadores: la concentración, el número de bases y el porcentaje de guaninas-citocinas. En la práctica, la temperatura de alineamiento que utilizaríamos es de 55 °C durante un tiempo entre 30 segundos.

2.2.3. Extensión. Esta etapa, consiste en la síntesis de la nueva cadena de ADN, a partir del extremo 3' del iniciador por acción de la ADN polimerasa, empleando como sustrato los cuatro dNTPs. En la mayoría de las reacciones, la etapa de extensión la desarrollaríamos a 72 °C porque es la temperatura a la cual la Taq polimerasa (enzima que utilizaríamos en el método) alcanza su mayor actividad.

2.3. Extensión final. Generalmente, al terminar los ciclos, se realiza una última extensión de aproximadamente 5 minutos a 72 °C para permitir que la polimerasa termine de sintetizar todos los fragmentos que pueden haber quedado incompletos.

3. Realizar electroforesis del producto obtenido.

7. RESULTADOS

- Diseñar un protocolo posible para amplificación de genes mediante la reacción en cadena de la polimerasa.
- Dejar las bases para futuros investigadores para que puedan continuar con la validación de este método.

8. CONCLUSIONES

La bioconservación representa una alternativa para la industria de alimentos, permitiendo así la obtención de productos libres de aditivos artificiales, pero a la vez deben ser inocuos y adquiera prolongada vida comercial, esto así generando grandes beneficios para la industria como a los consumidores.

Las investigaciones realizadas sobre péptidos bioactivos en productos lácteos y sus derivados, ofrecen un gran potencial para el desarrollo de alimentos funcionales.

Se pueden reforzar investigaciones para demostrar que la producción de bacteriocinas tiene una gran utilidad, el cual se pueden determinar los factores importantes en el producto alimenticio, para lograr la aplicación de estos bioactivos de manera exitosa y ser el sustituto de preservantes químicos a un futuro cercano.

La nisina es la bacteriocina mas estudiada debido a que es la única bacteriocina incluida en la lista positiva de aditivos alimentarios, Codex Alimentarius, por lo tanto se encuentra mucha información y hay muchas investigaciones sobre su producción y aplicación en alimentos.

9. RECOMENDACIONES

Detectar Nisina solamente ya que *Lactococina* tiene un espectro de inhibición muy estrecho por lo que se vuelve poco eficaz frente a muchos otros microorganismos. Además *Lactococcina* por su tamaño tiende a tener mayor acción hidrofóbica por lo que podría separar la fase grasa de los alimentos, por lo que se limitaría su uso.

Realizar la desnaturalización del ADN molde sin modificar bruscamente los tiempos o temperaturas ya que esto nos puede generar una serie de inconvenientes como por ejemplo permitir el reacoplamiento de las cadenas conllevando a una disminución del producto de la amplificación o si se dan pasos largos de desnaturalización producen pérdida en la actividad de la Taq-polimerasa.

Conservar estrictamente la temperatura entre los rangos descritos para la fase de acoplamiento ya que si la temperatura es muy alta no se produciría el apareamiento y si es muy baja se darían acoplamientos que no son específicos.

10. REFERENCIAS

- 1- Tagg, J.R., Dajani, A.S. y Wannamaker, L.W.. 1976. "Bacteriocins of Gram positive bacteria". *Bacteriol. Rev.*, 40: 722-756
- 2- Gratia, A. 1925. "Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacille". *C. R. Soc. Biol. Fill.*, 93: 1040-1041.
- 3- Jacob, F., Lwoff, A., Siminovitch, A. y Wollman, E.L. 1953. "Définition de quelques termes relatifs à la lysogénie". *Ann. Inst. Pasteur*, 84: 222-224, Tagg, J.R., Dajani, A.S. y Wannamaker, L.W.. 1976. "Bacteriocins of Gram positive bacteria". *Bacteriol. Rev.*, 40: 722-756.
- 4- Tagg, J.R., Dajani, A.S. y Wannamaker, L.W.. 1976. "Bacteriocins of Gram positive bacteria". *Bacteriol. Rev.*, 40: 722-756. , Monteville, T.J. y Kaiser, A.L. 1993. "Antimicrobial proteins: classification, nomenclature, diversity, and relationship to bacteriocins". En *Bacteriocins of lactic acid bacteria*. Hoover, D.G. y Steenson, L.R. (eds.). pp. 1-22. Academic press, Inc. New York. , Jack, R.W., Tagg, J.R. y Ray, B. 1995. "Bacteriocins of Gram-positive bacteria". *Microbiol. Rev.*, 59: 171-200.
- 5- Rogers, L.A. 1928. "The inhibiting effect of *Streptococcus lactis* on *Lactobacillus bulgaricus*". *J. Bacteriol.*, 16: 321-325.
- 6- Marcos Balciunas, E., Castillo Martinez, F. A., Dimitrov, S. T., Gombossy de Melo Franco, B. D., & De Souza Oliveira, R. P. (Julio de 2013). Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. *Food Control*, 32, 134 - 142.
- 7- Suarez Gea, A. M. (1997). Tesis Doctoral. Producción de anticuerpos frente a la nisina a: estrategias de inmunización y desarrollo de inmunoensayos. Madrid, España: Universidad Complutense de Madrid.
- 8- Cristóbal Delgado, R. L. (2008). Tesis de maestría. Lactobacilos productores de bacteriocinas aislados de quesos artesanales provenientes de Lima y provincias. Lima, Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

- 9- Joerger, R. (2003). Alternatives to Antibiotics: Bacteriocins, Antimicrobial Peptides and Bacteriophages. *Poultry Science*, 640 - 647.
- 10- Martínez Fernández, B. (1996). Tesis Doctoral. Bacteriocinas de *Lactococcus Lactis* Aislados de quesos Asturianos: Nisina Zy Lactococina 972. Oviedo, España: universidad de Oviedo.
- 11- Nuñez, G., Cayré, M. E., Castro, M. P., Campos, C., & Garro, O. A. (2001). Actividad de la Nisina sobre la microflora alterante de aderezos. Corrientes, Chaco, Argentina: Universidad Nacional del Nordeste.
- 12- Fenelon, M., Ryan, M., Ross, R., Guinee, T., & Hill, C. (Enero de 1999). Elevated Temperature Ripening of Reduced Fat Cheddar Made with or Without Lacticin 3147. Producing Starter Culture. *Journal of Dairy Science* (1), 10 - 22.
- 13- Fowler, G.G. y Gasson, M.J. 1991. "Antibiotics-nisin". En *Food preservatives*. Russel, N.J. y Gould, G.W. (eds.). pp. 135-152. Blackie, London.
- 14- Monroy Dosta, M. d., Castro Barrera, T., Fernández Perrino, F. J., & Mayorga Reyes, L. (2009). Revisión Bibliográfica: Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas. *ContactoS*, 73, 63 – 72.
- 15- Sierra Lopera, L. (2012). Tesis de Maestría. Evaluación de la preservación de extractos líquidos de café mediante el uso de bacteriocina (nisina) y aplicación de microondas. Medellín, Colombia: Universidad Nacional de Colombia.
- 16- Madrid, A. (1992). Los aditivos en los alimentos. Madrid: Mundi-prensa libros. S.A.
- 17- Herrera, V. (2009). Trabajo de grado. Evaluación de la producción de nisina a partir de *Lactococcus Lactis*. Subs. Lactics. Medellín, Colombia: Universidad Pontificia Bolivariana.
- 18- CAVA, Rita; SANGRONIS, Elba; LUCCI, Elisabetta y WOYZECHOWSKY, Lidia. Efecto de la adición de nisina en queso fresco "telita" sobre la

supervivencia de *Staphylococcus aureus*. *An Venez Nutr* [online]. 2006, vol.19, n.2 [citado 2015-04-19], pp. 69-73

- 19- Bacteriocins produced by wild *Lactococcus lactis* strains isolated from traditional, starter-free cheeses made of raw milk *International Journal of Food Microbiology*. 2010 Sep 30;143(1-2):61-6. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.07.029. Epub 2010 Jul 27.
- 20- Kalchayanand, N., Dunne, P., Sikes, A & Ray, B. 2004. Viability loss and morphology change of foodborne pathogens following exposure to hydrostatic pressures in the presence and absence of bacteriocins. *International Journal Food Microbiology*. 91: 91-98.
- 21- Grande, M., Lucas, R., Abriouel, H., BenOmar, N., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., Martínez-Cañamero, M., Valdivia, E & Galvez, 2005. Control of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juices by enterocin AS-48. *International Journal of Food Microbiology*. 104: 289-297.
- 22- Cintas, L.M., Casaus, M.P., Herranz, C., Nes, I.F. & Hernández, P.E. 2001. REVIEW: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. *Food Science Technology International*. 7(4): 281- 305.
- 23- Kleppe K, Ohtsuka E, Kleppe R, Molineux I, Khorana HG. Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *J Mol Biol*. 1971; 56: 341-61.
- 24- Mullis KB. The unusual origins of the polymerase chain reaction. *Sci Am*. 1990; 262: 56-65.
- 25- Tsongalis GJ, Silverman LM. Molecular diagnostics: A historical perspective. *Clín Chim Acta*. 2006; 369: 188-92.
- 26- Yi-dong W, Li-hua C, Xiu-jing W, Shi-qiang S, Jin-tu L, Li-zhong, et al. Gram specific probes based real time PCR for detection discrimination of bacterial neonatal sepsis. *J Clin Microbiol*. 2008; 46: 2613-9.

