

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
PROGRAMA DE MICROBIOLOGIA**

EMMANUEL CANO LÓPEZ

JUAN DAVID MONSALVE MARTÍNEZ

KAREN DAYANNA HOLGUÍN MALLAMATa

UNIVERSIDAD LIBRE SECCIONAL PEREIRA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

PROGRAMA DE MICROBIOLOGÍA

PEREIRA

2015

## TABLA DE CONTENIDO

- Índice de tablas y figuras
- Resumen
- Planteamiento del problema
- Justificación
- Objetivo general
- Objetivos específicos
- Marco teórico
  - Lácteos y sus derivados
  - Quesos
  - Quesos frescos
  - Microbiota de lácteos
  - Bacterias ácido lácticas
  - *Lactococcus lactis*
  - Bacteriocinas
  - Bacteriocinas sintetizadas por bacterias ácido lácticas
  - Uso en la industria alimentaria
  - Espectro de inhibición
  - Síntesis de bacteriocinas
  - Clasificación de las bacteriocinas
  - Localización de determinantes genéticos
  - Organización genética
  - Bacteriocinas producidas por *Lactococcus lactis*
  - Nisina A y Nisina Z
- Metodología
  - Búsqueda de referencias
  - Población
  - Tipo de muestreo
  - Tipo de estudio
  - Técnicas de procedimiento
  - Protocolo de toma de muestras de acuerdo a la NTC666
  - Protocolo para el aislamiento de *Lactococcus lactis* a partir de una muestra de queso fresco
  - Matriz de control de calidad en el laboratorio de microbiología
- Conclusiones
- Bibliografía

## INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

**Tabla 1.** Composición general de la leche en diferentes especies (por cada 100 gr).

**Tabla 2.** Relación de bacteriocinas de BAL frente a microorganismos no lácteos.

**Tabla 3.** Matriz de control de calidad en el laboratorio de microbiología.

**Figura 1.** Estructura general de las proteínas lácteas.

**Figura 2.** Organización de los genes implicados en la biosíntesis de la nisina.: promotor; T: terminador; *nisA*, gen estructural; *nisB, C*, modificación postraducciona; *nisT*, transporte; *nisF, E, G*, transporte / inmunidad; *nisR, K*, sistema de regulación de dos componentes.

## **Identificación de la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas nisina a y nisina z extraídas de *Lactococcus lactis* en quesos frescos producidos a pequeña escala.**

### **RESUMEN**

Los productos lácteos y sus derivados son una de las bases socio-económicas más fuertes en el país a nivel agroindustrial, puesto que genera una tasa de empleo de aproximadamente el 3% a nivel nacional y 10% a nivel agroindustrial; dado esto y dado al alto riesgo que los lácteos poseen como alimentos de alto riesgo, distintas entidades como el ICA o el INVIMA, o el mismo Ministerio de Protección Social, se crean mecanismos para garantizar la inocuidad de este producto, sin embargo las modificaciones que estos mecanismos sugieren no son adsequibles a los pequeños productores, para ello, se sugiere una alternativa que garantice la inocuidad de estos productos. Los microorganismos son importantes en los productos lácteos porque producen aromas y propiedades benéficas como conservantes; dentro de la microbiota dominante están las Bacterias Ácido lácticas (BAL) como los géneros *Lactococcus* o *Lactobacillus*, una de las características más notables en las BAL es la producción de bacteriocinas, que son péptidos de origen proteico que poseen una actividad antimicrobiana frente a gran variedad de microorganismos patógenos. Objetivo: profundizar acerca de estas proteínas; su clasificación, el espectro de inhibición, su uso en la industria alimentaria como reemplazo de conservantes químicos, sus aspectos genéticos y las que son sintetizadas por la BAL *Lactococcus lactis*, como un documento de apoyo para la realización del proyecto Identificación de la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas nisina a y nisina z extraídas en quesos frescos producidos a pequeña escala. Se realizó una búsqueda en las bases de datos de la Universidad Libre tales como ScienceDirect, ICONTEC, ProQuest y algunas externas como Redalyc. Resultados: Se encontró un total de 30 artículos entre investigaciones, resoluciones y decretos; se halló entre las investigaciones que estas bacteriocinas tienen un amplio espectro de inhibición sobre todo contra bacterias Gram Positivas, así como sus componentes moleculares entre los que se destacan, los primers para la Nisina A y Z.

### **PALABRAS CLAVE**

Leche, Queso, *Lactococcus lactis*, Bacteriocinas, Conservantes, Bioactivo.

## 1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Una de las principales bases socio-económicas en el sector agroindustrial nacional ha sido el sector lácteo, ya que según la Encuesta Nacional Agropecuaria “ENA”, hacia el año de 2012 casi 6mil 400 millones de litros de leche se produjeron<sup>(1)</sup>, de igual modo de acuerdo con el promedio de las importaciones de los años 2010-2013, el 44.89% de las entradas de productos lácteos fue leche en polvo entera, el 18.52% fue leche en polvo descremada, el 0.76% fue leche líquida, el 34.19% lactosueros y el 1.57% quesos, en promedio, durante los años 2010-2013, importar una tonelada de leche en polvo entera tuvo un costo de 5.58 mil dólares, de leche en polvo descremada 5.17 mil dólares, de leche líquida 3.35 mil dólares, de lactosuero 1.78 mil dólares y 11.71 mil dólares por tonelada de queso; por otro lado, de las exportaciones de productos lácteos realizadas por Colombia desde el año 2010 hasta el 2013, el 53% han sido quesos, el 15% leche en polvo entera, el 7% leche en polvo descremada, el 15% yogurt, el 4% leche condensada, el 4% crema de leche y el 2% mantequilla, por último, las toneladas de productos lácteos principalmente se han realizado a Venezuela un 38%, Estados Unidos 21%, República Dominicana 16%, Ecuador 12%, Perú 5%, Bangladesh 3%, Nueva Zelanda 1% y Taiwán 1%<sup>(1)</sup>, adicionalmente, en 2012, la ganadería de leche en Colombia generó el 3.18% del empleo total nacional, lo que correspondió al 13.92% de los empleos del sector agropecuario y el 10.2% del PIB pecuario para dicho año. La actividad agroindustrial de la leche proporciona 13.000 empleos directos en promedio anual con una participación media del 2% sobre el total del empleo nacional y de 4% en la producción industrial. Además, en el sector primario se encuentran alrededor de 400 mil pequeños ganaderos que dependen de la actividad lechera como su fuente principal de ingresos<sup>(2)</sup>.

La leche es un producto altamente perecedero, que requiere precauciones para asegurar su preservación y cumplir con los atributos de calidad e inocuidad que exige la industria para su higienización y elaboración de subproductos; es por esto que la producción láctea tiene la responsabilidad de ofrecer a los consumidores leche higienizada y productos inocuos, de buena calidad, para ello existe un sistema de pago, que se basa en varios aspectos como la calidad composicional: proteína, grasa y sólidos totales, y calidad higiénica: recuento de unidades formadoras de colonias (UFC)<sup>(3)</sup> e incluye bonificaciones obligatorias al proveedor de la leche cruda, estas bonificaciones se otorgan por los dos conceptos de calidad (anteriormente mencionados) y buenas prácticas ganaderas “BPG”<sup>(4)</sup>; siendo la leche, un producto de consumo masivo, la calidad debe ser un requisito fundamental y constante, sin embargo, los más perjudicados referente a la calidad son los pequeños productores, aquellos que poseen entre una y cinco cabezas de ganado, quienes alcanzan en promedio ocho litros por cabeza al día, y cuentan con un bajo nivel tecnológico<sup>(5)</sup>.

Muchos de los pequeños productores quienes son cabezas de familia, producen

lácteos y derivados en sus mismas viviendas, y los consumidores son aquellos que residen en sectores cercanos, es por esto que dado a que no cuentan con accesos tecnológicos e infraestructura completamente adecuada, tener acceso al sistema de BPG es una labor muy difícil al igual que mantener la calidad e inocuidad de los productos<sup>(6)</sup>, poniendo en riesgo a los consumidores, una de las razones principales es la contaminación por microorganismos como *Staphylococcus aureus* *Escherichia coli*, *Salmonella spp.* o *Listeria monocytogenes*, agentes causales de Enfermedades Transmitidas por Alimentos “ETAs”<sup>(7)</sup>, teniendo como consecuencias, el riesgo de la salud y la vida de los consumidores y por otro lado, la pérdida de la fuente de ingresos de estos productores.

Para bajar la probabilidad de que ocurra un peligro de contaminación por microorganismos causantes de ETAs dentro de la industria láctea, existe la alternativa de emplear preservativos biológicos o también llamados, biopreservadores<sup>(8)</sup>, con el objetivo de obtener productos inocuos y de satisfacer el interés de los consumidores por un alimento seguro para su salud; un biopreservador muy utilizado es la nisina<sup>(8)</sup>, una bacteriocina ampliamente aplicada en la industria alimentaria y reconocida y aprobada por la Organización para la Agricultura y la Alimentación de las Naciones Unidas “FAO”<sup>(9)</sup> y aprobada también por el Código Alimentarius<sup>(10)</sup> en la preservación de algunos derivados lácteos. Numerosos estudios han sido publicados reportando la eficacia de la nisina para inhibir el crecimiento de estos microorganismos<sup>(8)</sup>.

## **PREGUNTA PROBLEMA**

¿Es posible una acción antimicrobiana de las bacteriocinas Nisina A y Nisina Z frente a *Staphylococcus aureus* extraídas de queso fresco?

## **2. JUSTIFICACIÓN**

Todos los productos lácteos son una fuente abundante y cómoda de nutrientes para las poblaciones, el volumen del comercio nacional e internacional de sus productos derivados es bastante considerable<sup>(11)</sup>, en la economía colombiana, son una de las bases socioeconómicas más fuertes que existen, generando una gran tasa de empleos, desde el ámbito rural hasta el urbano<sup>(1)</sup>, sin embargo, hay factores que son fundamentales en la cadena productiva y que afectan directamente al consumidor; la calidad higiénica y composicional de la leche influyen directamente en su procesamiento, entendiéndose la calidad higiénica como lo correspondiente al contenido de microorganismos que alteran su calidad sanitaria y composicional, y la presencia de residuos químicos y de medicamentos veterinarios; siendo el primero el de mayor prioridad<sup>(11)</sup>; muchos problemas que se relacionan con la calidad higiénica son falta de inocuidad, definida como el conjunto de condiciones y medidas necesarias durante la producción, almacenamiento, distribución y preparación de los alimentos para asegurar que una vez ingeridos, no representen un

riesgo para la salud<sup>(12)</sup>.

Dentro de la cadena de producción de lácteos y derivados, se pueden presentar fallas en la inocuidad del producto y conducir a un riesgo alto en salud pública puesto que este producto se presenta como un alimento de alto riesgo<sup>(13)</sup> dadas sus propiedades nutricionales, es un excelente medio de crecimiento de microorganismos patógenos causantes de ETAs<sup>(7)</sup>.

Una alternativa para garantizar la inocuidad es la implementación de BPG desde la obtención de la materia prima, sin embargo, muchos pequeños productores de lácteos y derivados cuentan con una gran limitación en cuanto a recursos tecnológicos e infraestructura<sup>(11)</sup>, ya que la mayoría de éstos operan desde sus hogares y el destino de consumo de sus productos es a personas que residen en perímetros cercanos, poniendo en riesgo la salud de los usuarios.

Las bacteriocinas, un metabolito secundario producido por gran cantidad de bacterias, son muy utilizadas en la industria alimentaria de lácteos para preservar las características nutritivas de la materia prima a través de la inhibición de bacterias patógenas, satisfaciendo las demandas de los consumidores en cuanto a productos con procesos naturales, su uso puede ayudar a reducir la adición de conservantes químicos, alternativamente, su aplicación podría provocar que los alimentos se preserven de una manera natural y mejoren incluso sus propiedades sensoriales y nutricionales<sup>(14)</sup>, además, según el Códex Alimentarius, la Nisina un tipo de bacteriocina es permitida como conservante en un derivado lácteo muy importante: el queso fresco<sup>(10)</sup>; dado esto, la aplicación de estos metabolitos se puede considerar una opción para garantizar la inocuidad de los productos de los pequeños productores de lácteos y sus derivados.

Teniendo en cuenta lo anterior, se pretende realizar una alternativa que pueda garantizar la inocuidad de un derivado lácteo, el queso fresco, proveniente de pequeños productores ubicados en los 14 municipios de Risaralda, cuya base financiera es la producción de este producto, a través de la acción de las bacteriocinas Nisina A y Nisina Z, extraídas de su propia microbiota.

### **3. Objetivo General**

Evaluar la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas Nisina A y Nisina Z en quesos frescos producidos a pequeña escala frente a *Staphylococcus aureus*.

### **4. Objetivos específicos**

Aislar la bacteria *Lactococcus lactis* de los quesos frescos producidos a pequeña escala.

Extraer las bacteriocinas Nisina A y Nisina Z de la bacteria *Lactococcus lactis* provenientes de los quesos frescos producidos a pequeña escala.

Determinar la actividad antagonica de las bacteriocinas Nisina A y Nisina Z frente *Staphylococcus aureus* que afecta la calidad e inocuidad de los quesos frescos.

## 5. Marco Teórico

### 5.1 Lácteos y sus derivados

Según la Federación Panamericana de Lechería “FEPALE”, la leche es el alimento más completo e insustituible para el ser humano, debido a sus características nutricionales<sup>(15)</sup>. Desde el punto legal, el Ministerio de la Protección Social mediante el decreto 616 de 2006, y según el artículo 3 del capítulo 1, “*La leche es el producto de la secreción mamaria normal de animales bovinos, bufalinos y caprinos lecheros sanos, obtenida mediante uno o más ordeños completos, sin ningún tipo de adición, destinada al consumo en forma de leche líquida o a elaboración posterior*”<sup>(16)</sup>. La leche es una compleja mezcla de distintas sustancias, presentes en suspensión o emulsión y otras en forma de solución verdadera y presenta sustancias definidas: agua, grasa, proteína, lactosa, vitaminas, minerales; a las cuales se les denomina extracto seco o sólidos totales<sup>(17)</sup> (Tabla 1).

Tabla 1. Composición general de la leche en diferentes especies (por cada 100 gr)<sup>(17)</sup>

Nutriente (gr.)	Vaca	Búfala	Mujer
Agua	88	84	87.5
Energía (Kcal).	61	97	7.0
Proteína	3.2	3.7	1.0
Grasa	3.4	6.9	4.4
Lactosa	4.7	5.2	6.9
Minerales	0.72	0.79	0.20

El agua es la fase dispersante, en la cual los glóbulos grasos y demás componentes de mayor tamaño se encuentran emulsionados o suspendidos, la proteína contenida en la leche es del 3,5% (variando desde el 2.9% al 3.9%). Esta “proteína láctea” es una mezcla de numerosas fracciones proteicas diferentes y de pesos moleculares distintos, (Figura 1). Las proteínas se clasifican en dos grandes grupos: caseínas (80%) y proteínas séricas (20%)<sup>(17)</sup>.



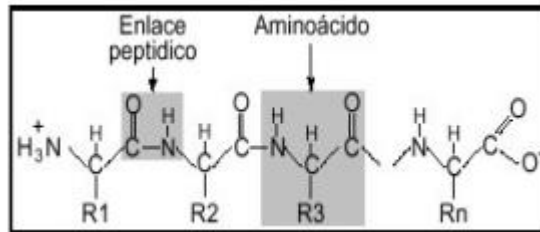


Figura 1. Estructura general de las proteínas lácteas<sup>(17)</sup>

La grasa láctea se sintetiza en su inmensa mayoría en las células secretoras de la glándula mamaria y constituye cerca del 3% de la leche; se encuentra en forma de partículas emulsionadas o suspendidas en pequeños glóbulos microscópicos, la leche de vaca contiene sodio, potasio, magnesio, calcio, manganeso, hierro, cobalto, cobre, fósforo, fluoruros, yoduros, también contiene vitaminas como la A, D, E, K, B1, B2, B6, B12, C, carotenos, nicotinamida, biotina, ácido fólico, las enzimas contenidas en la leche se aprovechan para efectos de inspección y control, ya que muchas de ellas influyen en la calidad de la leche y en el origen de distintas alteraciones<sup>(17)</sup>.

La Cadena de lácteos en Colombia está compuesta por dos eslabones principales. El primero comprende la producción de leche cruda bien sea bajo un sistema especializado o de doble propósito. El segundo eslabón es el industrial, en el cual se produce una amplia gama de productos lácteos o derivados de la leche como leche pasteurizada, leche ultrapasteurizada, leche evaporada, leche condensada, leche en polvo, leche maternizada, leche instantánea, leches ácidas o fermentadas, crema acidificada, leches saborizadas, dulces de leche, mantequilla, y quesos<sup>(18)</sup>.

## 5.2 Quesos

Según la Normatividad Técnica Colombiana “NTC” el queso es un producto fresco o madurado, sólido o semisólido que se obtiene mediante la coagulación de la leche cruda o leche pasteurizada de leche fresca con derivados lácteos, por la acción del cuajo y otros coagulantes aprobados y con un escurrido de suero que se produce parcialmente como consecuencia de la coagulación. En la clasificación del queso se mira el contenido de humedad sin materia grasa, el contenido de materia grasa en el extracto seco y las características del proceso<sup>(19)</sup>.

- Según el contenido de humedad sin materia de grasa
  - Extraduro
  - Duro
  - Firme / Semiduro
  - Blando
- Según el contenido de materia grasa en el extracto seco

- Extragrasso
  - Grasso
  - Semigrasso
  - Semidescremado
  - Descremado
- Según las características del proceso
    - Fresco
    - Semimaduro
    - Maduro
    - Madurado por mohos.

### 5.2.1 Queso fresco

El queso fresco se obtiene a partir de la coagulación de la leche y deshidratación de la cuajada; se conserva por varios días, el queso es rico en proteínas, grasas, sales minerales y vitaminas; en niños y adultos favorece el crecimiento y fortalecimiento de huesos y dientes<sup>(20)</sup>.

Procedimiento para procesar 10 litros de leche semidescremada ya pasteurizada:

1. Dejar enfriar la leche a 38 grados centígrados.
2. Agregar a la leche un gramo de cloruro de calcio para recuperar el calcio perdido en el proceso de calentamiento.
3. Disolver ¼ de pastilla de cuajo en ½ taza con agua, agregando un poquito de sal. O bien, un mililitro de cuajo líquido en 10 litros de leche.
4. Agregar el cuajo previamente disuelto a la leche y revolver. Agitar por un minuto con una paleta.
5. Dejar que la leche repose por 45 minutos.
6. Cortar la cuajada con un cuchillo o paleta limpia en cuadritos de un centímetro cuadrado.
7. Mover la cuajada con una paleta de acero inoxidable suavemente durante cinco minutos.
8. Calentar la cuajada a 40 grados centígrados por cinco minutos.
9. Dejar en reposo la cuajada durante cinco minutos.
10. Desuerar la cuajada en tela brin, en bandeja de plástico o acero inoxidable. Guardar el suero, pues puede utilizarse para otros procesos (requesón).
11. Agregar 3 onzas (3 cucharadas rasas) de sal gruesa de cocina.
12. Moler o amasar la cuajada en un molino manual y recibir el queso molido en una bandeja plástica o de acero inoxidable.
13. Poner la cuajada molido en el molde o empaque a utilizar
14. Colocar el queso fresco envasado en bandejas de acero inoxidable o plásticas.
15. Conservar en refrigeración a cuatro grados centígrados (refrigeradora normal).
16. Colocar el queso fresco envasado en bandejas de acero inoxidable o plásticas.

17. Conservar en refrigeración a cuatro grados centígrados (refrigeradora normal).

El rendimiento que se obtendrá con 10 litros de leche semidescremada será de 3 libras de queso fresco, en promedio<sup>(20)</sup>.

### 5.3 Microbiota en lácteos

Los microorganismos son importantes en la leche y los productos derivados porque producen aromas y propiedades físicas deseables en productos lácteos, pero otros pueden generar alteraciones y algunos patógenos o sus toxinas pueden tornar peligrosos a los productos lácteos. La diversidad en los microorganismos presentes es la responsable de la gran diferencia en las características organolépticas entre los quesos hechos con leche cruda, respecto a los pasterizados. La microbiota dominante incluye: Bacterias lácticas (*Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, etc), *Pseudomonas*, *Micrococcaceae* (*Micrococcus* y *Staphylococcus*), y levaduras. Otros organismos presentes en la leche cruda son *Bacillus*, *Clostridium*, *Listeria*, *Enterobacteriaceae* (*Hafnia*, *Citrobacter*, *Serratia*), *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Aeromonas*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Propionibacterium*<sup>(21)</sup>.

### 5.4 Bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas “BAL” son microorganismos que tiene diversas aplicaciones, siendo una de las principales la fermentación de alimentos como la leche, carne y vegetales para obtener diferentes productos entre esos se encuentra el queso. Las BAL, además de contribuir en la biopreservación de los alimentos, mejoran las características sensoriales como el sabor, olor, textura y aumentan su calidad nutritiva. Además, son un grupo de microorganismos representativos por varios géneros con características morfológicas, fisiológicas y metabólicas en común<sup>(22)</sup>.

En general son cocos o bacilos Gram positivos, no esporulados, no móviles, anaeróbicos, microaerofílicos o aerotolerantes. Para su multiplicación requieren de azúcares como la glucosa y lactosa, además aminoácidos, vitaminas y otros factores de crecimiento; la leche es el medio típico y satisfactorio para su proliferación, estos microorganismos son generalmente utilizados como cultivos indicadores en la elaboración y conservación de productos lácteos, tales como leche acidificada, yogurt, mantequilla, crema y quesos<sup>(22)</sup>.

La clasificación de las BAL en géneros diferentes se basa en el principio morfológico, modo fermentación de la glucosa, el crecimiento a diferentes temperaturas, la configuración del ácido láctico producido, habilidad para crecer a alta concentración de sal y tolerancia ácida o alcalina. Se encuentran los siguientes géneros<sup>(22)</sup>:

- *Aerococcus*
- *Alloinococcus*
- *Carnobacterium*
- *Dolosigranulum*
- *Enterococcus*
- *Globicatella*
- *Lactobacillus*
- *Lactococcus*
- *Lactosphaera*
- *Leuconostoc*
- *Oenococcus*
- *Pediococcus*

Sin embargo los géneros más representativos son:

- *Lactobacillus*
- *Pediococcus*
- *Streptococcus*
- *Leuconostoc*

La acción conservadora de las BAL es debido a la inhibición de un gran número de microorganismos patógenos y dañinos por varios productos finales de la fermentación. Estas sustancias son ácidos como láctico y acético, peróxido de hidrogeno, diacetilo, bacteriocinas y productos secundarios generados por la acción de lactoperoxidasa sobre el peróxido de hidrógeno y tiocianato<sup>(22)</sup>.

### 5.5 *Lactococcus lactis*

*Lactococcus lactis* es una bacteria ácido láctica que generalmente se encuentra en la leche y productos lácteos. Se caracteriza por producir nisina el cual tiene efecto antimicrobiano. Su aislamiento permitirá utilizarlo en la conservación de alimentos que tienen compromiso con bacterias patógenas responsables de las ETAs. La nisina es una sustancia polipeptídica producida a partir de una fermentación en medio lácteo modificado. La molécula exhibe su mayor estabilidad bajo condiciones ácidas en la que también es más soluble. Sin embargo, la velocidad en que puede metabolizar mono o disacáridos permitirá la formación de ácidos y de esta manera generar la producción de nisina, permitiéndole manifestar la propiedad bactericida<sup>(23)</sup>.

### 5.6 Bacteriocinas

Las bacteriocinas son péptidos de origen proteicos producidos tanto por bacterias gram negativas y positivas, en las que se incluye las bacterias ácido lácticas (BAL); estas proteínas poseen actividad antimicrobiana que a bajas concentraciones presentan capacidad inhibitoria frente a gran variedad de microorganismos<sup>(24-25)</sup>. La producción ocurre en la fase logarítmica del crecimiento bacteriano, poseen características notorias como su estabilidad al calor y al pH, están estrechamente relacionadas. Formadas por puentes de disulfuro y grupos tiol libres<sup>(24)</sup>.

Muchas de estas bacteriocinas poseen una excelente espectro de inhibición contra bacterias importantes involucradas en enfermedades transmitidas por alimentos (ETAS), entre estas: *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Salmonella spp.*<sup>(24)</sup>. Estos péptidos son sintetizados en el ribosoma con alrededor de 60 aminoácidos, estas pueden ser moléculas elongadas o globulares con un rango muy amplio en su peso molecular<sup>(26)</sup>, de este peso molecular muchas de estas se diferencian según su función.

#### 5.7 Bacteriocinas sintetizadas por bacterias ácido lácticas

Entre bacterias gram positivas que producen bacteriocinas se encuentra el grupo de las bacterias ácido lácticas, siendo estas de mayor importancia para la industria alimentaria conteniendo algunas como: Lactacina, Lactococina, Helveticina, Nisina<sup>(24)</sup>, esta última de mayor importancia por estar en la lista de aditivos naturales permitidos en el Codex Alimentarius.

Están compuestas por péptidos entre 20 y 60 aminoácidos, unidas por puentes de disulfuro y grupos tiol libres. Antes las bacteriocinas sintetizadas por las BAL se clasificaban en cuatro clases, según sus propiedades fisicoquímicas, características moleculares y su estructura<sup>(24)</sup>. En este momento se ha reducido a tres clases por que la cuarta aun no se ha podido justificar en su totalidad.

#### 5.8 Uso en la industria alimentaria

Actualmente la adición de aditivos químicos como conservantes ha sido desplazada por parte del Codex Alimentarios, ya que muchos de estos suelen tener efecto perjudicial para salud del consumidor. Razón por la cual los consumidores buscan consumir alimentos más orgánicos sin la adición de estos conservantes químicos. Siendo como la primer opción de estas industrias la adición de conservantes biológicos. Como primera opción se tiene este metabolito secundario producido por las BAL. Lo que le da apertura al estudio sobre estos péptidos microbianos capaces de lograr un alimento sin carga microbiana patógena que pueda ocasionar efectos adversos para los consumidores<sup>(25)</sup>.

Estas bacteriocinas al ser aceptadas como alternativa para ser un conservante, se utiliza ya en la industria, siendo aceptada para ser aplicada como ingrediente

bioactivo en polvo, como péptidos purificados o a través de cultivos lácticos que producen estas bacteriocinas.

Siendo utilizadas en especial en la industria de lácteos, que se remonta a estudios hechos en los años 50, estas bacteriocinas utilizadas con el fin de reducir la población de las esporas tales como las de *Clostridium tyributyricum*, entre otras, también para la inhibición de *Listeria monocytogenes*. Por lo general utilizadas en quesos madurados, cheddar, quesos frescos, en leche fresca y derivados, entre otras.

En la industria de cárnicos gracias a la acción de estos péptidos antimicrobianos se podría llegar a sustituir la adición de nitritos en este producto alimenticio. Por lo general se utiliza la adición de microorganismos que producen la bacteriocina Nisina, producida normalmente por bacterias pertenecientes al género: *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Carnobacteriu* y *Lactobacillus*, siendo aplicadas por lo general a salchichas de carne y pavo, salami.

En pesca las bacteriocinas también tiene campo de acción ya que este alimento es considerado según el decreto 719 del 2015 como de alto riesgo, y estos péptidos han mostrado efectividad cuando se adicionan a productos refrigerados y empacados al vacío, por lo general en langostas y salmón ahumado. Y en alimentos enlatados, como en maíz, zanahoria, estas bacteriocinas se utilizan para el control de algunas esporas termófilas evitando el empleo de altas temperaturas.

Por parte de cerveza y vinos se utiliza por lo general para evitar el deterioro de las bacterias ácido lácticas en cervezas y vinos, sucediendo esto por la resistencia que presenta las levaduras a la Nisina<sup>(25)</sup>.

## 5.9 Espectro de inhibición

El espectro de inhibición de las bacteriocinas sintetizadas de BAL, se dividen en dos grandes grupos; 1) las que actúan sobre cepas cercanas en su taxonomía (*lactococinas*, *lactacina*, *helveticina*), y 2) las que presentan un espectro de inhibición mas amplio frente a muchos microorganismos (Gram positivos) incluyendo a microorganismos patógenos y alterantes de alimentos (nisina, pediocinas, lactacina). Estas bacteriocinas están descritas generalmente para la inhibición de bacterias Gram positivas. Para la inhibición de bacterias Gram negativas por partes de estos péptidos sintetizados por BAL, se requiere un tratamiento previo ya sea con un agente quelante (EDTA) o por choques osmóticos, para inducir a una lesión en la pared celular, que permita el ingreso de las bacteriocinas; pero en algunos estudios se han descrito inhibición a cepas patógenas de *E. coli* y *Salmonella*, por *L. caseii* y *L. curvatus*.

Las bacteriocinas de clase 1 (Lantibióticos), actúan sobre las células vegetales evitando que germinen algunas esporas<sup>(25)</sup>.

Tabla 2. Relación de bacteriocinas de BAL frente a microorganismos no lácteos<sup>(25)</sup>.

<b>Microorganismo inhibido</b>	<b>Bacteriocina</b>
<i>Clostridium botulinum</i>	Nisina, Pediocina, Sakacina
<i>Escherichia coli</i>	Reuterina, Termofilina
<i>Listeria monocytogenes</i>	Nisina, Pediocina, (Entre otras)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Nisina, Lacticina, Pediocina, Plantaricina
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Nisina
<i>Bacillus subtilis</i>	Lacticina , Nisina, Termofilina

### 5.10 Síntesis de bacteriocinas

La producción de las bacteriocinas depende de su crecimiento y su actividad fisiológica, estas se han estudiado por en relación a su metabolito primario por lo que se relaciona con el aumento de su biomasa. Estas son sintetizadas en el ribosoma por medio de un transcrito que procede del gen estructural correspondiente, luego pasan a ser traducidos como pre-péptidos de un tamaño de alrededor de 24 a 30 en caso de los Lantibióticos, o más cortas de 18 a 24 (no lantibióticos).

### 5.11 Clasificación de las bacteriocinas

Las bacteriocinas se han clasificado tradicionalmente de acuerdo a sus propiedades bioquímicas y a sus características genéticas<sup>(32)</sup>:

Clase I. Lantibióticos: Actúan sobre la membrana citoplasmática, se caracterizan por poseer algunos aminoácidos que son poco comunes dentro de las estructuras proteicas, tales como dihidroalanina,  $\beta$ -metil- lantionina y lantionina, estos aminoácidos se forman por una modificación posterior a la traducción. La transformación es debida a la deshidratación de los aminoácidos treonina y serina, a los que posteriormente se les adicionan átomos de azufre, procedentes de la cisteína a los dobles enlaces de los deshidroaminoácidos. La nisina es una bacteriocina típica de esta clase<sup>(33)</sup>.

Clase II. No lantibióticos. Son bacteriocinas que se caracterizan por contener aminoácidos que se hayan comúnmente en las proteínas, pueden ser de peso molecular variable y se identifican tres subclases<sup>(34)</sup>:

Subclase IIa. Son péptidos que actúan de una manera efectiva en contra del género *Listeria*, comparten la secuencia TGNGVXC en la región N-terminal, son característicos de este grupo la sakacina P y la pediocina PA-1<sup>(34)</sup>.

Subclase IIb: Son péptidos que forman poros en la membrana citoplasmática y consisten de dos péptidos diferentes que son necesarios para una efectiva actividad antimicrobiana, se ha caracterizado a la lactococcina G y las plantaricinas EF y JK en este grupo<sup>(34)</sup>.

Subclase IIc: Son péptidos pequeños no modificados que presentan termo estabilidad y son transportados por medio de péptidos líder. Solamente se han reportado las bacteriocinas, divergicina A y acidocina B en esta subclase<sup>(34)</sup>.

Clase III.- Las bacteriocinas caracterizadas en esta categoría son, la acidofilicina A, las lacticinas A y B y las helveticinas J y V. Su peso molecular es mayor de 30 kDa<sup>(32)</sup>.

#### 5.11.1 Localización de determinantes genéticos

Las bacteriocinas pueden estar codificadas en el cromosoma y en plásmidos; dada la naturaleza transmisible y curable de la producción de nisina, simultáneamente con los procesos fermentativos de la sacarosa y otros caracteres, hizo pensar que ésta era de codificación plasmídica, sin embargo, análisis moleculares han establecido su localización en un transposón conjugativo de 70 kpb con 2 lugares específicos de unión en el cromosoma de *Lactococcus lactis*<sup>(35)</sup>. No obstante, otros lantibióticos (lactocina S y lacticina 481) están codificados en plásmidos<sup>(35)</sup>.

Los genes estructurales de la mayoría de las bacteriocinas no lantibióticos se encuentran en plásmidos aunque algunas como la helveticina J y la plantaricina A son de codificación cromosómica<sup>(35)</sup>.

En algunas ocasiones un solo plásmido puede portar los genes de varias bacteriocinas<sup>(36)</sup>. Alternativamente, la misma bacteriocina puede estar codificada en diferentes plásmidos presentes en cepas o subespecies distintas, así como una misma célula puede albergar varios plásmidos codificadores de diferentes bacteriocinas<sup>(37)</sup>.

#### 5.11.2 Organización genética

Los genes estructurales de las bacteriocinas van acompañados de otros, necesarios para su expresión y procesamiento y se organizan en operones. Sus funciones han sido investigadas por mutagénesis, transferencia, inactivación/superproducción, y/o por aislamiento y caracterización de sus productos<sup>(38)</sup>. La organización de los genes implicados en la biosíntesis de los lantibióticos es muy similar, así como sus productos, indican con esto un proceso común de biosíntesis<sup>(39)</sup> (Figura 2).



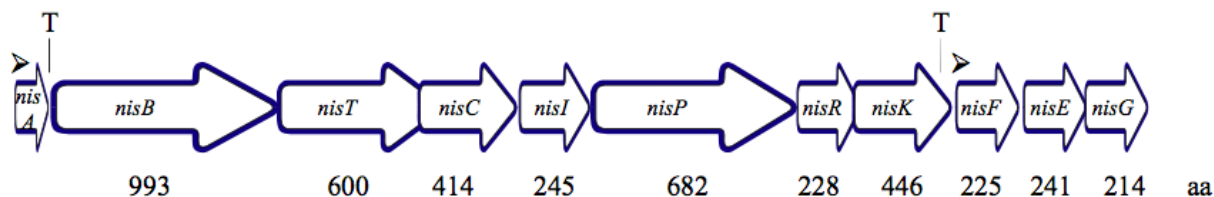


Figura 2. Organización de los genes implicados en la biosíntesis de la nisina.: promotor; T: terminador; *nisA*, gen estructural; *nisB*, *C*, modificación postraduccional; *nisT*, transporte; *nisF*, *E*, *G*, transporte / inmunidad; *nisR*, *K*, sistema de regulación de dos componentes<sup>(35)</sup>.

Los operones correspondientes a las bacteriocinas no lantibióticos son más sencillos, ya que hay menos genes implicados en su biosíntesis. Inmediatamente detrás y dependiendo del mismo promotor, se localizan los genes que codifican las proteínas implicadas en el transporte, como ocurre con la pediocina PA-1/AcH<sup>(40)</sup>. No obstante, pueden encontrarse por delante, en cuyo caso tienen su propio promotor como, por ejemplo, en la lactococina A<sup>(35)</sup>. Generalmente, estos genes están en la misma orientación y a poca distancia unos de otros<sup>(35)</sup>.

### 5.12 Bacteriocinas producidas por *Lactococcus lactis*

Entre el grupo de BAL, *Lactococcus lactis* juega un papel importante en los procesos de fermentación en la industria láctea. Además de su papel esencial en la acidificación de la leche, contribuye considerablemente a la formación del sabor de los quesos mediante la producción de péptidos y aminoácidos, impide el crecimiento de bacterias patógenas y descomposición y crea condiciones óptimas para la maduración. Por estas razones se incluye en cultivos iniciadores comerciales para la producción de quesos y leches fermentadas. Este microorganismo también es capaz de producir bacteriocinas del tipo lantibiótico y no lantibiótico. Entre ellos, la nisina, un lantibiótico de 34 aminoácidos que es una de las bacteriocinas más estudiados. Hasta ahora hay cinco variantes ya conocidas, la nisina A (Primera en ser descubierta), Z, Q, U, y F. Las diferencias entre estas variantes se basan en los cambios en la cadena de aminoácidos que podrían interferir con su actividad antimicrobiana. La nisina ha sido aprobada como un conservante de alimentos seguros por la UE (E234), así como por la OMS y la FDA y está siendo utilizada como conservante de alimentos en más de 50 países<sup>(41)</sup>.

### 5.13 Nisina A y Nisina Z

La síntesis de la nisina es compleja, requiere de procesos de transcripción, traducción, modificaciones post traduccionales, secreción, procesamiento, y señales de transducción. Existen dos variantes de esta bacteriocina, la nisina A y la nisina Z que difieren solamente en el amino ácido de la posición 27, la histidina en la nisina

A cambia por asparagina en la nisina Z<sup>(42)</sup>, lo que mejora su solubilidad y difusión a pH 6,0<sup>(43)</sup>, Esta característica puede ser importante en algunos sistemas de alimentos, como quesos, donde la difusión es limitada<sup>(44)</sup>.

## 6. Metodología

### 9.1 Búsqueda de referencias

El objetivo en la búsqueda de referencias fue el de hallar literatura relacionada con las bacteriocinas sintetizadas por la bacteria *Lactococcus lactis*, con especial atención en las bacteriocinas nisina A y nisina Z.

Para la búsqueda de referencias se utilizó la herramienta “Académico” del motor búsqueda “Google” (<https://scholar.google.com/>), se realizó la consulta: “bacteriocinas + *Lactococcus lactis* + nisina”, la cuál arrojó 510 resultados, se escogieron las 3 primeras páginas para la selección de las referencias.

También, se buscó en la “Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal” (<http://www.redalyc.org>), y se realizó la consulta: “bacteriocinas AND *Lactococcus lactis* AND nisina” la cuál arrojó 41 documentos para la selección de referencias.

Así mismo se realizó una búsqueda en “Pubmed central” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/>), con las consultas “bacteriocins AND *Lactococcus lactis* AND nisin” la cuál arrojó 512 de los cuales se escogieron las dos primeras páginas de búsqueda para la selección de referencias.

Por último se realizó una consulta en la base de datos local de la Universidad Libre Seccional Pereira (<http://unilibrepereira.edu.co/>), “Science direct” (<http://www.sciencedirect.com>), con los términos: “bacteriocins AND *Lactococcus lactis* AND nisin”, el cuál arrojó 78 resultados para la selección de referencias.

### 9.2 Población

El departamento de Risaralda se encuentra ubicado en el centro occidental de la región andina colombiana, consta de 14 municipios: Apia, Balboa, Belén de Umbría, Dosquebradas, Guatica, La Celia, La Virginia, Marsella, Mistrató, Pueblo Rico, Quinchía, Santa Rosa de Cabal, Santuario y Pereira; donde se llevará a cabo la recolección de muestras de quesos frescos procedentes de predios certificados y no certificados de todos los municipios.

Los análisis de laboratorio se realizarán en el Laboratorio de Investigación de la Universidad Libre seccional Pereira.

### 9.3 Tipo de muestreo

Se realizara un muestreo aleatorio simple a las empresas productoras de queso frescos en los municipios del departamento de Risaralda.

#### 9.4 Tipo de estudio

El tipo de investigación será descriptivo-correlacional, puesto que se manejarán dos variables y sus interacciones concretamente, la capacidad del microorganismo *Lactococcus lactis* de producir las bacteriocinas Nisina A y Nisina Z y su capacidad de inhibir el microorganismo patógeno Gram Positivo *Staphylococcus aureus*, se analizará a través de una correlación simple.

Modelo estadístico: Prueba Diagnóstica por especificidad y sensibilidad

#### 9.5 Técnicas y procedimientos

Selección de las muestras. Para la obtención las muestras de quesos frescos, se establecerán contactos formales con la secretaria de salud para la entrega de las muestras.

Las muestras serán escogidas al azar y se empacaran en bolsas herméticas selladas y guardadas en una caja de icopor con geles, una vez en el Laboratorio de Investigación de la Universidad Libre seccional Pereira se llevan a refrigerar para los análisis, el tiempo para la toma de muestras no deberá exceder de 1 día y para los análisis máximo 2 días.

#### 9.6 Protocolo de toma de muestras de acuerdo a la NTC666

Equipo de muestreo y químicos:

- Probadores de queso de forma y tamaño adecuado al queso al que se va realizar el muestro
- Cuchillo con hoja puntiaguda y superficie suave
- Espátula
- Alambre de corte, de resistencia y tamaño suficientes
- Etanol. Alcohol no desnaturalizado. 70% (V/V)
- Recipiente de vidrio

Nota: Todo el equipo de muestreo debe estar esterilizado antes de realizar el procedimiento de muestreo, generalmente por el método de la autoclave a 121°C por 20 minutos.

Procedimiento:

- Los recipientes deberán abrirse inmediatamente antes del análisis

- Se toma una muestra mínima de 100 gramos
- Inmediatamente después del muestreo, se colocan las muestras (Núcleos, tajadas, sectores, quesos enteros pequeños) en el recipiente de vidrio que encaje con la forma y el tamaño adecuados. La muestra se puede cortar para que quede en el recipiente en caso de que no encaje con sus proporciones, pero no se deberá comprimir ni moler.
- El almacenamiento de la muestra será en papel de aluminio, y deberá estar muy bien envuelta, adentro o incluso afuera del recipiente se deberá evitar el enmohecimiento de la superficie del queso.
- La muestra deberá incluir cualquier capa superficial del queso (Moho y costra)

#### Almacenamiento:

- El almacenamiento deberá ser tal, que el estado de éstas en el momento del muestreo no se vea afectado en una medida apreciable.
- Se deben tomar precauciones para evitar las exposiciones a olores rancios, luz directa y demás condiciones adversas.
- Si el análisis de la muestra no se puede realizar en un intervalo de tiempo prudente para que no altere sus propiedades tanto microbiológicas como fisicoquímicas, se deberá llevar a enfriamiento a una temperatura entre 0 y 8°C.

### 9.7 Protocolo para el aislamiento de *Lactococcus lactis* a partir de una muestra de queso fresco

#### Equipos y materiales:

- Stomacher
- Bolsa de polietileno estéril
- Balanza
- Espátula para la muestra
- Frasco con 90 ml de agua peptonada.
- Tubos de ensayo con 9 ml de agua peptonada.
- Pipetas esterilizadas.
- Cajas de Petri esterilizadas.
- Agar M17
- Gradilla para tubos.

#### Procedimiento

Comenzar el trabajo después de recibir la muestra; refrigerar entre 0° y 8° C siempre que no sea posible hacerlo en la primera hora después del muestreo. Si las

muestras llegan congeladas, descongelarlas en su envase original en una nevera entre 2°-5°C y comenzar el trabajo de análisis tan pronto como sea posible, una vez conseguida la descongelación completa.

Pesar 10 gramos representativos de la muestra total en el diluyente (agua peptonada 0.1%) colocar en el stomacher y hacer funcionar el equipo por 60 segundos.

Tarar un frasco tapa azul estéril que contiene 90 ml de agua peptonada al 0.1 %. 10 gramos de muestra, representativos de la muestra total. Agitar la bolsa vigorosamente. Transferir alícuotas de 1 ml a tubos con 9 ml de diluyente, ésta será la dilución ( $10^{-1}$ ). Con otra pipeta de 1 ml, mezclar en el agitador a 2800 rpm por unos segundos. Transferir con la misma pipeta 1 ml a otro tubo de dilución conteniendo 9 ml de diluyente y mezclar en el agitador. Repetir los pasos hasta realizar el número de diluciones necesarias. Cada dilución sucesiva disminuirá 10 veces la concentración.

Marcar convenientemente los tubos. Las pipetas no deben ser usadas por cantidades inferiores a 1/10 de su volumen total.

#### Medio de cultivo

Preparar la muestra y las diluciones de acuerdo al procedimiento descrito. Pipetear por duplicado en cajas de petri, alícuotas de 1 ml de las diluciones: 10-1, 10-2, 10-3, 10-4. Las citadas diluciones se aconsejan en los casos en que no se conozca previamente el número aproximado de microorganismos presentes en el alimento.

Inmediatamente verter en cada caja de 18 a 20 ml de medio M17, manteniendo a una temperatura entre 45° y 50° C, el agar. Seguidamente mezclar el inóculo con el agar girando las cajas con movimientos de vaivén en todas las direcciones por más de diez veces en cada dirección. Como prueba de esterilidad, verter la cantidad del medio de cultivo sobre una caja de petri sin muestra y marcarla como control. Dejar las placas sobre la mesa hasta solidificación del agar.

#### Métodos de identificación:

Prueba de catalasa, método del portaobjetos:

Procedimiento:

- Con el asa de siembra recoger el centro de una colonia pura de 18-24 horas y colocar sobre un portaobjetos limpio de vidrio.
- Agregar con gotero o pipeta Pasteur una gota de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% sobre el microorganismo sin mezclarlo con el cultivo.
- Observar la formación inmediata de burbujas (resultado positivo).
- Desechar el portaobjetos en un recipiente con desinfectante.
- Si se invierte el orden del método (extender la colonia sobre el agua oxigenada) pueden producirse falsos positivos.

### Tinción de Gram:

- Recoger muestra estéril
- Hacer el extendido en espiral
- Dejar secar a temperatura ambiente
- Fijar la muestra al calor (flameado 3 veces aprox.)
- Agregar azul violeta (cristal violeta) y esperar 1 minuto. Este tinte dejará de color morado las bacterias Gram positivas
- Enjuagar con agua
- Agregar lugol y esperar 1 minuto
- Enjuagar con agua
- Agregar alcohol y acetona y esperar 15 segundos
- Enjuagar con agua
- Agregar safranina y esperar 30 segundos. Este tinte dejará de color rosado las bacterias Gram negativas
- Enjuagar con agua

*Lactococcus lactis*: Gram positiva, forma: cocos

### 9.8 Matriz de control de calidad en el laboratorio de microbiología:

Los controles que se realizarán para prevenir falsos positivos en la realización de los protocolos respectivos se pueden apreciar en la tabla 3.

Tabla 3. Matriz de control de calidad en el laboratorio de microbiología.

MATRIZ CONTROL DE CALIDAD INTERNO EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA							
Punto a controlar	Tipo de control	Desinfección y limpieza	Estado de funcionamiento	Tiempo de mantenimiento	PCC	Prueba de esterilidad	Formatos de uso y registros
Manipulador		Lavar las manos antes, durante y después con Jabón líquido industrial	Uso de Bata larga, tapa boca, cofia, guantes	Cada práctica	El tipo de Jabón y mal lavado	Siembra en agar nutritivo antes y después	No aplica
Medio ambiente		No aplica	Libre de Hongos y levaduras	Cada mes	Contaminación microbiana en los cultivos	Exposición al aire caja agar nutritivo de 15-30 min	No aplica
Superficie mesón		Usar alcohol al 70% antes y después	Libre de suciedad e impurezas	Cada práctica	Contaminación microbiana en los cultivos	Siembra en agar nutritivo con un hisopo estéril antes y después	No aplica
Medios de cultivo y reactivos		No aplica	Observar tabla de contenido, fecha vencimiento y propiedades físicas.	Cada mes	Contaminación microbiana en los cultivos o mala operación	Preparación e incubación sin inoculación microbiana	Si aplica
Cabina de Bioseguridad		Desinfectar con alcohol zona de trabajo y UV (15 min)	Prendida, y con mínimo dos manipuladores	Cada práctica	Daño interno del equipo	Siembra en agar nutritivo con un hisopo estéril antes y después	Si aplica
Material de vidrio		Lavar con desinfectante industrial antes y después	Limpio y sin fracturas	Cada práctica	Mal lavado o fracturas cortantes	Secar en el horno	Si aplica
Autoclave		Desinfectar con alcohol internamente	Prendido y sin inconvenientes	Cada práctica	Daño interno del equipo	Exposición interna en el equipo caja agar nutritivo de 15-30 min	Si aplica

## 7. Conclusiones

Las bacteriocinas al ser una alternativa para reemplazar los conservantes químicos; en los últimos años se han posicionado en el mercado de la industria alimentaria, siendo ya de gran importancia para la investigación, estas se encuentran en la microbiota del mismo producto. Las bacteriocinas Nisina A y Z son permitidas por la normatividad internacional como el Codex Alimentarius; estos péptidos sintetizados por las BAL, porque son una alternativa tanto para empresas o como para pequeños y medianos productores, añadiendo un valor agregados y productos inocuos y de excelente calidad.

## 8. Bibliografía

1. Corporación Colombiana Internacional. Caracterización de la comercialización de cuatro cuencas lecheras. Bogotá. 2013.
2. Jaramillo AR, Areiza AM. Análisis del Mercado de la Leche y Derivados Lácteos en Colombia (2008-2012). Estudios de Mercado, Superintendencia de Industria y Comercio. 2012.
3. Ministerio de Agricultura. Resolución 0017 de 2012 [Internet] Disponible en: [http://www.sic.gov.co/drupal/sites/default/files/normatividad/get\\_file%3Fuuid%3Ddef3be8c-7678-4ef8-bb7d-cb8643c3f07d%26groupId%3D10157.pdf](http://www.sic.gov.co/drupal/sites/default/files/normatividad/get_file%3Fuuid%3Ddef3be8c-7678-4ef8-bb7d-cb8643c3f07d%26groupId%3D10157.pdf). Acceso: marzo 20 de 2015.
4. Federación Nacional Ganadera. Carta FEDEGAN. 2014, 143.
5. Federación Nacional Ganadera. Carta FEDEGAN. 2010, 116.
6. Instituto Colombiano Agropecuario. Las Buenas Practicas Ganaderas en la Producción de la Leche. Sanidad Agropecuaria e Inocuidad en la Producción Primaria. 2011.
7. ICONTEC. Norma Técnica Colombiana. Productos Lácteos. Queso Fresco [Internet] Disponible en: [http://e-normas.icontec.org/icontec\\_enormas\\_mobile/visor/HTML5.asp](http://e-normas.icontec.org/icontec_enormas_mobile/visor/HTML5.asp). Acceso: marzo 21 de 2015.
8. Castro G, Valbuena E, Briñez W, Sánchez E, Vera H, Tovar A. Comparación del Empleo de Nisina y Cultivos de *Lactococcus lactis subsp. lactis* para la Biopreservación de Queso Blanco. Científica XIX. 2009, 201-209.
9. Thomas L, Clarkson M, Delves J. Nisin. Natural Food Antimicrobial System. 2000, 463-524.
10. Codex Alimentarius. Norma de Grupo del Codex para el Queso no Madurado, incluido el Queso Fresco. Codex Stan 221. 2001.
11. Codex Alimentarius. Código de Prácticas de Higiene para la Leche y los Productos Lácteos. CAC/RCP 57. 2004.
12. Ministerio de Salud y Protección Social. Calidad e Inocuidad de Alimentos [Internet] Disponible en: <http://www.minsalud.gov.co/salud/Paginas/inocuidad->

- alimentos.aspx. Acceso: marzo 25 de 2015.
13. Ministerio de Salud y Protección Social. Resolución 719 de 2015 [Internet] Disponible en: [http://www.minsalud.gov.co/Normatividad\\_Nuevo/Resoluci%C3%B3n%200719%20de%202015.pdf](http://www.minsalud.gov.co/Normatividad_Nuevo/Resoluci%C3%B3n%200719%20de%202015.pdf). Acceso: Abril 05 de 2015.
  14. Ravishankar V, Jamuna A. Beneficial Microbes in Fermented and Functional Foods. 2014.
  15. Ministro de Agricultura y Desarrollo Rural. Leche. Boletín de Análisis por Producto. 2010, 6 (20).
  16. Ministerio de la Protección Social: Decreto 616 de 2006 [Internet] Disponible en: <http://207.239.251.110:8080/jspui/bitstream/11348/5498/1/leche%20bueno.pdf>. Acceso: mayo 22 de 2015.
  17. Agudelo DA, Bedoya O. Composición Nutricional de la Leche de Ganado Vacuno. Lasallista de Investigación. 2005, 2 (5): 38-42.
  18. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural: Observatorio Agrocadenas Colombia. La Cadena de Lacteos en Colombia: Una mirada global de su estructura y dinámica. 2005, 74 (36).
  19. Norma Técnica Colombiana. Productos Lacteos: Queso [Internet] Disponible en: [http://tic.uis.edu.co/ava/pluginfile.php/155346/mod\\_resource/content/1/NTC750.pdf](http://tic.uis.edu.co/ava/pluginfile.php/155346/mod_resource/content/1/NTC750.pdf). Acceso: mayo 22 de 2015.
  20. FAO. Procesos para la Elaboración de Productos Lacteos. Manual: Buenas Practicas en el Manejo de la Leche. 2011, 3 (30).
  21. Manual de Microbiología de los Alimentos. Leches y Derivados. 2007.
  22. Ramírez JC, Rosas P, Velázquez MY, Ulloa JA, Arce F. Bacterias Lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. Fuente. 2011, 7 (16).
  23. Modelamiento del Efecto del Cloruro de Sodio sobre el Crecimiento y la Producción de Nisina de *Lactococcus lactis* [Internet] Disponible en: [http://www.unac.edu.pe/documentos/organizacion/vri/cdcitra/Informes\\_Finales\\_Investigacion/Marzo\\_2011/ZARATE%20SARAPURA\\_FCNM/INFORME%20FINAL.PDF](http://www.unac.edu.pe/documentos/organizacion/vri/cdcitra/Informes_Finales_Investigacion/Marzo_2011/ZARATE%20SARAPURA_FCNM/INFORME%20FINAL.PDF). Acceso: mayo 22 de 2015.
  24. Beristain SC, Palou E, López A. Bacteriocinas: Antimicrobianos naturales y su aplicación en los alimentos. Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos. 2012, 6 (15): 64-78.
  25. Agudelo N. La obtención de Bacteriocinas a partir de Bacterias Acido Lacticas y su Aplicación en la Industria de Alimentos. 2013.
  26. Rojas C, Vargas P. Bacteriocinas: Sustituto de preservantes tradicionales en la Industria Alimentaria. Tecnología en marcha. 2008, 21 (8): 9-16.
  27. Tecnología y Alimentos. Conservadores Biológicos: Bacteriocinas [Internet] Disponible en: <https://tecnoyalimentos.wordpress.com/category/alimentacion/conservadores-biologicos-alimentacion/>. Acceso: mayo 24 de 2015.
  28. In golf F. Nes, Sung-Sik Yoon, Ozung B. Diep. Ribosomally Synthesized



- Antimicrobial Peptides (Bacteriocins) in Lactic Acid Bacteria. *Food Science and Biotechnology*. 2007, 16 (16): 675-690.
29. Zacharof MP, Lovitt RW. *Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria*. Elsevier. 2012, 2 (7): 50-56.
  30. Mondragon G, Escalante P, Osuna JA, Ibarra V, Morlett JA, Aguilar CN, *et al*. Bacteriocinas: Características y aplicación en alimentos. *Investigacion y Ciencia*. 2013, 21 (7): 64-70.
  31. Jeevaratnam K, Jamuna M, Bawa S. Biological preservation of foods– Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Indian Journal of Biotechnology*. 2005, 4 (9): 446-454.
  32. Campo M, Gómez HE, Alaníz R. Bacterias Acido Lácticas con Capacidad Antagónica y Actividad Bacteriocinogénica Aisladas de Quesos Frescos. *e-Gnosis*. 2008, 6 (17).
  33. Paq U, Sahl HG. Multiple activities in lantibiotics-models for the design of novel antibiotics? *Curr Pharm Des*. 2002, 8: 815-833.
  34. Van Belkum MJ, Stiles ME. Nonlantibiotic antibacterial peptides from lactic acid bacteria. *Natural Product Reports*. 2000, 17: 323-335.
  35. Martínez B. Bacteriocinas de *Lactococcus lactis* Aislados de Quesos Asturianos: Nisina Z y Lactocococina 972.
  36. Van Belkum MJ, Hayema BJ, Jeeninga RE, Kok J, Venema G. Organization and nucleotide sequences of two lacticoccal bacteriocin operons. *Appl Environ Microbiol*. 1991, 57 (7): 492-498.
  37. Quadri LE, Sailer M, Roy KL, Vederas JC, Stiles ME. Chemical and genetic characterization of Bacteriocins produce by *Carnobacterium piscicola* LV17B. *J Biol Chem*. 1994.
  38. Klaenhammer TR. Genetics of bacteriocins produce by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology*. 1993, 39-85.
  39. Siezen RJ, Kuipers OP, Vos WM. Comparison of lantibiotic gene clusters and encoded proteins. *Antonie van Leeuwenhoek*. 1996, 69: 171-184.
  40. Marugg JD, Gonzalez CF, Kunka BS, Ledebøer AM, Pucci MJ, Toonen MY, *et al*. Cloning, expression and nucleotide sequence of genes involved in production of pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC 1.0. *Appl Environ Microbiol*. 1992, 58: 2360-2367.
  41. Pisano MB, Fadda ME, Melis R, Ciusa ML, Viale S, Deplano M, *et al*. Molecular identification of Bacteriocins produce by *Lactococcus lactis* dairy strains and their technological and genotypic characterization. *Food Control*. 2015, 51 (8): 1-8.
  42. Piper C, Hill C, Cotter PD, *et al*. Bioengineering of a Nisin A- producing *Lactococcus lactis* to create isogenic strains producing the natural variants Nisin F, Q and Z. *Microbio Biototechnol*. 2011, 4: 375 – 382.
  43. De Arauz LJ, Jozala AF, Mazzola PG, *et al*. Nisin biotechnological production and application: a review. *Trends Food Sci. Tech*. 2009, 20: 46-154.
  44. Perin LM, Miranda RO, Camargo M, Colombo AF, Carvalho LA. Antimicrobial activity of the Nisin Z producer *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Lc08 against

*Listeria monocytogenes* in skim milk. Arq Bras Med Vet Zootec. 2013, 65 (5): 1554 – 1560.