



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

Programa de Posgrado en Alimentos del Centro de la
República. (PROPAC)

Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

**“CONTROL DE *Listeria monocytogenes* EN QUESO
FRESCO TIPO PANELA MEDIANTE ENDOLISINAS
RECOMBINANTES Y ANTIMICROBIANOS NATURALES”**

T E S I S

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de: Maestro en
Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta: I. Q. en A. Luis Alberto Ibarra Sánchez.

Dirigido por: Dra. Silvia Lorena Amaya Llano.

Co-dirigido por: Dr. Michael J Miller.

CU, Santiago de Querétaro, Qro. Noviembre, 2014.



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

“CONTROL DE *Listeria monocytogenes* EN QUESO FRESCO TIPO PANELA MEDIANTE
ENDOLISINAS RECOMBINANTES Y ANTIMICROBIANOS NATURALES”

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:

Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta:

I. Q. en A. Luis Alberto Ibarra Sánchez.

Dirigido por:

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano

Co-dirigido por:

Dr. Michael J Miller

SINODALES

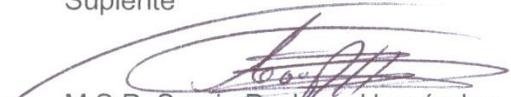
Dra. Silvia Lorena Amaya Llano
Presidente

Dr. Michael J Miller
Secretario

Dr. Eduardo Castaño Tostado
Vocal

Dra. Carlos Regalado González
Suplente

Dra. Diana Jaqueline Pimentel González
Suplente


M.S.P. Sergio Pacheco Hernández
Director de la Facultad



Firma



Firma



Firma



Firma



Firma

Dr. Jaimeo Torres Pacheco
Director de Investigación y
Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Noviembre, 2014. México

RESUMEN

El queso fresco tipo Panela (clasificado en Estados Unidos como queso tipo Hispano) es un producto elaborado con leche pasteurizada y la adición de cuajo, de textura no compacta y que no funde al calentarse. Su alto contenido de humedad, pH neutro y bajos niveles de sal proporcionan condiciones adecuadas para el crecimiento de microorganismos deterioradores y patógenos entéricos, notablemente *Listeria monocytogenes*. En relación a la inactivación de microorganismos patógenos, los antimicrobianos de origen natural (animales, vegetales y microorganismos) pueden ser aplicados como conservadores en alimentos. Los ácidos fenólicos de diversas fuentes vegetales, son conocidos por mostrar actividad antimicrobiana contra una variedad de microorganismos. La nisina, una bacteriocina producida por *Lactococcus lactis*, ha sido ampliamente estudiada y está reportada su efectividad como antimicrobiano. Por otra parte, las endolisinas son enzimas codificadas por el genoma de los bacteriófagos que degradan el peptidoglicano de la pared celular de las bacterias dando como resultado la lisis celular y su muerte. El objetivo de esta investigación fue clonar y sobreexpresar las endolisinas LysZ5 y PlyP100 en *Escherichia coli*, y evaluar el efecto antimicrobiano de dichas endolisinas y algunos antimicrobianos naturales como fermentos, ácido protocatecuico, ácido ferúlico y nisina contra *Listeria monocytogenes* al ser incorporadas en la fabricación de queso fresco tipo Panela. La actividad lítica de las endolisinas purificadas fue de 15.7 U/mg de proteína de LysZ5, y 13.7 U/mg de proteína de PlyP100. Ambas endolisinas mostraron actividad lítica frente a las seis cepas de *Listeria* evaluadas. Únicamente la combinación binaria de Nisaplin® con el ácido ferúlico mostró efecto sinergista. La adición de ácido ferúlico (4 mg/g) al queso fresco tipo Panela mantuvo sin cambios significativos el inóculo inicial de *L. monocytogenes* durante 21 días de almacenamiento. La adición de LysZ5 (19 U/g) y PlyP100 (12 U/g) al queso fresco tipo Panela redujo las cuentas viables iniciales de *L. monocytogenes* en al menos 1 Log UFC/g después de 21 días de almacenamiento. El queso fresco tipo Panela adicionado de endolisinas exhibió una menor dureza y gomosidad, y las muestras adicionadas con ácido ferúlico mostraron una menor elasticidad. La evaluación sensorial reveló que los consumidores prefieren ligeramente menos la apariencia, el color y el aroma del queso fresco tipo Panela con LysZ5. En adición, no existieron diferencias entre las muestras de queso fresco tipo Panela respecto a la textura. El ácido ferúlico y las endolisinas purificadas, LysZ5 y PlyP100, muestran un potencial para su uso en el queso fresco tipo Panela debido a su actividad antilisteria contra *L. monocytogenes* a 4°C.

Palabras clave: Queso fresco, *Listeria monocytogenes*, endolisina, LysZ5, PlyP100, ácido ferúlico.

ABSTRACT

Panela fresh cheese is a rennet-set cheese (classified in United States as Hispanic-style cheese), made from pasteurized milk known for its crumbly texture and non-melting properties. However, its high moisture content, near neutral pH and moderate salt content provide the ideal conditions for growth of various spoilage and pathogenic bacteria, notably *Listeria monocytogenes*. Naturally occurring antimicrobial compounds could be applied as food preservatives to protect food safety, quality and extend the shelf life. Polyphenols from different plant sources have shown interesting properties for the control of pathogens with relevance to humans. Nisin, a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis*, has been widely studied and it is reported to be effective in its potential role as antimicrobial. Endolysins are phage-encoded enzymes that hydrolyze bacterial cell walls resulting in cell lysis and death. In this work *Listeria* phage endolysins, LysZ5 and PlyP100, were cloned and overexpressed in *Escherichia coli* and antimicrobial activities of both endolysins and some natural antimicrobials as ferments, protocatechuic acid, ferulic acid and nisin against *L. monocytogenes* were evaluated in Panela fresh cheese. Lytic activity of purified endolysins tested against *L. innocua* was 15.7 U/mg protein for LysZ5, and 13.7 U/mg protein for PlyP100. Both endolysins showed lytic activity against the six strains of *Listeria* tested. Binary combination of Nisaplin® with ferulic acid showed synergistic effect. The addition of 4.0 mg/g ferulic acid to Panela fresh cheese maintained the initial inoculum level of *L. monocytogenes* without significant change during 21 days storage. For endolysins, the addition of LysZ5 (19 U/g) and PlyP100 (12 U/g) to Panela fresh cheese reduced the initial viable counts of *L. monocytogenes* in at least 1 Log CFU/g after 21 day storage. Panela fresh cheese added with endolysins exhibited lower hardness and gumminess, and ferulic acid-Panela fresh cheese displayed lower springiness. Sensory test revealed that consumers preferred slightly less the appearance, color and aroma of LysZ5-Panela fresh cheese. In addition, no differences existed between Panela fresh cheese samples with respect to texture. Ferulic acid and purified endolysins LysZ5 and PlyP100, shows promise for potential use in Panela fresh cheese because their antilisterial activity against *L. monocytogenes* at 4°C.

Keywords: Fresh cheese, *Listeria monocytogenes*, endolysin, LysZ5, PlyP100, ferulic acid.

ÍNDICE GENERAL

	Página
RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
ÍNDICE GENERAL	iii
ÍNDICE DE CUADROS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
II.1 Queso	3
II.1.1 Producción y demanda	3
II.1.2 El queso en México	4
II.1.3 Microorganismos patógenos en queso	5
II.2 <i>Listeria monocytogenes</i>	6
II.2.1 Listeriosis	8
II.2.2 Prevalencia de <i>L. monocytogenes</i> en quesos tipo Hispano	8
II.3 Antimicrobianos de origen natural	9
II.3.1 Fermentos	10
II.3.1.1 Aplicaciones de los fermentos en alimentos	10
II.3.2 Ácidos fenólicos	10
II.3.2.1 Aplicaciones de los ácidos fenólicos en alimentos	11
II.3.3 Bacteriocinas	11
II.3.3.1 Modo de acción de las bacteriocinas	12
II.3.3.2 Aplicaciones de las bacteriocinas en alimentos	13
II.3.4 Bacteriófagos	14
II.3.4.1 Ciclo de vida antibacteriano	14
II.3.4.2 Aplicaciones basadas en bacteriófagos en alimentos	15
II.3.5 Endolisinas	16
II.3.5.1 Modo de acción de las endolisinas	17
II.3.5.2 Aplicaciones de las endolisinas en alimentos	18
III. JUSTIFICACIÓN	20

IV. HIPÓTESIS	21
V. OBJETIVOS	22
V.1 Objetivo general	22
V.2 Objetivos específicos	22
VI. METODOLOGÍA	23
VI.1 Materiales	23
VI.1.1 Materiales biológicos	23
VI.1.2 Reactivos	23
VI.2 Métodos	24
VI.2.1 Manipulaciones de ADN	24
VI.2.1.1 Diseño de ADN plasmídicos	24
VI.2.2 Transformación y sobreexpresión de los genes <i>lysZ5</i> y <i>plyP100</i> en <i>Escherichia coli</i> .	24
VI.2.2.1 Preparación de células competentes	24
VI.2.2.2 Transformación de células competentes	25
VI.2.2.3 Electroforesis en geles de agarosa	25
VI.2.2.4 Inducción de <i>lysZ5</i> y <i>plyP100</i> en <i>E. coli</i>	26
VI.2.2.5 Expresión de LysZ5 y PlyP100	28
VI.2.2.6 Purificación de LysZ5 y PlyP100	28
VI.2.3 Caracterización de <i>Listeria innocua</i> y <i>Listeria monocytogenes</i>	28
VI.2.3.1 Activación de la cepa	28
VI.2.3.2 Conteo de <i>L. innocua</i> y <i>L. monocytogenes</i>	29
VI.2.4 Evaluación de la actividad antimicrobiana de LysZ5 y PlyP100 en <i>L. monocytogenes</i>	29
VI.2.4.1 Identificación de la actividad lítica y el espectro lítico	29
VI.2.4.2 Influencia de los cationes Ca ²⁺ y Na ⁺ en la actividad lítica	30
VI.2.5 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los fermentos, ácido protocatecuico, ácido ferúlico y nisina en <i>L. innocua</i>	30
VI.2.5.1 Determinación de la concentración mínima inhibitoria	30
VI.2.5.2 Determinación de los efectos combinados de los compuestos antilisteria	31

VI.2.6 Determinación de la actividad antilisteria de LysZ5 y PlyP100 en queso fresco tipo Panela	32
VI.2.7 Determinación de la actividad antilisteria del ácido ferúlico en queso fresco tipo Panela	33
VI.2.8 Elaboración de queso fresco tipo Panela adicionado de ácido ferúlico, LysZ5 y PlyP100	33
VI.2.9 Propiedades de textura del queso tipo Panela adicionado de antimicrobianos	34
VI.2.10 Evaluación sensorial	35
VI.2.11 Análisis de los datos experimentales	34
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
VII.1 Manipulaciones de ADN	37
VII.1.1 Diseño de ADN plasmídicos	37
VII.2 Transformación y sobreexpresión de los genes <i>lysZ5</i> y <i>plyP100</i> en <i>Escherichia coli</i>	38
VII.2.1 Electroforesis en geles de agarosa	38
VII.2.2 Inducción de <i>lysZ5</i> y <i>plyP100</i> en <i>E. coli</i>	40
VII.3 Evaluación de la actividad antimicrobiana de LysZ5 y PlyP100 en <i>L. monocytogenes</i>	44
VII.3.1 Identificación de la actividad lítica y el espectro lítico	44
VII.3.2 Influencia de los cationes en la actividad lítica	46
VII.4 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los fermentos, ácido protocatecuico, ácido ferúlico y nisina en <i>L. innocua</i>	48
VII.4.1 Determinación de la concentración mínima inhibitoria	48
VII.4.2 Determinación de los efectos combinados de los compuestos antilisteria	50
VII.5 Determinación de la actividad antilisteria de LysZ5 y PlyP100 en queso fresco tipo Panela	51
VII.6 Determinación de la actividad antilisteria del ácido ferúlico en queso fresco tipo Panela	53

VII.7 Propiedades de textura del queso tipo Panela adicionado de antimicrobianos	55
VII.8 Evaluación sensorial	57
IX. CONCLUSIONES	59
X. BIBLIOGRAFÍA	60
XI. ANEXOS	69

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Cepas bacterianas	22
2	Nucleótidos de reconocimiento para las enzimas de restricción	23
3	Mezcla de reacción de doble digestión enzimática	25
4	Condiciones de cultivo para la inducción de <i>lysZ5</i> y <i>plyP100</i>	26
5	Antimicrobianos naturales con potencial antilisteria	30
6	Concentración mínima inhibitoria de seis antimicrobianos naturales contra <i>Listeria innocua</i>	47
7	Determinación de los efectos combinados de los fermentos y ácidos fenólicos con Nisaplin®	49
8	Atributos de textura del queso fresco tipo Panela adicionado de antimicrobianos	54
9	Aceptabilidad de los consumidores del queso fresco tipo Panela adicionado de ácido ferúlico y endolisinas	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Modelo para el mecanismo antimicrobiano de la nisina	12
2	Etapas durante los ciclos de vida lítico y lisogénico de los bacteriófagos	14
3	Modo de acción de las endolisinas codificadas por fagos	17
4	Mapa del plásmido pRSETB-lysZ5	36
5	Mapa del plásmido pRSETB-plyP100	37
6	Electroforesis en gel de agarosa de las colonias de <i>E. coli</i> BL21 (DE3) transformadas	38
7	Evaluación de las condiciones de inducción del gen <i>lysZ5</i> en <i>E. coli</i>	39
8	Evaluación de las condiciones de inducción del gen <i>plyP100</i> en <i>E. coli</i>	40
9	Efecto de las fracciones solubles de <i>E. coli</i> inducidas y sin inducir, conteniendo el plásmido que codifica para la endolisina LysZ5/PlyP100, sobre la reducción de la densidad óptica de células de <i>Listeria innocua</i>	41
10	Espectro lítico de LysZ5 y PlyP100 contra cepas de <i>Listeria</i>	44
11	Influencia de la concentración de Ca y Na en la actividad lítica de LysZ5	46
12	Influencia de la concentración de Ca y Na en la actividad lítica de PlyP100	46
13	Sobrevivencia de <i>L. monocytogenes</i> en queso fresco tipo Panela adicionado con LysZ5 y PlyP100, almacenado a 4°C	51
14	Sobrevivencia de <i>L. monocytogenes</i> en queso fresco tipo Panela adicionado con ácido ferúlico, almacenado a 4°C	52

I. INTRODUCCIÓN

El queso, desde un punto de vista nutricional, es considerado como un alimento altamente nutritivo, debido a su variado contenido de proteínas, materias grasas, calcio, fósforo y vitaminas (Revilla, 1982; Dillon y Berthier, 2000).

La demanda de queso ha sido uno de los factores más significativos que influyen en la industria láctea. El consumo del queso continúa en incremento debido a su versatilidad y adaptabilidad en los alimentos, más variedades disponibles y a que más mujeres laboran fuera del hogar. El cambio de los hábitos del consumidor de preparar los alimentos en casa a comprar alimentos parcial o totalmente listos para su consumo, también ha beneficiado la venta de los quesos. La popularidad de los alimentos Latinos y los quesos Hispanos ha aumentado significativamente (Geisler, 2012).

Los quesos tipo Hispano (como se clasifica en Estados Unidos a los quesos mexicanos) elaborados a partir de leche cruda (esto es sin tratamiento térmico) han sido implicados en brotes de infecciones por varios agentes patógenos, incluyendo brotes de listeriosis en Los Ángeles, California (Linnan *et al.*, 1988) y Winston-Salem, Carolina del Norte (Macdonald *et al.*, 2005), y brotes de infección debido a *Salmonella* serotipo Typhimurium al norte de California (Cody *et al.*, 1999) y Yakima, Whashington (Villar *et al.*, 1999).

Los alimentos que presentan un alto riesgo de contaminación por *Listeria monocytogenes* son los alimentos refrigerados listos para su consumo, como son los quesos. Esto es debido a la habilidad de este microorganismo para crecer a temperaturas de refrigeración (tan bajas como -1.5°C) y a su tolerancia a pH bajo y altas concentraciones de sal (Kousta *et al.*, 2010).

Los antimicrobianos naturales permiten prolongar la vida de anaquel del alimento al inhibir el crecimiento de los microorganismos o al causar la muerte de los mismos, y están disponibles de varias fuentes naturales, tales como plantas, animales y microorganismos. El uso de antimicrobianos naturales como conservadores en alimentos puede ayudar a evitar el excesivo procesamiento físico

del alimento para asegurar su inocuidad microbiana, lo que a menudo altera las propiedades organolépticas del producto (Juneja, Dwivedi y Yan, 2012).

Las frutas y vegetales frescos contienen una variedad de compuestos fenólicos antimicrobianos. Los compuestos fenólicos se encuentran en los tejidos de la planta como fenoles con sustitución simple, o complejos, como moléculas polimerizadas con altos pesos moleculares. Derivados del ácido cinámico tales como los ácidos caféico, p-cumárico y ferúlico, conocidos colectivamente como ácidos hidroxicinámicos, y el ácido clorogénico son comunes en muchos cultivos alimenticios (Wen *et al.*, 2003). Hoy sabemos que los antimicrobianos de origen vegetal son importantes en la fisiología de la planta debido a que contribuyen a la resistencia contra microorganismos. Se ha observado que los polifenoles de diferentes fuentes vegetales tienen propiedades interesantes para el control de microorganismos patógenos para humanos (Stojković *et al.*, 2013).

El uso de fagos virulentos, presentes naturalmente, para reducir la contaminación de los alimentos tiene ventajas sobre los conservadores químicos. Las endolisinas fágicas son enzimas que degradan el peptidoglicano de la pared celular de las bacterias. Son codificadas por el genoma del fago y sintetizadas al final del ciclo de vida lítico del fago para liberar de la célula huésped los virus recién producidos. Además de la “lisis desde el interior”, las endolisinas de los fagos de bacterias Gram-positivas también son capaces de lisar rápidamente las células bacterianas cuando son aplicadas de forma exógena. Se ha considerado que hay una baja probabilidad de desarrollar resistencia contra la actividad de las endolisinas ya que tienen como blanco enlaces altamente conservados en los peptidoglicanos (García *et al.*, 2010a; García *et al.*, 2010b; Obeso *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2012).

II. REVISIÓN DE LITERATURA

II.1 Queso

El queso es una de las formas más antiguas de conservar los principales elementos nutritivos de la leche. Está compuesto por caseína, grasa, sales insolubles, agua y pequeñas cantidades de lactosa, albúmina y sales solubles de la leche que son concentradas por coagulación de la misma, por medio de la renina o ácido láctico producido por microorganismos. Después de la coagulación, parte del agua de la leche es removida mediante el calentamiento, agitación, desuero y prensado de la cuajada (Revilla, 1982; Dillon y Berthier, 2000).

La Norma Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010 define a los quesos como, productos elaborados de la cuajada de la leche estandarizada y pasteurizada de vaca o de otras especies animales, con o sin adición de crema, obtenida de la coagulación de la caseína con cuajo, gérmenes lácticos, enzimas apropiadas, ácidos orgánicos comestibles y con o sin tratamiento ulterior, por sales fundentes e ingredientes comestibles opcionales.

Debido a la gran diversidad de quesos en el mercado, no existe un sistema de clasificación único. Sin embargo, algunos factores que se toman en cuenta son: grado de añejamiento, procedencia de la leche, textura y contenido de grasa (Revilla, 1982; Almanza, 2011). La Norma Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010 clasifica a los quesos dependiendo de su proceso como: fresco, madurado y procesado.

II.1.1 Producción y demanda

En los Estados Unidos, más de 300 variedades de queso son producidas, en su mayoría a partir de leche de vaca. Además, la demanda de queso ha sido uno de los factores más significativos que influyen en la industria láctea. La producción total de queso en Estados Unidos en el 2013, excluyendo el queso Cottage, fue de 5 millones de toneladas, 2% más de la producción del 2012. De esa producción, el queso tipo Hispano comprende 109 mil toneladas (USDA, 2014). En México, la

producción total de queso en 2013, fue de 288 mil toneladas, de esa producción, los quesos frescos comprenden 179 mil toneladas y representan el 62% de la producción total de queso en ese año (SIAP, 2014).

El consumo de queso *per cápita* para una persona estadounidense fue de 15.2 kg en el 2012, dentro del cual su consumo de queso tipo Hispano *per cápita* fue de 0.3 kg (USDA ERS, 2013). En México, el consumo *per cápita* de queso fue de 2.83 kg en el 2010 (Almanza, 2011).

Otro factor que contribuye a la popularidad del queso en los Estados Unidos ha sido la gran aceptación de la cocina étnica, tal como la Italiana y la Mexicana, que emplean sustancialmente más queso (Geisler, 2012).

II.1.2 El queso en México

Se entiende por quesos mexicanos (genuinos), aquellos elaborados a partir de leche fluida de vaca, con el empleo mínimo de aditivos, incorporando los permitidos por las normas vigentes. No incluyen grasa vegetal, ni derivados proteicos, a excepción de pequeñas cantidades de estos últimos, solamente para estandarizar la relación % de grasa/ % de proteínas.

Son fabricados dentro del territorio nacional por mexicanos (nativos o nacionalizados), o extranjeros residentes. Muchos de estos productos son meramente regionales debido al fuerte vínculo del queso con las condiciones ecológicas que privan en ese territorio, otros se han difundido por todo el país y un poco en el extranjero, sobre todo por los emigrantes mexicanos hacia Estados Unidos de América (Cervantes *et al.*, 2006). En México, hay una clara preferencia al consumo de los quesos frescos, de entre los cuales destaca el queso Panela, ya que representó el 28.6% de la producción total de quesos frescos en 2013 (SIAP, 2014).

En Estados Unidos, los quesos tipo Hispano, son una categoría de quesos que son elaborados en México, América Latina, y el Caribe, y muchos de ellos están basados en quesos Europeos pero con modificaciones que se ajustan a las

preferencias locales y a las condiciones de manufactura (Van Hekken *et al.*, 2007). Los quesos tipo Hispano que reflejan sus orígenes Europeos incluyen el Manchego, Idiazábal, Roncal, Quartirolo, Queso de Bola, y Queso Prato. Otros quesos, por su parte, usan nombres descriptivos tales como Queso Fresco, Queso Blanco, Panela, Asadero, Queso Añejo, Queso de Prensa y Queso Enchilado. Mientas que otros se refieren a la región en dónde fueron desarrollados, tal como el Queso Chihuahua, Oaxaca y Cotija (Hnosko *et al.*, 2009)

Quizá el único aspecto negativo que se les atribuye a los quesos mexicanos, es que no son totalmente garantes de inocuidad, ya que una buena parte de ellos se elaboran con leche cruda, sin pasteurizar. Además, una gran proporción de consumidores en México, también prefieren los quesos elaborados con leche cruda (Torres-Vitela *et al.*, 2012). Por lo tanto, existe la necesidad de que los quesos mexicanos se produzcan a través de procesos estandarizados que garanticen inocuidad, pero siempre cuidando de no afectar las características organolépticas propias, que han dado origen a su especificidad (Cervantes *et al.*, 2006).

II.1.3 Microorganismos patógenos en queso

Los quesos son productos alimenticios listos para su consumo que no son sometidos a ningún tratamiento posterior para asegurar su seguridad antes de su consumo. La contaminación del queso con microorganismos patógenos puede ocurrir en varias etapas desde su elaboración hasta el momento de su consumo.

Algunos de los patógenos de los cuales está bien documentado que han causado brotes por el consumo de varios tipos de queso contaminados son: *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. y *Escherichia coli* O157:H7. Además, la presencia de estas bacterias patógenas en quesos elaborados con leche cruda o quesos que se han recontaminado después de la pasteurización, representan una amenaza a la salud humana debido al incremento en el número de casos y a la severidad de los síntomas.

L. monocytogenes es el agente causal de la listeriosis, una enfermedad transmitida por alimentos infecciosa y severa, que se caracteriza por una muy alta tasa de mortalidad comparada con aquellas de otras bacterias patógenas. La listeriosis afecta principalmente a aquellos individuos cuyo sistema inmune se encuentra perturbado, incluyendo a mujeres embarazadas, recién nacidos, ancianos y personas inmunocomprometidas, aun así el nivel de contaminación tiene un papel importante para que el patógeno cause la infección.

S. aureus es una de las causas importantes por intoxicaciones alimenticias a nivel mundial. El envenenamiento por el alimento con *Staphylococcus* es causado por la ingestión del alimento que contenga una o más enterotoxinas preformadas producidas por *S. aureus*. Los síntomas tienen una manifestación rápida e incluyen náuseas, vómito y diarrea.

Las infecciones por *Salmonella*, aunque han sido asociadas generalmente con aves de corral, también han sido ligadas con brotes asociados con el consumo de varios tipos de queso. Los síntomas típicos de esta enfermedad incluyen náusea, vómito y diarrea, mientras que las complicaciones adicionales asociadas con la infección incluye septicemia, o artritis reactiva.

Escherichia coli O157:H7 es un patógeno emergente que ha causado más brotes relacionados con el consumo de leche cruda y pasteurizada en comparación con el consumo de queso. La dosis infectante de *E. coli* O157:H7 es de 10-100 células, o incluso menores en el caso de los grupos susceptibles causando una amplia gama de síntomas clínicos, incluyendo diarrea no sanguinolenta, colitis hemorrágica, síndrome urémico hemolítico, y la muerte (Kousta *et al.*, 2010).

II.2 *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes es un bacilo corto, Gram-positivo, anaerobio facultativo, con un bajo contenido de G+ C (contenido de guanina y citosina, de 36 a 42%) y sin cápsula. Es catalasa positivo, L-Ramnosa positivo, oxidasa negativo y móvil de 22 a 25°C, pero a 37°C no se expresa el gen que codifica para la flagelina y la bacteria

no manifiesta movilidad. El patógeno es de 1 a 2 μm de longitud y puede existir como células individuales o dobles pero se asocian en largas cadenas dependiendo de su crecimiento. Tiene la habilidad de crecer en un amplio rango de temperatura (1 a 45°C), aunque su temperatura óptima de crecimiento se ubica de 30 a 37°C. *L. monocytogenes* también es tolerante y sobrevive en condiciones extremas como en un amplio rango de pH (4.5 a 8.0), altas concentraciones de sal (10%) y en la presencia de agentes antimicrobianos (Fernández Escartín, 2008; Adzitey y Huda, 2010).

L. monocytogenes pertenece al género *Listeria*, que está muy relacionado con *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, y *Staphylococcus*. Además, hay seis especies notables bajo el género *Listeria*; *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* subsp. *ivanovii*, *L. ivanovii* subsp. *londoniensis*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimeri* y *L. grayi* (Fernández Escartín, 2008).

Hay 13 patrones distintos del antígeno somático O en *L. monocytogenes*, que comprende los serovares; 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 4c, 4d, 4e, 4ab, y 7. Los serovares 1/2a, 1/2b, y 4b (el más virulento) son los responsables del 98% de los brotes. También hay tres linajes; Linaje I (altamente patógeno, responsable de la mayoría de los brotes p. ej. 1/2b, 3b, 4b, 4d, 4e), Linaje II (medianamente patógeno, casos esporádicos p. ej. 1/2a, 1/2c, 3c, 3a) y Linaje III (raramente causa enfermedad en humanos p. ej. 4a, 4c) (Adzitey y Huda, 2010).

L. monocytogenes puede ser encontrado en el tracto intestinal de animales tales como reses, cabras, ovejas, aves de corral, peces, conejos, ratones, mascotas y animales silvestres. Además se puede encontrar en tierra, agua, efluentes, plantas, vegetales y heces de humanos y animales. *L. monocytogenes* también puede colonizar varias superficies inertes y puede formar biopelículas en superficies de procesamiento de alimentos (Fernández Escartín, 2008; Adzitey y Huda, 2010).

II.2.1 Listeriosis

L. monocytogenes causa dos formas de listeriosis: listeriosis gastrointestinal no invasiva y listeriosis invasiva. En individuos inmunocompetentes, la listeriosis no invasiva se desarrolla como una típica gastroenteritis febril. En adultos inmunocomprometidos, tales como ancianos y pacientes que reciben agentes inmunosupresores, la listeriosis se puede manifestar como septicemia o meningoencefalitis. La listeriosis invasiva también puede ser adquirida por el feto de su madre infectada por vía de la placenta. La listeriosis perinatal puede llevar al aborto, nacimiento de un feto mortinato o un bebé con infección generalizada (granulomatosis infantiséptica), y sepsis o meningitis en el neonato. En los casos no asociados al embarazo, la listeriosis se manifiesta principalmente como una meningoencefalitis o septicemia. El periodo medio de incubación se estima es de 3 semanas (Fernández Escartín, 2008; Allerberger y Wagner, 2010).

Los brotes han ocurrido de 3-70 días posteriores a una única exposición al producto implicado. El comienzo de la meningoencefalitis, que es raro en mujeres embarazadas, puede ser repentino, con fiebre, dolor de cabeza intenso, náuseas, vómito y señales de irritación meníngea, o puede ser subagudo, particularmente en un huésped inmunocomprometido o anciano (Allerberger y Wagner, 2010).

II.2.2 Prevalencia de *L. monocytogenes* en quesos tipo Hispano

Cada año en los Estados Unidos, alrededor de 1600 personas se enferman seriamente como resultado de la infección de *L. monocytogenes*, y 260 de estas personas mueren debido a la infección (CDC, 2013). La listeriosis es la causa de únicamente el 0.02% de las enfermedades transmitidas por alimentos, pero es la causa del 27.6% de las muertes debido a la infección por estos patógenos. Las mujeres embarazadas, los neonatos, y las personas inmunocomprometidas tienen un alto riesgo de adquirir una enfermedad seria debido a *L. monocytogenes* (MacDonald *et al.*, 2005). Un estudio llevado a cabo por la fundación de investigación del International Life Science Institute (Washington, DC) clasificó al

queso fresco como un factor de mayor riesgo a enfermar de listeriosis (ILSI, 2005). Además cabe señalar que están reportados brotes de listeriosis donde el alimento implicado fue el queso tipo Hispano, como son los brotes ocurridos en Los Ángeles, California (Linnan *et al.*, 1988) y en Winston-Salem, Carolina del Norte (Macdonald *et al.*, 2005). A la fecha, en México no han sido reportados brotes de listeriosis asociados al consumo de queso. Sin embargo esto no significa que este microorganismo patógeno no haya estado presente en los quesos debido a la escases de reportes de casos de enfermedades gastrointestinales y la posible asociación con el consumo de alimentos en México (Torres-Vitela *et al.*, 2012).

Aunque la pasteurización de la leche reduce en gran medida el riesgo de los patógenos en los productos lácteos, a menudo es omitida durante la producción no comercial y no regulada de quesos frescos y no madurados. *L. monocytogenes* no tiende a sobrevivir el proceso de maduración requerido para la producción de quesos añejos y duros. El queso fresco tipo Mexicano es vendido de puerta en puerta y en pequeños mercados que abastecen a los consumidores Latinoamericanos en los Estados Unidos (MacDonald *et al.*, 2005).

II.3 Antimicrobianos de origen natural

El aumento en la demanda por alimentos saludables ha originado muchos cambios en la calidad e inocuidad de los alimentos y en la conformación de los ingredientes alimenticios. Los alimentos procesados con el mínimo de aditivos alimenticios así como de tratamientos térmicos son una tendencia creciente entre los consumidores. Los antimicrobianos naturales están disponibles de varias fuentes naturales, tales como plantas, animales y microorganismos. Los antimicrobianos naturales permiten prolongar la vida de anaquel del alimento al inhibir el crecimiento de los microorganismos o al causar la muerte de los mismos. El uso de antimicrobianos naturales como conservadores en alimentos puede ayudar a evitar el excesivo procesamiento físico del alimento para asegurar su inocuidad microbiana, lo que a menudo altera las propiedades organolépticas del producto (Juneja, Dwivedi y Yan, 2012).

II.3.1 Fermentos

Los fermentos son productos de acidificación controlada *in situ* por bacterias ácido lácticas (BAL); típicamente, la fermentación produce ácidos orgánicos, proteínas de bajo peso molecular y otros compuestos antimicrobianos, tales como diacetilo (Monteville y Chikindas, 2007). La eficacia de los fermentos está determinada por el pH inicial y la capacidad amortiguadora del producto, las características de los microorganismos objetivos, el tipo de carbohidratos fermentables, y las tasas de crecimiento de las BAL y los microorganismos patógenos en abusos de temperatura y refrigeración.

II.3.1.1 Aplicaciones de los fermentos en alimentos

MicroGARD™, un producto producido mediante la fermentación de la leche por *Propionibacterium shermanii*, es un conservador para alimentos con estatus GRAS; la fermentación produce acetato, ácido propiónico y proteínas de bajo peso molecular. Los productos MicroGARD™ están comercialmente disponibles y afirman inhibir el crecimiento de bacterias Gram-negativas y Gram-positivas. Sin embargo, los estudios han mostrado que la eficacia de MicroGARD™ contra bacterias Gram-positivas es dependiente del alimento. En carne para hamburguesas, MicroGARD™ fue capaz de reducir las cuentas viables de *E. coli* O157:H7, pero no pudo inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes* (Dave *et al.*, 2003). Aunque los productos MicroGARD™ poseen una bacteriocina, la principal actividad antimicrobiana proviene del ácido propiónico, por lo que su actividad es dependiente del pH de la matriz alimenticia (Monteville y Chikindas, 2007).

II.3.2 Ácidos fenólicos

Las frutas y vegetales frescos contienen una variedad de compuestos fenólicos antimicrobianos. Los compuestos fenólicos se encuentran en los tejidos de la planta como fenoles con sustitución simple, o complejos, como moléculas polimerizadas con altos pesos moleculares. Derivados del ácido cinámico tales

como los ácidos caféico, p-cumárico y ferúlico, conocidos colectivamente como ácidos hidroxicinámicos, y el ácido clorogénico son comunes en muchos cultivos alimenticios (Wen *et al.*, 2003). Hoy se sabe que los antimicrobianos de origen vegetal son importantes en la fisiología de la planta debido a que contribuyen a la resistencia contra microorganismos. Se ha observado que los polifenoles de diferentes fuentes vegetales tienen propiedades interesantes para el control de microorganismos patógenos para humanos (Stojković *et al.*, 2013).

II.3.2.1 Aplicaciones de los ácidos fenólicos en alimentos

El interés en las propiedades antimicrobianas de los compuestos fenólicos se debe a que se sugiere que afectan el comportamiento de los microorganismos patógenos en alimentos derivados de plantas. Reinders *et al.* (2001) concluyeron que el ácido caféico en un sistema modelo de jugo de manzana fue un factor determinante en la sobrevivencia de *Escherichia coli* O157:H7. Algunos trabajos se han encaminado a evaluar la actividad antimicrobiana de algunos compuestos fenólicos al ser incorporados en matrices alimentarias. Chao y Yin (2009) evaluaron los extractos acuosos y etanólicos de flor de jamaica, así como el ácido protocatecuico (su principal compuesto fenólico), adicionados a carne molida y jugo de manzana, encontrando que mostraron efectos inhibitorios dependientes de la dosis contra *Salmonella* thyphimurium, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*. De manera similar, la incorporación de ácido protocatecuico a queso crema inhibió el desarrollo de *L. monocytogenes* después de tres días a la inoculación (Stojković *et al.*, 2013). Por su parte, Takahashi *et al.* (2013) reportan la inhibición de *L. monocytogenes* en queso y salmón ahumado adicionados de ácido ferúlico.

II.3.3 Bacteriocinas

Las bacteriocinas son péptidos o proteínas sintetizados ribosomalmente por bacterias con actividad antimicrobiana. En un principio fueron descritas en *E. coli*

(colicinas). La mayoría de las colicinas son proteínas relativamente grandes (hasta 80 kDa) que eliminan bacterias muy relacionadas tras su unión a la membrana interna u otros blancos citosólicos.

Hoy en día, el término bacteriocina es usado generalmente para describir a los péptidos pequeños, catiónicos y termoestables sintetizados por bacterias Gram-positivas, específicamente bacterias ácido lácticas (BAL), las cuales muestran un amplio espectro de inhibición. Desde que las BAL han sido asociadas tradicionalmente a los alimentos y son reconocidas como seguras, la bioconservación de los alimentos se ha enfocado principalmente en las bacteriocinas de las BAL (García *et al.*, 2010b).

II.3.3.1 Modo de acción de las bacteriocinas

El modo de acción de las bacteriocinas de BAL ha sido ampliamente estudiado aunque el mayor número de trabajos se ha llevado a cabo básicamente con la nisina, la primer bacteriocina Gram-positiva descrita.

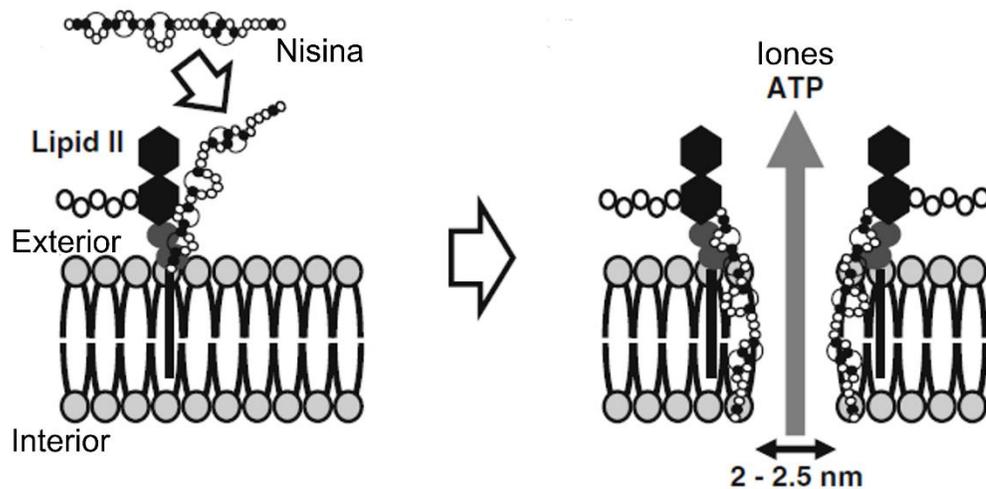


Figura 1. Modelo para el mecanismo antimicrobiano de la nisina (Zendo *et al.*, 2010)

Basado en su naturaleza catiónica e hidrofóbica, la mayoría de estos péptidos actúan como permeabilizadores de membrana. La formación de poros permite la disipación total o parcial de fuerza motriz de protones, causando finalmente la muerte de la célula.

La nisina y otros lantibióticos usan el precursor de la pared celular lipid II como una molécula de anclaje (Figura 1). Así, hay dos modos de acción, esto es la inhibición de la biosíntesis de la pared celular y la formación de poros, son combinados en una molécula con una actividad antimicrobiana potente. Esta estrategia también es usada por otros lantibióticos y bacteriocinas no formadoras de poros como el no lantibiótico Lcn972 (García *et al.*, 2010b).

II.3.3.2 Aplicaciones de las bacteriocinas en alimentos

El campo de aplicación más grande ha sido la aplicación de las bacteriocinas para inhibir a las bacterias patógenas y deterioradoras durante el procesamiento de alimentos. Las bacteriocinas pueden ser aplicadas básicamente en tres formas diferentes: i) producción *in situ* por un cultivo iniciador o cultivo protector, ii) como un ingrediente (fermentación de una cepa bacteriocinogénica), o iii) como un aditivo en una preparación semipurificada o purificada (García *et al.*, 2010b).

Los cultivos iniciadores lácteos productores de nisina han sido diseñados para inhibir específicamente a *S. aureus* en quesos de coagulación ácida y a *Clostridium tyrobutyricum* en quesos semiduros (Rilla *et al.*, 2003; Rilla *et al.*, 2004). Los cultivos protectores, que no contribuyen a los atributos sensoriales del alimento, han sido aplicados principalmente para mejorar la calidad higiénica de los productos de carne y pescado crudos (Devlieghere *et al.*, 2004).

Además de la bioconservación de los alimentos, las bacteriocinas han mostrado que aceleran la maduración de los quesos al promover la liberación de enzimas intracelulares a la matriz del queso y un subsecuente incremento en la concentración de compuestos volátiles y otros más responsables de los atributos sensoriales de los quesos madurados (Martínez-Cuesta *et al.*, 2006). Los

productores de bacteriocinas también han mostrado contener a la microbiota inesperada y garantizar productos fermentados homogéneos (Ryan *et al.*, 2001).

II.3.4 Bacteriófagos

Los bacteriófagos o fagos son los microorganismos más abundantes en la Tierra (10^{31} partículas) y están ampliamente distribuidos incluyendo en alimentos de varios orígenes. Los bacteriófagos son virus que infectan y se multiplican específicamente en bacterias. Así, son inofensivos para los humanos, animales y plantas.

Dependiendo de su forma de vida, los fagos son divididos en fagos virulentos y fagos moderados. Los fagos virulentos siguen estrictamente el ciclo lítico a través del cual se multiplican dentro de la célula bacteriana para finalmente lisar la célula para liberar la progenie de fagos. En contraste, los fagos moderados pueden entrar en el ciclo lisogénico al insertar su DNA en el cromosoma bacteriano (profago) donde se replica como parte del genoma del huésped hasta que sea inducido para entrar al ciclo lítico (García *et al.*, 2010b).

II.3.4.1 Ciclo de vida antibacteriano

Son distinguidas varias fases en el ciclo lítico (Figura 2). Primero, el reconocimiento del huésped y la adsorción, mediadas parcialmente por proteínas que reconocen de forma peculiar a los receptores específicos de la bacteria. Tras la adsorción irreversible, el fago inserta el ácido nucleico que se transcribe por la RNA polimerasa de célula huésped. El genoma del fago es replicado en múltiples copias y las proteínas recién sintetizadas confiscan toda la maquinaria de la célula huésped y la fuerzan a producir exclusivamente las proteínas estructurales del fago, las cuales se ensamblan en los nuevos virus, y las proteínas de lisis que, en última instancia, lisarán al huésped bacteriano. El último paso lítico es precisamente donde reside la actividad antimicrobiana del fago (García *et al.*, 2010b).

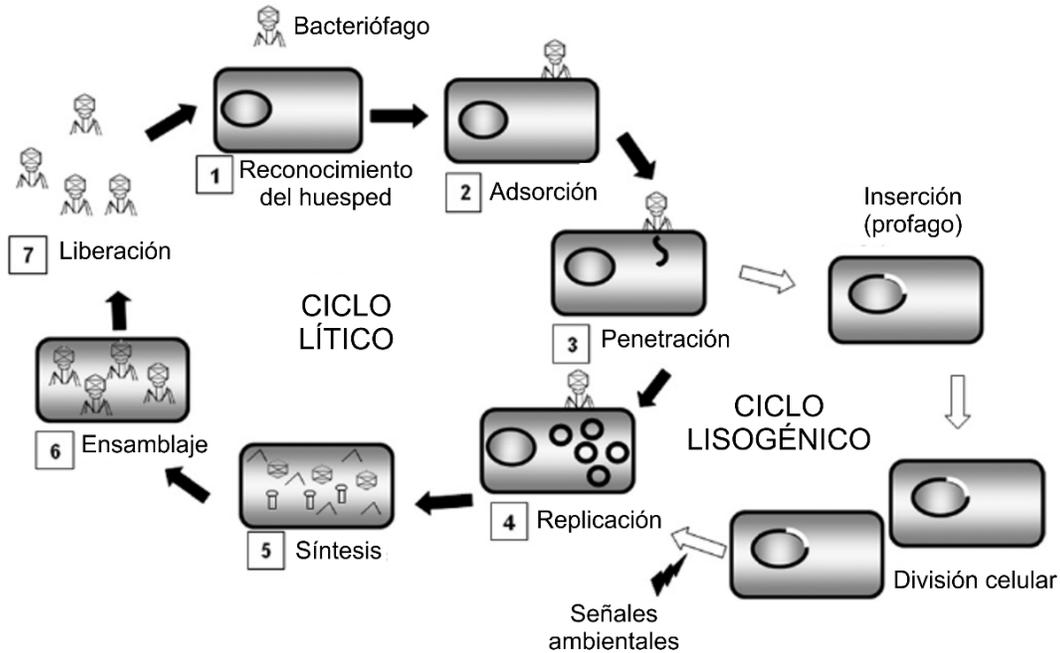


Figura 2. Etapas durante los ciclos de vida lítico y lisogénico de los bacteriófagos (García *et al.*, 2010b).

II.3.4.2 Aplicaciones basadas en bacteriófagos en alimentos

Los bacteriófagos son aptos i) para prevenir o reducir la colonización y enfermedades en el ganado (terapia con fagos), ii) para descontaminar carcasas y otros productos crudos, tales como las frutas y vegetales frescos, y para desinfectar equipos y superficies de contacto (biosanitización con fagos), y iii) para extender la vida de anaquel de alimentos perecederos como conservadores naturales (biocontrol con fagos).

La evidencia experimental de la actividad antimicrobiana de los fagos durante el procesamiento de los alimentos y su almacenamiento aún causa temor pero los resultados son prometedores. La especificidad de huésped de los fagos, en ocasiones restringido a algunas cepas, plantea una carga para su amplia aplicación como bioconservadores de alimentos. Sin embargo, es precisamente esta característica lo que los hace candidatos muy atractivos como bioconservadores en

productos fermentados al evitar interferencias con la actividad del cultivo iniciador o el desarrollo de la microbiota secundaria (García *et al.*, 2010b).

La incorporación de fagos en leche contaminada con *Salmonella* en la producción de queso Cheddar redujo las células viables después del almacenamiento (Modi *et al.*, 2001). De manera similar, el crecimiento de *S. aureus* en leche y durante la elaboración de requesón fue inhibido por fagos y la inhibición evolucionó durante la maduración, y almacenamiento de quesos de coagulación ácida y semiduros (García *et al.*, 2007; García *et al.*, 2009). La erradicación completa de *L. monocytogenes*, dependiendo de la dosis y el tratamiento, fue obtenida en la superficie de queso madurado mediante la aplicación del fago virulento P100 en su superficie (Carlton *et al.*, 2005). Recientemente, dos cocteles de fagos contra *L. monocytogenes*, Listex (EBI Food Safety, www.ebifoodsafety.com) y ListShield (Intralytics, www.intralytics.com) fueron aprobados por la Food and Drug Administration (FDA) en carne lista para su consumo (García *et al.*, 2010b).

II.3.5 Endolisinas

Los bacteriófagos han desarrollado dos mecanismos básicos para liberar los nuevos virus de la célula bacteriana infectada. En los bacteriófagos filamentosos la progeñe es extrudida de la célula bacteriana sin matarla, mientras que los bacteriófagos no filamentosos destruyen la pared celular del huésped bacteriano mediante enzimas líticas codificadas por el fago. Los fagos de RNA y DNA pequeño codifican proteínas específicas que interfieren con las enzimas del huésped responsables de la biosíntesis de peptidoglicano. En fagos de DNA grande, las endolisinas (también referidas como lisinas) son producidas durante la fase tardía de la expresión génica en el ciclo lítico y son responsables de la escisión del peptidoglicano. Las endolisinas también son capaces de degradar el peptidoglicano de bacterias Gram positivas cuando son aplicadas de manera externa a la célula bacteriana, de este modo actúan como agentes antibacterianos (García *et al.*, 2010b).

II.3.5.1 Modo de acción de las endolisinas

Las endolisinas Gram positivas muestran una estructura modular compuesta por al menos dos dominios funcionales distintos. El dominio N-terminal contiene la actividad catalítica, generalmente con una actividad muralítica (hidroliza la mayor parte de las uniones conservadas en el peptidoglicano) (Figura 3).

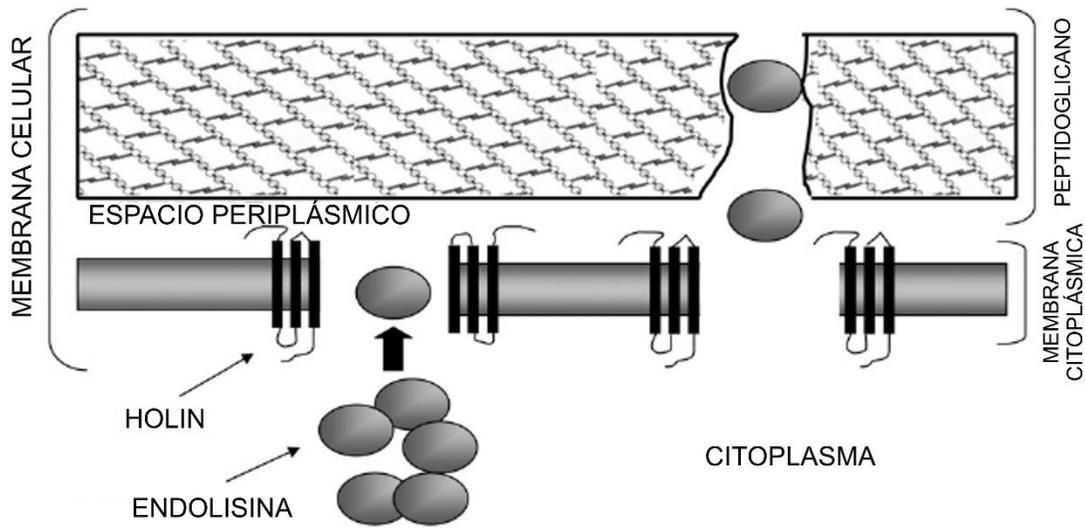


Figura 3. Modo de acción de las endolisinas codificadas por fagos (García *et al.*, 2010b).

En el C-terminal, un dominio de unión a la pared celular (DUP) confiere algunos grados de especificidad a la enzima. Además, los DUPs mantienen a la endolisina unida a su substrato una vez que el huésped es lisado. De esta manera, las endolisinas no son liberadas al ambiente evitando la lisis de nuevas células huésped putativas del fago. Los DUPs a menudo no se encuentran entre endolisinas de fagos Gram negativos. La mayoría de las endolisinas carecen de señales de secreción y su acceso al peptidoglicano desde el interior de la célula es dependiente de pequeñas proteínas hidrofóbicas, denominadas holin, las cuales también son codificadas por el fago, y permiten a las endolisinas atravesar la membrana citoplasmática y tener acceso al peptidoglicano (Wang *et al.*, 2000). La mayoría de las endolisinas muestran un espectro de actividad lítica reducido, a menudo

restringido a las especies del huésped bacteriano del fago del cual se deriva, aunque algunas son específicas para un género (García *et al.*, 2010b).

II.3.5.2 Aplicaciones de las endolisinas en alimentos

A la fecha, muy pocos reportes se han dirigido al potencial antimicrobiano de las endolisinas a lo largo de la cadena de producción alimentaria. En una etapa de producción primaria, la protección contra el fitopatógeno *Erwinia amylovora* fue demostrada en patatas transgénicas que sintetizan la lisozima T4 (Düring *et al.*, 1993) o por la aplicación de la endolisina recombinante phiEa1h en la superficie de peras (Kim *et al.*, 2004). Como medida profiláctica, la endolisina PlyC en forma de aerosol contribuye a erradicar o reducir la carga de *Streptococcus equi* en una variedad de materiales incluso en presencia de detergentes no iónicos, agua dura, y materia orgánica (Hoopes *et al.*, 2009). De manera similar, una endolisina de estafilococo ha mostrado remover biopelículas de *S. aureus* (Sass y Bierbaum, 2007).

En el procesamiento de alimentos, el biocontrol de patógenos mediante endolisinas ha sido dirigido básicamente a la industria láctea. Bacterias ácido lácticas recombinantes fueron capaces de secretar endolisinas activas de *Listeria*, pero su actividad antagonista en leche o en matrices alternativas de alimentos no ha sido probada (Turner *et al.*, 2007). Obeso *et al* (2008) demostraron que la endolisina LysH5 purificada puede eliminar *Staphylococcus aureus* creciendo en leche pasteurizada y el patógeno no fue detectado después de 4 h de incubación a 37°C. García *et al* (2010a) reportaron el sinergismo entre la endolisina LysH5 y la nisina para eliminar *S. aureus* en leche pasteurizada. Zhang *et al* (2012) observaron que la endolisina LysZ5 fue capaz de reducir *L. monocytogenes* a niveles no detectables en leche de soya a temperaturas de refrigeración (4°C).

El uso de organismos genéticamente modificados (OGM) como productores de endolisinas puede acrecentar la preocupación pública, y en el caso de su aplicación a productos de consumo esta preocupación es concebida. En el caso de

la aplicación de productos finales de la traducción de OGM, las endolisinas pueden ser consideradas como auxiliares en el procesamiento o como aditivos alimenticios, en cuyo caso aún se requieren rigurosas evaluaciones para demostrar la ausencia de toxinas, alérgenos, u otros compuestos peligrosos que determinarán su seguridad y regulación (Law, 2002). Varios tratamientos preclínicos exitosos con endolisinas han sido evaluados en modelos animales y no fue observada toxicidad potencial (Oliveira *et al.*, 2012).

III. JUSTIFICACIÓN

El queso, desde un punto de vista nutricional, es considerado como un alimento altamente nutritivo, debido a su variado contenido de proteínas, materias grasas, calcio, fósforo y vitaminas. El consumo del queso continúa en incremento debido a su versatilidad y adaptabilidad en los alimentos, más variedades disponibles y a que la familia tradicional ha ido cambiando induciendo cambios en los hábitos del consumidor de preparar los alimentos en casa, prefiriendo comprar alimentos parcial o totalmente listos para su consumo; este cambio, ha beneficiado la venta de los quesos.

Sin embargo, los alimentos con un alto riesgo de contaminación por *Listeria monocytogenes* son los alimentos refrigerados listos para su consumo, como son los quesos. Las condiciones favorables de crecimiento en los quesos frescos, incluyendo la alta humedad, bajo contenido de sal, y pH cercano a la neutralidad, aunado a la habilidad de *Listeria monocytogenes* para desarrollarse a temperaturas de refrigeración, son factores primarios que contribuyen al incremento del riesgo de infección por *L. monocytogenes* en este tipo de alimentos.

El uso de antimicrobianos naturales, así como de endolisinas, como conservadores son estrategias con potencial de exploración para el control de *L. monocytogenes* en un alimento de alto riesgo, como son los quesos frescos.

Actualmente son pocos los trabajos que estudian el potencial antimicrobiano de las endolisinas codificadas por fagos para su aplicación como conservadores naturales en los alimentos. El uso de endolisinas como bioconservadores es una estrategia prometedora ya que se ha visto que pueden inhibir una gran variedad de microorganismos patógenos, pero aún no ha sido evaluada su actividad antimicrobiana en quesos, por lo que tienen potencial como medida para el control de *L. monocytogenes*, dando como resultado un producto alimenticio más seguro.

IV. HIPÓTESIS

La incorporación de la endolisinas LysZ5 y PlyP100, así como de antimicrobianos naturales como son fermentos, ácido ferúlico, ácido protocateuico y nisina, en la elaboración de queso fresco tipo Panela reducirá las poblaciones de *Listeria monocytogenes*, resultando así en un producto alimenticio más seguro.

V. OBJETIVOS

V.1 Objetivo general

Clonar y sobreexpresar las endolisinas LysZ5 y PlyP100 en *Escherichia coli*, y evaluar el efecto antimicrobiano de dichas endolisinas y algunos antimicrobianos naturales como fermentos, ácido ferúlico, ácido protocatecuico y nisina contra *Listeria monocytogenes* al ser incorporados en la fabricación de queso fresco tipo Panela

V.2 Objetivos específicos

1. Clonar y sobreexpresar los genes *lysZ5* y *plyP100* en *Escherichia coli*.
2. Evaluar la actividad lítica y antimicrobiana de las endolisina recombinantes LysZ5 y PlyP100.
3. Evaluar la actividad antimicrobiana de los fermentos, ácido ferúlico, ácido protocatecuico y nisina, solos y en combinación.
4. Determinar la actividad antilisteria de los fermentos, ácidos fenólicos, nisina y endolisinas sobre la sobrevivencia de *Listeria monocytogenes* en queso fresco tipo Panela durante un periodo de almacenamiento de 21 días a 4°C.
5. Evaluar el efecto de los antimicrobianos con el mejor efecto antilisteria, sobre las características de textura y la aceptabilidad sensorial del queso fresco tipo Panela.

VI. METODOLOGIA

VI.1 Materiales

VI.1.1 Materiales biológicos

Las cepas bacterianas para el desarrollo del estudio se muestran en el Cuadro 1. *Escherichia coli* BL21 (DE3) fue usada para la expresión de los genes de las endolisinas.

Cuadro 1. Cepas bacterianas.

Cepa
<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19112
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644
<i>Listeria monocytogenes</i> 10403S
<i>Listeria monocytogenes</i> SLCC - 5764
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 13932

VI.1.2 Reactivos

Agarosa grado electroforético, isopropil-b-D-tiogalactósido (IPTG) de Invitrogen.

Bromuro de etidio 10 mg/mL de Bio-rad.

Tris (hidroximetil)-aminometano 99.9%; HCl 37.3%, grado reactivo; glicerol; NaOH en perlas, NaCl cristal, CaCl₂ cristal, fosfato de potasio monobásico cristal 99.7% de Baker.

Fosfato de potasio dibásico trihidratado, 99%; sulfato de amonio granular, 99%; cloruro de potasio 100%; ampicilina trihidratada de Sigma.

Los marcadores de peso molecular de 1 kb para ADN de Promega.

Los medios de cultivo serán Infusión Cerebro Corazón (BHI), agar bacteriológico y agar PALCAM de WVR International.

VI.2 Métodos

VI.2.1 Manipulaciones de ADN

VI.2.1.1 Diseño de ADN plasmídicos

Los genes que codifican para las endolisinas LysZ5 y PlyP100 fueron sintetizados químicamente y subclonados por la compañía Life Technologies™ (NY, USA) utilizando las secuencias reportadas en la base de datos del NCBI (*lysZ5* GenBank: HQ437691.1; *plyP100* GenBank: DQ004855.1). Mediante el configurador de proyectos (GeneArt® Project Configurator), ambas secuencias se modificaron adicionando los nucleótidos de reconocimiento para las enzimas de restricción *Bgl*II y *Eco*RI (Cuadro 2), los genes modificados fueron subclonados en un vector de expresión pRSET B.

Cuadro 2. Nucleótidos de reconocimiento para las enzimas de restricción.

Extremo	Secuencia	Enzima
5'	AGATCT	<i>Bgl</i> II
3'	GAATTC	<i>Eco</i> RI

Los ADN plasmídicos que se proporcionaron se denominaron pRSETB-lysZ5 y pRSETB-pyP100 (Life Technologies™, NY, USA)

VI.2.2 Transformación y sobreexpresión de los genes *lysZ5* y *plyP100* en *Escherichia coli*.

VI.2.2.1 Preparación de células competentes

Para la preparación de células de *Escherichia coli* BL21 (DE3) se inocularon 5 mL de medio LB con una colonia aislada de células de *E. coli* BL21 (DE3) y se

incubó por 12 horas a 37 °C y 200 rpm. Se inoculó 1 mL en un matraz conteniendo 100 mL de medio LB en un matraz de 250 mL. Se creció a 37 °C con agitación hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 0.5. Se tomaron 50 mL del cultivo en 2 tubos de polipropileno estériles de 50 mL y se centrifugaron por 10 min a 3000 rpm a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y cuidadosamente la pastilla se resuspendió en 5 mL de la solución de CaCl₂ 0.1 M fría. Se incubó en hielo durante 30 min. Se repitió la etapa de centrifugación e incubación en hielo seis veces. Se centrifugaron las células por 10 min a 3000 rpm a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 2.5 mL de la solución de CaCl₂ + glicerol fría (0.1 M CaCl₂, 15% glicerol). Se tomaron alícuotas de 50 µL en tubos de 1.5 mL estériles y se almacenaron inmediatamente a -70 °C (Ausubel *et al.*, 1992).

VI.2.2.2 Transformación de células competentes

Para transformar células competentes de *E. coli* BL21 (DE3) se siguió el protocolo de transformación utilizando cloruro de calcio (Seidman *et al.*, 1997). Se descongeló en hielo una alícuota de células competentes almacenada a -70 °C y se le agregó 2 µL del ADN plasmídico (aproximadamente 5 ng) y se incubó en hielo durante 30 min. A la par se realizó un control negativo en el cual se agregó 2 µL de agua desionizada estéril. Se dió un choque térmico en un baño de agua a 42°C por 30 s e inmediatamente se colocaron en hielo durante 2 minutos. Se les agregó 950 µL de medio LB y se incubaron 1 h a 37°C a 200 rpm en agitador orbital. Se inocularon 50 y 100 µL de cultivo por extensión en superficie en placas de agar de LB con 50 µg/mL de ampicilina y se incubaron a 37°C durante toda la noche.

VI.2.2.3 Electroforesis en geles de agarosa

Para verificar la presencia del inserto, se realizó una electroforesis de la doble digestión del ADN plasmídico con las enzimas *EcoRI* y *HindIII*.

Se seleccionó una colonia aislada transformada con pRSETB-lysZ5 y pRSETB-plyp100 de las placas de agar LB con ampicilina (50 µg/mL), se inocularon

en 3 ml de caldo LB con ampicilina y se incubaron no más de 16 h a 37°C y agitación 200 rpm. Las células se centrifugaron a 8000 rpm por 3 min, se descartó el sobrenadante y las pastillas obtenidas se les extrajo el ADN plasmídico mediante el QIAprep® Spin Miniprep Kit (QIAGEN). El ADN plasmídico de las colonias transformadas y los plásmidos pRSETB-lysZ5 y pRSETB-plyP100 se sometieron a una doble digestión enzimática. La reacción de digestión se realizó con los componentes del Cuadro 3. La mezcla de reacción se incubó a 37°C por 4 horas.

El gel de agarosa se preparó al 1% en solución amortiguadora TAE, disuelta en microondas, cuando la suspensión alcanzó aproximadamente 50°C se adicionó 15 µL de bromuro de etidio (10 mg/ml) por 120 mL de suspensión de agarosa, se mezcló evitando formar burbujas y se vertió en el soporte de la cámara de electroforesis, se dejó enfriar. Se añadió solución amortiguadora TAE cubriendo el gel de agarosa. Se cargaron los pozos del gel con 5 µL del ADN digerido mezclado con 1 µL de solución amortiguadora de carga. Se corrió la electroforesis a 75 voltios durante 80 minutos. Se visualizaron los fragmentos de ADN mediante luz UV y se realizó una fotografía de la imagen.

Cuadro 3. Mezcla de reacción de doble digestión enzimática.

Componente	Cantidad (µL)
H ₂ O	4
Amortiguador de <i>EcoRI</i>	2
ADN (1 µg)	10
<i>EcoRI</i>	2
<i>BglII</i>	2
Total	20

VI.2.2.4 Inducción de *lysZ5* y *plyP100* en *E. coli*

A partir de las conservas de la cepas BL21 (DE3) transformadas con las construcciones pRSETB-lysZ5 y pRSET-plyP100, con cada una se inocularon 6.5 mL de medio LB/ampicilina y se crecieron por 16 h a 37 °C. Estos cultivos se

utilizaron para inocular tubos con 3 mL de medio LB con ampicilina 50 µg/mL y se incubaron a 37 °C y 250 rpm. Una vez alcanzada una densidad óptica a 600 nm de 0.6, se realizó la inducción de la expresión de la proteína agregando IPTG en dos concentraciones diferentes (0.1 y 1 mM) (Cuadro 4). Se tomaron tres tubos de 3 mL de la incubadora antes de inducir (control de inducción). Una vez adicionado el IPTG, los tubos se dividieron en dos lotes para su incubación a dos temperaturas diferentes (25 y 37°C), y se continuó el crecimiento por 20 h a 25°C y 300 rpm, retirando tres tubos de 3 mL a las 12 y 20 h para cada cepa transformada con las diferentes concentraciones de IPTG. A la par, se continuó el crecimiento por 8 h a 37°C y 300 rpm, retirando tres tubos de 3 mL a las 4 y 8 h para cada cepa transformada con las diferentes concentraciones de IPTG. Durante cada muestreo, se centrifugaron los 3 mL a 13000 rpm por 2 min, se descartó el sobrenadante y la pastilla celular se almacenó a -20°C.

Las pastillas celulares se descongelaron en hielo, se resuspendieron en 1 mL de PBS (amortiguador salino fosfato) y se realizó la ruptura celular por sonicación, 15 s de pulso y 15 s de descanso en hielo, se repitió cinco veces. El lisado celular crudo se mantuvo en hielo.

Cuadro 4. Condiciones de cultivo para la inducción de *lysZ5* y *plyP100*.

Factor	Niveles	
	-1	+1
IPTG (mM)	0.1	1
Temperatura (°C)	25	37
Tiempo de incubación (h)	4/12	8/20

La expresión de las endolisinas se verificó mediante un ensayo de reducción óptica (ver VI.2.4.1) en células muertas (en autoclave) de *Listeria innocua*, monitoreando la reducción de la densidad óptica a 600 nm cada 30 min durante 12 horas a 25°C. Se utilizó el lisado celular crudo como fuente de las endolisinas *LysZ5* y *PlyP100*.

VI.2.2.5 Expresión de *lysZ5* y *plyP100*

Una vez que se verificó la expresión de las endolisinas, se realizaron ensayos en matraces con 250 mL de medio LB/ampicilina. El cultivo se creció a 37 °C y 250 rpm hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 0.6 y se realizó la inducción de la expresión de la proteína agregando IPTG a 1 mM.

Se continuó el crecimiento por 20 h a 25°C y 300 rpm para *E. coli* BL21 pRSETB-*plyP100*, y por 8 h a 37°C y 300 rpm para *E. coli* BL21 pRSETB-*lysZ5*. Transcurrido el tiempo, las células se cosecharon mediante centrifugación a 4000 rpm durante 30 min a 4°C. Las pastillas celulares se lavaron una vez con PBS estéril y se congelaron a -20°C toda la noche.

VI.2.2.6 Purificación de *LysZ5* y *PlyP100*

Las pastillas celulares se descongelaron en hielo y las endolisinas recombinantes se purificaron mediante Ni-NTA Fast Start Kit de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Ni-NTA Fast Start Kit, QIAGEN, USA). Las endolisinas purificadas *LysZ5* y *PlyP100* fueron diluidas en glicerol estéril (concentración final 50%), y almacenadas a -20°C.

La proteína total fue cuantificada mediante Quick Start Bradford Protein Assay (Bio-Rad).

VI.2.3 Caracterización de *Listeria innocua* y *Listeria monocytogenes*

VI.2.3.1 Activación de la cepa

Para su activación, se tomó una conserva de *Listeria innocua* o *Listeria monocytogenes* y se colocó en 10 mL de caldo BHI y se incubó toda la noche a 37°C en agitación a 200 rpm.

VI.2.3.2 Conteo de *L. innocua* y *L. monocytogenes*

Como técnica para contar las unidades formadoras de colonia (UFC) de *L. innocua* y *L. monocytogenes* se utilizó el método de siembra en extensión por superficie. Se colocaron con una micropipeta 100 μ L de medio con las células a contar sobre una caja petri con agar PALCAM adicionado de ceftazidima (20 mg/L), el líquido de las células se extendió sobre el agar hasta sequedad utilizando una varilla en forma de “L”. El agar se preparó de acuerdo a lo especificado por el proveedor. Las cajas se incubaron a 37°C durante 48 h. Las diluciones se realizaron en PBS.

VI.2.4 Evaluación de la actividad antimicrobiana de LysZ5 y PlyP100 en *L. monocytogenes*

VI.2.4.1 Identificación de la actividad lítica y el espectro lítico

Se creció la cepa *Listeria innocua* previamente activada hasta una densidad óptica a 600 nm de 1, se centrifugó a 6000 rpm durante 10 min, y se resuspendió en solución amortiguadora de fosfatos 50 mM (pH 7.0), a una densidad óptica a 600 nm de 1.

A las suspensiones bacterianas (0.1 mL) se les adicionaron diluciones 1/20 o 1/160 de LysZ5 y PlyP100 purificadas (0.1 mL) en una placa de poliestireno de 96 pozos estéril, y se monitoreó la reducción de la densidad óptica a 600 nm cada 30 s durante 30 min, a 25°C, en un espectrofotómetro.

La actividad de las endolisinas fue calculada utilizando la pendiente más pronunciada de la curva obtenida, y 1 U fue definida como la cantidad de enzima que disminuye la DO_{600} de células de *Listeria* en suspensión en 0.01/min (Schmelcher *et al.*, 2012). La actividad específica fue calculada como el cambio en la DO_{600} por mg de proteína por minuto (Obeso *et al.*, 2012).

El espectro lítico de las endolisinas fue determinado de manera similar en células de *Listeria monocytogenes* usando 1.5 μ g de endolisina.

VI.2.4.2 Influencia de los cationes Ca²⁺ y Na⁺ en la actividad lítica

El efecto de la concentración de los cationes en la actividad lítica fue realizada mediante un diseño factorial completo de dos factores con tres niveles cada uno (Ca²⁺: 0, 30 y 165 mM; Na⁺: 0, 170 y 514 mM). Este ensayo se realizó en solución amortiguadora Tris-HCl 50 mM (pH 7.2), se emplearon CaCl₂ y NaCl como fuente de los cationes, siguiendo el procedimiento descrito para la determinación de la actividad lítica (ver VI.2.4.1). Dicho ensayo de reducción óptica se llevó a cabo en células muertas (en autoclave) de *Listeria innocua*, monitoreando la reducción de la densidad óptica a 600 nm cada 30 s durante 30 min a 25°C, usando 1.5 µg de endolisina y la actividad específica fue calculada.

VI.2.5 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los fermentos, ácido protocatecuico, ácido ferúlico y nisina en *L. innocua*

VI.2.5.1 Determinación de la concentración mínima inhibitoria

Se determinó la concentración mínima inhibitoria de los antimicrobianos naturales usando como cepa blanco *L. innocua*, mediante el método de microdilución en caldo en placas de 96 pozos (Brandt *et al.*, 2010; Magalhães & Nitschke, 2013). Se colocaron 100 µL de agua desionizada estéril en todos los pozos, se adicionaron 100 µL de la solución antimicrobiana (Cuadro 5) en el pozo de la primera columna y se realizaron diluciones seriales. El inóculo de *L. innocua* se preparó en caldo BHI y se incubó toda la noche a 37°C. Después de la incubación, las células se diluyeron en caldo BHI 2x ajustadas a aproximadamente 10⁵ CFU/mL. Todos los pozos, excepto la columna del control negativo, se inocularon con 100 µL de *L. innocua*. Se midió la densidad óptica (DO) inicial a 600 nm. Las microplacas se incubaron por 24 h a 37°C. Después de la incubación, se midió nuevamente la DO₆₀₀.

La concentración mínima inhibitoria (CMI) fue determinada como la concentración mínima que produjo un cambio DO₆₀₀<0.05.

Cuadro 5. Antimicrobianos naturales con potencial antilisteria

Clasificación	Compuesto
Fermentos	Verdad® F80
	Verdad® F95
	PuraQ® Arome NA4
Ácidos fenólicos	Ácido protocatecuico
	Ácido ferúlico
Bacteriocina	Nisaplin® (nisina)

VI.2.5.2 Determinación de los efectos combinados de los compuestos antilisteria

La concentración fraccional inhibitoria (CFI) de Nisaplin® y sus combinaciones con los fermentos y ácidos fenólicos contra *L. innocua* fue determinada usando la prueba de tablero (Brandt *et al.*, 2010; Magalhães y Nitschke, 2013). El índice CFI fue calculado empleando las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de los compuestos antimicrobianos solos y el respectivo CMI cuando los compuestos fueron combinados. La clasificación de las interacciones antimicrobianas fue de acuerdo a los siguientes parámetros: cuando el índice CFI es ≤ 0.5 la interacción es sinergista, cuando el índice CFI es > 0.5 y ≤ 4 la interacción es indiferente y si el índice CFI > 4 define una interacción antagonista.

La prueba de tablero fue elaborada usando una microplaca de 96 pozos con diluciones seriales de Nisaplin® y los fermentos/ácidos fenólicos. Las diluciones de Nisaplin® fueron preparadas en las filas horizontales y los fermentos/ácidos fenólicos en las columnas verticales. Las concentraciones de los antimicrobianos abarcaron desde el valor CMI hasta cinco diluciones seriales dobles. La técnica de micro dilución en caldo fue realizada como se describe anteriormente

(determinación de MIC). El índice CFI fue determinado usando la siguiente ecuación:

$$CFI = CFI_A + CFI_B$$

$$CFI = \frac{(\text{CMI de A en combinación})}{(\text{CMI de A})} + \frac{(\text{CMI de B en combinación})}{(\text{CMI de B})}$$

VI.2.6 Determinación de la actividad antilisteria de LysZ5 y PlyP100 en queso fresco tipo Panela.

Leche comercial entera pasteurizada se calentó a 35°C. Se adicionó cloruro de calcio (20g/100 L de leche) y cuajo (15 mL/100 L de leche), y la leche se dividió en porciones de 2 mL en tubos de microcentrífuga. Los tubos se incubaron a 35°C por 45 min en baño maría. Una vez formada la cuajada, se cortaron con un asa estéril. Las cuajadas se cocinaron a 40°C por 30 min (incrementando 1°C cada 6 min). Los tubos se centrifugaron a 8000 rpm por 15 s, se retiraron 400 µL de suero y a cada tubo se le adicionaron 100 µL de NaCl (0.16 g/mL), las cuajadas fueron agitadas suavemente con una punta de micropipeta. Los tubos se colocaron en baño maría a 40°C por 20 min. Se retiraron los tubos del baño maría y se inocularon con un coctel de *L. monocytogenes* de aproximadamente 10⁵ CFU/mL. 15 min después de la inoculación, los tubos se centrifugaron a 8000 rpm por 5 min, y el suero fue descartado. Se prepararon muestras adicionando directamente a la cuajada de los tubos las endolisinas LysZ5 (19 U/mL) y PlyP100 (12 U/mL), se incluyeron muestras sin adición de endolisinas, y se centrifugaron a 8000 rpm por 7 min, el suero residual fue removido. Las muestras de queso se almacenaron a 4°C y la viabilidad de *L. monocytogenes* se determinó por recuento en placa en los días 0, 1, 3, 7, 14 y 21 de almacenamiento.

VI.2.7 Determinación de la actividad antilisteria del ácido ferúlico en queso fresco tipo Panela.

Las muestras de queso fresco tipo Panela se elaboraron de acuerdo al procedimiento descrito anteriormente (Ver VI.2.6). Los tubos con la cuajada cocinada se inocularon con un coctel de *L. monocytogenes* de aproximadamente 10^3 CFU/mL. 15 min después de la inoculación, los tubos se centrifugaron a 8000 rpm por 5 min, y el suero fue descartado. Se prepararon muestras adicionando directamente a la cuajada de los tubos el ácido ferúlico (4.0 mg/g), se incluyeron muestras sin adición de antimicrobiano, y se centrifugaron a 8000 rpm por 7 min, el suero residual fue removido. Las muestras de queso se almacenaron a 4°C y la viabilidad de *L. monocytogenes* se determinó por recuento en placa en los días 0, 1, 3, 7, 14 y 21 de almacenamiento.

VI.2.8 Elaboración de queso fresco tipo Panela adicionado de ácido ferúlico, LysZ5 y PlyP100.

Se elaboró el queso fresco tipo Panela a partir de leche cruda de bovino que se filtró sobre una manta de cielo y se depositó en una tina de acero inoxidable con chaqueta alimentada con vapor. La leche se pasteurizó a 65°C por 30 minutos con agitación constante. Transcurrido ese tiempo, la leche se dejó enfriar a 35°C, una vez a dicha temperatura la leche, se le agregó cloruro de calcio al 50% (40 ml para 100 litros de leche), el cual fue diluido en 10 veces su volumen con agua destilada estéril, se mezcló cuidando que la temperatura se mantuviera a 35°C.

A continuación se agregaron 25 ml de cuajo por cada 100 L de leche, el cuajo fue disuelto en 10 veces su volumen en agua destilada estéril previo a su incorporación a la leche. Se mezcló perfectamente y se dejó reposar 45 min. Se cortó la cuajada con liras horizontales y verticales, con el fin de obtener cubos de 1 cm³ para acelerar el desuerado del grano. Posteriormente se procedió a cocinar la cuajada a 40°C por 30 min. Se hizo un desuerado parcial (aproximadamente 2/3

partes del suero) y se agregó 0.85% de sal en relación a la cantidad de leche empleada y se agitó por 10 min.

A la cuajada cocinada y salada se le retiró el suero restante, se pesaron porciones de 100 g de la cuajada, y se le adicionaron de ácido ferúlico (4.0 mg/g), LysZ5 (19 U/g), PlyP100 (12 U/g), además de un tratamiento sin antimicrobiano. La cuajada y los antimicrobianos se homogenizaron perfectamente con ayuda de cucharas de aluminio estériles. Se realizaron muestras de queso fresco tipo Panela adicionadas de antimicrobianos por triplicado: ácido ferúlico, LysZ5, PlyP100 y sin antimicrobiano.

La pasta con los antimicrobianos se moldeó en canastos limpios y hervidos con capacidad aproximada de 250 g, se dejaron desuerar los quesos apilando un canasto encima de otro durante 20 minutos, luego se voltearon los quesos en el mismo canasto y se dejaron desuerar 15 minutos más. Por último se empacaron los quesos en bolsas de polietileno con cierre tipo zip-lock y fueron refrigerados a 4 °C.

VI.2.9 Propiedades de textura del queso tipo Panela adicionado de antimicrobianos

El análisis del perfil de textura (TPA) se realizó en los siguientes tratamientos: queso tipo Panela adicionado con LysZ5, queso tipo Panela adicionado con PlyP100, queso tipo Panela adicionado con ácido ferúlico y queso Panela sin antimicrobiano. Dos cilindros de 20 mm de diámetro y 20 mm de altura fueron cortados de cada muestra de queso. Se realizó una doble compresión utilizando un texturómetro modelo TA-plus (Lloyd Instruments, Hants, UK), con una sonda cilíndrica de 5 cm de diámetro. Se seleccionó una velocidad de cabezal de 1 mm/s, una compresión de deformación del 25% y la fuerza de contacto de 0.3 N. Las variables determinadas fueron: dureza (N), cohesividad (adimensional), elasticidad (mm), gomosidad (N) y masticabilidad (mJ).

VI.2.10 Evaluación sensorial

Se llevó a cabo una evaluación sensorial de los quesos después de 48 h posteriores a su manufactura a través de una prueba de preferencia utilizando un panel no entrenado de 60 personas. Se compararon cuatro tratamientos de queso tipo Panela: queso tipo Panela adicionado con LysZ5, queso tipo Panela adicionado con PlyP100, queso tipo Panela adicionado de ácido ferúlico y queso Panela sin antimicrobiano. Las muestras experimentales de queso se cortaron en cubos de 1.5 cm y se equilibraron a temperatura ambiente durante 30 min antes de la evaluación sensorial. Los cubos de queso se identificaron mediante códigos de tres dígitos generados aleatoriamente y se presentaron al azar a los panelistas no entrenados (Escobar *et al.*, 2011). A cada panelista se le pidió evaluar las cuatro muestras de queso en cuanto a su aceptabilidad de apariencia, color, aroma y textura mediante una escala hedónica de 9 puntos, donde 1 = Me disgusta extremadamente, 5 = No me gusta o disgusta, y 9 = Me gusta extremadamente (Soni *et al.*, 2010; Van Hekken *et al.*, 2013).

VI.2.11 Diseño y análisis estadístico de datos experimentales

Los tratamientos se aleatorizaron y fueron aplicados por triplicado para su análisis. Hubo seis etapas experimentales:

1. Evaluación de condiciones de cultivo para la inducción de *lysZ5* y *plyP100*. En este caso el diseño estadístico que se utilizó fue de tres factores de dos niveles cada uno, la concentración de IPTG (0.1 y 1 mM), la temperatura de incubación (25 y 37°C) y el tiempo de incubación (4/12 y 8/20 h). La actividad lítica de los lisados crudos fue la variable respuesta.
2. Determinación de la influencia de los cationes (Ca^{2+} y Na^+) en la actividad lítica de las endolisinas. Se utilizó un diseño estadístico de dos factores de tres niveles cada uno, la concentración de Ca^{2+} (0, 30 y 165 mM) y la concentración de Na^+ (0, 170 y 514 mM). La actividad específica de las endolisinas purificadas fue la variable respuesta.

3. Para la evaluación de la actividad antilisteria de las endolisinas en queso fresco tipo Panela durante el almacenamiento a 4°C, se empleó un diseño estadístico de un factor de tres niveles (19 U/mL LysZ5, 12 U/mL PlyP100, y sin antimicrobiano). La viabilidad de *L. monocytogenes* fue la variable respuesta.
4. Para la evaluación de la actividad antilisteria del ácido ferúlico en queso fresco tipo Panela durante el almacenamiento a 4°C, se empleó un diseño estadístico de un factor de dos niveles (4.0 mg/g ácido ferúlico y sin antimicrobiano). La viabilidad de *L. monocytogenes* fue la variable respuesta.
5. Evaluación de las propiedades de textura. El diseño estadístico fue de un factor de cuatro niveles (LysZ5, PlyP100, ácido ferúlico y sin antimicrobiano). Las variables respuesta a determinar fueron: dureza, cohesividad, elasticidad, gomosidad y masticabilidad.
6. Evaluación sensorial. Se empleó un diseño estadístico de un factor de cuatro niveles (punto 5). Como variable respuesta fue el número que se le otorgó a cada descriptor de acuerdo a la escala hedónica empleada

Los datos experimentales se analizaron mediante un análisis de varianza y se compararon las medias entre sí utilizando una prueba de Tukey. Los resultados se expresan como la media \pm el error estándar.

Todos los análisis se realizaron con el programa JMP versión 7.0.1.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VII.1 Manipulaciones de ADN

VII.1.1 Diseño de ADN plasmídicos

Los genes sintéticos *lysZ5* y *plyP100* fueron clonados en un vector de expresión pRSET B empleando los sitios de clonación de *Bgl*II y *Eco*RI. Los mapas de los ADN plasmídicos pRSETB-*lysZ5* y pRSETB-*pyP100* se muestran en las Figuras 4 y 5.

Como aspectos relevantes, los vectores pRSET B están diseñados para obtener altos niveles de expresión y purificación de proteína de genes clonados en *E. coli*. La presencia del promotor T7 hace posible los altos niveles de expresión de las secuencias de ADN clonadas. La secuencia incluye un codón de iniciación a la traducción (ATG) y una cola de polihistidinas que funciona como un dominio de afinidad metálica en la proteína traducida. (invitrogen™, NY, USA).

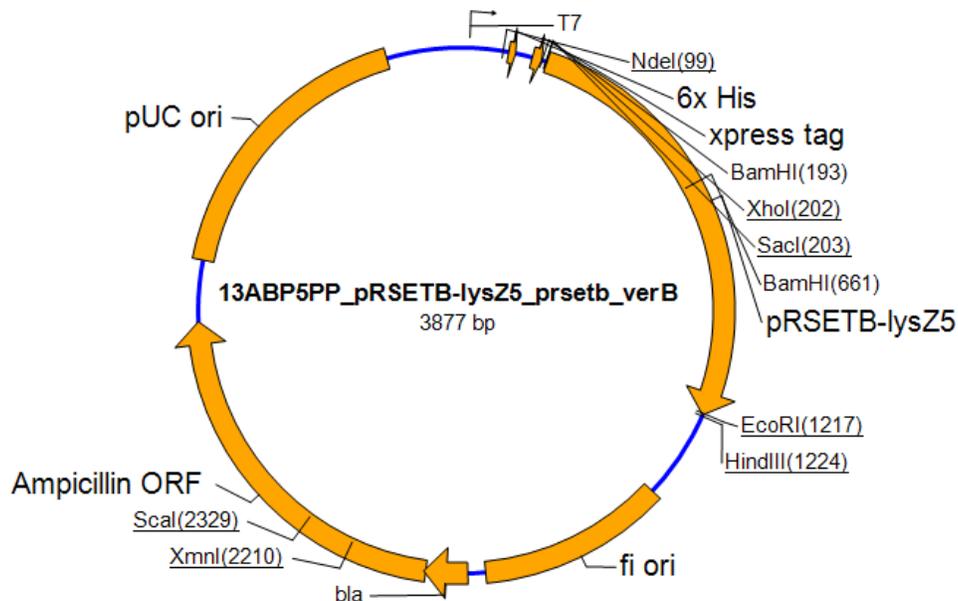


Figura 4. Mapa del plásmido pRSETB-*lysZ5* (Life Technologies™, NY, USA)

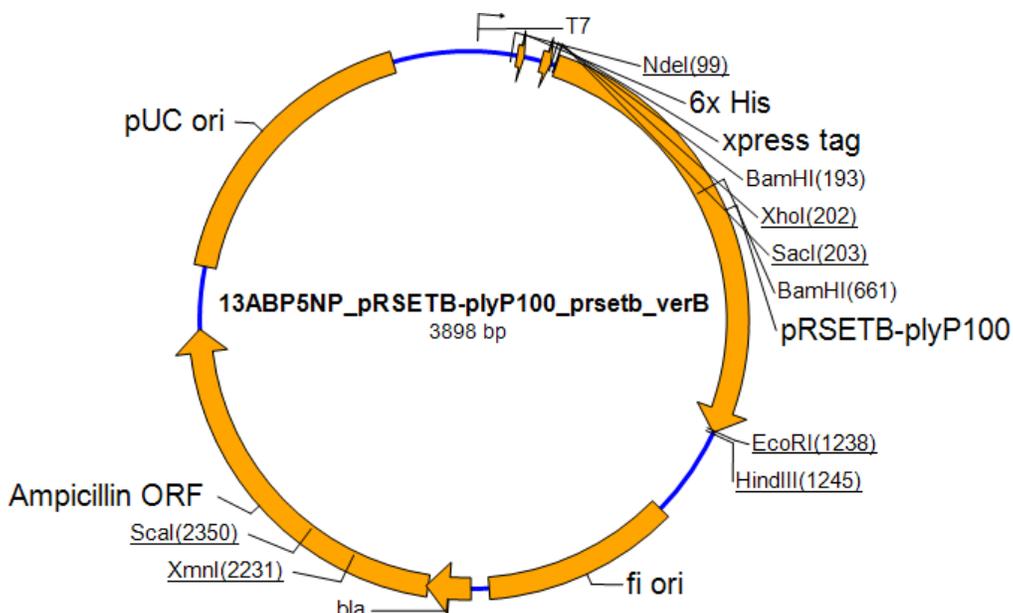


Figura 5. Mapa del plásmido pRSETB-plyP100 (Life Technologies™, NY, USA)

El sistema de la ARN polimerasa T7 es el sistema promotor comúnmente utilizado en *E. coli*, y su uso ha sido reportado en diversos trabajos para la expresión de genes que codifican endolisinas fágicas en *E. coli* (Obeso *et al.*, 2008; García *et al.*, 2010a; Zhang *et al.*, 2012). La ARN polimerasa T7 transcribe el ADN cinco veces más rápido que la ARN bacteriana, y una vez inducida la expresión, la mayoría de la maquinaria celular se dirige a la producción de la proteína recombinante, comprendiendo hasta el 50% del total de la proteína celular (Francis y Page, 2010), con lo cual es posible obtener altos niveles de expresión de la proteína recombinante.

VII.2 Transformación y sobreexpresión de los genes *lysZ5* y *plyP100* en *Escherichia coli*.

VII.2.1 Electroforesis en geles de agarosa

Con los plásmidos pRSETB-lysZ5 y pRSETB-plyP100 se transformaron células competes de *E. coli* BL21 (DE3). De las colonias transformadas, se confirmó la presencia del inserto mediante una electroforesis de la doble digestión del ADN plasmídico con las enzimas *EcoRI* y *BglII*.

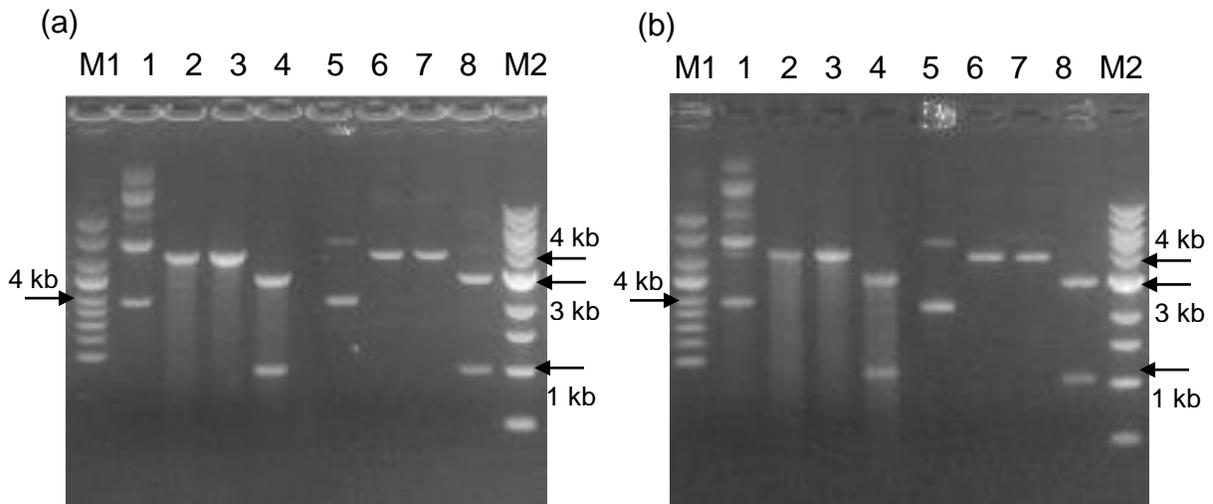


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa de las colonias de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas. (a) ADN plasmídico con el inserto *lysZ5*. (b) ADN plasmídico con el inserto *plyP100*. ADN plasmídico de *E. coli* BL21 (DE3) (carriles 1-4), ADN plasmídico pRSETB (carriles 5-8), ADN plasmídico sin digerir (carriles 1 y 5), digestión con *EcoRI* (carriles 2 y 6), digestión con *BglII* (carriles 3 y 7), digestión doble *EcoRI* + *BglII* (carriles 4 y 8). M: Marcador de peso molecular, Supercoiled DNA Ladder (1), 1 kb DNA Ladder (2).

En la Figura 6, se observa una banda en el carril 1 con un peso molecular cercano a los 4 kb, lo cual corresponde con los pesos moleculares de los plásmidos pRSETB-*lysZ5* y pRSETB-*plyP100* (Figuras 4 y 5). En los carriles 2 y 3 se observa una banda con un peso molecular cercano a los 4 kb, en este caso se trata de ADN lineal ya que tanto *EcoRI* como *BglII* cuentan con una sola secuencia de reconocimiento dentro de la secuencia completa del plásmido, por lo que en ambos casos debía observarse una banda. En el carril 4 hay dos bandas, una de aproximadamente 3 kb y la otra de 1 kb, lo cual corresponde al vector pRSET B libre del inserto (~3kb) y al gen sintetizado químicamente (~1kb). Las enzimas *EcoRI* y *BglII* fueron las empleadas para clonar los genes *lysZ5* y *plyP100* (ambos de ~1kb) en los vectores pRSET B, por lo que la digestión doble con estas enzimas da lugar a dos fragmentos de DNA. El patrón de bandas observado por la digestión del ADN plasmídico de las cepas transformadas de *E. coli* BL21 (DE3) con las enzimas *EcoRI* y *BglII*, coincide con el patrón de bandas observadas en las digestiones de los

plásmidos puros pRSETB-lysZ5 y pRSETB-plyP100 (carriles 5-8), con lo cual se confirmó que las colonias transformantes analizadas poseían el inserto de *lysZ5/plyP100*, por lo que se tomaron como candidatos para ser empleadas en los ensayos de inducción de dichos genes.

VII.2.2 Inducción de *lysZ5* y *plyP100* en *E. coli*

Para evaluar las mejores condiciones de inducción (temperatura, tiempo de incubación y concentración del inductor) para obtener niveles altos de expresión de las endolisinas recombinantes LysZ5 y PlyP100 en *E. coli* BL21 (DE3), se aprovechó la capacidad que tienen las endolisinas de degradar el peptidoglicano de la pared celular de las bacterianas, en este caso particular células de *Listeria*, por lo que el nivel de expresión de estas endolisinas puede ser relacionado directamente con la reducción de la densidad óptica a 600 nm de células de *Listeria*, lo cual fue utilizado como indicativo de la expresión de proteína soluble y activa.

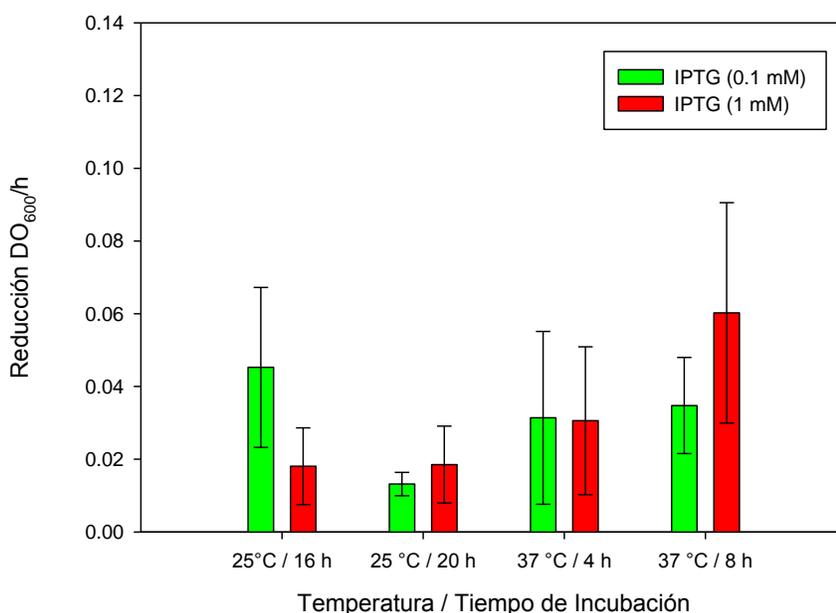


Figura 7. Evaluación de las condiciones de inducción del gen *lysZ5* en *E. coli*.

El efecto de los factores: temperatura, tiempo de incubación y concentración del inductor (IPTG), así como sus interacciones, no tuvieron efecto estadísticamente significativo ($P > 0.05$) sobre la sobreexpresión del gen *lysZ5* (Figura 7). Sin embargo, la reducción en la densidad óptica (DO_{600}) de las células de *Listeria innocua* por la fracción soluble de *E. coli* pRSETB-*lysZ5* bajo las diferentes condiciones de inducción evaluadas, fueron estadísticamente mayores ($P = 0.0002$) en comparación con la reducción en la DO_{600} de células de *L. innocua* debido a la solución amortiguadora de lisis (amortiguador de fosfatos) y las fracciones solubles de los lisados de *E. coli* BL21 (D3) (la cepa parental sin transformar con el plásmido pRSETB-*lysZ5*) y *E. coli* pRSETB-*lysZ5* sin inducir (Figura 9). Este resultado sugiere que la reducción en la DO_{600} de células de *L. innocua* es debido a la presencia de la endolisina LysZ5 producida de forma recombinante en la fracción soluble del lisado de *E. coli* pRSETB-*lysZ5* una vez inducida la sobreexpresión y que no hay otro compuesto presente en el lisado de la cepa de *E. coli* utilizada en este estudio que produzca dicho efecto.

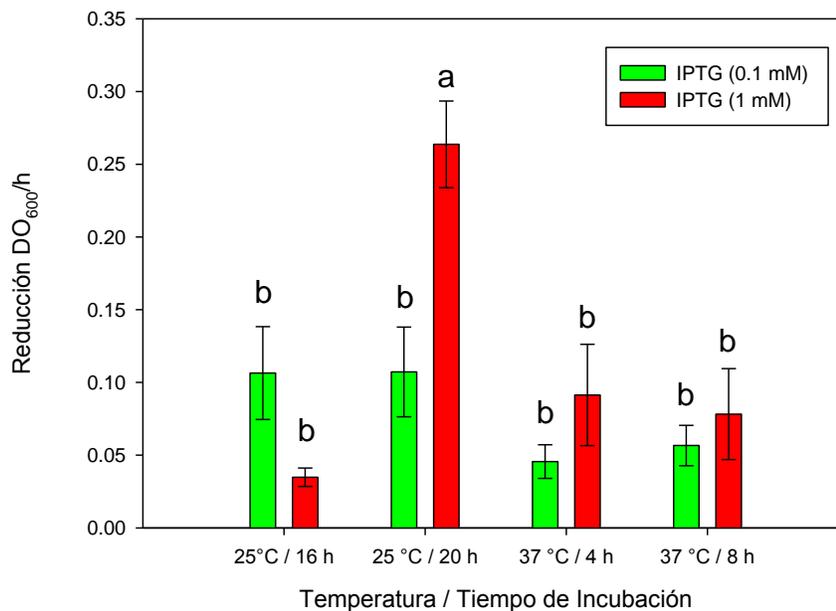


Figure 8. Evaluación de las condiciones de inducción del gen *plyP100* en *E. coli*.

Respecto al gen *plyP100*, la triple interacción de la temperatura, el tiempo de incubación y la concentración de IPTG fue estadísticamente significativa ($P = 0.0034$). Se observa la mayor reducción de la DO_{600}/h en el lisado proveniente *E. coli* pRSETB-*plyP100* cuando fue inducida con 1 mM de IPTG a 25°C durante 20 h, dicho tratamiento presenta diferencia estadísticamente significativa respecto a los siete tratamientos restantes(Figura 8).

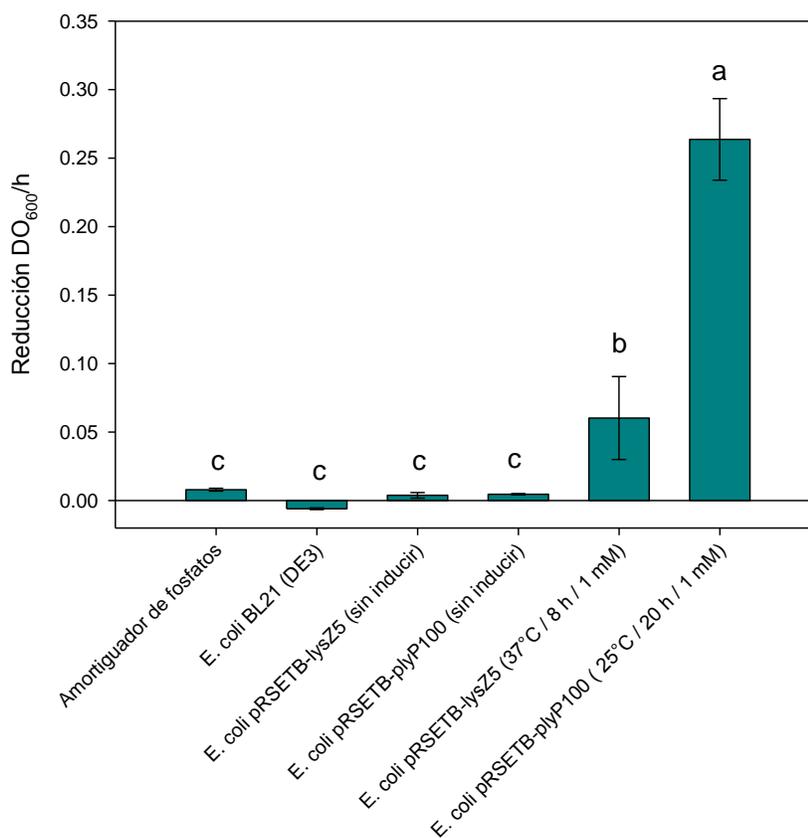


Figura 9. Efecto de las fracciones solubles de *E. coli* inducidas y sin inducir, conteniendo el plásmido que codifica para la endolisina LysZ5/PlyP100, sobre la reducción de la densidad óptica de células de *Listeria innocua*.

Las condiciones de inducción que mostraron mayores niveles de expresión de PlyP100 son similares a las empleadas por Obeso *et al.* (2008) (1 mM de IPTG a 28°C durante 18 h) y Zhang *et al.* (2012) (1 mM de IPTG a 19°C durante 18 h)

para la expresión de las endolisinas recombinantes LysH5 y LysZ5 respectivamente. Sin embargo, otras condiciones de inducción se han reportado para la expresión de endolisinas fágicas. García *et al.* (2010a) realizó la inducción de LysH5 con 1 mM de IPTG a 37°C durante 3 h, por su parte, Schmelcher *et al.* (2012) emplearon condiciones de 1 mM de IPTG a 35°C durante 4 h, para la expresión de HPL118, HPL500, HPL511 y HPLP35.

En *E. coli*, el uso de promotores de expresión fuertes y concentraciones altas del inductor puede resultar en concentraciones de proteína que son tan altos que las proteínas se agregan antes de su plegamiento. Por lo que, reducir la tasa de transcripción y/o traducción facilita el plegamiento al permitir que la proteína recién sintetizada se plegue antes de agregarse y formar cuerpos de inclusión. Disminuir la temperatura de expresión, en muchos casos aumenta la solubilidad de las proteínas expresadas de forma recombinante (Kataeva *et al.*, 2005; Volonte *et al.*, 2008; Piserchio *et al.*, 2009). A temperaturas bajas, los procesos celulares son más lentos, lo que permite reducir las tasas de transcripción, traducción, y división celular, a su vez reduce la agregación de proteínas. Debido a la reducida tasa de síntesis, tiempos de inducción más largos son necesarios para obtener rendimiento suficiente de la proteína (16-20 h a 18°C). Por el contrario, a temperaturas cercanas a la óptima de crecimiento (37°C) los tiempos de inducción son menores, en muchos casos 4 h (Francis y Page, 2010). Aunado a los cambios en la temperatura de crecimiento, una reducción en la tasa de transcripción puede lograrse al disminuir la concentración del agente inductor, adicionalmente, puede mejorar la producción de proteína soluble, aunque no en todos los casos. Turner *et al.* (2005) al inducir la ciclomaltodextrinasa recombinante utilizando 0.05 mM de IPTG, la proteína fue soluble y activa, sin embargo, cuando la concentración del inductor se empleó al doble (0.1 mM) la proteína expresada fue insoluble e inactiva. Es así, que las condiciones de expresión, como son temperatura, tiempo de incubación y concentración del inductor, son algunos de los parámetros a considerar cuando se diseña la estrategia de expresión de proteínas en *E. coli*.

Con estos resultados, las mejores condiciones para la sobreexpresión de los genes de las endolisinas fueron seleccionadas como 37°C por 8 h con 1 mM IPTG para *E. coli* pRSETB-lysZ5 y 25°C por 20 h con 1 mM IPTG para *E. coli* pRSETB-plyP100.

VII.3 Evaluación de la actividad antimicrobiana de LysZ5 y PlyP100 en *L. monocytogenes*

VII.3.1 Identificación de la actividad lítica y el espectro lítico

Las endolisinas LysZ5 y PlyP100 fueron expresadas como proteínas de fusión con una cola de polihistidinas en el extremo N-terminal, lo cual permitió la purificación mediante cromatografía de afinidad por metal inmovilizado (IMAC).

La actividad lítica de las endolisinas purificadas fue de 11.7 U/ml y 15.7 U/mg de proteína para LysZ5, 9.7 U/ml y 13.7 U/mg de proteína para PlyP100. La actividad lítica de diferentes endolisinas fágicas está reportada en un rango de 3.6 hasta alrededor de 200 mil U/ml (Obeso *et al.*, 2008; García *et al.*, 2010a; Schmelcher *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012). Sin embargo, los diferentes tipos de ensayos empleados y la definición arbitraria de unidad de actividad en dichos reportes hacen la comparación difícil o imposible.

El bajo rendimiento de purificación en este estudio puede estar relacionado a que las proteínas recombinantes producidas en el citoplasma de *E. coli* a menudo forman agregados proteicos densos e insolubles llamados cuerpos de inclusión (LaVallie, 1995), con lo cual la proteína soluble presente en el citoplasma es menor a la encontrada en dichos agregados. Una alternativa para aumentar el rendimiento de purificación de LysZ5 y PlyP100 puede ser su obtención de los cuerpos de inclusión. García *et al.* (2010a) mejoraron la purificación de la endolisina LysH5 al recuperarla de los cuerpos de inclusión con el subsecuente replegamiento, de esta manera incrementaron el rendimiento de purificación en 35 veces comparado con su reporte previo (Obeso *et al.*, 2008).

El espectro lítico de LysZ5 y PlyP100 fue evaluado al adicionar directamente 1.5 µg de endolisina purificada a las suspensiones celulares de cada una de las cepas de *Listeria*. Ambas endolisinas produjeron lisis (reducción de la DO₆₀₀) en las células *L. innocua* y de las cinco cepas de *L. monocytogenes* (Figura 10).

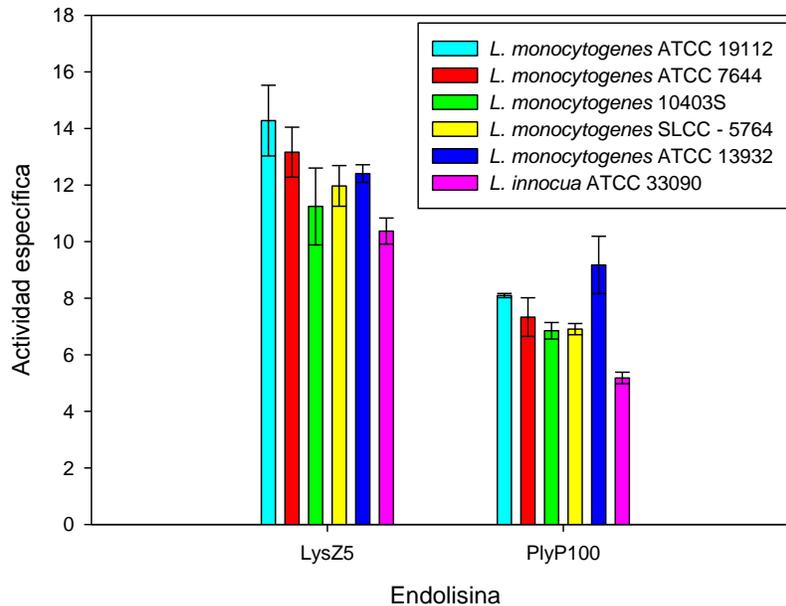


Figura 10. Espectro lítico de LysZ5 y PlyP100 contra cepas de *Listeria*.

Zhang *et al.* (2012), previamente reportaron que LysZ5 fue capaz de lisar las células de los 18 aislados de *L. monocytogenes*, aunado a los resultados de este estudio, la endolisina LysZ5 puede lisar las células de 23 cepas de *L. monocytogenes*. Respecto a PlyP100, la endolisina que codifica el genoma del fago de *Listeria* P100, es el primer trabajo que evalúa su capacidad de lisis en las células de *L. monocytogenes*, a pesar de ello, el panorama de PlyP100 parece ser prometedor ya que el fago P100 es uno de los pocos fagos virulentos que son estrictamente líticos e invariablemente letales a la célula bacteriana una vez que ha ocurrido la infección, se ha reportado que infecta y lisa a más del 95% de los aproximadamente 250 aislados de *Listeria* asociados a enfermedades transmitidas por alimentos (Carlton *et al.*, 2005), y su uso en alimentos crudos y listos para su

consumo está aprobado en Estados Unidos (USDA-FSIS, 2009; USFDA, 2006, 2007).

VII.3.2 Influencia de los cationes en la actividad lítica

Se evaluó la influencia de los cationes Ca^{2+} y Na^+ en la actividad lítica de las endolisinas. La leche y el queso son buenas fuentes de calcio y el queso fresco tiene un contenido de NaCl que oscila entre el 1 y 3%. En el caso del queso ambos cationes están presentes.

La interacción de la concentración de Ca^{2+} y Na^+ fue estadísticamente significativa en la actividad específica de las endolisinas LysZ5 ($P < 0.0001$) y PlyP100 ($P < 0.0001$). Los resultados muestran tendencias similares para LysZ5 y PlyP100 (Figuras 11 y 12), a una concentración de calcio de 30 mM (valor encontrado en la leche) o de 175 mM de sodio, la actividad específica se incrementa en siete veces para LysZ5 y en 20 veces para PlyP100, y al aumentar la concentración de calcio y sodio, solos o en combinación, la actividad específica se disminuye por debajo de la actividad observada sin ninguno de los cationes. A concentraciones de calcio a 165 mM en combinación con dos concentraciones de sodio: 170 y 514 mM (valores de calcio y sodio encontrados en el queso fresco mexicano), la actividad específica disminuye en 15 veces para LysZ5 y en cuatro veces para PlyP100.

Estos resultados obtenidos coinciden con lo observado para otras endolisinas de fagos de *Listeria*. Ply500 mostró una actividad relativa óptima a 100-150 mM de Na^+ , la cual disminuye con el incremento en la concentración de sal (Schmelcher *et al.*, 2011). Por su parte, Schmelcher *et al.* (2012) reportan que la actividad lítica de las endolisinas HPL118, HPL500, HPL511 y HPLP35 mostraron su actividad óptima entre 200-300 mM de Na^+ , y además observaron que el Ca^{2+} fue efectivo en la restauración de la actividad lítica de dichas endolisinas después de la remoción del Zn^{2+} .

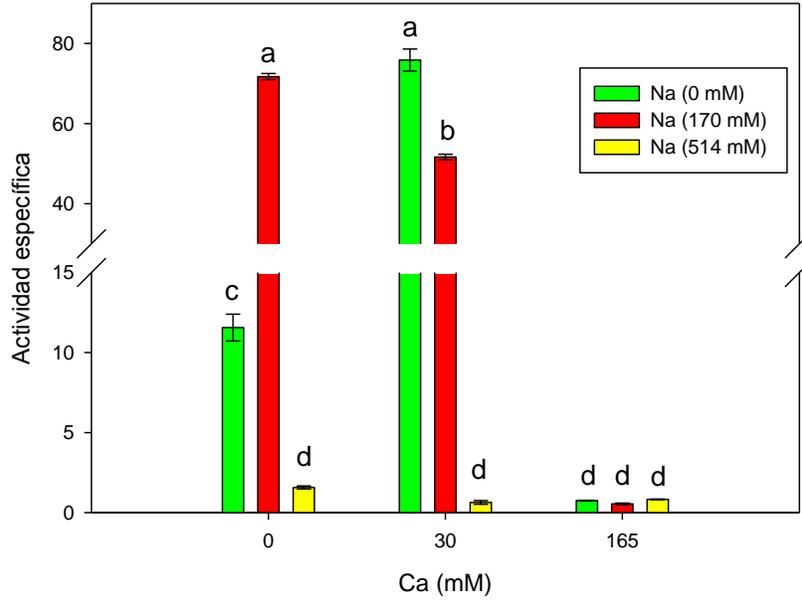


Figura 11. Influencia de la concentración de Ca y Na en la actividad lítica de LysZ5.

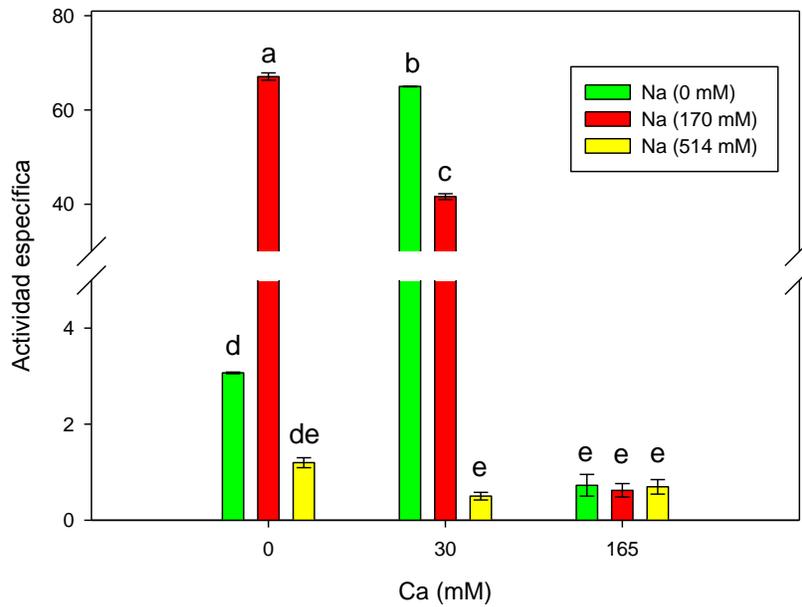


Figura 12. Influencia de la concentración de Ca y Na en la actividad lítica de PlyP100.

Se ha sugerido que la interacción iónica tiene un papel importante como la base molecular para la asociación de los dominios de unión a la pared celular (DUPs) a su ligando en la pared celular de la bacteria (Schmelcher *et al.*, 2011). También se ha propuesto que los cationes divalentes pueden estar asociados con las enzimas puras y ser necesarios para la actividad y/o estabilidad estructural de las endolisinas (García *et al.*, 2010a).

Estos resultados indican que la concentración de LysZ5 y PlyP100 tendría que ser mayor en el queso que la necesaria en leche para tener un efecto antimicrobiano contra las células de *Listeria*.

VII.4 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los fermentos, ácido protocatecuico, ácido ferúlico y nisina en *L. innocua*

VII.4.1 Determinación de la concentración mínima inhibitoria

Se realizó la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de seis antimicrobianos naturales (Cuadro 6) con potencial antilisteria y se evaluó contra *Listeria innocua* como microorganismo blanco.

Cuadro 6. Concentración mínima inhibitoria de seis antimicrobianos naturales contra *Listeria innocua*.

Antimicrobiano	CMI
Verdad® F80	64 mg/ml
Verdad® F95	16 µl/ml
PuraQ® Arome NA4	160 µl/ml
Ácido protocatecuico	2.5 mg/ml
Ácido ferúlico	2.5 mg/ml
Nisaplin®	0.25 mg/ml

Nisaplin® presentó el valor de CMI más bajo respecto a todos los antimicrobianos evaluados. Los valores de CMI encontrados para los fermentos comerciales Verdad® F80, Verdad® F95 y PuraQ® Arome NA4 fueron mayores respecto a las concentraciones recomendadas por el fabricante para su adición a alimentos (máximo 4 mg/ml, 6 µl/ml y 25 µl/ml respectivamente), aunado a sus características de olor y color por ser productos de fermentación, pueden no resultar adecuados para su incorporación en queso fresco tipo Panela en concentraciones de sus valores de CMI.

Respecto a los ácidos fenólicos, el valor de CMI del ácido ferúlico y el ácido protocatecuico mostraron un potencial antimicrobiano similar en la inhibición de *L. innocua*. Valores de CMI de ácidos fenólicos previamente reportados contra *L. monocytogenes*, incluyen: ácido cafeico, 2.3 – 3.0 mg/ml; ácido cinámico, 1.5 – 2.0 mg/ml; ácido cumárico, 1.5 – 2.3 mg/ml; ácido ferúlico, 1.8 – 3.0 mg/ml; y ácido protocatecuico, 0.04 - 0.75 mg/ml (Wen *et al.*, 2003; Chao y Yin, 2009; Takahashi *et al.*, 2013; Stojković *et al.*, 2013). De los resultados en este estudio, sólo el valor CMI del ácido ferúlico es similar a los datos antes mencionados, mientras que el ácido protocatecuico mostró un valor CMI superior a lo reportado para dicho compuesto.

Brandt *et al.* (2010) observaron que la inhibición e inactivación *in vitro* de *L. monocytogenes* varía entre cepas. Es posible que las diferencias en el valor CMI del ácido protocatecuico se atribuya a que en este estudio se realizó la evaluación *in vitro* con *L. innocua* y no con *L. monocytogenes*. Se ha sugerido que las variaciones en la susceptibilidad de cepas de *L. monocytogenes*, puede estar relacionada a las diferencias en la composición de los lípidos de membrana (Magalhães y Nitschke, 2013). Stojković *et al.* (2013) proponen que el ácido protocatecuico induce daños a la estructura de la membrana celular provocando cambios en su permeabilidad.

El valor CMI no ofrece un indicativo sobre la concentración del antimicrobiano que puede inhibir a los microorganismos patógenos en un alimento. En otros estudios han reportado que concentraciones de 2 a 100 veces mayores de los agentes antimicrobianos son generalmente requeridas en un alimento en

comparación con la observada en caldo de cultivo (Burt, 2004). Por ejemplo, Soni *et al.* (2010) reportaron que 200 ppm de arginato láurico fue altamente efectivo en la reducción hasta niveles no detectables de *L. monocytogenes* en caldo soya tripticaseína, mientras que un efecto inhibitorio similar en leche descremada y leche entera requirió una concentración de 800 ppm.

VII.4.2 Determinación de los efectos combinados de los compuestos antilisteria

Una vez determinados los valores de CMI para los seis antimicrobianos con potencial antilisteria, se evaluó la posible interacción sinergista en combinaciones binarias con Nisaplin®.

Cuadro 7. Determinación de los efectos combinados de los fermentos y ácidos fenólicos con Nisaplin®.

Antimicrobiano	CMI _A	CMI _B	CFI
	(Nisaplin®)		
Verdad® F80	64 mg/ml	0.25 mg/ml	2
Verdad® F95	16 µl/ml	0.25 mg/ml	2
PuraQ® Arome NA4	160 µl/ml	0.25 mg/ml	2
Ácido protocatecuico	0.6 mg/ml	0.12 mg/ml	0.72
Ácido ferúlico	0.6 mg/ml	0.06 mg/ml	0.48

La concentración fraccional inhibitoria (CFI) de Nisaplin® y sus combinaciones con los fermentos y ácidos fenólicos contra *L. innocua* se muestra en el Cuadro 7. De las combinaciones evaluadas, solamente el ácido ferúlico mostró un efecto sinergista con Nisaplin® (CFI ≤ 0.5). Lo que respecta a los fermentos y al

ácido protocatecuico, el índice CFI obtenido sugiere una interacción indiferente ($0.5 < \text{FIC} \leq 4$) en sus combinaciones con Nisaplin®.

Aunque el método CFI es más preciso al determinar la clasificación de la interacción como antagonista, aditiva o sinergista, no provee un indicativo de la magnitud de dicha interacción (Brandt *et al.*, 2010). Además, estos resultados únicamente demuestran la actividad antimicrobiana *in vitro* de estos compuestos, y pueden ocurrir interacciones potenciales entre los antimicrobianos y la matriz del alimento, por lo que las aplicaciones de las combinaciones de antimicrobianos deben ser complementadas en el producto alimenticio para validar su efectividad.

Por lo anterior, se realizaron pruebas preliminares en queso fresco tipo Panela, para determinar el efecto antilisteria de las mezclas Nisaplin®-fermentos y Nisaplin®-ácido fenólicos (ver Anexos), observando que sólo el ácido ferúlico presentó potencial antimicrobiano en el control de *L. innocua* en queso fresco tipo Panela.

VII.5 Determinación de la actividad antilisteria de LysZ5 y PlyP100 en queso fresco tipo Panela

La actividad antimicrobiana de las endolisinas purificadas fue evaluada al adicionarse a queso fresco tipo Panela, inoculado con un coctel de cinco cepas de *L. monocytogenes*. Con la finalidad de poder observar si las endolisinas purificadas presentaban actividad antilisteria una vez incorporadas en el queso tipo Panela, se adicionaron las concentraciones máximas posibles de LysZ5 y PlyP100 tomando en consideración el rendimiento de purificación obtenido (Ver VII.3.1).

Durante 21 días de almacenamiento del queso fresco tipo Panela, *L. monocytogenes* incrementó sus cuentas viables de un inóculo inicial de 5.10 Log UFC/g hasta 7.24 Log UFC/g. La incorporación de LysZ5 (19 U/g) así como de PlyP100 (12U/g) disminuyeron las cuentas viables de *L. monocytogenes* en al menos 1 Log UFC/g respecto al inóculo inicial al final del experimento (Figura 13).

Poco se ha explorado sobre el potencial de las endolisinas como antimicrobianos naturales en los alimentos. Las endolisinas de fagos de *Listeria*, Ply118 y Ply511 han sido expresadas en *Lactococcus lactis* como medida de biocontrol de *L. monocytogenes* en cultivos iniciadores lácticos (Gaeng *et al.*, 2000; Turner *et al.*, 2007), pero no ha sido exitoso. Por otro lado, se ha reportado que la endolisina de fago de *Staphylococcus aureus*, LysH5, fue capaz de lisar un amplio rango de cepas de *Staphylococcus* e inhibir el crecimiento de *S. aureus* en leche (Obeso *et al.*, 2008). También se ha observado que LysH5 tiene un fuerte efecto inhibitorio de *S. aureus* cuando fue combinada con la nisina en leche pasteurizada (García *et al.*, 2010a). En el caso de la endolisina LysZ5, a una concentración de 40 U/ml, fue capaz de reducir las cuentas viables de *L. monocytogenes* a niveles no detectables en leche de soya almacenada a 4°C (Zhang *et al.*, 2012).

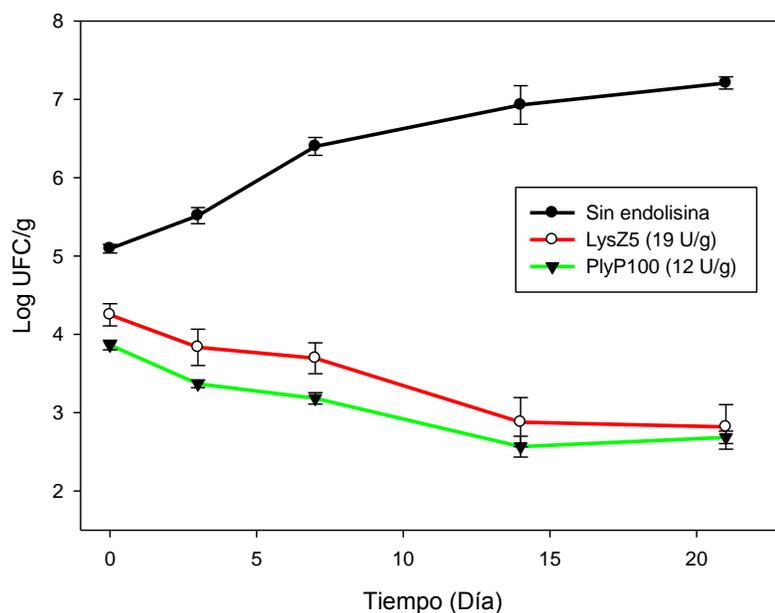


Figura 13. Sobrevivencia de *L. monocytogenes* en queso fresco tipo Panela adicionado con LysZ5 y PlyP100, almacenado a 4°C.

Las endolisinas han mostrado una alta efectividad cuando han sido evaluadas en leche, sin embargo, los resultados de este estudio muestran que la actividad de las endolisinas es menor en el queso fresco tipo Panela. Algunos de

los factores que pueden ser responsables de dicho comportamiento pueden incluir: 1) una mayor concentraciones de cationes en el queso en comparación con la leche (Ver VII.3.2); y 2) la matriz semi sólida del queso lo cual puede limitar la difusión del antimicrobiano para entrar en contacto con la célula bacteriana (Burt, 2004). Este estudio representa el primer reporte en que se muestra que las endolisinas de fagos de *Listeria* son capaces de reducir las cuentas viables de *L. monocytogenes* en queso fresco tipo Panela a temperaturas de refrigeración.

VII.6 Determinación de la actividad antilisteria del ácido ferúlico en queso fresco tipo Panela

La actividad antimicrobiana del ácido ferúlico fue evaluada al adicionarse a queso fresco tipo Panela, inoculado con un coctel de *L. monocytogenes*. Durante 21 días de almacenamiento del queso fresco tipo Panela, *L. monocytogenes* incrementó sus cuentas viables de un inóculo inicial de 3.06 Log UFC/g hasta 6.39 Log UFC/g (Figura 14). Estos resultados confirman que el almacenamiento en refrigeración (4°C) es insuficiente en el control de *L. monocytogenes* y por lo tanto son necesarias barreras antimicrobianas para disminuir o inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes* (Soni *et al.*, 2010). La incorporación de ácido ferúlico (4.0 mg/g) al queso tipo Panela, mantuvo sin cambios significativos el inóculo inicial de 3.09 Log UFC/g de *L. monocytogenes* durante 21 días de almacenamiento a 4°C. Al final del experimento, las cuentas viables de *L. monocytogenes* fueron aproximadamente 3.5 Log UFC/g menores comparado con el tratamiento sin antimicrobiano.

Takahashi *et al.* (2013) reportaron que en queso adicionado de 2000 ppm de ácido ferúlico almacenado por 1-5 días a 10°C, el inóculo inicial de 2 Log NMP/g de *L. monocytogenes* se mantuvo sin cambios significativos, de manera similar en salmón ahumado, el ácido ferúlico exhibió un importante efecto de inhibición del crecimiento de *L. monocytogenes*, manteniendo el nivel del inóculo inicial de 2 Log NMP/g hasta el día 3 de almacenamiento.

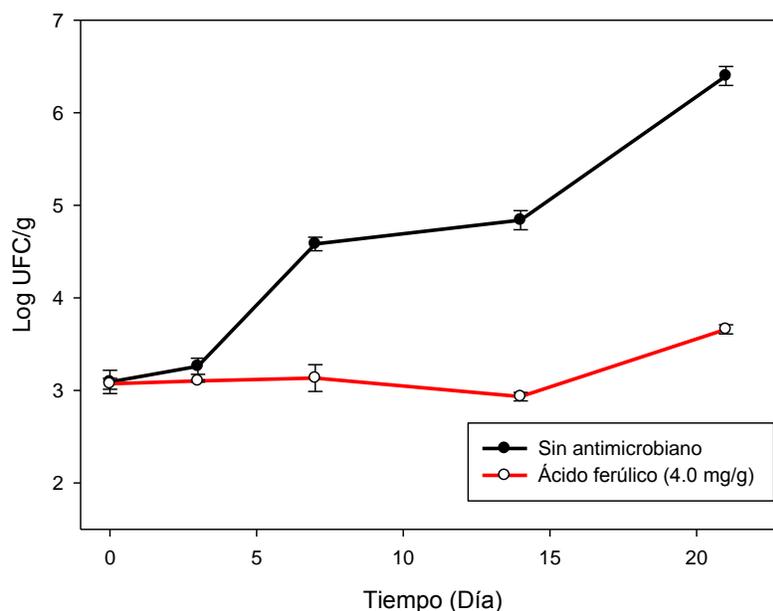


Figura 14. Sobrevivencia de *L. monocytogenes* en queso fresco tipo Panela adicionado con ácido ferúlico, almacenado a 4°C.

El ácido ferúlico, a diferencia de otros compuestos antimicrobianos, no presenta un efecto bactericida, sin embargo, inhibe el crecimiento bacteriano principalmente al provocar la entrada de protones al interior de las células y una salida de iones de potasio de las mismas (Campos *et al.*, 2009). Aunque el efecto bacteriostático del ácido ferúlico no ofrece el mejor escenario en el control de *L. monocytogenes*, Takahashi *et al.* (2015) realizaron un estudio para determinar la habilidad de *L. monocytogenes* a desarrollar resistencia al ácido ferúlico después de exposiciones repetidas ante este agente antimicrobiano, observando que no hubo un incremento en la resistencia de 10 cepas de *L. monocytogenes* durante su exposición repetida a concentraciones altas y bajas de ácido ferúlico, lo cual sugiere que el ácido ferúlico es un agente antimicrobiano que imparte de manera consistente un efecto inhibitorio del crecimiento bacteriano.

VII.7 Propiedades de textura del queso tipo Panela adicionado de antimicrobianos

El perfil de textura del queso tipo Panela fue evaluado en muestras de queso en cuya elaboración se adicionaron las concentraciones de los antimicrobianos que mostraron el mejor efecto antilisteria (4.0 mg/g de ácido ferúlico, 19 U/g de LysZ5 y 12 U/g PlyP100). En el Cuadro 8 se muestran los resultados de los atributos de textura del queso fresco tipo Panela adicionado de ácido ferúlico y endolisinas, después de dos días de almacenamiento a 4 °C.

La dureza es la fuerza máxima que tiene lugar en cualquier tiempo durante el primer ciclo de compresión, se refiere a la fuerza requerida para comprimir un alimento entre los molares o la lengua y el paladar, y la gomosidad es la energía requerida para desintegrar un alimento semisólido de modo que esté listo para ser tragado (Hleap y Velasco, 2010). El análisis del perfil de textura mostró una disminución en la dureza y en la gomosidad ($P < 0.0001$) cuando la cuajada es adicionada de las endolisinas, principalmente con PlyP100. La cohesividad es el cociente entre el área bajo la curva de fuerza de las dos compresiones, representa la fuerza con la que están unidas las partículas, límite hasta el cual se puede deformar antes de romperse (Hleap y Velasco, 2010). No hubo diferencias estadísticamente significativas ($P = 0.0926$) en los valores de cohesividad en los tratamientos adicionados con los antimicrobianos y el queso sin antimicrobiano. La elasticidad es la altura que recupera el alimento después de la primera compresión, mide cuanta estructura del alimento se ha roto por la compresión inicial (Hleap y Velasco, 2010). La elasticidad disminuyó de manera significativa ($P = 0.0177$) en el queso adicionado con ácido ferúlico respecto al queso sin antimicrobiano. La masticabilidad es calculada multiplicando la dureza, la cohesividad y la elasticidad, representa el trabajo necesario para desintegrar un alimento hasta que esté listo para ser tragado (Hleap y Velasco, 2010). Los quesos adicionados de ácido ferúlico y PlyP100 mostraron una disminución significativa ($P = 0.0140$) en los valores de masticabilidad en relación al queso sin antimicrobiano.

Cuadro 8. Atributos de textura del queso fresco tipo Panela adicionado de antimicrobianos.

	Antimicrobiano			
	Sin antimicrobiano	Ácido ferúlico	LysZ5	PlyP100
Dureza (N)	4.19 ± 0.16 ^a	4.62 ± 0.12 ^a	3.59 ± 0.12 ^b	3.03 ± 0.10 ^c
Cohesividad	0.77 ± 0.02 ^a	0.84 ± 0.02 ^a	0.83 ± 0.02 ^a	0.79 ± 0.02 ^a
Elasticidad (mm)	3.36 ± 0.24 ^a	2.15 ± 0.32 ^b	2.95 ± 0.22 ^{a,b}	3.13 ± 0.23 ^{a,b}
Gomosidad (N)	8.67 ± 0.35 ^a	8.78 ± 0.24 ^a	7.28 ± 0.30 ^b	5.85 ± 0.23 ^c
Masticabilidad (mJ)	11.75 ± 0.89 ^a	7.71 ± 1.19 ^b	8.83 ± 0.84 ^{a,b}	7.51 ± 0.68 ^b

^{a,b,c} Medias con diferente letra en cada fila indica que hay diferencias estadísticamente significativas.

De acuerdo al análisis de perfil de textura, el queso tipo Panela adicionado de endolisinas tiende a ser menos firme al presentar una disminución en la dureza, gomosidad y masticabilidad. Por otro lado, la disminución en la elasticidad del queso tipo Panela adicionado de ácido ferúlico, indica que es más firme, con una menor resistencia a la deformación, más frágil y quebradizo (Solís-Méndez *et al.*, 2013).

Se han reportado cambios en sólo algunos parámetros del perfil de textura en diferentes tipos de quesos con la adición de antimicrobianos. En queso Minas Tradicional Serro elaborado con diferentes concentraciones de nisina, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la dureza, fracturabilidad, gomosidad, cohesividad y masticabilidad, a excepción de la elasticidad, lo cual relacionaron principalmente con el incremento en el tiempo de maduración (Pinto *et al.*, 2011). Por otro lado, Ramos *et al.* (2012) evaluaron diferentes recubrimientos elaborados a base de aislado de proteína de suero e incorporados con agentes antimicrobianos (natamicina, ácido láctico y quitooligosacáridos), aplicándolos a queso Regional Saloio, reportando que los valores de dureza fueron mayores en los quesos sin recubrimientos, sin embargo no encontraron diferencias estadísticamente significativas entre quesos con los diferentes tipos de recubrimientos.

VII.8 Evaluación sensorial

Se llevó a cabo una evaluación sensorial del queso fresco tipo Panela adicionado de antimicrobiano (4.0 mg/g de ácido ferúlico, 19 U/g de LysZ5, 12 U/g PlyP100 y sin antimicrobiano), mediante una prueba de preferencia con un panel no entrenado de 60 personas, 28 hombres y 32 mujeres, entre 18 y 46 años de edad. En la evaluación sensorial se pidió a los panelistas no evaluar el atributo de sabor del queso debido a que las endolisinas así como el ácido ferúlico aún no se encuentran permitidos como aditivo alimenticio en la NOM-243-SSA1-2010.

Cuadro 9. Aceptabilidad de los consumidores¹ del queso fresco tipo Panela adicionado de ácido ferúlico y endolisinas.

Antimicrobiano	Aceptabilidad			
	Apariencia	Color	Aroma	Textura
Sin antimicrobiano	7.08 ± 0.17 ^a	7.32 ± 0.13 ^a	6.40 ± 0.20 ^a	6.62 ± 0.21 ^a
Ácido ferúlico	7.17 ± 0.16 ^a	7.13 ± 0.14 ^a	6.13 ± 0.21 ^a	6.75 ± 0.19 ^a
LysZ5	6.43 ± 0.19 ^b	6.95 ± 0.16 ^a	5.93 ± 0.19 ^a	6.60 ± 0.19 ^a
PlyP100	6.98 ± 0.18 ^{ab}	7.30 ± 0.15 ^a	6.48 ± 0.20 ^a	6.65 ± 0.19 ^a

^{a,b} Medias con diferente letra en cada columna indica que hay diferencias estadísticamente significativas

¹ La aceptabilidad de los consumidores se basó en una escala hedónica de 9 puntos (1 = Me disgusta extremadamente, 5 = No me gusta o disgusta, y 9 = Me gusta extremadamente)

No existieron diferencias estadísticamente significativas respecto al color ($P = 0.2498$), aroma ($P = 0.1880$) y textura ($P = 0.9497$) entre las muestras de queso sin antimicrobiano, y los tratamientos con ácido ferúlico y endolisinas, mientras que el nivel de aceptabilidad de la apariencia fue menor ($P = 0.0152$) en el queso adicionado con LysZ5 (Cuadro 9). Los resultados de aceptabilidad indican que los consumidores no difieren de manera importante en su nivel de preferencia del queso fresco tipo Panela adicionado de los antimicrobianos evaluados. A pesar de los resultados obtenidos, no se descarta que al evaluar el sabor sea posible que los

consumidores puedan detectar una diferencia sensorial debido al uso de dichos antimicrobianos en el producto.

Un antimicrobiano alimentario debe cubrir tres aspectos importantes en el producto: i) tener un modo selectivo de acción, ii) no cambiar las características organolépticas y propiedades de textura del producto, y iii) ser una sustancia inocua para el consumo humano (Oliveira *et al.*, 2012). Es así que la evaluación de un antimicrobiano con potencial aplicación para alimentos no solamente se limita a sus propiedades antimicrobianas. Reis *et al.* (2012) analizaron las propiedades antifúngicas del extracto de *Agaricus bohusii* Bon incorporado en queso crema así como su impacto en la aceptabilidad de los consumidores, de sus resultados, el extracto metanólico de *A. bohusii* inhibió el desarrollo de *Penicillium verucosum* var. *cyclopium* en el queso crema almacenado a temperatura ambiente durante siete días, por otro lado, la evaluación sensorial mostró que el queso crema en combinación con el extracto de *A. bohusii* tuvo una aceptación por parte de los panelistas ligeramente mayor en comparación con el queso crema control.

En base a los resultados del presente este estudio, la incorporación de las endolisinas LysZ5 y PlyP100 en la elaboración de queso fresco tipo Panela, presentaron un efecto bactericida en el desarrollo de *L. monocytogenes*, mientras que la adición del ácido ferúlico al queso tipo Panela, inhibió el desarrollo de este microorganismo patógeno, en ambos casos, dichos efectos antimicrobianos fueron consistentes durante el almacenamiento del queso a temperaturas de refrigeración. En cuanto a la aceptabilidad de los consumidores, a pesar de que el atributo de sabor no fue evaluado, debido a que no se ha autorizado el consumo de las endolisinas (LysZ5 y PlyP100), y el ácido ferúlico está permitido como aditivo alimentario únicamente en algunos países (por ejemplo Japón), cabe resaltar que otros parámetros sensoriales en el queso tipo Panela no se vieron afectados. Por lo anterior, las endolisinas LysZ5 y PlyP100, así como el ácido ferúlico, pueden ser buenos candidatos como antimicrobianos para su uso en queso fresco tipo Panela.

IX. CONCLUSIONES

Los factores analizados, temperatura, tiempo de incubación y concentración del inductor, tuvieron efectos significativos sobre el nivel de expresión de la endolisina recombinante PlyP100 en *E. coli*.

Las endolisinas recombinantes LysZ5 y PlyP100 presentaron actividad lítica frente a las cepas de *Listeria monocytogenes* evaluadas.

La concentración de iones Na⁺ y Ca²⁺, en niveles presentes en el queso fresco tipo Panela, disminuyeron entre cuatro y quince veces la actividad específica de LysZ5 y PlyP100.

Los fermentos, el ácido protocatecuico y Nisaplin® no mostraron potencial antimicrobiano frente a *L. innocua* para su incorporación en la elaboración de queso fresco tipo Panela.

El ácido ferúlico (4.0 mg/g) adicionado al queso fresco tipo Panela, inhibió el crecimiento de *L. monocytogenes* durante 21 de almacenamiento a 4°C.

La adición de 19 U/g de LysZ5 y 12 U/g de PlyP100 a la elaboración de queso fresco tipo Panela, redujo las poblaciones de *L. monocytogenes* en al menos 1 Log UFC/g, durante 21 días de almacenamiento a 4°C.

El perfil de textura del queso fresco tipo Panela refleja que es menos firme al ser adicionado de endolisinas, por el contrario, el ácido ferúlico da como resultado un queso más firme, frágil y quebradizo.

El nivel de aceptabilidad en los descriptores apariencia, color y aroma fue ligeramente menor en el queso adicionado con LysZ5. Los resultados de aceptabilidad indican que los consumidores no difieren de manera importante en su nivel de preferencia del queso fresco tipo Panela adicionado de los antimicrobianos evaluados

X. BIBLIOGRAFÍA

Adzitey, F. y Huda, N. 2010. *Listeria monocytogenes* in foods: Incidences and possible control measures. African Journal of Microbiology Research, 4(25):2848-2855.

Allerberger, F. y Wagner, M. 2010. Listeriosis: a resurgent foodborne infection. Clinical Microbiology Infection, 16:16–23.

Almanza, C.J. 20 de Enero de 2011. El negocio del queso. El economista.

Brandt, A.L, Castillo, A., Harris, K.B., Keeton, J.T., Hardin, M.D. y Taylor, T.M. 2010. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by food antimicrobials applied singly and in combination. Journal of Food Science. 75(9): M557-M563.

Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. International Journal of Food Microbiology. 94: 223-253.

Campos, F.M., Couto, J.A., Figueiredo, A.R., Tóth, I.V., Rangel, A.O.S.S. y Hogg, T.A. 2009. Cell membrane damage induced by phenolic acids on wine lactic acid bacteria. International Journal of Food Microbiology. 135: 144-151.

Carlton, R.M., Noordman, W.H., Biswas, B., de Meester, E.D. y Loessner, M.J. 2005. Bacteriophage P100 for control of *Listeria monocytogenes* in foods: genome sequence, bioinformatic analyses, oral toxicity study, and application. Regulatory Toxicology and Pharmacology. 43:301-312.

CDC. 2013. Centers for Disease Control and Prevention. Listeria (Listeriosis). Statistics. <http://www.cdc.gov/listeria/statistics.html> Mayo de 2014

Cervantes, F., Villegas, A., Cesín, A. y Espinoza, A. 2008. Los quesos mexicanos genuinos. Patrimonio que debe rescatarse. Mundi-Prensa, Universidad Autónoma Chapingo and Universidad Autónoma del Estado de México, México, D.F.

Chao, C. y Yin, M. 2009. Antibacterial effects of roselle calyx extracts and protocatechuic acid in ground beef and apple juice. *Foodborne Pathogens and Disease*. 6(2): 201-206.

Cody, S.H., Abbott, S.L., Marfin, A.A., Schulz, B., Wagner, P., Robbins, K., Mohle-Boetani, J.C., y Vugia, D.J. 1999. Two outbreaks of multidrug-resistant *Salmonella* serotype typhimurium DT104 infections linked to raw-milk cheese in Northern California. *JAMA*, 281:1805–10.

Dave, R.I., Sharma, P., Julson, J., Muthukumarappan, K. y Henning, D.R. 2003. Effectiveness of Microgard® in controlling *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Science and Technology*. 40: 262-266.

Devlieghere, F., Vermeiren, L., & Debevere, J. 2004. New preservation technologies: possibilities and limitations. *International Dairy Journal*. 14:273-285.

Dillon, J. y Berthier, A. 2000. Nutritional characteristics of cheese. *Science to Quality Assurance*, Eck, A. y Gills, J. Ed. Lavoisier Publishing, Paris.

Düring, K., Porsch, P., Fladung, M. y Lörz, H. 1993. Transgenic potato plants resistant to the phytopathogenic bacterium *Erwinia carotovora*. *The Plant Journal*. 3:587-598.

Escobar, D., Clark, S., Ganesan, V., Repiso, L., Waller, J. y Harte, F. 2011. High-pressure homogenization of raw and pasteurized milk modifies the yield, composition, and texture of queso fresco cheese. *Journal of Dairy Science*. 94: 1201-1210.

Fernández Escartín, E. 2008. *Listeria monocytogenes*. En: *Microbiología e Inocuidad de los Alimentos*, Universidad Autónoma de Querétaro, México. 220-249.

Francis, D. y Page, R. 2010. Strategies to optimize protein expression in *E. coli*. *Current Protocols in Protein Science*. 61: 5.24.1-5.24.29.

Gaeng, S., Scherer, S., Neve, H., Loessner, M.J. 2000. Gene cloning and expression and secretion of *Listeria monocytogenes* bacteriophage-lytic enzymes in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 2951-2958.

García, P., Madera, C., Martínez, B. y Rodríguez, A. 2007. Biocontrol of *Staphylococcus aureus* in curd manufacturing processes using bacteriophages. *International Dairy Journal*. 17:1232-1239.

García, P., Madera, C., Martínez, B., Rodríguez, A. y Suárez, J.E. 2009. Prevalence of bacteriophages infecting *Staphylococcus aureus* in dairy samples and their potential as biocontrol agents. *Journal of Dairy Science*. 92:3019-3026.

García, P., Martínez, B., Rodríguez, L. y Rodríguez, A., 2010a. Synergy between the phage endolysin LysH5 and nisin to kill *Staphylococcus aureus* in pasteurized milk. *International Journal of Food Microbiology*. 141:151-155.

García, P., Rodríguez, L., Rodríguez, A. y Martínez, B. 2010b. Food biopreservation: promising strategies using bacteriocins, bacteriophages and endolysins. *Trends in Food Science & Technology*, 21:373-382.

Hleap, J.I. y Velasco, V.A. 2010. Análisis de las propiedades de textura durante el almacenamiento de salchichas elaboradas a partir de tilapia roja (*Oreochromis sp.*). *Facultad de Ciencias Agropecuarias*. 8(2):46-56.

Hnosko, J., Clark, S. y Van Hekken, D. 2009. Latin American Cheeses. En: *The Sensory Evaluation of Dairy Products*, Springer, USA. 489-504.

Hoopes, J.T., Stark, C.J., Kim, H.A., Sussman, D.J., Donovan, D.M. y Nelson, D.C. 2009. Use of a bacteriophage lysin, PlyC, as an enzyme disinfectant against *Streptococcus equi*. *Applied and Environmental Microbiology*. 75:1388-1394.

ILSI. 2005. Achieving continuous improvement in reductions in food-borne listeriosis – A risk-based approach. *Journal of Food Protection*. 68:1932-1994.

Juneja, V.K., Dwivedi, H.P. y Yan, X. 2012. Novel Natural Food Antimicrobials. *Annual Review of Food Science and Technology*. 3:318-403.

Kataeva, I., Chang, J., Xu, H., Luan, C.H., Zhou, J., Uversky, V.N., Lin, D., Horanyi, P., Liu, Z.J., Ljungdahl, L.G., Rose, J., Lou, M. y Wang, B.C. 2005. Improving solubility of *Schewanella oncidensis* MR-1 and *Clostridium thermocellum*

JW-20 proteins expressed into *Escherichia coli*. Journal of Proteome Research. 4:1942-1951.

Kim, K.P., Klumpp, J. y Loessner, M.J. 2007. *Enterobacter sakazakii* bacteriophages can prevent bacterial growth in reconstituted infant formula. International Journal of Food Microbiology. 115:195-203.

Kousta, M., Mataragas, M., Skandamis, P., y Drosinos, E.H. 2010. Prevalence and sources of cheese contamination with pathogens at farm and processing levels. Food Control, 21:805–815.

Law, B.A. 2002. The nature of enzymes and their action in foods. En: Enzymes in food technology, B.A.L. Robert, & J. Whitehurst. Sheffield, UK: Sheffield Academic Press. 1-18.

LaVallie, E.R. 1995. Production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. Current Protocols in Protein Science. 5.1.1-5.1.8.

Linnan, M.J., Mascola, L., Lou, X.D., Goulet, V., May, S., Salminen, C., Hird, D.W., Yonekura, M.L., Hayes, P., Weaver, R., Audurier, A., Plikaytis, B.D., Fannin, S.L., Kleks, A. y Broome, C.V. 1988. Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. New England Journal of Medicine, 319:823–8.

MacDonald, P.D.M., Whitwam, R.E., Boggs, J.D., MacCormack, J.N., Anderson, K.L., Reardon, J.W., Saah, J.R., Graves, L.M., Hunter, S.B., y Sobel, J. 2005. Outbreak of Listeriosis among Mexican Immigrants as a Result of Consumption of Illicitly Produced Mexican-Style Cheese. Clinical Infectious Diseases, 40:677–82.

Magalhães, L. y Nitschke, M. 2013. Antimicrobial activity of rhamnolipids against *Listeria monocytogenes* and their synergistic interaction with nisin. Food Control. 29:138-142.

Martínez-Cuesta, M. C., Requena, T. y Peláez, C. 2006. Cell membrane damage induced by lacticin 3147 enhances aldehyde formation in *Lactococcus lactis* IFPL730. International Journal of Food Microbiology. 109:198-204.

Modi, R., Hirvi, Y., Hill, A. y Griffiths, M.W. 2001. Effect of phage on survival of *Salmonella enteritidis* during manufacture and storage of Cheddar cheese made from raw and pasteurized milk. *Journal of Food Protection*. 64:927-933.

Monteville, T.J. y Chikindas, M.L. 2007. Biopreservation of Foods. En: *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, (M.P. Doyle and L.R. Beuchat, eds.) ASM Press, Whashington, D.C. 747-764.

Obeso, J.M., Martínez, B., Rodríguez, A. y García, P., 2008. Lytic activity of the recombinant staphylococcal bacteriophage ϕ H5 endolysin active against *Staphylococcus aureus* in milk. *International Journal of Food Microbiology*. 128:212-218.

Oliveira, H., Azaredo, J., Lavigne R. y Kluskens L.D. 2012. Bacteriophage endolysins as a response to emerging foodborne pathogens. *Trends in Food Science & Technology*. 28: 103-115.

Pinto, M.S., Fernandes de Carvalho, A., Pires, A.C.S., Campos Souza, A.A., Fonseca da Silva, P.H., Sobral, D., de Paula, J.C.J. y de Lima Santos, A. 2011. The effects of nisin on *Staphylococcus aureus* count and the physicochemical properties of Traditional Minas Serro cheese. *International Dairy Journal*. 27: 90-96.

Piserchio, A., Ghose, R. y Cowburn, D. 2009. Optimized bacterial expression and purification of the c-Src catalytic domain for solution NMR studies. *Journal of Biomolecular NMR*. 44: 87-93.

Ramos, Ó.L., Pereira, J.O., Silva, S.I., Fernandes, J.C., Franco, M.I., Lopes-da-Silva, J.A., Pintado, M.E. y Malacata, F.X. 2012. Evaluation of antimicrobial edible coatings from a whey protein isolate base to improve the shelf life of cheese. *Journal of Dairy Science*. 95(11): 6282-6292.

Reinders, R.D., Biesterveld, S. y Bijker, P.G.H. 2001. Survival of *E. coli* O157:H7 ATCC 43895 in a model apple juice medium with different concentrations of proline and caffeic acid. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 2863-2866.

Reis, F.S., Stojković, D., Stojković, M., Glamočlija, J., Ćirić, A. Barros, L. y Ferreira, I.C.F.R. 2012. Chemical characterization of *Agaricus bohusii*, antioxidant potential and antifungal preserving properties when incorporated in cream cheese. *Food Research International*. 48: 620-626.

Revilla, A. 1982. *Tecnología de la leche*. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. San José, Costa Rica.

Rilla, N., Martínez, B., & Rodríguez, A. 2004. Inhibition of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain in Afuega'l Pitu cheese by the nisin Z-producing strain *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IPLA 729. *Journal of Food Protection*. 67:928-933.

Rilla, N., Martínez, B., Delgado, T., y Rodríguez, A. 2003. Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* in Vidiago cheese by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IPLA 729, a nisin Z producer. *International Journal of Food Microbiology*. 85:23-33.

Ryan, M.P., Ross, R.P. y Hill, C. 2001. Strategy for manipulation of cheese flora using combinations of lactacin 3147-producing and -resistant cultures. *Applied and Environmental Microbiology*. 67:2699-2704.

Sandra, S., Stanford, M.A. y Meunier Goddik, L. 2004. The use of high-pressure processing in the production of Queso Fresco cheese. *Journal of Food Science*. 69(4):FEP153-FEP158.

Sass, P. y Bierbaum, G. 2007. Lytic activity of recombinant bacteriophage ϕ 11 and ϕ 12 endolysins on whole cells and biofilms of *Staphylococcus aureus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 73:347-352.

Seidman, C.E., Struhl, K., Sheen, J. y Jessen, T. 1997. Introduction of plasmid DNA into cells. *Current Protocols in Molecular Biology*. 37:1.8.1-1.8.10.

Schmelcher, M., Tchang, V.S. y Loessner, M.J. 2011. Domain shuffling and module engineering of *Listeria* phage endolysins for enhanced lytic activity and binding affinity. *Microbial Biotechnology*. 4(5): 651-662.

Schmelcher, M., Waldherr, F. y Loessner, M.J. 2012. *Listeria* bacteriophage peptidoglycan hydrolases feature high thermoresistance and reveal increased activity after divalent metal cation substitution. *Applied Microbiology Biotechnology*. 93: 633-643.

SIAP. 2014. Boletín de leche. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Mayo de 2014.

Secretaría de Salud. Norma Oficial Mexicana. NOM-243-SSA1-2010, Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba. Mayo 2014.

Solís-Méndez, A.D., Estrada-Flores, J.G. y Castelán-Ortega, O.A. 2013. A study on the texture diversity of the Artisan Ranchero cheese from Central Mexico. *International Journal of Dairy Technology*. 66(1):37-44.

Soni, K.A. y Nannapaneni, R., 2010. Bacteriophage significantly reduces *Listeria monocytogenes* on raw salmon fillet tissue. *Journal of Food Protection*. 73:32-38.

Soni, K.A., Nannapaneni, R., Schilling, M.W. y Jackson, V. 2010. Bactericidal activity of lauric arginate in milk and Queso Fresco cheese against *Listeria monocytogenes* cold growth. *Journal of Dairy Science*. 93: 4518-4525.

Stojković, D.S., Živković, J., Sković, M., Glamočlija, J., Ferreira, I.C.F.R., Janković y Maksimović, Z. 2013. Antibacterial activity of *Veronica montana* L. extract and of protocatechuic acid incorporated in a food system. *Food and Chemical Toxicology*. 55: 209-213.

Takahashi, H., Kashimura, M., Koiso, H., Kuda, T. y Kimura, B. 2013. Use of ferulic acid as a novel candidate of growth inhibition agent against *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat food. *Food Control*. 33: 244-248.

Takahashi, H., Takada, K., Tsuchiya, T., Miya, S., Kuda, T. y Kimura, B. 2015. *Listeria monocytogenes* develops no resistance to ferulic acid after exposure to low concentrations. *Food Control*. 47: 560-563.

Torres-Vitela, M.R., Mendoza-Bernardo, M., Castro-Rosas, J., Gomez-Aldapa, C.A., Garay-Martinez, L.E., Navarro-Hidalgo, V. y Villarruel-López, A. 2012. Incidence of *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, and staphylococcal enterotoxin in two types of Mexican fresh cheeses. *Journal of Food Protection*. 75(1):79-84.

Turner, M.S., Waldherr, F., Loessner, M.J. y Giffard, P.M. 2007. Antimicrobial activity of lysostaphin and a *Listeria monocytogenes* bacteriophage endolysin produced and secreted by lactic acid bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*. 30:58-67.

Turner, P., Holst, O. y Karlsson, E.N. 2005. Optimized expression of soluble cyclomaltoamylase of thermophilic origin in *Escherichia coli* by using a soluble fusion-tag and by tuning of inducer concentration. *Protein Expression and Purification*. 39: 54-60.

USDA ERS. 2013. United States Department of Agriculture. Economic Research Service. Dairy Data. Per capita consumption of selected cheese varieties (Annual). Mayo de 2014.

USDA-FSIS. 2009. United States Department of Agriculture-Food Safety and Inspection Service. Safe and suitable ingredients used in the production of meat and poultry products. Mayo de 2014.

USFDA. 2006. U.S. Food and Drug Administration. Agency Response Letter GRAS Notice No. GRN 000198. Mayo 2014.

USFDA. 2007. U.S. Food and Drug Administration. Agency Response Letter GRAS Notice No. GRN 000218. Mayo 2014.

USDA. 2014. Dairy Products. United States Department of Agriculture. National Agricultural Statistics Service. Mayo de 2014.

Van Hekken, D.L., Tunick, M.H., Farkye, N.Y. y Tomasula, P.M. 2013. Effect of hydrostatic high-pressure processing on the chemical, functional, and rheological properties of starter-free Queso Fresco. *Journal of Dairy Science*. 96: 6147-6160.

Van Hekken, D.L., Tunick, M.H., Tomasula, P.M., Molina Corral, F.J. y Gardea A.A. 2007. Mexican Queso Chihuahua: rheology of fresh cheese. *International Journal of Dairy Technology*. 60(1): 5-12.

Villar, R.G., Macek, M.D., Simons, S., Hayes, P.S., Goldoft, M.J., Lewis, J.H., Rowan, L.L., Hursh, D., Patnode, M. y Mead, P.S. 1999. Investigation of multidrugresistant *Salmonella* serotype typhimurium DT104 infections linked to raw-milk cheese in Washington State. *JAMA*. 281:1811–6.

Volonte, F., Marinelli, F., Gastaldo, I., Sacchi, S., Pilone, M.S., Pollegioni, I. y Molla, G. 2008. Optimization of glutaryl-7-aminocephalosporanic acid acylase expression in *E. coli*. *Protein Expression and Purification*. 61:131-137.

Wang, I.N., Smith, D.L. y Young, R. 2000. Holins: the protein clocks of bacteriophage infections. *Annual Review of Microbiology*. 54:799-825.

Wen, A., Delaquis, P., Stanich, K. y Toivonen, P. 2003. Antilisterial activity of selected phenolic acids. *Food Microbiology*. 20: 305-311.

Zendo, T., Yoneyama, F. y Sonomoto, K. 2010. Lactococcal membrane-permeabilizing antimicrobial peptides. *Applied Microbiology Biotechnology*. 88:1-9.

Zhang, H., Bao, H., Billington, C., Hudson, J.A. y Wang, R. 2012. Isolation and lytic activity of the *Listeria* bacteriophage endolysin LysZ5 against *Listeria monocytogenes* in soya milk. *Food Microbiology*. 31:133-136.

XI. ANEXOS

Anexo 1. Determinación de la actividad antilisteria de los antimicrobianos naturales en queso fresco tipo Panela

Tomando como referencia los resultados obtenidos en las determinaciones de CMI y CFI para los seis antimicrobianos naturales propuestos, se realizó una prueba preliminar en queso fresco tipo Panela, para determinar el efecto antilisteria de las mezclas de Nisaplin®-fermentos y Nisaplin®-ácido fenólicos, a su vez se incluyeron los tratamientos de Nisaplin®, ácido ferúlico y ácido protocatecuico sin combinar.

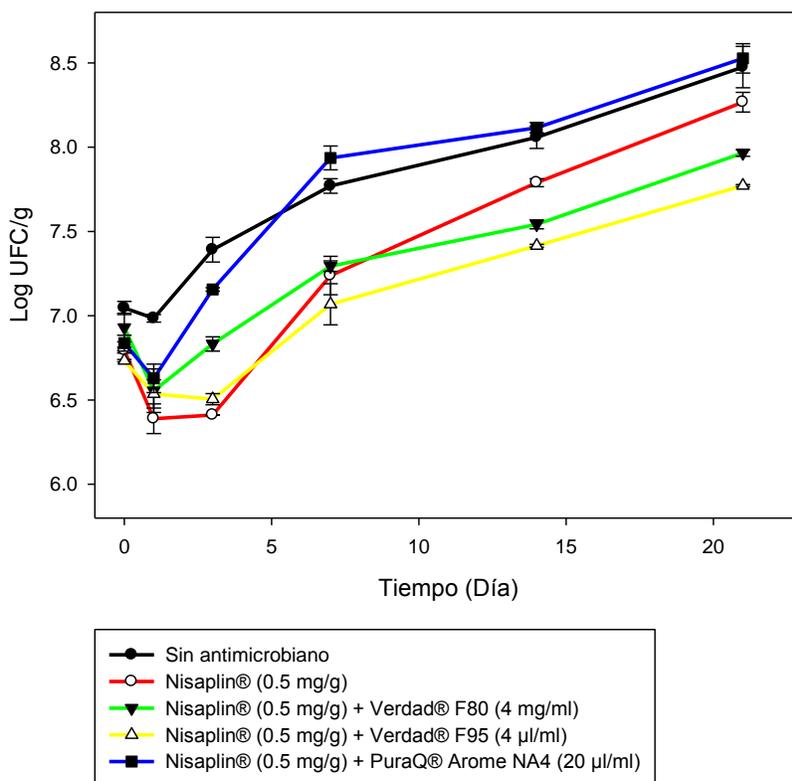


Figura A1. Sobrevivencia de *L. innocua* en queso fresco tipo Panela adicionado de Nisaplin® y sus mezclas con fermentos, almacenado a 4°C.

La concentración de Nisaplin® se fijó en 0.5 mg/g de queso en todos los tratamientos evaluados debido a que es el equivalente de nisina permitido por la NOM-243-SSA1-2010 (Nisaplin® tiene un contenido de 2.5% de nisina). Los ácidos ferúlico y protocatecuico se evaluaron de manera individual a la concentración obtenida del valor de su respectivo CMI. Las mezclas de antimicrobianos con Nisaplin® se seleccionaron de las concentraciones inferiores a los valores CMI individuales de los fermentos y ácidos fenólicos que mostraron inhibición en la prueba de tablero (FIC).

En la Figura A1 se observa el efecto antimicrobiano contra *L. innocua* de Nisaplin® y sus mezclas con fermentos, cuando estos son incorporados en la elaboración de queso fresco tipo Panela. En todos los tratamientos con Nisaplin® se observó una reducción de ~0.5 Log UFC/g al cabo de las primeras 24 h respecto al inóculo inicial de *L. innocua*, a partir del día 3 de almacenamiento se presentó el crecimiento de *L. innocua* alcanzando los recuentos del tratamiento sin antimicrobianos al cabo de 28 días de almacenamiento de los quesos a 4°C.

Estos resultados sugieren dos puntos, el primero que la concentración máxima de nisina permitida por la NOM-243-SSA1-2010 para su adición a quesos no es suficiente para eliminar a este microorganismo con lo que posteriormente se presenta un incremento en el recuento de *L. innocua*, y segundo que la adición de los fermentos junto con Nisaplin® no tiene efecto alguno (positivo o negativo) frente a la inactivación de *L. innocua*. En este punto se descartó la posibilidad de emplear cualquiera de los tres fermentos evaluados como potencial agente antilisteria en queso fresco tipo Panela, aunado al hecho de que incrementar la concentración de dichos fermentos puede tener un impacto negativo en las propiedades organolépticas de este tipo de queso.

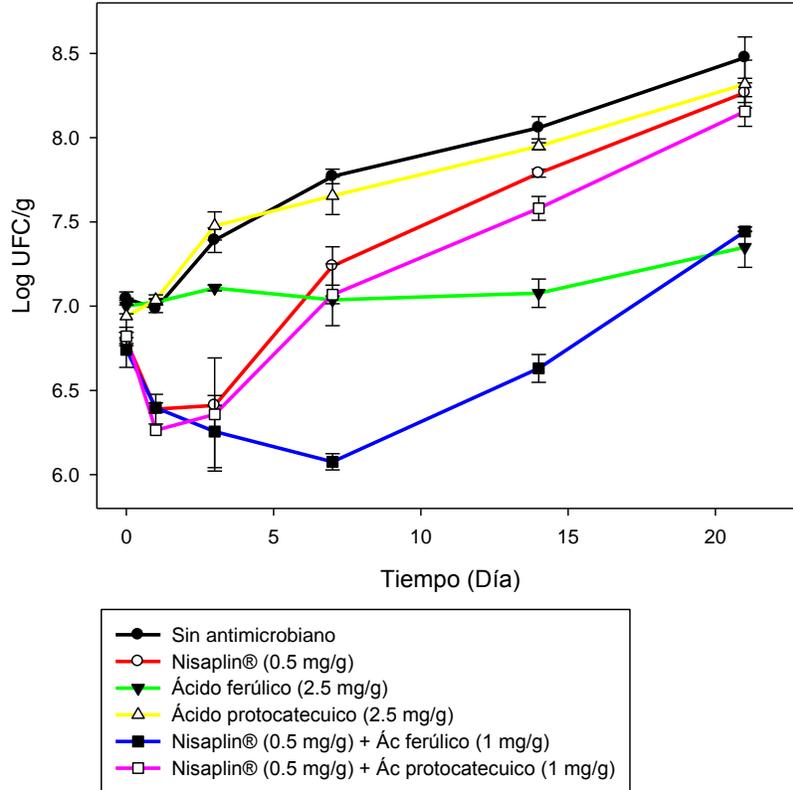


Figura A2. Supervivencia de *L. innocua* en queso fresco tipo Panela adicionado de Nisaplin®, ácidos fenólicos y sus mezclas, almacenado a 4°C.

En la Figura A2 se observa el efecto antimicrobiano contra *L. innocua* de Nisaplin®, ácidos fenólicos y sus mezclas, cuando estos son incorporados en la elaboración de queso fresco tipo Panela. Similar a lo observado en el resultado anterior (Figura A1) en todos los tratamientos que incluyen Nisaplin®, hay una reducción poco más 0.5 Log UFC/g al cabo de las primeras 24 h respecto al inóculo inicial de *L. innocua* (aproximadamente 7 Log UFC/g). La adición del ácido protocatecuico (2.5 mg/g) al queso fresco tipo Panela no mostró ningún efecto antimicrobiano contra *L. innocua*, la supervivencia del microorganismo es similar a la observada en el tratamiento sin antimicrobiano, en el caso de la mezcla Nisaplin®-ácido protocatecuico, no se observaron diferencias en la supervivencia de *L. innocua* respecto al tratamiento al que se incorporó únicamente Nisaplin®. Esto

sugiere que el ácido protocatecuico podría requerir concentraciones mayores a las evaluadas a fin de presentar un efecto antilisteria en el queso fresco tipo Panela.

Lo que respecta al ácido ferúlico, su adición individual al queso fresco tipo Panela, presentó un fuerte efecto bacteriostático manteniendo los recuentos de *L. innocua* sin cambios significativos durante 21 días de almacenamiento a 4°C. En el queso fresco tipo Panela adicionado de la mezcla Nisaplin®-ácido ferúlico, se observa una reducción de la población inicial de *L. innocua* seguido por un alargamiento de la fase lag, obteniendo una diferencia de ~1 Log UFC/g respecto al tratamiento de Nisaplin® al día 21 de almacenamiento. Estos resultados sugirieron que la combinación de Nisaplin® con el ácido ferúlico tiene potencial para controlar el crecimiento de *L. innocua* en queso fresco tipo Panela.

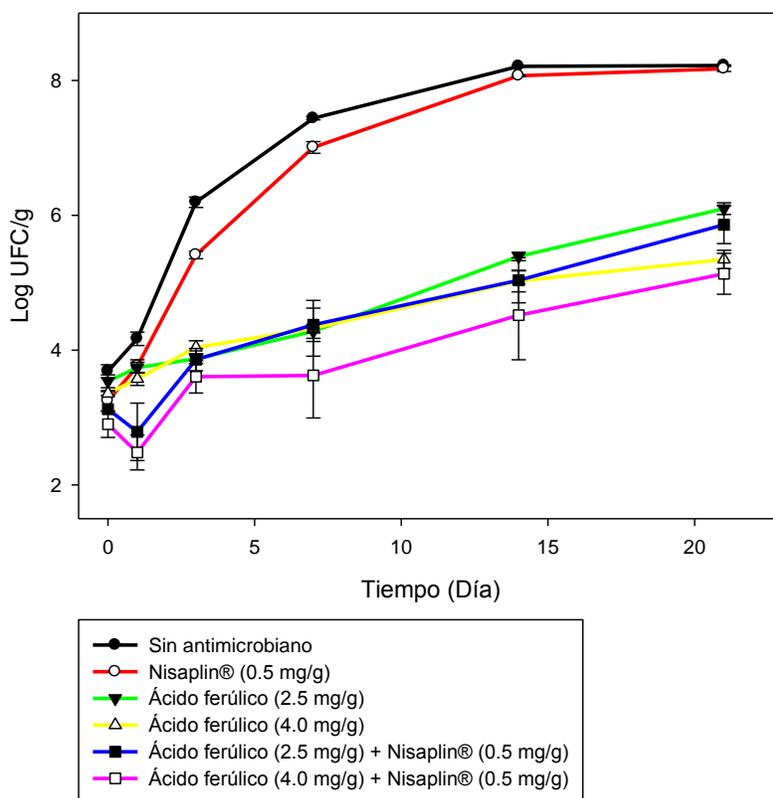


Figura A3. Supervivencia de *L. innocua* en queso fresco tipo Panela adicionado de Nisaplin® y sus mezclas con diferentes concentraciones de ácido ferúlico, almacenado a 4°C.

Tomando como referencia los resultados anteriores, se seleccionó la combinación Nisaplin®-ácido ferúlico para una nueva evaluación contra *L. innocua* en queso fresco tipo Panela. Se evaluaron tres concentraciones diferentes de ácido ferulico (0, 2.5 y 4 mg/g) en combinación con Nisaplin® (0 y 0.5 mg/g).

El aumento de la concentración del ácido ferúlico (Figura A3), conduce a un alargamiento de la fase lag, lo que a su vez disminuye la tasa de crecimiento (pendiente) de *L. innocua* posterior a la reducción inicial producida por Nisaplin® durante las primeras 24 h de almacenamiento del queso a 4°C. Aunque no se observó un efecto bacteriostático muy notable por parte del ácido ferúlico como en el resultado previo (Figura A2), es importante señalar que al cabo de 21 días de almacenamiento de las muestras, *L. innocua* incrementó ~4 Log UFC/g respecto al inóculo inicial (~3.5 Log UFC/g) cuando las muestras de queso no eran adicionadas de antimicrobianos, mientras que las muestras de queso tipo Panela adicionadas de ácido ferúlico (2.5 mg/g y 4.0 mg/g) solo y en combinación con Nisaplin® mostraron un incremento en las cuentas viables de dicho microorganismo no mayor a ~1 Log UFC/g respecto al inóculo inicial al cabo de 21 días de almacenamiento a 4°C.

A pesar de que los resultados de índice CFI (ver VII.4.2) denotaron que la combinación de Nisaplin® y ácido ferúlico actúan de manera sinérgica en la inhibición de *L. innocua*, este efecto positivo de inhibición sólo se observó durante las primeras 24 horas posteriores a la elaboración del queso fresco tipo Panela, a partir del día 3 de almacenamiento, no hay diferencia estadísticamente significativa en la tasa de crecimiento (pendiente) de *L. innocua* cuando el queso es adicionado de ácido ferúlico o su mezcla con Nisaplin®. Por lo anterior, la adición de Nisaplin® resulta innecesaria, concluyendo así que sólo el ácido ferúlico como agente listeriostático tiene potencial para ser incorporado en el queso fresco tipo Panela.