



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA**

**DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN
Y POSGRADO EN ALIMENTOS**

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

**“ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA Y PERFIL DE PÉPTIDOS DE
Lactococcus lactis UQ2 Rif L⁺ COMO CULTIVO PROTECTOR INCORPORADO EN
EL PROCESO DE QUESO TIPO PANELA”**

TESIS

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

Presenta

IBT Angélica Liliana Flores Pérez

Dirigido por:

Dra. Blanca Estela García Almendárez

Santiago de Querétaro
Noviembre 2017



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

**“ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA Y PERFIL DE
PÉPTIDOS DE
Lactococcus lactis UQ2 Rif L⁺ COMO CULTIVO PROTECTOR INCORPORADO EN
EL PROCESO DE QUESO TIPO PANELA”**

TESIS

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

Presenta
IBT Angélica Liliana Flores Pérez

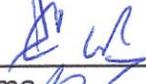
Dirigido por:
Dra. Blanca Estela García Almendárez

Dra. Blanca Estela García Almendárez
Presidente



Firma

Dr. Carlos Regalado González
Secretario



Firma

Dr. Aldo Amaro Reyes
Vocal



Firma

Dr. Rubén Salcedo Hernández
Suplente



Firma

Dr. José Eleazar Barboza Corona
Suplente



Firma



MSP Sergio Pacheco Hernández

Director de la Facultad de Química



Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña

Directora de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro., México
Noviembre 2017

RESUMEN

Uno de los productos lácteos más consumidos en México es el queso tipo panela. Sin embargo, por su alta humedad presenta el riesgo de ser contaminado por microorganismos patógenos y deterioradores. *Lactococcus lactis* UQ2 es una bacteria ácido láctica (BAL) aislada de un queso mexicano y sintetiza nisina por autoinducción. Las proteasas y peptidasas de BAL son el principal factor responsable de la proteólisis y formación de compuestos de sabor del queso. El objetivo de este estudio fue evaluar la proteólisis en el queso panela incorporando *Lactococcus lactis* UQ2 Rif L⁺ como cultivo protector. *L. lactis* y nisina se obtuvieron por fermentación usando un medio de cultivo alternativo, controlando pH, temperatura y agitación en un biorreactor. Ambos fueron microencapsulados mediante secado por aspersión. Los quesos fueron elaborados con leche de vaca pasteurizada y se analizaron por triplicado cada 7 días durante 21 días de almacenamiento. La actividad de nisina se determinó mediante el método de difusión en agar, la viabilidad de *L. lactis* por cuenta en placa, la actividad proteolítica por el método de Kunitz y el perfil peptídico por electroforesis en geles de acrilamida (PAGE) utilizando el sistema Tris-tricina y urea-PAGE. La población total de bacterias y hongos se determinó por cuenta en placa según las normas mexicanas NOM-092-SSA1-1994 y NOM-111-SSA1-1994. La producción de nisina *in situ* fue de 7.07 UI/mL (8 h). Se obtuvo una población de 9.44 log UFC/g de *L. lactis* microencapsulado, con 42.13 % de sólidos recuperados. En el caso de la nisina microencapsulada, se obtuvo una actividad de 6,260 UI/g, con 77.7 % de sólidos recuperados. El máximo crecimiento de *L. lactis* y actividad de nisina en el queso se obtuvo a los 7 días, con 7.56 log UFC/g y 46.34 UI/g, respectivamente. La concentración máxima de tirosina libre liberada fue 0.19 mg/100 g de queso a los 21 días; lo que indicó actividad enzimática, formación de péptidos y liberación de aminoácidos. El perfil de proteólisis reveló hidrólisis de caseínas desde el día 1 y 4 bandas con alta densidad correspondientes a péptidos de bajo peso molecular a los 7 y 14 días (6.2 kDa). La importancia de este trabajo es que *L. lactis* UQ2 Rif L⁺ es una cepa capaz de promover la biopreservación del queso a través de la síntesis de nisina generando actividad proteolítica, además de formar péptidos que pueden ser precursores de sabores y aromas deseables para el consumidor.

(Palabras clave: Queso panela, *L. lactis* UQ2 Rif L⁺, nisina, proteólisis)

SUMMARY

One of the most consumed dairy products in México is the panela cheese type. However, for its high humidity it presents the risk of being contaminated by pathogens and spoilage microorganisms. *Lactococcus lactis* UQ2 is a lactic acid bacteria (LAB) isolated from a Mexican cheese which synthesizes nisin by autoinduction. The proteases and peptidases enzymes of LAB are the main responsible factor for proteolysis and essential compounds formation in cheese ripening, which contributes to the development of its flavor and texture. The objective of this study was to evaluate the proteolysis in the panela cheese incorporating with *Lactococcus lactis* UQ2 Rif L⁺ microencapsulated as protective culture. *L. lactis* and nisin were obtained using an alternative culture medium, controlling pH, temperature, and agitation in bioreactor. Both were microencapsulated by spray drying. Panela cheeses made of pasteurized cow milk were analyzed by triplicate, every 7 days for 21 days. Nisin activity was determined by agar diffusion method, population of *L. lactis* by plaque account, proteolytic activity by Kunitz method and peptide profile by electrophoresis in acrylamide gels (PAGE) using the system Tris-tricine and urea-PAGE. Total bacterial and fungi and yeasts were determined by plaque count, according to the Mexican norms NOM-092-SSA1-1994 and NOM-111-SSA1-1994, respectively. Nisin production was obtained *in situ* with 7.07 IU/mL (8 h). A population of 9.44 log CFU/g of microencapsulated *L. lactis* was obtained, with a recovery of 42.13 % solids. Respecting microencapsulated nisin, a recovery of 77.7 % solids was obtained with an activity of 6260 IU/g. In the cheese, the maximum growth of *L. lactis* and nisin activity was expressed at 7 days at storage, with 46.34 IU/g and 7.56 Log UFC/g, respectively. The maximum concentration of free tyrosine released during ripening was 0.19 mg/100g of cheese; indicating enzymatic activity, peptide formation and amino acid release. The proteolysis profile revealed casein hydrolysis from day 1 and 4 high density bands corresponding to low molecular weight peptides at 7 and 14 days (6.2 kDa). The importance of this work is that *L. lactis* UQ2 Rif L⁺ is a strain capable of promoting the cheese biopreservation through nisin synthesis generating proteolytic activity, in addition to forming peptides which may be precursors of flavors and aromas desirable to the consumer.

(Key words: Panela cheese, *L. lactis* UQ2 Rif L⁺, nisin, proteolysis)

DEDICATORIA

Es muy probable que todos los hijos hayamos pensado alguna vez: “Decirle a mamá cuánto la queremos?

Pero, si ya lo sabe....

¿Agradecerle todo lo que ha hecho por nosotros? Nunca nos ha dejado... ¿Contarle lo que sentimos?

Seguramente se lo imagina...”

Y un día comprendemos que, si bien es cierto que sabe y cree muchas cosas, siempre ha esperado en silencio escucharlas de nosotros...

Porque nos ha dado mucho.

Todo lo que ha podido o ha sabido...

Porque nos ha regalado todos los caminos y nos ha abierto todas las puertas...

Entonces, hoy, no mañana, igual que de pequeños, tal vez sea el momento de decirle....

Gracias

Por tu apoyo incondicional para que terminara la maestría.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Blanca E. García por su ejemplo de dedicación y perseverancia y por los conocimientos heredados,

Al Dr. Regalado, Dr. Aldo, Dr. Rubén Salcedo y Dr. Eleazar Barboza por sus observaciones y aportaciones al presente trabajo,

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada,

A los compañeros del laboratorio por su compañerismo, amistad y momentos compartidos,

A todos los que colaboraron y estuvieron presentes en esta etapa, muchas gracias por su apoyo.

ÍNDICE

Contenido	Página
Resumen	i
Summary	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Índice	v
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE CUADROS	x
1. Introducción	1
2. Revisión de literatura	3
2.1 Queso	3
2.1.2 Queso panela	4
2.2 Enfermedades asociadas al consumo de queso fresco	5
2.3 Bioconservación	6
2.3.1 Actividad bioconservadora de bacterias ácido lácticas	7
2.4 <i>Lactococcus lactis</i> UQ2 Rif L ⁺	9
2.5 Bacteriocinas	9
2.5.1 Clasificación de las bacteriocinas	11

2.5.2	Mecanismo de acción de las bacteriocinas	12
2.6	Nisina	13
2.6.1	Biosíntesis de la nisina	14
2.6.2	Mecanismo de acción de la nisina	15
2.7	Microencapsulación	16
2.8	Bioquímica del sabor del queso	18
2.8.1	Proteólisis en queso	21
2.8.2	Lipólisis en queso	23
2.9	Técnicas electroforéticas	25
2.9.1	Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) con el sistema Tris-tricina	25
2.9.2	Urea PAGE	27
2.9.3	Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE)	27
3	Justificación	28
4	Objetivos	29
4.1	Objetivo general	29
4.2	Objetivos específicos	29
5	Metodología	30
5.1	Cepas microbianas	30

5.2 Producción de nisina y LUQ2	30
5.3 Microencapsulación de LUQ2 y nisina mediante secado por aspersión	31
5.4 Determinación de viabilidad de LUQ2	31
5.5 Determinación de actividad de nisina	32
5.5.1 Activación de <i>Micrococcus luteus</i>	32
5.5.2 Curva calibración de actividad de nisina	32
5.5.3 Determinación de la actividad de nisina	33
5.6 Elaboración del queso tipo panela	34
5.7 Análisis microbiológico	34
5.7.1 Determinación de la cuenta bacteriana total	34
5.7.2 Determinación de hongos y levaduras	35
5.8 Determinación de actividad de nisina en queso tipo panela	35
5.9 Determinación de la población de <i>L. lactis</i> UQ2 Rif L ⁺ en el queso tipo panela	36
5.10 Determinación de actividad proteolítica en queso tipo panela	36
5.11 Elaboración de PAGE con el sistema Tris-tricina	38
5.11.1 Preparación de geles	38
5.11.2 Preparación de las muestras y condiciones de la corrida	40
5.12 Elaboración de Urea PAGE	41

5.12.1	Preparación de geles	41
5.12.2	Preparación de las muestras y condiciones de la corrida	42
5.13	Elaboración de electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE)	42
5.13.1	Extracción de ADN	42
5.13.2	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) anidada	43
5.13.3	Corrida de DGGE	44
6	Resultados y discusión	46
6.1	Crecimiento LUQ2 y producción de nisina en biorreactor	46
6.2	Determinación microbiológica en queso panela	51
6.3	Viabilidad de LUQ2 microencapsulado y actividad de nisina en el queso tipo panela	52
6.4	Actividad proteolítica en el queso tipo panela	56
6.5	Perfil proteico en el queso tipo panela	61
6.5.1	Urea PAGE	61
6.5.2	Tris-tricina	63
6.5.3	DGGE	67
7	Conclusiones	69
8	Referencias	71
9	Anexos	86

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estructura de la nisina	13
2	Organización transcripcional del clúster de genes biosintéticos de nisina	14
3	Mecanismo de acción de la nisina	16
4	Vías metabólicas que conducen la formación de compuestos de sabor en el queso	19
5	Curva de calibración de nisina	46
6	Crecimiento de LUQ2 durante 8 h de fermentación	48
7	Actividad de nisina y en viabilidad de LUQ2 en queso	53
8	Curva estándar de tirosina	56
9	Actividad proteolítica en queso	58
10	Gel urea PAGE en queso con cultivo protector	61
11	Gel urea PAGE en queso sin cultivo protector	61
12	Gel Tris- tricina PAGE de queso tipo panela con cultivo protector	64
13	Análisis densitométrico del gel Tris-tricina PAGE de queso tipo panela con cultivo protector	64
14	Gel Tris- tricina PAGE de queso tipo panela sin cultivo protector	65
15	Análisis densitométrico del gel Tris-tricina PAGE de queso tipo panela sin cultivo protector	65
16	Gel DGGE PAGE de queso tipo panela con cultivo protector y sin cultivo protector	68

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Proteínas presentes en la leche bovina	22
2	Preparación de la curva estándar de tirosina	37
3	Preparación de la actividad proteolítica en queso tipo panela	38
4	Preparación del gel separador (16.5 % T, 6 % C) y gel concentrador (4 % T, 3 % C), Tris-tricina PAGE	39
5	Preparación del gel separador (15 % T) y el gel concentrador (4 % T), Urea PAGE	41
6	Preparación de PCR	44
7	Preparación del gel DGGE	45
8	Halos de inhibición producidos por nisina en medio Assay inoculado con <i>M. luteus</i>	47
9	Actividad de nisina durante la primera fermentación	47
10	Actividad de nisina durante la segunda fermentación	47
11	Actividad de nisina microencapsulada	50
12	Balance de sólidos en el proceso de microencapsulado	50
13	Determinación de cuenta bacteriana total en quesos con cultivo protector	51
14	Actividad proteolítica en queso con cultivo protector	57
15	Actividad proteolítica en queso sin cultivo protector	58

1. Introducción

La competitividad a la que se enfrentan las empresas lácteas hoy en día hace evolucionar la implementación de nuevos procesos que mejoren la calidad de los productos, manteniendo en éstos sus propiedades físico-químicas y sensoriales, así como buenas prácticas de higiene y de conservación. Por lo general, los productos lácteos se conservan por medio de procedimientos físicos como la aplicación de refrigeración, congelación o deshidratación; o por medio de productos químicos como la sal, los ácidos orgánicos o los conservadores. Sin embargo, la adición de cultivos protectores de origen lácteo puede sintetizar nuevos componentes de sabor que promuevan perfiles sensoriales agradables en los consumidores.

La bioconservación es el uso de microorganismos antagonistas o sus metabolitos para inhibir o destruir el crecimiento de microorganismos indeseables. Los microorganismos que con mayor frecuencia se utilizan como bioconservadores son las bacterias ácido lácticas (BAL) y las levaduras.

La fermentación bacteriana contribuye al sabor y a la conservación del queso. De acuerdo a Cotter *et al.* (2005), en un principio la acción conservante de las BAL se explicaba por la producción de ácidos orgánicos y peróxido de hidrógeno, hasta que un agente antimicrobiano llamado bacteriocina fue aislado de *Lactococcus lactis*.

Las bacteriocinas son péptidos con actividad antimicrobiana que son secretados por bacterias lácticas durante la fase exponencial del crecimiento o al final de ella, y la salida al medio es producto de la excreción celular.

Lactococcus lactis ssp. *lactis* son bacterias ácido lácticas utilizadas en la fermentación de productos lácteos, son capaces de sintetizar nisina, bacteriocina que se ha usado ampliamente en la industria. Por otra parte, las enzimas proteasas y peptidasas de BAL son el principal factor responsable de la proteólisis y formación de compuestos esenciales en la maduración de un queso, lo que contribuye al desarrollo su sabor y textura.

Lactococcus lactis UQ2 es una cepa aislada en el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Química de un queso mexicano, que ha demostrado buen desarrollo en la leche y en el perfil sensorial del queso tipo panela, además de que sintetiza la bacteriocina genéticamente identificada como nisina tipo A (García-Almendárez, *et al.*, 2008).

En el presente estudio, la cepa modificada *L. lactis* UQ2 Rif L⁺ (LUQ2) se incorporó como cultivo bioprotector, lo que dio origen a la producción de nisina *in situ* en un queso tipo panela, se evaluó la actividad proteolítica y el perfil de péptidos del producto para ser relacionados con parámetros sensoriales.

2. Revisión de literatura

2.1 Queso

El queso se define como un producto elaborado con la cuajada de leche estandarizada y pasteurizada de vaca o de otras especies animales, con o sin adición de crema, obtenida por la coagulación de la caseína con cuajo, microorganismos lácteos, enzimas apropiadas, ácidos orgánicos comestibles y con o sin tratamiento ulterior por calentamiento, drenada, prensada o no, con o sin adición de fermentos de maduración, mohos especiales, sales fundentes e ingredientes comestibles opcionales, dando lugar a las diferentes variedades de quesos de acuerdo a su proceso: fresco, madurado o procesado (NOM-243-SSA1-2010).

Por otra parte, el Codex Alimentarius (1999), define al queso como “un producto lácteo elaborado con la cuajada de leche entera, parcial o totalmente descremada de vaca o de otra especie animal, por la coagulación de la caseína con el cuajo (quimosina o renina), otras enzimas, microorganismos lácteos, ácidos orgánicos, y la adición o no de cultivos iniciadores, aditivos y condimentos”.

Los quesos se clasifican según el proceso de elaboración en quesos frescos, sin maduración y sin adición de fermento; quesos madurados, con maduración y adición de fermento; quesos fundidos y procesados a partir de la fusión de diferentes variedades de quesos (Codex Alimentarius, 1999).

El queso fresco es el queso que está listo para su consumo inmediatamente después de su elaboración (Ochoa-Flores, 2013). Los quesos frescos de acuerdo a la norma oficial mexicana (NOM-243-SSA1-2010) “son aquellos que se caracterizan por su alto contenido de humedad, y por no tener corteza o tener corteza muy fina, pudiendo o no adicionarle aditivos e ingredientes opcionales. Se consideran como quesos frescos el panela, canasto, sierra, ranchero, blanco, enchilado y adobado”.

2.1.2 Queso panela

El queso panela es un queso fresco de pasta blanda, autoprensado, con sabor lácteo suave y con un ligero sabor salado (Villegas y Cervantes, 2011). Es caracterizado por su alta humedad y susceptible al deterioro, por lo que es consumido dentro de los primeros días de haber sido elaborado (Jiménez-Guzmán *et al.*, 2009; Guerra-Martínez *et al.*, 2012). Su composición química consta de 53-58 % de humedad, 19-29 % de grasa, 16-20 % de proteína y 1.5-2.2 % de sal (PROFECO, 2007; Cervantes-Escoto *et al.*, 2008). La humedad del queso desempeña un papel fundamental en sus propiedades sensoriales y en textura, así como en su vida de anaquel y rendimiento. Sin embargo, el queso fresco es un sistema que sufre con el tiempo cambios en su contenido de humedad, su textura, atributos sensoriales y rendimiento (Ochoa-Flores, 2013)

En México, el queso panela tiene una buena aceptación entre los consumidores debido a su sabor, desmoronamiento y buenas propiedades de rebanado. Por lo tanto, es fabricado por la industria en grandes volúmenes debido a su alta demanda. Según las últimas cifras reportadas en el Boletín de la leche (SIAP, 2017), en mayo de 2017 hubo una producción en México de queso panela de 4, 375 ton, lo que produjo para el mismo mes 244, 480 miles de pesos. En el 2016 la producción total de queso panela fue de 51, 239 ton; su producción superó a todos los quesos reportados: el queso amarillo (48,675 ton), el queso chihuahua (38, 772 ton), el doble crema (50, 559 ton), el queso manchego (34, 393) y el queso Oaxaca (24, 366 ton).

En Estados Unidos, el interés y aceptación de los quesos tipo hispano ha aumentado debido al crecimiento de la población hispana, además del interés de los consumidores en probar comidas latinoamericanas (Guerra-Martínez *et al.*, 2012). Según datos de la USDA (2017), en el 2016 en Estados Unidos se contaba con 59 plantas queseras productoras de quesos hispanos y obtuvieron un total de ingresos de 266, 254 mil libras.

2.2 Enfermedades asociadas al consumo de queso fresco

La leche cruda es leche que no ha sido pasteurizada (calentada a una temperatura específica durante un tiempo establecido) para eliminar los microorganismos nocivos que pudiera haber en ella. Estos microorganismos nativos normalmente no cambian el aspecto, ni el olor de la leche hasta su descomposición. La pasteurización es la mejor manera de asegurarse de que la leche sea segura para su consumo (CDC, 2017).

La presencia de microorganismos patógenos en queso depende de la calidad y el tratamiento térmico de la leche, la limpieza en general de la quesería, la calidad de los cultivos lácteos adicionales, el manejo de la cuajada durante el procesamiento, y la temperatura de almacenamiento, transporte y distribución del queso (FDA, 2016).

Los microorganismos patógenos que se han reportado en derivados lácteos son generalmente *Escherichia coli* O157:H7, *Clostridium botulinum*, *C. perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* tipo emético, *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella* sp., *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes* (González y Rojas, 2005; Sánchez-Valdés *et al.*, 2016).

En México, no se tienen definidos los antecedentes de los productos incriminados, aparentemente se trata de quesos frescos no pasteurizados o contaminados por las personas que los elaboran. Sin embargo, datos de la Secretaría de Salud y Asistencia en México, demuestran que los quesos ocupan el 32 % de los alimentos involucrados en brotes de enfermedades por consumo (Torres-Torres *et al.*, 2007).

Consumir alimentos contaminados provoca enfermedades gastrointestinales; las infecciones agudas del tracto gastrointestinal figuran entre las enfermedades infecciosas más frecuentes. De acuerdo con estadísticas del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), las infecciones como gastroenteritis, salmonelosis, tifoidea y cólera representan un severo problema de salud pública (González y Rojas, 2005).

En Estados Unidos, desde 1993 hasta el 2012 hubo 127 brotes que fueron vinculados a la leche cruda (CDC, 2017). Estos brotes hicieron que se enfermaran 1,909 personas y que 144 fueran hospitalizadas. La mayoría de los 127 brotes fueron causados por *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, productora de la toxina de Shiga, o por *Salmonella*. Los brotes notificados representan la punta del iceberg. La mayoría de las enfermedades transmitidas por los alimentos no son parte de un brote reconocido, y por cada brote y cada caso de enfermedad que se notifica, hay muchos más que ocurren.

Un gran número de brotes causados por leche cruda y queso fresco afectan a niños. Desde el 2007 hasta el 2012, por lo menos un niño menor de cinco años fue afectado en el 59 % de los brotes causados que se notificaron en la CDC (2017). En estos brotes, el 38 % de las enfermedades fueron causadas por *Salmonella* y el 28 % causadas por *E. coli*, productora de la toxina de Shiga.

2.3 Bioconservación

La bioconservación es la incorporación de cultivos o sus metabolitos para eliminar o evitarla presencia de microorganismos patógenos o deterioradores en una amplia variedad de alimentos (Kaškonienė *et al.*, 2016).

Se pueden describir dos tipos de cultivos, los cultivos iniciadores que frecuentemente son utilizados en la elaboración de productos lácteos fermentados y cultivos protectores que se emplean para lograr la preservación de los alimentos, inhibiendo microorganismos patógenos e indeseables (Bajpai, *et al.*, 2016).

Las bacterias ácido lácticas tienen la característica de ser cultivos iniciadores y tener efecto protector. Sin embargo, también son empleadas como bioconservadores en la industria de alimentos por su capacidad de inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos al producir compuestos de bajo peso molecular, como ácidos orgánicos, dióxido de carbono, peróxido de hidrógeno, diacetil (2,3 - butanodiona) y bacteriocinas (Messens y De Vuyst, 2002; Ammor *et al.*, 2006; Bajpai, *et al.*, 2016).

2.3.1 Actividad bioconservadora de bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas (BAL), constituyen un grupo heterogéneo de microorganismo que producen ácido láctico en el proceso de la fermentación. BAL son bacterias Gram positivas, catalasas negativas, facultativas anaerobios, no esporulados, no reductores de nitritos y generalmente inmóviles (Álvarez-Sieiro *et al.*, 2016).

BAL son consideradas por la FDA (Food and Drug Administration) como bacterias GRAS (Generally Recognized As Safe) y por la EFSA (European Food Safety Authority) como bacterias QPS (Qualified Presumption of Safety) (Álvarez-Sieiro *et al.*, 2016). Por esta razón, son ampliamente utilizadas en la elaboración de alimentos fermentados, con el propósito de brindar sabor, color y aroma (Leroy y De Vuyst, 2004; Gad *et al.*, 2016; Macaluso *et al.*, 2016).

La actividad de bioconservación de las BAL también es resultado de la competencia por nutrientes debido a su capacidad de producir ácido láctico y otros ácidos orgánicos que disminuyen el pH de los alimentos, inhibiendo así el crecimiento de bacterias patógenas. Las BAL también producen peróxido de hidrógeno, el cual ha demostrado que inhibe bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Staphylococcus* y *Salmonella* (Ammor *et al.*, 2006; Gad *et al.*, 2016).

Las bacteriocinas y otros metabolitos producidos por BAL también se consideran como compuestos seguros con algunas otras propiedades, por ejemplo de estabilidad, actividad antimicrobiana y conservación del sabor (Cotter *et al.*, 2005; Kaškonienė *et al.*, 2017).

Se ha evaluado la utilización de cultivos de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* en la elaboración de queso blanco por su capacidad de producir nisina. Castro (2007), inoculó la leche con bacterias coliformes, *Staphylococcus aureus* y el cultivo protector observando que se inhibía el crecimiento de bacterias patógenas. Sin embargo, cuando se inoculaba la leche con 10^3 UFC/mL de *Staphylococcus aureus*, el cultivo protector no inhibía su crecimiento.

Hamama *et al.* (2002), trabajaron con cultivos de *Lactococcus lactis* productores de nisina en queso Jben, queso griego tradicional elaborado con leche cruda. Se demostró que la nisina producida por *L. lactis* perdía su efecto inhibitorio frente a 10^5 UFC/g de *Staphylococcus aureus* inoculado desde la elaboración del queso.

Rodríguez (2005), encontraron un efecto inhibitorio en las cepas de *Lactococcus lactis*, productoras de pediocina y nisina, sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli*, en quesos madurados elaborados a partir de leche pasteurizada.

También se han estudiado cepas autóctonas, productoras de bacteriocinas, que fueron aisladas de productos lácteos elaborados sin ningún cultivo comercial adicionado. Tal es el caso de Salinas (2001), que utilizó cultivos de *Enterococcus faecalis* aislados de queso palmita. El cultivo inhibió el crecimiento de *Listeria monocytogenes*, proporcionó buenas características organolépticas y aceptables parámetros microbiológicos.

2.4 *Lactococcus lactis* UQ2 Rif L⁺

Lactococcus lactis UQ2 Rif L⁺ (LUQ2) es una cepa aislada de un queso mexicano, mediante conjugación posee mayor capacidad de producción de nisina tipo A que la cepa original, resistencia a la rifampicina y actividad de fosfo- β -galactosidasa (García-Parra *et al.*, 2010).

2.5 Bacteriocinas

Las bacteriocinas son un grupo de péptidos extracelulares, con propiedades antimicrobianas, principalmente relacionadas taxonómicamente con la especie o género productor. Son producidas ribosomalmente, transformadas o no por enzimas con modificaciones postraduccionales, secretadas hacia el medio extracelular y pueden ayudar al organismo productor a competir con otras especies bacterianas (Cotter *et al.*, 2005, Álvarez-Sieiro *et al.*, 2016).

Álvarez-Sieiro *et al.* (2016), analizaron un total de 238 genomas completos de BAL en bases de datos públicas, pertenecientes a los géneros *Aerococcus*, *Bifidobacterium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconstoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus* y *Weisella*, de las cuales se obtuvo una lista de 785 grupos de genes de bacteriocinas.

Las bacteriocinas son resistentes al calor e hidrolizadas por proteasas gástricas, lo que permite su posible utilización como conservadores naturales de los alimentos (Barbosa *et al.*, 2016).

Las formas de incorporación de las bacteriocinas en la preservación de alimentos son la inoculación con cultivos iniciadores o protectores que producirán bacteriocinas en el alimento. Otra forma es la adición de bacteriocinas purificadas o semi-purificadas y el uso de un producto previamente fermentado con un cultivo productor de bacteriocina, como ingrediente dentro del procesamiento de un alimento (Macaluso *et al.*, 2016).

Las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas (BAL) son particularmente interesantes debido al uso seguro de algunas de ellas, consideradas con estatus GRAS y QPS (Álvarez-Sieiro *et al.*, 2016). Hasta ahora, sólo se han comercializado la nisina como aditivo alimentario y la pediocina PA-1 como ingrediente, en forma de “ALTA 2431” (Quest), la cual se obtiene por fermentación de la cepa productora *Pediococcus acidilactici* (Nishie *et al.*, 2012; Mondragón *et al.*, 2013).

Sin embargo, otras bacteriocinas del BAL también ofrecen perspectivas prometedoras para ser utilizadas como biopreservadores en los alimentos, como por ejemplo la enterocina AS-48 (Sánchez-Hidalgo *et al.*, 2011) o la lacticina 3147 (Suda *et al.*, 2012).

Las cepas de BAL también se proponen como probióticos, es decir, microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud al huésped. En los últimos años, varios estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que las bacteriocinas de BAL presentan un efecto protector en el tracto gastrointestinal al excluir patógenos o promover la colonización intestinal (Corr *et al.*, 2007; Kommineni *et al.* 2015). Por ejemplo, *Lactobacillus salivarius* UCC118 protege a los ratones contra la infección con el patógeno *L. monocytogenes* (Corr *et al.*, 2007), y la cepa *Streptococcus mutans* BCS3-L1 es capaz de reemplazar las poblaciones existentes de *S. mutans* y persistir con el tiempo (Hillman *et al.*, 2000).

2.5.1 Clasificación de las bacteriocinas

Teniendo en consideración las propiedades físico-químicas, el tamaño, el espectro de inhibición y la presencia de aminoácidos modificados, las bacteriocinas de las bacterias lácticas se clasifican en 4 clases desde los últimos cinco años.

Los lantibióticos (Clase I) son péptidos pequeños (< 10 kDa), termoestables y que se caracterizan por la presencia de aminoácidos no usuales (Arnison *et al.* 2013). Éstos se generan por modificaciones postraduccionales, por deshidratación de serina y treonina formando dehidroalamina (Dha) y dehidrobutirina (Dhb) respectivamente, estos residuos pueden unirse a través de un grupo tioéter a cadenas laterales de cisteína dando lugar a aminoácidos inusuales como lanionina (Lan) y α -metil-lanionina (MeLan) (Beristain-Bauza, 2012). Algunos lantibióticos son enteriocina AS-48, estreptolisina S, subtilisina, microcina J25 y nisina A producida por *L. lactis* (Ortega, 2015).

Se distinguen 2 tipos de lantibióticos: El tipo A, que son péptidos de 2,164 a 3,488 Da, de estructura terciaria sacacorchos, anfipáticos y con 2 a 7 cargas positivas; el tipo B, son péptidos de estructura globular, con tamaños entre 1,959 y 2,041 Da, sin carga o cargados negativamente. Hasta el momento, no se han identificado lantibióticos de tipo B dentro de las bacterias lácticas. La nisina A, producida por *L. lactis*, fue el primer lantibiótico conocido y pertenece al tipo A. Dentro de este grupo se encuentran la nisina Z variante natural de la nisina A con una sustitución His27Asn, la lacticina 481 de *L. lactis*, la lactocina S y la plantaricina C sintetizadas por *Lactobacillus sake* y *Lb. plantarum*, respectivamente y la carnocina UI49 producida por *Carnobacterium piscícola*, entre otros (Knerr y van der Donk, 2012).

Los no lantibióticos (Clase II) son péptidos pequeños (<10 kDa) termoestables y que no contienen aminoácidos modificados en su estructura primaria. Junto con los lantibióticos es la clase más numerosa de bacteriocinas. Algunas bacteriocinas no lantibióticas son pediocina PA-1, lactococina Q, lacticina Q y laterosporulina (Nishie *et al.*, 2012; Alvarez-Sieiro *et al.*, 2016).

La Clase III son proteínas de más de 10kDa que están constituidas exclusivamente por aminoácidos no modificados y son sensibles al calor (Beristain-Bauza, 2012).

Las bacteriocinas mixtas (Clase IV) presentan en la parte peptídica un componente glucídico o lipídico esencial para su actividad biológica. Como ejemplo de bacteriocinas con fracciones glucídicas se encuentra la leucocina S (Arnison *et al.*, 2013).

2.5.2 Mecanismo de acción de las bacteriocinas

Las bacteriocinas producidas por BAL se distinguen en 2 grupos con diferente espectro de inhibición. En el primer grupo se encuentran las bacteriocinas que inhiben cepas relacionadas, como las lactococinas A, B, M, G, lactacina B y helveticina. En el segundo grupo se encuentran las bacteriocinas que inhiben un rango amplio de microorganismos, ya sea patógenos y Gram positivos; por ejemplo la nisina, pediocinas y lactacina F (Beristain-Bauza, 2012).

Por otra parte, los lantibióticos actúan sobre células vegetativas y también inhiben la germinación de esporas (Egan *et al.*, 2016). Por ejemplo, *Clostridium difficile* es el patógeno entérico más frecuentemente identificado en pacientes con diarrea nosocomial asociada a antibióticos y colitis pseudomembranosa. Le Lay *et al.* (2016), inhibieron el crecimiento de todos los aislamientos de *C. difficile* con 6,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de nisina Z y 0,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de nisina A.

El blanco de acción de las bacteriocinas es la membrana plasmática alterando su permeabilidad selectiva. Provocan liberación tanto de iones, como de compuestos de bajo peso molecular y posteriormente de ATP intracelular. Estos cambios ocasionan la disipación completa o parcial de la fuerza protón motriz inhibiendo la generación de

(Cotter *et al.*, 2005). La actividad de la nisina es medida en unidades internacionales (UI), y la actividad aproximada de 1 µg de nisina pura es de 40 UI (Davidson, *et al.*, 2005; Rossi-Márquez *et al.*, 2009).

2.61 Biosíntesis de la nisina

La nisina (contemplando la de LUQ2) es producida por un grupo de 11 genes *nisABTCIPRKFEG*, involucrados en su biosíntesis, regulación e inmunidad. Conforme a la Figura 2, el clúster de genes biosintéticos de la nisina está conformado por 4 unidades transcripcionales. El primer operón consiste en *nisA*, el gen estructural de la nisina tipo A, que está separado de la maquinaria de modificación. *nisBTCIP*, es un gen embebido que codifica la proteína de inmunidad *nisl* y los genes reguladores *nisRK*. Posteriormente el gen *nisl* está precedido por un promotor interno, que permite la expresión de la proteína de inmunidad antes de que se establezca la producción completa de nisina. Los genes reguladores del sistema de dos componentes *NisRK*, están precedidos por un promotor débil. El cuarto operón codifica las proteínas de inmunidad *nisFEG*. Los promotores marcados P* son controlados por un sistema de dos componentes *NisRK*, mientras que la transcripción de *nisRK* y *nisl* (P) es constitutiva (Lubelskia *et al.*, 2007).

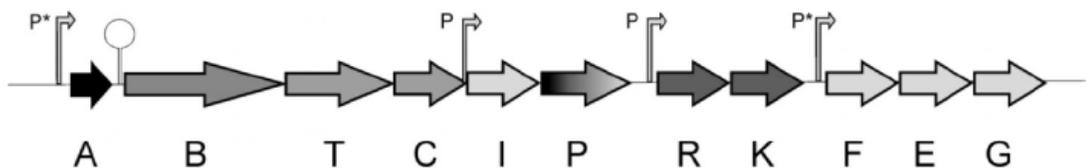


Figura 2. Organización transcripcional del clúster de genes biosintéticos de nisina.

Cuatro unidades transcripcionales separadas están presentes en la regulación de nisina (Lubelskia *et al.*, 2007). A, B, T, C, I, P, R, K, F, E y G representan los 11 genes biosintéticos de la nisina, P* indica promotor y P promotor interno.

La biosíntesis de los 11 genes es regulada por autoinducción, los promotores que transcriben los operones *nisBTCIP* (biosíntesis e inmunidad) y *nisFEG* (inmunidad) son controlados por el sistema de dos componentes *nisRK* que responde a la concentración de nisina en un sistema de detección “quorum sensing” (QS) (Lubelski *et al.*, 2008).

El mecanismo QS es un sistema de comunicación bacteriana que describe la capacidad de un microorganismo para percibir y responder a la densidad poblacional mediante la regulación de la expresión genética y se ha mostrado también para los antibióticos de tipo II tales como la bovicina HJ50 (Ni *et al.*, 2011).

2.6.2 Mecanismo de acción de la nisina

La nisina actúa sobre bacterias Gram positivas. En el primer caso, como se describirá posteriormente, forma canales iónicos en la membrana plasmática; en el segundo, modifica los grupos sulfhidrilo presentes en la envoltura de la espora (Breukink y Kruijff, 2006).

La nisina lleva a cabo un mecanismo dual sobre las bacterias Gram positivas: A) penetración de baja afinidad por uniones electrostáticas. B) inhibición de la síntesis de la pared celular dirigida por la molécula lípido II.

La nisina se une a la membrana celular mediante atracciones electrostáticas, lo cual se facilita debido a la carga positiva de este péptido y las cargas negativas de los componentes de la pared celular. Posteriormente, la nisina se une al lípido II, el transportador principal de las subunidades de peptidoglicano, desde el citoplasma a la pared celular. Por lo tanto previene la síntesis correcta de la pared celular, provocando la formación de un poro transmembranal de 8 subunidades de nisina y 4 subunidades de lípido II (Hsu *et al.*, 2004) (Figura 3).

Estas alteraciones provocan la disipación completa o parcial de la fuerza motriz (PMF) ocasionando desórdenes metabólicos secundarios que, en último término,

inhiben la generación de energía y la síntesis de macromoléculas, lo que supone la muerte celular (de Kruijff *et al.*, 2008).

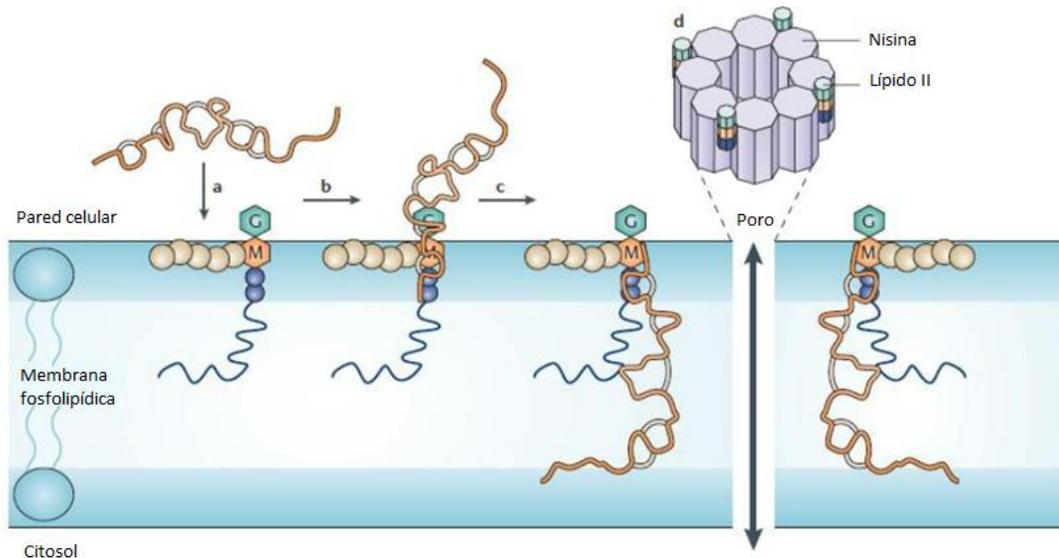


Figura 3. Mecanismo de acción de la nisina. a. Unión de la nisina a la pared celular. b. Unión de la nisina a la molécula lípido 2. c. Formación de poro transmembranal (Breukink y de Kruijff, 2006).

2.7 Microencapsulación

La microencapsulación se define como una tecnología para la contención de sólidos, líquidos o materiales gaseosos en cápsulas selladas en miniatura (1–1000µm) que pueden liberar su contenido a velocidades controladas bajo condiciones específicas para evitar pérdidas de la actividad biológica y la estabilidad de los ingredientes activos (Desai y Jin, 2005; Nazarro *et al.*, 2012).

Existen varios procesos para producir microencapsulados, entre los que están el secado por aspersión, la aspersión con enfriamiento, el lecho fluidizado, la coacervación/separación de fase, la gelación, la evaporación de solvente, la expansión de fluido supercrítico, la polimerización interfacial (policondensación), la polimerización de la emulsión y la extrusión (Nesterenko *et al.*, 2013).

Actualmente el secado por aspersion es uno de los métodos más utilizados en la industria alimenticia. Se usa con el propósito de proteger ingredientes que son sensibles a la luz y el oxígeno y disminuir la formación de radicales libres (Nesterenko *et al.*, 2013).

Un paso importante en el proceso de microencapsulación es la selección de materiales de encapsulación apropiados. Los polímeros deben ser químicamente compatibles, no reactivos con el componente para encapsular y proporcionar el revestimiento deseado, con características tales como resistencia, flexibilidad, impermeabilidad y estabilidad (Maresca *et al.*, 2016).

Los polisacáridos son utilizados frecuentemente para la encapsulación de materiales para la industria alimentaria, dentro de los que destacan la celulosa, el almidón y sus derivados como la amilosa, amilopectina, maltodextrosa, entre otros (Maresca *et al.*, 2016).

Cuando la nisina libre se agrega a la leche para la conservación del queso, la mayoría de la nisina se adhiere a las superficies de grasa y proteína, teniendo menor accesibilidad atacar a las células bacterianas. Este método no permite una distribución homogénea de la nisina en la matriz de queso (Lawuyi *et al.*, 2007).

Para superar estas limitaciones, la microencapsulación de nisina puede ofrecer las siguientes ventajas: (1) reducir o evitar la afinidad de la nisina a los componentes del alimento, (2) actuar como conservador a largo plazo en alimentos almacenados durante largos períodos de tiempo, y (3) proteger la nisina de inhibidores o condiciones desfavorables que ocurren naturalmente en la matriz alimentaria (Laridi *et al.*, 2003).

Algunos autores han descrito previamente la microencapsulación de nisina usando diferentes matrices (Xiao *et al.*, 2011; Xiao y Zhong, 2011; Narsaiah *et al.*, 2012; Huq *et al.*, 2014, Khaksar *et al.*, 2014).

Por otra parte, la adición de microorganismos al queso durante su elaboración, pueden afectar el crecimiento y la producción de ácido y aroma de los cultivos iniciadores o propios de la leche, reduciendo así la calidad global del producto final (Laridi, 2003; Lawuyi *et al.*, 2007).

La microencapsulación de microorganismos puede ofrecer las siguientes ventajas: (1) proteger y mantener viabilidad durante almacenamiento y en el producto, (2) proteger las células contra la acción de antimicrobianos (3) favorecer la producción de bacteriocinas regulada por quórum sensing (González-Sánchez *et al.*, 2010).

2.8 Bioquímica del sabor del queso

El desarrollo del sabor del queso tiene gran interés económico, ya que el sabor final determina en parte la elección del consumidor. La formación del sabor se produce durante el almacenamiento del queso y es un proceso complejo en el que están involucradas tres vías catabólicas principales: glicólisis, lipólisis y proteólisis (Figura 4).

Principalmente, la calidad y el sabor del queso está muy influenciado por los niveles de péptidos, aminoácidos y ácidos grasos libres resultantes de la proteólisis y la lipólisis durante el almacenamiento del queso (Ozturkoglu-Budak *et al.*, 2016).

Las cepas de *Lactococcus lactis* han sido ampliamente usadas como cultivos iniciadores para la producción de quesos suaves y semiduros. Los cultivos iniciadores a la venta están limitados por un número de productores, lo que ha restringido el número de cepas utilizadas en fermentaciones industriales lácteas y ha contribuido a la reducción de la diversidad del sabor del queso (Fernández de Palencia *et al.*, 2006; Macaluso *et al.*, 2016).

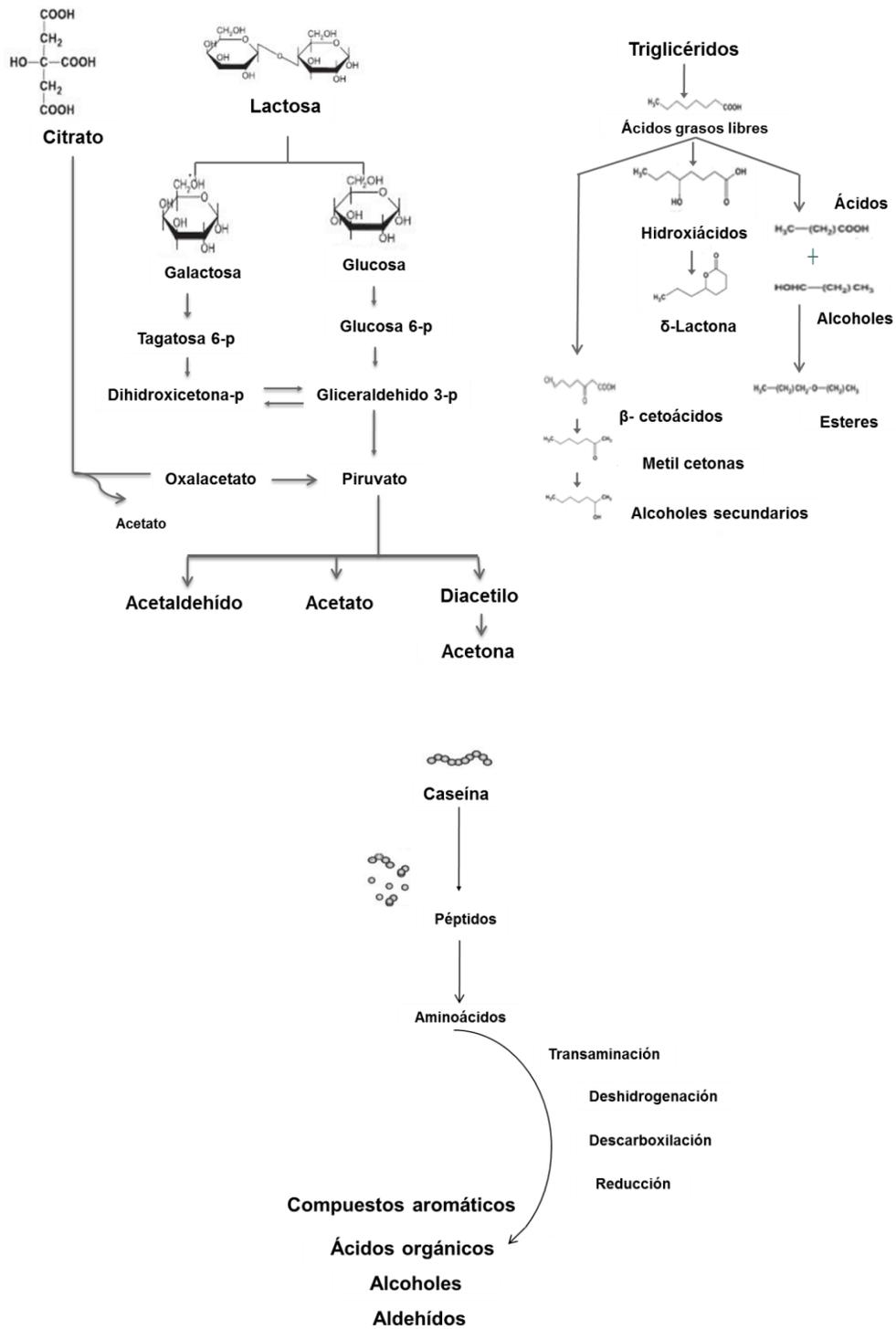


Figura 4. Vías metabólicas que conducen la formación de compuestos de sabor en el queso (Modificado de Marilley y Casay, 2004).

Se ha demostrado que las diferencias sensoriales entre los quesos elaborados con leche cruda y los quesos elaborados con leche pasteurizada dependen principalmente de la diversidad y complejidad de las comunidades microbianas presentes en la leche cruda (Ballesteros *et al.*, 2006).

En comparación con cepas industriales, las cepas nativas de *L. lactis* producen sabores distintos relacionados a su mayor actividad enzimática debido a la conversión de aminoácidos. La transaminación de aminoácidos es la ruta clave para la conversión de aminoácidos en *L. lactis* y puede dar lugar a la formación de compuestos de sabor tales como aldehídos por descarboxilación de los α -cetoácidos (Fernández de Palencia *et al.*, 2006).

Sin embargo, existe un alto grado de variación entre especies y los esfuerzos recientes se han centrado en la detección y evaluación de nuevas cepas de *L. lactis* aisladas de diferentes quesos tradicionales elaborados con leche de buena calidad. Estas cepas podrían ser utilizadas para aumentar la biodiversidad, diversificar el sabor y restaurar las características de los quesos tradicionales (Slaterry *et al.*, 2010).

La presencia de cultivos iniciadores no es suficiente para explicar la formación de sabor en los quesos. La microflora nativa puede desempeñar un papel importante, de hecho, lactobacilos heterofermentativos se encuentran regularmente en bajas concentraciones en la leche (Miloni *et al.*, 2015).

El desarrollo del sabor y aroma en los productos lácteos se lleva a cabo principalmente por cultivos iniciadores del grupo de BAL, destacando los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* y *Leuconostoc* (Widyastuti y Febrisiantosa, 2014).

Se han identificado 38 compuestos volátiles en queso tipo panela incorporando *L. lactis* UQ2 como cultivo protector: 3 compuestos aromáticos, 6 aldehídos, 5 cetonas, 12 ésteres, 6 ácidos orgánicos, 4 alcoholes, 1 lactona y 1 hidrocarburo. La adición del cultivo protector indujo la síntesis de los compuestos hexanal y 3-metil butanol que son producidos por cepas de *Lactococcus* y proveen al queso características sensoriales semejantes a un queso elaborado con leche no pasteurizada (Ochoa, 2011).

2.8.1 Proteólisis en queso

La proteólisis es probablemente el evento bioquímico más importante de un queso, teniendo una contribución en el sabor y textura de la mayoría de las variedades. Este proceso está influenciado por varios factores, incluyendo la plasmina (precursor inactivo de una enzima proteasa), las peptidasas endógenas o exógenas, como las de la microflora derivada de la leche, del coagulante y de las bacterias iniciadoras, el pH, los niveles de humedad de las cuajadas, el tiempo y la temperatura de maduración, el contenido de sal y la humedad (Veloso *et al.*, 2004; Wilkinson y Kilcawley, 2005, Ozcan y Kurdal, 2012, Escobar-Zepeda *et al.*, 2016).

Las proteínas lácteas (Cuadro 1) se hidrolizan parcialmente mediante el cuajo y otras enzimas microbianas nativas para producir compuestos de bajo peso molecular y se descomponen posteriormente mediante peptidasas en diversas sustancias nitrogenadas, tales como proteosa, peptona, aminoácidos y aminos (Eren-Vapur y Ozcan, 2012).

Cuadro 1. Proteínas presentes en la leche bovina (Farrell, 2004).

Proteína	Variante genética	Peso molecular (Da)
α 1-Caseína (α 1-CN)	B	23,615
	C	23,542
α 2-Caseína (α 2-CN)	A	25,226
β -Caseína (β -CN)	A ¹	24,023
	A ²	23,983
	B	24,092
κ -Caseína (κ -CN)	A	19,037
	B	19,006
β -Lactoglobulina (β -LG)	A	18,363
	B	18,277
α -Lactalbúmina (α -LA)	B	14,178
Albumina del suero (SA)	A	66,399
Inmunoglobulina G1 (IgG1)		161,000
Inmunoglobulina G2 (IgG2)		150,000
Inmunoglobulin A7 (IgA)		385,000–417,000
Inmunoglobulina M(IgM)		1,000,000
Lactoferrina (LF)		76,110

Por lo tanto, el queso contiene en estado libre diferentes cantidades de aminoácidos, constitutivos de la caseína. Los aminoácidos libres totales del queso están relacionados tanto con el aroma así como con el sabor del producto. Además se ha demostrado que existe una relación definida en el aroma y la concentración de determinados aminoácidos libres como la tirosina y el triptófano, la prolina y el ácido glutámico (Guerra-Martínez *et al.*, 2012).

Los aminoácidos son producidos por transaminación, deshidrogenación, descarboxilación o reducción; y mediante estos procesos se generan compuestos aromáticos tales como 2-metil butirato, 2-metil butanal, 2-metil-1 propanal, ácido fenil acético, dimetildisulfuro, 3-metil butirato, 3-metil-2-butanona y 2-metil propionato (Marilley y Casay, 2004).

Por lo tanto, la actividad de proteasa conduce a una gran cantidad de péptidos, la denominada solución de fracción nitrógeno soluble en un queso. Posteriormente, estos péptidos se degradan en péptidos más pequeños y aminoácidos. La degradación de caseína se incrementa en 100 % en la presencia de un cultivo adjunto; sin embargo, un problema común con su introducción aunado a una proteólisis excesiva es el desarrollo de amargor en el queso (Yuceer *et al.*, 2009).

La proteólisis es la limitante de la velocidad en la maduración de muchos quesos, especialmente en los quesos semi-duros, y por lo tanto ha sido el foco de la mayoría de las investigaciones sobre el sabor del queso. En particular, el uso de bacterias lácticas termófilas como un cultivo adicional a las bacterias lácticas mesófilas se ha convertido en una práctica común en la fabricación de queso para agregar sabor, textura y aroma (Marilley y Casay, 2004).

Las enzimas de bacterias ácido lácticas son el principal factor responsable de la proteólisis y formación de compuestos esenciales en la maduración de un queso. La capacidad de BAL y otros microorganismos propios de la leche para degradar los aminoácidos a los compuestos de aroma es altamente dependiente de cada cepa (Bozoudi *et al.*, 2015).

2.8.2 Lipólisis en queso

Por otra parte, los ácidos grasos libres son precursores importantes de las reacciones catabólicas y producen compuestos volátiles. Sin embargo, la hidrólisis enzimática de triacilglicéridos a ácidos grasos, glicerol y mono- o diacilglicéridos es esencial para el desarrollo del sabor en algunas variedades de queso.

La lipólisis en el queso se debe a la presencia de enzimas hidrolasas que separan el enlace éster entre un ácido graso y el núcleo de glicerol del triacilglicérido, produciendo ácidos grasos libres, mono- y diacilglicéridos. Los ácidos grasos son precursores importantes de las reacciones catabólicas, producen una variedad de compuestos volátiles tales como alcoholes, ésteres, aldehídos, cetonas y lactonas (López *et al.*, 2006).

Las enzimas hidrolasas pueden clasificarse como esterasas o lipasas, que se distinguen de acuerdo con tres características principales: (1) longitud de la cadena del éster hidrolizado, (2) naturaleza fisicoquímica del sustrato y (3) cinética enzimática. Las esterasas hidrolizan cadenas de ésteres entre 2 y 8 átomos de carbono y sustratos solubles en soluciones acuosas, mientras que las lipasas hidrolizan cadenas de ésteres de 10 o más átomos de carbono y sustratos emulsificados (Collins *et al.*, 2003). Las BAL tienen enzimas esterasas y lipasas capaces de hidrolizar una gama de ésteres provenientes de tri-, di, y monoacilglicéridos (Candioti *et al.*, 2002).

A pesar de la presencia de estas enzimas, BAL, especialmente *Lactococcus* y *Lactobacillus* poseen poca capacidad enzimática lipolítica en comparación con especies tales como *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y *Flavobacterium*. Sin embargo, durante un período de maduración prolongado, BAL son responsables de la liberación de niveles significativos de ácidos grasos libres (Collins *et al.*, 2003).

Piña (2012), trabajó queso tipo panela variando el nivel de grasa inicial en la leche e incorporando *L. lactis* UQ2 como cultivo protector. Realizó una evaluación sensorial y de compuestos volátiles de a los 7, 14 y 21 días de almacenamiento con paneles de 100 consumidores cada uno. Mostró que el nivel inicial de grasa determina la preferencia del consumidor para el sabor y textura del producto. Los tratamientos de queso con mayor contenido inicial de grasa tuvieron mayor preferencia del consumidor para los dos parámetros evaluados. Para el atributo del sabor, el tratamiento con 3.5 % grasa y 10^7 UFC/ mL inóculo tuvo una aceptación de 80 % en los tres tiempos evaluados. Se identificaron 37 compuestos volátiles, de los cuales 3-metil-1-butanol, hexanal, 3-metil-butanal y 2-metil-propanol son compuestos producidos por cepas de *Lactococcus*.

2.9 Técnicas electroforéticas

En los últimos años se han descrito varios métodos para el estudio de la maduración y caracterización microbiológica del queso, utilizando técnicas electroforéticas como Tris- tricina SDS -PAGE (Lozo *et al.*, 2007; Brutti *et al.*, 2012); Urea-PAGE (Veloso *et al.*, 2004; Baruzzi *et al.*, 2012; Hinz *et al.*, 2012; Masotti *et al.*, 2017) y DGGE-PCR (Masoud *et al.*, 2011; Dolci *et al.*, 2013; Arcuri *et al.*, 2013; Cárdenas *et al.*, 2014).

2.9.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) con el sistema Tris-tricina

Técnica electroforética desnaturizante discontinua en gel de poliacrilamida que separa péptidos y proteínas de bajo peso molecular, menores a 30 kDa; los cuales no se pueden separar por el método discontinuo de Laemmli-SDS-PAGE, ya que se necesitaría que el gel tuviera un mayor porcentaje total (Haider *et al.*, 2012). Un mayor porcentaje total de monómeros es mejor para separar proteínas de tamaño pequeño.

Al igual que el método de Laemmli, esta técnica utiliza geles de poliacrilamida que se forman por la polimerización de la acrilamida por acción de un agente reticulante, la bis-acrilamida, en presencia de un iniciador y un catalizador. Como catalizador se suele utilizar TEMED (N,N,N,N'-tetrametilnediamina) y como iniciador el ión persulfato ($S_2O_8^-$) que se añade en forma de persulfato de amonio (Haider *et al.*, 2012).

Los geles de acrilamida utilizados se caracterizan por la concentración porcentual total (% p/v T) de ambos monómeros (acrilamida y el reticulante bisacrilamida) y el porcentaje de concentración del reticulante (% p/p C) con relación a la concentración total (Schägger, 2006).

Es una electroforesis desnaturizante, en donde las proteínas migran asegurando la completa desnaturización (pérdida de la estructura tridimensional). En esta situación la migración es proporcional a la carga y al tamaño de la molécula pero de sodio o SDS, un detergente (Haider *et al.*, 2012).

En una electroforesis discontinua porque se emplea un sistema de dos amortiguadores, en donde la separación de las proteínas está directamente relacionada con los valores de pKa de los grupos funcionales de tris (pKa= 8.3 a 20 °C) y tricina (pKa=8.15 a 20 °C), ya que poseen valores diferentes que definen las movilidades electroforéticas de los iones acarreadores en relación con las movilidades electroforéticas de las proteínas (Schägger, 2006).

2.9.2 Urea PAGE

Técnica electroforética desnaturizante que utiliza gel de poliacrilamida en presencia de urea para separar productos de hidrólisis de las caseínas (α , β y κ) y péptidos, de acuerdo a su peso molecular (Veloso *et al.*, 2004).

2.9.3 Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE)

La electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE por sus siglas en inglés) es una técnica electroforética para identificar variables en un sólo nucleótido de un segmento de ADN y el patrón de bandas generado se considera como una "imagen" de toda la comunidad microbiana (Arcuri *et al.*, 2013; Dolci *et al.*, 2013). Esta técnica se usa para visualizar el ADN de una comunidad microbiana que se encuentra en la muestra de estudio.

El método requiere la amplificación previa de un gen altamente conservado entre especies como es el ARNr 16S mediante una PCR. Los fragmentos de ADN amplificados deben tener un tamaño entre 200 y 500 pb, ya que secuencias de mayor tamaño pueden generar artificios en la DGGE. Al amplificar por PCR, el resultado que se obtiene son múltiples copias del gen seleccionado de todos los microorganismos presentes en la comunidad. Por lo tanto, el amplicón incluye fragmentos del mismo tamaño que difieren únicamente entre sí por su secuencia nucleotídica, variable entre especies (Randazzo *et al.*, 2006).

Por lo tanto, la DGGE permite diferenciar fragmentos de igual tamaño, ya que la desnaturización en el gel depende de la secuencia nucleotídica, a diferencia de una electroforesis convencional, en la que las bandas de ADN que tienen el mismo tamaño migran a la misma posición. La base bioquímica de esta separación está en el principio de que concentraciones crecientes de un agente desnaturizante separarán la doble hélice de ADN en diferentes dominios internos (Bonetta *et al.*, 2008).

3. Justificación

Actualmente la tendencia del consumidor consiste en adquirir alimentos frescos mínimamente procesados y rechazar los aditivos químicos, lo cual abre las puertas a reconsiderar el potencial antimicrobiano de las bacterias lácticas como una nueva estrategia de bioconservación (Sloan, 2015).

Las bacteriocinas son las sustancias antimicrobianas más adecuadas desde un punto de vista tecnológico para ser utilizadas como conservantes de grado alimentario. Sus propiedades físico-químicas las hacen resistentes a los tratamientos térmicos y cambios de pH que sufren los alimentos durante su fabricación y almacenamiento.

Las bacterias lácticas ofrecen la posibilidad de producir bacteriocinas *in situ* cuando se encuentran en un medio favorable. LUQ2 produce la bacteriocina genéticamente identificada como nisina tipo A, se espera que su adición en el proceso de elaboración del queso panela induzca la producción de nisina *in situ*. La nisina en el queso panela puede prevenir la presencia de microorganismos patógenos Gram positivos. Asimismo, LUQ2 puede reforzar el proceso de proteólisis, causado por las proteasas del cultivo, y desarrollar sabor y aroma en el queso, haciendo a éste competente con un queso elaborado con leche cruda.

El perfil proteico se analizó para conocer, predecir y controlar características sensoriales al añadir el cultivo protector en el queso. El sistema enzimático de LUQ2 metaboliza los compuestos del queso y genera un perfil proteico diferente a un queso sin adición de la cepa, permitiendo compuestos de sabor y aroma más agradables para el consumidor.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Evaluar la actividad proteolítica y el perfil proteico en el queso tipo panela adicionado con *Lactococcus lactis* UQ2 Rif L⁺ como cultivo protector.

4.2 Objetivos específicos

- a) Producir a nivel biorreactor *L. lactis* UQ2 Rif L⁺ y nisina.
- b) Microencapsular y secar por aspersion *L. lactis* UQ2 Rif L⁺ y nisina.
- c) Evaluar el efecto de la incorporación de nisina y *L. lactis* UQ2 Rif L⁺ microencapsulados en queso tipo panela.
- d) Evaluar la actividad proteolítica que produce *L. lactis* UQ2 Rif L⁺ en queso tipo panela.
- e) Determinar el perfil proteico que produce *L. lactis* UQ2 Rif L⁺ en queso tipo panela.

5. Metodología

5.1 Cepas microbianas

Lactococcus lactis UQ2 Rif L⁺ (LUQ2) y *Micrococcus lactis* NCBI 8166 fueron proporcionadas por el laboratorio de Biotecnología del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos de la Facultad de Química, UAQ. Las cepas estaban en conservas de perlas de vidrio a -70 °C.

5.2 Producción de nisina y LUQ2

Se llevó a cabo el procedimiento de García-Almendárez *et al.* (2008) con algunas modificaciones. La conserva de LUQ2 se activó 4 veces en medio M17 (Oxoid, Hampshire, England) a 30 °C y se usó un inóculo de 1 % (v/v) para la fermentación.

Se utilizó el biorreactor Applikon (Applikon, Foster City, C.A.) con un volumen de 2 L en medio de suero lácteo suplementado. El medio consistió en 1.5 % (p/v) de suero de leche, 1.4 % (p/v) de peptona de soya (Bioxon, Cuautitlán, México), 0.05 % (p/v) de MgSO₄ (Sigma, MO, USA), 0.01 % (p/v) MnSO₄ (Sigma) y 0.002 % (p/v) Tween 20 (Hycel, México).

Los parámetros que se introdujeron en el biocontrolador del biorreactor fueron los siguientes, pH 6.5, D.O. 100 %, temperatura 30 °C y agitación 200 rpm durante 8 h. Cada dos horas se tomó muestra del medio para analizar viabilidad de *L. lactis* y actividad de nisina.

Una vez finalizada la fermentación, para recuperar las células, el medio se centrifugó (10 min, 6500 rpm, 4 °C), se recuperó el sedimento y se lavó con solución salina estéril al 0.85 % (p/v); el procedimiento se repitió dos veces.

Para recuperar la nisina, el sobrenadante que se separó en el paso anterior descrito como Extracto Libre de Células (ELC) se calentó en baño maría a 80 °C por 30 min y se ajustó el pH a 6.5 con NaOH 0.1 M.

5.3 Microencapsulación de LUQ2 y nisina mediante secado por aspersión

El material encapsulante fue preparado con 10 % de sólidos (60 % almidón modificado, 10 % proteína de suero concentrada, 30 % maltodextrina) respecto a las células o al ELC, disuelto en amortiguador de fosfatos.

Se utilizó el secador por aspersión Mini Spray Dryer (B-191, Büchi, Flawil, Switzerland) a una temperatura de entrada de 110 °C, bomba al 20 % y aspersion al 95 % para las células; y a una temperatura de entrada de 175 °C, bomba al 25 % y aspersion al 95 % para el ELC (nisina) (Patiño *et al.*, 2014). Posteriormente se analizó la viabilidad de *L. lactis* y la actividad de nisina.

5.4 Determinación de viabilidad de LUQ2

El método de cuenta en placa fue de Miles Misra, es una técnica usada para calcular la población microbiana expresada como UFC / mL en una suspensión bacteriana (Vanderzant y Splittstoesser, 1992).

Para las muestras de fermentación, se realizaron diluciones decimales y se sembró por triplicado 20 µL de cada dilución en medio agar M17 (Oxoid, Hampshire, England) adicionado con 10 % (p/v) de lactosa (Sigma) y 1 % (p/v) de rifampicina (Sigma).

Para LUQ2 microencapsulado, se diluyó 0.1 g en 1 mL de agua peptonada al 0.1 % (p/v) (Bioxon), se realizaron diluciones seriadas por triplicado y se siguió el procedimiento anteriormente descrito.

Se incubaron las cajas a 30 °C por 24 h. Se seleccionaron las diluciones en donde se pudo realizar el conteo de UFC y se expresó en UFC/mL (Vanderzant y Splittstoesser, 1992).

5.5 Determinación de actividad de nisina

La determinación de la actividad de nisina se realiza por el método de difusión en agar de acuerdo al BS 4020 (1974). El método de difusión en agar ha sido probablemente el método más utilizado para determinar la actividad antimicrobiana. El antimicrobiano difunde desde el disco al medio de cultivo inoculado con cierto microorganismo, produciendo así una zona de inhibición (Davidson, *et al.*, 2005).

5.5.1 Activación de *Micrococcus luteus*

M. luteus NCBI 8166 estaba conservado en ultracongelación a -70 °C, para activarlo se colocó en caldo Assay: 1 % (p/v) peptona de caseína (Bioxon), 0.3 % (p/v) extracto de carne (Bioxon), 0.03 % (p/v) NaCl (J.T. Baker, NJ, USA), 0.4 % (p/v) extracto de levadura (BD, Francia) y 0.1 % (p/v) azúcar mascabada (Dilis, Técnica Mexicana de Alimentación, México). Se incubó durante 48 h a 30 °C, posteriormente se sembró por estriado en un tubo inclinado y en placas con agar Assay durante 48 h a 30 °C (Tramer y Fowler, 1964; British Standar 4020, 1974).

5.5.2 Curva calibración de actividad de nisina

Para realizar los ensayos de actividad, se tomó una asada del cultivo del tubo inclinado y se resuspendió en 500 µL de solución Ringer 1x. La solución Ringer 4x se preparó de la siguiente manera: 0.9 % (p/v) cloruro de sodio (J.T. Baker), 0.042 % (p/v) cloruro de potasio (Sigma), 0.024 % (p/v) cloruro de calcio anhidro (J.T. Baker) y 0.020 % (p/v) bicarbonato de sodio (Sigma).

De la solución se tomaron alícuotas empezando con 30, 40 y 50 µL y se aforaron a 1 mL con solución Ringer 1x. Se midieron la absorbancias a 650 nm hasta obtener una solución de 0.3. Se realizó este procedimiento hasta obtener 10^6 - 10^7 UFC/ mL de *M. luteus* NCBI 8166 (Tramer y Fowler, 1964; British Standar 4020, 1974).

Se disolvió 0.01 g de nisina (Sigma, MO, USA) y en 8 mL de HCl 0.02 N (J.T. Baker). Se calentó en agua hirviendo por 5 min, se enfrió rápidamente a 20 ± 5 °C y se dejó reposar por 2 h. Se llevó la solución a 10 mL con HCl 0.02 N, se realizaron diluciones en HCl 0.02 N hasta obtener una concentración de 10 UI/mL y se diluyó hasta obtener concentraciones de 2, 4, 6, 8 y 10 UI/mL.

Se realizaron pozos de 8 mm de diámetro con un horador número 4 en las cajas Petri con agar Assay suplementado con 1 % (p/v) de la solución de *M. luteus* (10^6 - 10^7 UFC/ mL) y 1 % (p/v) de Tween 20 (Sigma).

Se inocularon los pozos con 60 µL de las soluciones realizadas por triplicado y se incubó a 30 °C durante 48 h. La zona de inhibición se midió en mm y se graficó el promedio contra el log de UI/mL para determinar la tendencia de los datos (Tramer y Fowler, 1964; British Standar 4020, 1974).

5.5.3 Determinación de la actividad de nisina

Para determinar la actividad de nisina de las muestras de fermentación, éstas se calentaron a 80° C con baño maría, por 30 min para inactivar proteasas, se centrifugaron (15 min, 4500 rpm, 4 °C) y se les ajustó el pH a 6.5 con NaOH 0.1 M (J.T. Baker). Se recuperó el sobrenadante y se filtró en membranas con poro de 0.22 µm. Se realizaron diluciones seriadas por triplicado (García-Almendárez *et al.*, 2008).

Se inocularon los pozos de agar Assay, suplementado con 1 % (p/v) de la solución de *M. luteus* (10^6 - 10^7 UFC/ mL) y 1 % (p/v) de Tween 20 (Sigma), con 60 µL de solución y se realizó el procedimiento que se describió anteriormente.

Para determinar la actividad de nisina microencapsulada, se disolvió 0.1 g de nisina en 1 mL de HCl 0.02 N (J.T. Baker), se realizaron diluciones decimales por triplicado y se prosiguió con el procedimiento anterior.

5.6 Elaboración del queso tipo panela

Un litro de leche entera pasteurizada Lala (Grupo Lala, Coahuila, México) se calentó a 30 °C, se agregó 0.005 % (p/v) de CaCl₂ (J.T. Baker) diluido en 50 mL de agua y se homogenizó lentamente. Posteriormente se adicionó 0.04 % (v/v) de cuajo (Qualact, Altecsa S.A., México), se agitó para homogenizar y dejó coagular por 45 min.

Posteriormente, la cuajada se cortó en cubos pequeños, se mantuvo en reposo por 10 min, se retiró 2/3 de suero (desuero parcial) y se pesó. Se agregó 7 log de LUQ2 microencapsulado, 5 ppm de nisina microencapsulada y 0.6 % p/v de sal. Se revolvió cuidadosamente la mezcla y se desuero totalmente. El queso se moldeó en recipientes de plástico de 50 g y se prensaron ligeramente apilándolos 20 min (cada lado), permitiendo el drenaje natural del suero a temperatura ambiente.

El queso se dejó en refrigeración durante una noche para el desuero y al día siguiente se desmoldo, se empacó al vacío y se mantuvo en refrigeración (3 °C) hasta su análisis. Con este procedimiento, se obtuvieron 3 quesos independientes.

De los quesos se realizaron análisis microbiológicos, viabilidad de LUQ2, actividad de nisina, actividad proteolítica y el perfil proteico durante el almacenamiento en refrigeración por 21 días cada 7 días.

5.7 Análisis microbiológico

5.7.1 Determinación de la cuenta bacteriana total

Se llevó a cabo el procedimiento descrito en la NOM-092-SSA1-1994. Una suspensión con 10 g de queso y 90 mL de agua peptonada al 0.1 % (p/v) (Bioxon) fue homogenizada por 1 min en mortero. Se realizaron diluciones seriadas por triplicado con agua peptonada y se colocaron 0.1 µL en placas de agar métodos estándar (Bioxon) según la técnica de cuenta en placa. Se incubaron a 30 °C por 48 h. Transcurrida la incubación se contaron las colonias y se expresaron los resultados como UFC/g.

5.7.2 Determinación de hongos y levaduras

Se llevó a cabo el procedimiento descrito en la NOM-111-SSA1-1994. Una suspensión con 10 g de queso y 90 mL de agua peptonada al 0.1 % (p/v) (Bioxon, Cuautitlán, México) fue homogenizada por 1 min en mortero. Se realizaron diluciones seriadas por triplicado con agua peptonada y se colocó 1 mL de la dilución en placas Petri. Posteriormente se vertió 15-20 mL de agar papa dextrosa (Bioxon) acidificado a un pH de 3.5 con ácido tartárico al 10 % (p/v). Se mezcló el medio con 6 movimientos de derecha a izquierda, 6 en sentido de las manecillas del reloj, 6 en sentido contrario y 6 de atrás para adelante. Se incubaron a 25 °C por 5 días. Transcurrida la incubación se contaron las colonias y se expresaron los resultados como UFC/g.

5.8 Determinación de actividad de nisina en queso tipo panela

Una suspensión de queso con 40 g de queso y 160 mL de HCl 0.02 N (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA) fue homogenizado por 1 min en mortero. El pH de la mezcla fue ajustado a 2 con NaOH 1 M (J.T. Baker). La solución se calentó 5 min a 80 °C en baño maría, se ajustó hasta un pH de 6.5 y se aforó a 200 mL con HCl 0.02 N (J.T. Baker). Posteriormente la solución se centrifugó (15 min, 11,000 rev/min, 4 °C), se tomó una alícuota de la fase líquida intermedia debajo de la grasa y se esterilizó la muestra mediante una membrana con poro de 0.45 µm.

En cajas Petri con agar Assay suplementado con 1 % (p/v) de la solución de *M. luteus* (10^6 - 10^7 UFC/ mL) y 1 % (p/v) de Tween 20 (Sigma, MO, USA) se realizaron pozos de 8 mm de diámetro. Con el extracto obtenido se realizaron diluciones decimales consecutivas por triplicado y se colocaron 60 µL de muestra en cada pozo. Las placas se incubaron a una temperatura de 30 °C durante 48 h. La zona de inhibición se midió en mm y la concentración fue calculada mediante la curva estándar de nisina (Tramer y Fowler, 1964; British Standar 4020, 1974).

5.9 Determinación de la población de *L. lactis* UQ2 Rif L+ en el queso tipo panela

La determinación de la población en el queso también se llevó a cabo por el método de Miles-Misra o método de la gota. De cada una de las muestras de queso se preparó una serie de diluciones decimales seriadas; para ello se homogenizó 10 g de queso con 90 mL de agua peptonada al 0.1 % (p/v) (Bioxon) en un mortero por 1 minuto. Se tomó 1 mL de la dilución anterior y se adicionó a 9 mL de agua peptonada, se homogenizó y se repitió el procedimiento hasta obtener las diluciones necesarias dependiendo de la población microbiológica esperada (Vanderzant y Splittstoesser, 1992).

Para realizar la cuenta por Miles-Misra, se colocan tres gotas de 20 µl de las diluciones correspondientes en placas de agar M17 (Oxoid, Hampshire, England) suplementado con 10 % (p/v) de lactosa (Sigma, MO, USA) y 1 % (p/v) de rifampicina (Sigma, MO, USA). Las placas se incubaron a 30 °C y después de 24 h se procedió a realizar el conteo de UFC (Vanderzant y Splittstoesser, 1992).

5.10 Determinación de actividad proteolítica en queso tipo panela

Se realizó la curva estándar de tirosina para poder calcular la concentración de tirosina soluble en el queso. Para la curva estándar se prepararon 7 viales con las cantidades que se muestran en el Cuadro 2. A cada uno de los 7 viales se agregaron diferentes volúmenes de la solución de tirosina 0.02 % (p/v) (Sigma, MO, USA), se añadió un volumen de agua destilada para aforar a 1 mL y se adicionó 2.5 mL de solución de carbonato de sodio 20 % (p/v) (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA) y 0.5 mL de solución de Folin-Ciocalteu (FCR) (Sigma, MO, USA). Posteriormente los viales se incubaron a 37 °C por 30 min y se midió su absorbancia a 600 nm (Kunitz, 1947)

Cuadro 2. Preparación de la curva estándar de tirosina

No. de tubo	Solución stock de tyr 0.02 % (p/v) (μ L)	Agua (μ L)	Solución carbonato de sodio 20 % (p/v) (mL)	Solución Folin-Ciocalteu (mL)	
1 (B)	0	1000	2.5	0.5	
2	25	975	2.5	0.5	
3	50	950	2.5	0.5	Incubar a
4	100	900	2.5	0.5	37 °C por
5	200	800	2.5	0.5	30 min
6	250	750	2.5	0.5	
7	300	600	2.5	0.5	

Para la actividad proteolítica de las muestras de queso, se disolvió en mortero 5 g de queso con 25 mL de amortiguador de fosfato, la mezcla se centrifugó (10 min, 4,000 rpm, 4 °C), se tomó una alícuota de la fase líquida intermedia debajo de la grasa y se calentó a 37 °C durante 10 min (solución de queso). Posteriormente se prepararon 4 viales por triplicado, se les agregó caseína al 1 % (p/v) (Hammarstein), se calentaron a 37 °C por 5 min, se les adicionó la solución de queso, se mezclaron en vortex e incubaron a 37 °C por 10 min, se les añadió ácido tricloroacético al 5 % (v/v) (Merck), se incubaron a 37 °C por 30 min, se filtraron en membrana 0.45 mm y se tomaron 1 mL, a esta cantidad se le agregó la Carbonato de sodio al 20 % (J.T. Baker) y Folin-Ciocalteu (Sigma).

Las cantidades anteriores se aprecian en el Cuadro 3. Las soluciones se incubaron a 37 °C y se midió su absorbancia a 600 nm. La actividad proteolítica fue calculada mediante la curva estándar de tirosina y los resultados se expresaron en mg de tirosina soluble/ g de queso y mg de tirosina soluble /100 g de queso.

Cuadro 3. Preparación de la actividad proteolítica en queso tipo panela

No. de Tubo	Caseína 1 % (p/v) (μL)	Solución de queso (μL)	Ácido tricloroacético 5 % (v/v) (μL)	Carbonato de sodio 20 % (p/v) (μL)	Folin-Ciocalteu (μL)
1B	2,500	0	2,500	2,500	500
2	2,500	500	2,500	2,500	500
3	2,500	500	2,500	2,500	500
4	2,500	500	2,500	2,500	500

5.11 Elaboración de PAGE con el sistema Tris-tricina

5.11.1 Preparación de geles

Se colocaron las placas de vidrio una frente a la otra en el aparato de electroforesis, utilizando separadores de 1 mm. Se verificó que no haya fugas adicionando agua en el espacio libre entre las placas. Se colocó la plantilla de los pozos y se realizó una marca 1 cm debajo de los pozos.

Las cantidades para la preparación del gel separador y el gel concentrador (Cuadro 4), las soluciones y el procedimiento se llevaron a cabo conforme Ausubel *et al.* (2002).

Cuadro 4. Preparación del gel separador (16.5 % T, 6 % C) y gel concentrador (4 % T, 3 % C), Tris-tricina PAGE

Solución stock	Cantidades gel separador	Cantidades gel concentrador
Solución acril-bisacrilamida 49.5 %T, 6 % C	6 mL	0 mL
Solución acril-bisacrilamida 49.5 % T, 3 % C	0 mL	0.75 mL
Amortiguador Tris /SDS pH 8.45	6 mL	2.3 mL
Agua HPCL	1.9 mL	6.3 mL
Glicerol	4.1 mL	--
Volumen total	18 mL	9.35 mL
Persulfato de Amonio 10 % (p/v)	50 µL	40 µL
TEMED	5 µL	5 µL

Nota: Las cantidades descritas sirven para preparan dos geles.

El amortiguador de los geles consistió en una solución Tris/SDS pH 8.45, 3 M de Tris (Invitrogen, USA) y SDS 0.3 % p/v (Bio-Rad, CA, USA).

Para preparar el gel separador, se mezcló la solución acrilamida-bisacrilamida (Invitrogen), amortiguador Tris-SDS pH 8.45, Glicerol (J.T. Baker) y Agua HPLC. Se desgasificó durante 5 min utilizando una bomba de vacío y posteriormente se agregaron los catalizadores PSA (Sigma) y TEMED (Invitrogen).

Se adicionó la solución del gel separador en el interior de las placas de vidrio hasta la marca que se realizó. Se cubrió la parte superior del gel con una solución saturada de isobutanol para evitar que al polimerizar el gel forme menisco y se excluye el oxígeno que interfiere en la polimerización. Se descartó la solución de isobutanol y se secó con papel absorbente una vez polimerizados los geles.

Para preparar el gel concentrador, se mezcló la cantidad indicada de soluciones acril-bisacrilamida, Tris/SDS pH 6.8, agua HPLC y glicerol. Se desgasificó la solución durante 5 min utilizando una bomba de vacío y se adicionó los catalizadores PSA y TEMED.

Se agregó la solución del gel concentrador en el interior de las placas de vidrio, encima del gel separador. Se insertaron los peines de teflón de 1 mm y se dejó reposar hasta que el gel se polimerizó.

5.11.2 Preparación de las muestras y condiciones de la corrida

Para la preparación de las muestras, se disolvió 10 g de queso en 40 mL de HCl 0.02 N (JT Baker). Se homogenizó y se centrifugó (10 min, 4,000 rpm, 4 °C). Se realizaron diluciones con HCl 0.02 N para obtener 40 µg de proteína en las muestras. Las muestras fueron mezcladas (1:1) con amortiguador de muestra Tris- tricina (2x) y calentadas a 40 °C durante 30-60 min.

Se utilizó el marcador para péptidos No.80-1129-83 (Amersham, Buckinghamshire, UK) y el marcador ECL Rainbow Low Range No. RPN755E (Amersham, Buckinghamshire, UK). El marcador para péptidos No.80-1129-83 se llevó a ebullición por 10 min antes de cada carga y el marcador ECL Rainbow se cargó sin tratamiento previo.

En el gel se cargaron 20 µL de marcador para péptidos y/o 5 µL de estándar ECL Rainbow y 15 µL de muestra.

Los amortiguadores de electroforesis fueron Tris 0.2 M pH 8.9 (Invitrogen) para la parte inferior de la cámara (ánodo) y una solución de Tris 0.1 M (Invitrogen), Tricina 0.1 M (Bio-Rad) y SDS (Bio-Rad) al 0.1 % (p/v) para la parte superior del gel (cátodo).

Se efectuó la separación electroforética usando una cámara vertical (Hoefer SE 280, Scientific Instrument, MA, E.U.) a 30 V hasta el final del gel concentrador, aumentando a 150 V hasta el término de la corrida.

Los geles se tiñeron con azul brillante de Coomassie Brilliant Blue G250 (Serva, Heidelberg) y se analizaron mediante el fotodocumentador (Alphalmager HP System, Protein Sample, California, E.U.)

5.12 Elaboración de Urea PAGE

5.12.1 Preparación de geles

Se realizó el mismo procedimiento que la electroforesis Tris-tricina. Las cantidades para la preparación del gel separador y el gel concentrador (Cuadro 5), las soluciones y el procedimiento se llevaron a cabo conforme a lo descrito por Veloso *et al.* (2002). El amortiguador del gel consistió en una solución de Tris 0.76 M (Invitrogen) y urea 9 M (Bio-Rad) a pH 8.9.

Cuadro 5. Preparación del gel separador (15 % T) y el gel concentrador (4 % T), Urea PAGE

Solución stock	Cantidades gel separador	Cantidades gel concentrador
Solución 30 % Acrilamida-0.8 % Bis-acrilamida	7.5 mL	0.65 mL
Amortiguador Tris/Urea pH 8.9	3.75 mL	1.25 mL
Agua HPLC	3.75 mL	3.05 mL
Volumen total	15 mL	4.95 mL
Persulfato de Amonio 10 % (p/v)	50 µL	25 µL
TEMED	10 µL	5 µL

Nota: Las cantidades descritas sirven para preparar dos geles.

5.12.2 Preparación de las muestras y condiciones de la corrida

Para la preparación de las muestras, se disolvió 10 g de queso en 40 mL de HCl 0.02 N (J.T.Baker). Se homogenizó y se centrifugó (10 min, 4,000 rpm, 4 °C). Se realizaron diluciones con HCl 0.02 N para obtener 40 µg de proteína en las muestras. Las muestras fueron mezcladas (1:2) con amortiguador de muestra Urea (6x) (Tris 0.12 M, Urea 8.2 M, EDTA 2.5 mM, β-mercaptoetanol 0.2M y Azul de bromofenol 0.01 % p/v) y calentadas a ebullición durante 5 min.

Se utilizó un marcador de mezclas de caseínas α y β donado por la empresa Nucitec. Se agregó 4.8 µL de amortiguador de muestra 6x a 24 µL de marcador y se llevó a ebullición durante 5 min. El amortiguador de electroforesis fue una solución de Tris 0.02 M (Invitrogen) y Glicina 0.19 M (Sigma).

En el gel se cargaron 5 µL de marcador y 20 µL de muestra. Se efectuó la separación electroforética usando una cámara vertical (Hoefer SE 280) a 20 mA hasta el final del gel concentrador, aumentando a 30 mA hasta el término de la corrida.

Los geles se tiñeron con azul brillante de Coomassie Brilliant Blue G250 (Serva) y se analizaron mediante el fotodocumentador (Alphamager HP System).

5.13 Elaboración de electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE)

5.13.1 Extracción de ADN

7.5 g de queso fueron diluidos en 20 mL de amortiguador de citrato de sodio (J.T. Baker), al 2 % (p/v) con pH 8, se incubó a 45 °C durante 1 hora y se centrifugó (10 min, 3,000 xg, 4 °C). Se recuperó el sobrenadante debajo de la fase grasosa y se volvió a centrifugar (10 min a 22,000 x g, 4 °C). Se recuperó la pastilla celular en 1 mL de solución salina (NaCl) al 0.85 % (p/v) pH 7 y se realizaron 2 lavados bajo las mismas condiciones (Escobar-Zepeda *et al.*, 2016).

Posteriormente la pastilla celular se le agregó 100 µL de solución salina para resuspender y se utilizó el kit para extracción y purificación de DNA (PowerSoil DNA Isolation Kit, Mo BIO Carlsbad, USA) siguiendo el protocolo del fabricante.

Se midió la concentración del ADN en NanoDrop (2000, Thermo Scientific, E.U.) a una longitud de onda de 260 y 280 nm.

5.13.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) anidada

Se utilizaron 2 primers específicos de bacterias para la amplificación del ARN ribosomal 16S: 27F (50-GTTGATCCTGGCTCAG-30) y el 1492R (50-ACGGYTACCTTGTTACGACTT-30) (Cisneros-Pérez *et al.*, 2015).

El ADN del queso fue amplificado 2 veces por PCR utilizando el Kit de Taq ADN Polimerasa (Invitrogen, CA, USA). Las soluciones para las reacciones del PCR consistieron en amortiguador 10x (PCR-MgCl₂), MgCl₂ 50 mM, Mezcla de dNTP 10 mM, 10 mM de cada cebador, ADN Taq polimerasa 2.5 U agua HPLC estéril y 1 µL de ADN en un volumen final de 25 µL (Cuadro 6).

Las condiciones de la PCR, para las 2 rondas, en el termociclador (MJ Mini Personal Thermal Cycler, Bio-Rad, USA) fueron de: 94 ° C durante 3 min, 35 ciclos de: 94°C durante 60 s, 45°C durante 60 s, 72°C durante 1 min; y 72°C durante 10 min.

Los productos de PCR se visualizaron en gel de agarosa al 1 % teñidos con bromuro de etidio (Bio-Rad, CA, E.U.) para evaluar el tamaño y la pureza del amplicón.

Cuadro 6. Preparación de PCR

	Cantidad (μL)
Agua HPLC estéril	14.5
Amortiguador 10x (PCR-MgCl ₂)	2.5
MgCl ₂ 50 mM	1.5
dNTP 10 mM	0.5
Primer 27F 10 mM	0.5
Primer 1492R 10 Mm	0.5
Taq ADN Polimerasa	0.1
ADN	1
Volumen total	21.1 μL

5.13.3 Corrida de DGGE

El DGGE se realizó conforme a Carillo-Reyes *et al.* (2012). Los productos de PCR se separaron en geles de poliacrilamida al 8 % con un gradiente de desnaturalización lineal (urea y formamida) del 30 al 60 % (1 mm de espesor) (Cuadro 7) en amortiguador TAE 50 x (Tris acetato 20 mM, acetato de sodio 10 mM, EDTA 0,5 mM, pH 8,0).

Cuadro 7. Preparación del gel DGGE

Solución	Cantidad gel 30 %	Cantidad gel 60 %
Acrilamida 8 % (p/v)	3 mL	3 mL
Amortiguador 50x TAE	0.3 mL	0.3 mL
Formamida	1.8 mL	3.6 mL
Urea	1.89 g	3.78 g
Glicerol	0.3 mL	0.3 mL
Agua	9.6 mL	7.8 mL
Volumen total	15 mL	15 mL
Persulfato de Amonio 10 % (p/v)	160 μ L	160 μ L
TEMED	16 μ L	16 μ L

La electroforesis se llevó a cabo a 60°C a un voltaje constante de 70 V durante 16 h. Posteriormente se sumergió el gel en solución de bromuro de etidio (Bio-Rad) durante 30 min y se enjuagó con agua destilada. Las bandas de gel se observaron a la luz UV y se analizaron mediante el fotodocumentador (AlphaImager HP System).

6. Resultados y discusión

6.1 Crecimiento de LUQ2 y producción de nisina en biorreactor

Para la obtención de LUQ2 y nisina se realizaron dos fermentaciones en medio suplementado con suero de leche. Para una aplicación exitosa en la industria alimentaria, la nisina debe producirse con una alta concentración, productividad y rendimiento y a un bajo costo. Los medios de cultivo preparados con suero de leche se han utilizado como medios de cultivo alternativos (García-Almendárez *et al.*, 2008; Malvido *et al.*, 2016).

En las fermentaciones en donde el aumento de la biomasa es paralelo al aumento de la bacteriocina, la nisina es sintetizada como un metabolito primario (Malvido *et al.*, 2016). En las 2 fermentaciones que se realizaron, se obtuvo nisina como metabolito primario.

Para poder calcular la actividad de nisina de las fermentaciones y de la nisina microencapsulada, se llevó a cabo la curva de calibración de nisina (Sigma) (Figura 5). Posteriormente se incubó la nisina a diferente concentración (UI/mL) en medio Assay inoculado con *M. luteus*. En el Cuadro 8 se muestran los halos de inhibición producidos por la nisina. Se graficó el diámetro en mm contra el logaritmo de Unidades Internacionales de nisina por mililitro.

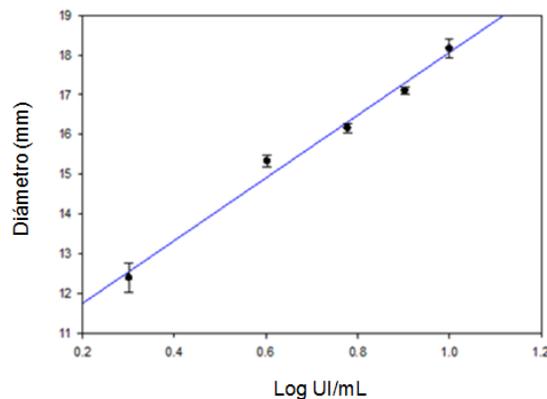


Figura 5. Curva de calibración de nisina

Cuadro 8. Halos de inhibición producidos por nisina en medio Assay inoculado con *M. luteus*

Concentración (UI/mL)	Diámetro del halo (mm)			Promedio (mm)	Desv. Estándar
2	12.1	12.8	12.3	12.4	0.36
4	15.2	15.5	15.3	15.33	0.15
6	16.1	16.3	16.1	16.16	0.11
8	17.2	17	17.1	17.1	0.1
10	18	18.3	17.9	18.06	0.20

Para las dos fermentaciones, se calculó la actividad de nisina del medio. El medio de suero suplementado permitió un máximo de 7.07 UI / mL y 7.01 UI/mL a nivel biorreactor a las 8 h de fermentación (Cuadro 9 y Cuadro 10).

Cuadro 9. Actividad de nisina durante la primera fermentación

Tiempo (horas)	Dilución	Diámetro del halo en mm			Promedio UI/mL de nisina	Desv. Estándar
2	1.00E-01	11.3	11	12.2	1.47	0.28
4	1.00E-01	16.1	16.3	16.5	6.02	0.35
6	1.00E-01	16.3	16.35	16.5	6.16	0.19
8	1.00E-01	16.9	16.8	16.75	7.01	0.15

Cuadro 10. Actividad de nisina durante la segunda fermentación

Tiempo (horas)	Dilución	Diámetro del halo en mm			Promedio UI/mL de nisina	Desv. Estándar
2	1.00E-01	13	12.5	13.1	2.18	0.20
4	1.00E-01	16.4	16.6	16.55	6.41	0.19
6	1.00E-01	16.6	16.66	16.5	6.54	0.15
8	1.00E-01	16.9	16.8	16.85	7.07	0.10

El crecimiento de LUQ2 durante la segunda fermentación se presenta en fase exponencial debido a las cuatro activaciones previas del inóculo (Figura 6). El inóculo para la fermentación fue de 6.7 Log UFC/mL (tiempo 0) y la máxima población fue de 9.44 Log UFC/ mL a las 8 h de fermentación.

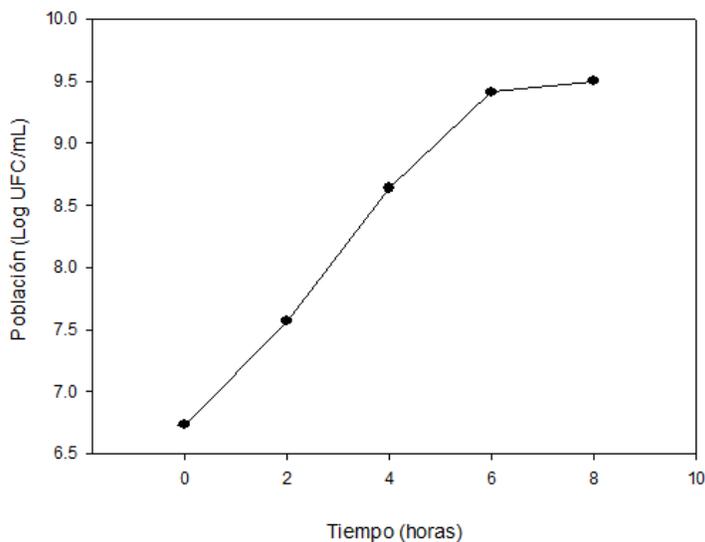


Figura 6. Crecimiento de LUQ2 durante la 8 h de fermentación, medio de cultivo suplementado con suero de leche.

Una vez finalizada la fermentación, se recuperaron las células y la nisina, y se microencapsularon por separado. Para la microencapsulación se utilizaron almidones modificados como materiales de pared, las microcápsulas se obtuvieron mediante secado por aspersión a una temperatura de 175 °C para la nisina y 110 °C para las células. La viabilidad de *L. lactis* microencapsulado fue de 2.817E+08 UFC/mL (2.817E+09 UFC/g).

La actividad de nisina microencapsulada fue de 5,244.72 UI/g y 6,260.60 UI/g (Cuadro 11). El balance de la actividad de nisina en el proceso de microencapsulado se muestra en el Cuadro 12, un título de 7.01 UI/mL y 7.07 UI/mL a la entrada del proceso de microencapsulado dio lugar a 5,244.72 UI/g y 6,260.60 UI/g de nisina, correspondientemente, al final del proceso de microencapsulación.

La nisina es termoestable debido a sus modificaciones postraduccionales, como la deshidratación de serina y treonina que forman aminoácidos como dehidroalamina (Dha) y dehidrobutirina (Dhb), estos residuos se unen a cadenas laterales de cisteína mediante enlace tioéter dando lugar a aminoácidos inusuales como lanionina (Lan) y α -metil-lanionina (MeLan) (Beristain-Bauza, 2012). Su composición de aminoácidos raramente encontrados en la naturaleza son los responsables de importantes propiedades funcionales, termoestabilidad y acción bactericida de la nisina (Jozala *et al.*, 2015).

En el Cuadro 12 se presenta el balance de sólidos en el proceso de encapsulado tanto para la nisina como para las células. El peso final de la nisina microencapsulada de la primera fermentación fue de 92 g con un rendimiento de 61.33 % y el de la segunda fermentación fue de 136 g con un rendimiento de 77.71 %. El peso final de las células microencapsuladas fue de 18.54 g con un rendimiento de 42.13 %. Un buen rendimiento de acuerdo al manual del secador por aspersion Mini Spray Dryer (B-191, Büchi, Flawil, Switzerland) es arriba del 60 %, lo cual se obtuvo con la nisina microencapsulada por su característica termoestable. El proceso de secado por aspersion maneja una temperatura de secado de 175 °C durante 1-1.5 segundos.

Silva *et al.* (2012), microencapsularon nisina con liposomas usando lecitina parcialmente purificada de soya y colesterol como materiales de pared, mediante el método de hidratación con película delgada; obteniendo una eficiencia de 88 % en la microencapsulación, pero sin presentar actividad. Xiao *et al.* (2011) microencapsularon nisina usando zeína mediante secado por aspersion obteniendo una eficiencia de 57.89 %. En este estudio, se logró obtener una eficiencia alta sin perder la actividad de la nisina microencapsulada.

En estudios realizados anteriormente por Patiño (2014), en el laboratorio de biotecnología de la UAQ, se microencapsuló y se encontraron las temperaturas ideales del secado por aspersión para la cepa LUQ2. En función a la eficiencia, la viabilidad y la actividad de nisina, se obtuvieron datos muy similares a los de Patiño. A una temperatura de entrada de 175 °C, él obtuvo una actividad de 6,730.2 UI/g de nisina microencapsulada con 65.7 % de eficiencia en el proceso y 9.87 ± 0.13 log UFC/g de LUQ2 microencapsulada a una temperatura de entrada de 110 °C.

Cuadro 11. Actividad de nisina microencapsulada

Fermentación	Diámetro del halo en mm			UI/g de nisina	Desv. Estándar
1.	16	15.8	15.7	5,244.72	0.23
2.	16.5	16.5	16.3	6,260.60	0.21

Cuadro 12. Balance de sólidos en el proceso de encapsulado

Fermentación	Entrada	Salida	Eficiencia del proceso de encapsulado ²
1	1.15 L de ELC ¹ + 150 g de polímero	92 g de nisina encapsulada	61.33 %
2	1.75 L de ELC ¹ + 175 g de polímero	136 g de nisina encapsulada	77.71 %
2	19 g de células + 25 g de polímero	18.54 g de células encapsuladas	42.13 %

¹ELC= Extracto Libre de Células

²Se calculó con base al peso del polímero, la cantidad de ELC es muy pequeña.

6.2 Determinación microbiológica en queso panela.

Se elaboraron 3 quesos tipo panela inoculados con la cepa LUQ2 microencapsulada y nisina microencapsulada (autoinductor), y 3 quesos sin inoculación. Se almacenaron durante 21 días a 4 °C; a los días 1, 7, 14 y 21 se registraron la actividad de nisina, la viabilidad de la cepa, la actividad proteolítica y el perfil peptídico.

Para evaluar microbiológicamente el proceso, se determinó la cuenta bacteriana total y hongos y levaduras por medio de la NOM-121-SSA1-119 y NOM-092-SSA1-1994, respetivamente.

Los resultados de la determinación de cuenta bacteriana total para los quesos con cultivo protector microencapsulado se muestran en la Cuadro 13.

Cuadro 13. Determinación de cuenta bacteriana total en quesos con cultivo protector

Tiempo (días)	Log (UFC/g) de queso			Promedio Log (UFC/g) de queso	Desv. Estándar
	Queso 1	Queso 2	Queso 3		
1	7.259	7.284	7.283	7.283	0.012
21	7.599	7.579	7.619	7.619	0.016

Con respecto a la determinación de hongos y levaduras, los quesos elaborados con cultivo protector al primer día tuvieron 25 UFC/g y a los veintiún días 50 UFC/g; y las muestras sin cultivo protector al primer día tuvieron 30 UFC/g y a los veintiún días 80 UFC/g. Esta reducción se pudo deber a que el cultivo microencapsulado estaba produciendo nisina *in situ*. La nisina tiene actividad antimicrobiana dirigida Gram positiva (Gharsallaoui *et al.*, 2016), pero el efecto hacia hongos y levaduras puede ser secundario debido a las modificaciones que produce la nisina en la flora bacteriana del queso.

Según la NOM-121-SSA1-1994, el límite máximo permitido de hongos y levaduras en quesos frescos es de 500 UFC/g. En los quesos elaborados, tanto con cultivo protector y sin cultivo protector, se obtuvo un promedio menor a 80 UFC/g, lo cual indica que los quesos no presentan contaminación y son seguros para el consumo humano. De acuerdo a la cuenta bacteriana total, no hay un límite máximo en quesos frescos.

6.3 Viabilidad de LUQ2 microencapsulado y actividad de nisina en el queso tipo panela

Durante el proceso de elaboración del queso, se inoculó 7 Log UFC de LUQ2 microencapsulado / g de pasta después del desuero parcial y se registró la viabilidad de la cepa microencapsulada y la actividad de nisina *in situ* durante el almacenamiento a 4 °C durante los días 1, 7, 14 y 21. Los resultados se presentan en la Figura 7.

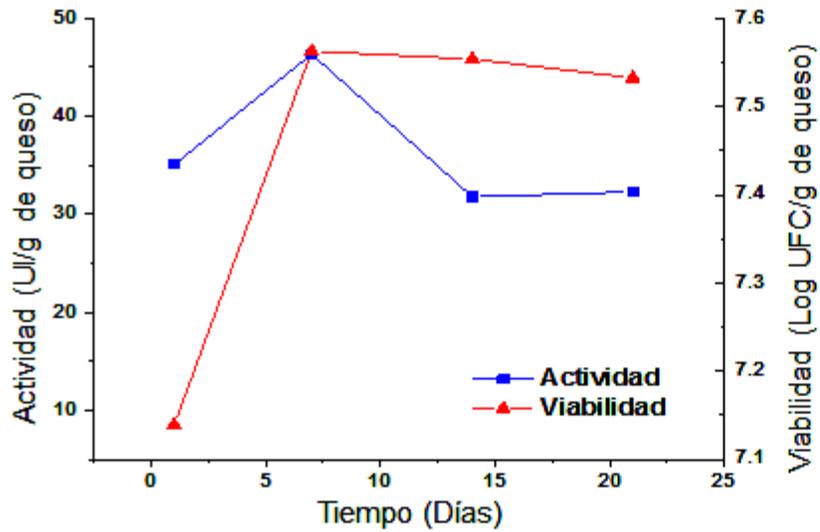


Figura 7. Actividad de nisina y en viabilidad de LUQ2 en queso

Piña (2011), en el laboratorio de Biotecnología de la Universidad Autónoma de Querétaro estableció que un inóculo de 7 log UFC/g de LUQ2 es suficiente para otorgar características sensoriales y microbiológicas deseables al queso, por lo que en este estudio se trabajó con esta población.

Los resultados en la **Figura 7** indican el crecimiento de la cepa en el sustrato (queso), con niveles superiores a 7 Log UFC/g. Se puede observar que la cepa a los 7 días de almacenamiento en la matriz del queso llegó a 7.56 Log UFC/g como crecimiento máximo, después de ese día la viabilidad de la cepa empezó a disminuir lentamente.

Patiño (2014), en el laboratorio de Biotecnología de la Universidad Autónoma de Querétaro obtuvo una población promedio de 7.4 log UFC/g de LUQ2 a los siete días de almacenamiento en un queso panela con cultivo protector. También determinó que una concentración de 7 log UFC/g de cultivo protector puede disminuir hasta un log de *L. monocytogenes* EGDe en 7 días de almacenamiento a 4 °C, en un queso inoculado con 4 log UFC/g.

A los quesos tipo panela se les agregó 7.5 mg de nisina/kg (30 UI/g). La concentración máxima permitida en quesos frescos es de 12.5 mg de nisina/kg (50 UI/g), de acuerdo al Comité FAO/OMS del Codex sobre la Leche y los Productos Lácteos" (Ross, 2002). Se puede incorporar la nisina para inducir la biosíntesis de la misma o se puede agregar directamente la cantidad máxima permitida de nisina.

Se registró la máxima producción de nisina al séptimo día de almacenamiento, alcanzando valores de 46.34 UI/g y posteriormente se registró una ligera disminución en la segunda y tercera semana. En investigaciones previas realizadas por Patiño (2014), a los 7 días de almacenamiento se obtuvo una máxima producción de nisina de 50 UI/g en un queso elaborado bajo las mismas condiciones. En ambos casos, la actividad de nisina en el queso está dentro de la normatividad.

De acuerdo a los resultados sobre la actividad de nisina en el queso, al séptimo día de almacenamiento ésta aumentó, esto podría deberse a que una pequeña cantidad de nisina puede promover la biosíntesis de nisina *in situ*. Es posible que la autoinducción se deba a que la nisina desencadena la producción de la misma por quorum sensing. El quorum sensing es una forma de comunicación celular en donde se generan señales para regular el mecanismo de la expresión genética en respuesta a la densidad de cierta molécula, en este caso de nisina en el medio (Trmčić *et al.*, 2011).

Varias cepas de BAL productoras de bacteriocinas han sido aisladas de la leche y los productos lácteos, según lo revisado recientemente por Franco *et al.* (2011). La nisina, producida por *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*, sigue siendo la bacteriocina más estudiada, y su uso comercial en quesos está permitido en muchos países (Furtado *et al.*, 2015).

Benech *et al.* (2002), adicionaron *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis UL719 y nisina Z microencapsulada en liposomas en queso Cheddar. La nisina se agregó a leche antes de la adición del cuajo, se obtuvo una actividad de nisina de 300 UI /g de queso y se evaluó la producción de nisina *in situ* durante 6

meses. Durante la maduración del queso, se observó una disminución progresiva de la actividad de nisina Z, se detectó una actividad de nisina de 27 ± 2 UI /g después de 6 meses de maduración. Estos autores obtuvieron una disminución en la actividad de nisina microencapsulada en el queso de 91 %, en nuestro caso sólo hubo una disminución de 7.93 % en 3 semanas.

Malheiros *et al.* (2012), añadieron 0.10 mg/mL y 25 mg/mL de nisina libre, 0.25 mg/mL nisina microencapsulada en liposomas y 3 log UFC/g de *L. monocytogenes*. Los quesos Minas frescal, originarios de Brasil, adicionados con nisina microencapsulada no disminuyeron la población de *L. monocytogenes*, sin embargo los quesos adicionados con nisina libre tuvo un efecto bactericida a los 7 días de almacenamiento. Malheiros *et al.* concluyeron que la nisina microencapsulada con liposomas pierde actividad en el queso, lo cual no pasa con el material encapsulante de este trabajo (60 % almidón modificado, 10 % proteína de suero concentrada y 30 % maltodextrina).

Furtado *et al.* (2015), prepararon quesos con leche de cabra pasteurizada adicionada con *L. lactis* DF04Mi productor de nisina o *L. lactis* R704. Los quesos fueron inoculados con 10^3 UFC/g de *L. monocytogenes*. Cuando los quesos se prepararon con *L. lactis* DF4Mi productor de nisina, el crecimiento de *L. monocytogenes* después de 10 días bajo refrigeración fue de 3.76 ± 0.03 UFC/g, 3 log menos que en los quesos donde la cepa productora de nisina estaba ausente.

Así mismo, Patiño (2014) concluyó que el queso panela con *L. lactis* UQ2 microencapsulado (7 log UFC/g) y nisina microencapsulada como inductor (12,5 mg / kg), incorporado con *L. monocytogenes* (4 log UFC/g) permitió la producción de nisina (126 UI/g) a los 21 días de almacenamiento. Lo cual logró una reducción en *L. monocytogenes* (1 log UFC/g). Este comportamiento se puede atribuir como un método de defensa y competición llevado a cabo por el cultivo protector contra otras bacterias en su hábitat, activando una mayor producción de antimicrobianos.

6.4 Actividad proteolítica en el queso tipo panela

Se realizó la curva estándar de tirosina para poder calcular la concentración de tirosina soluble en el queso (Figura 8)

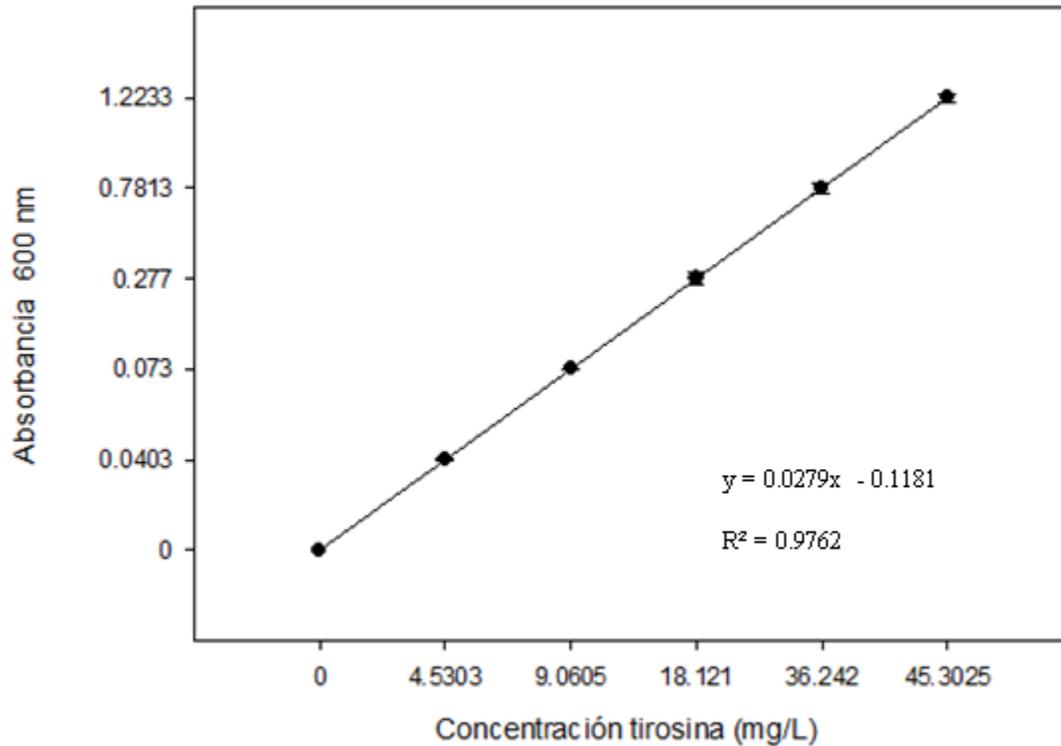


Figura 8. Curva estándar de tirosina

La tirosina soluble puede estar presente debido a productos de hidrólisis de las α -caseína, ya que los polipéptidos básicos N-terminales de la α _s-caseína resultantes de la acción del cuajo aportan al comienzo de la maduración nitrógeno soluble total. Así también, los fragmentos originados por la acción de la proteasa alcalina al hidrolizar la β -caseína contribuyen al incremento de tirosina soluble (Mendia *et al*, 2000).

La κ -caseína contiene 9 residuos de tirosina y al ser hidrolizada también contribuye a la formación de tirosina soluble. Durante la coagulación de la leche, la kappa caseína es hidrolizada por enzimas en el enlace 105:106 liberando para-kappa-caseína insoluble (residuos 1-105), el cual queda en la cuajada y contiene todos los residuos de tirosina (Mendia *et al*, 2000; Mora y Marcos, 1981).

Los aminoácidos pueden contribuir al sabor directo o indirectamente sirviendo como precursores de compuestos aromáticos volátiles tales como aldehídos, ácidos, alcoholes, ésteres y compuestos de azufre durante mecanismos enzimáticos como reacciones de transaminación o eliminación. En los últimos años, ha quedado claro que la conversión de aminoácidos en compuestos volátiles (saborizantes) juega un papel importante en la formación de sabor durante el proceso de maduración (Ayad *et al.*, 2001; Escobar-Zepeda *et al.*, 2016).

Se determinó la actividad proteolítica en los quesos con y sin cultivo protector, los días 1, 7, 14 y 21 y los resultados son expresados en los Cuadros 14 y 15 y Figura 9.

Cuadro 14. Actividad proteolítica en queso con cultivo protector

Tiempo (días)	mg/100 g de queso			Promedio mg/100 g de queso	Desv. Estándar
	Queso 1	Queso 2	Queso 3		
0	0.119	0.116	0.125	0.12	0.004
1	0.121	0.117	0.125	0.121	0.003
7	0.155	0.172	0.159	0.162	0.008
14	0.177	0.174	0.184	0.178	0.004
21	0.193	0.192	0.207	0.197	0.007

Cuadro 15. Actividad proteolítica en queso sin cultivo protector

Tiempo (días)	mg/100 g de queso			Promedio mg/100 g de queso	Desv. Estándar
	Queso 1	Queso 2	Queso 3		
0	0.119	0.116	0.125	0.12	0.004
1	0.121	0.117	0.125	0.121	0.003
7	0.155	0.172	0.159	0.162	0.008
14	0.177	0.174	0.184	0.178	0.004
21	0.193	0.192	0.207	0.197	0.007

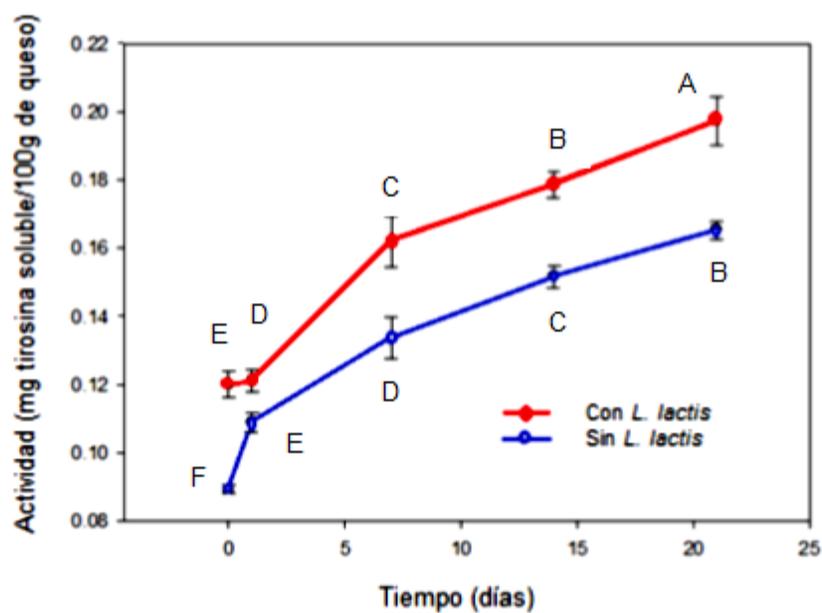


Figura 9. Actividad proteolítica en queso. Niveles que no estén conectados con la misma letra son significativamente diferentes.

De acuerdo a los resultados obtenidos, la actividad proteolítica en el queso panela con cultivo protector y sin cultivo protector son significativamente diferente de acuerdo al día de almacenamiento. La actividad proteolítica va en aumento conforme a los días de almacenamiento; la actividad máxima obtenida a los veintiún días en los quesos con *L. lactis* fue de 0.197 mg de tirosina soluble/100 g de queso, mientras que la actividad máxima en los quesos sin *L. lactis* fue de 0.165 mg de tirosina soluble/100 g de queso.

El queso panela con *L. lactis* tiene mayor actividad proteolítica debido a que durante el almacenamiento del queso, las enzimas proteolíticas del cultivo inicial juegan un papel importante en la ruptura de las proteínas. Se ha demostrado que las proteinasas y peptidasas de bacterias iniciadoras liberan péptidos y aminoácidos libres de caseína (Engels y Visser 1994; 2012 Guerra Martínez *et al.*, 2012). Varias enzimas implicadas en la conversión de aminoácidos se han identificado en los cultivos iniciadores. Generalmente, estas enzimas están implicadas en diversas reacciones, incluyendo desaminación, transaminación, descarboxilación y corte de las cadenas laterales de aminoácidos (Ayad *et al.*, 2001)

Eren-Vapur y Ozcán (2012), determinaron la concentración de aminoácidos libres en un queso blanco turco al variar los tipos de cuajo y la cantidad del cultivo iniciador. Obtuvieron los siguientes valores de tirosina libre: 0.015 mg/100 g al utilizar cuajo microbiano y 10 DCU (Direct Culture Unit) de cultivo iniciador, 0.030 mg/100 g al utilizar cuajo microbiano y 20 DCU de cultivo inicial, 0.010 mg/100 g al utilizar cuajo animal y 10 DCU de cultivo inicial y 0.019 mg/100 g al utilizar cuajo animal y 20 DCU de cultivo inicial. Los datos anteriores son menores que los que se obtuvieron en el queso tipo panela inoculado con LUQ2.

Bezerra *et al.* (2016) analizaron la actividad proteolítica en el queso Coalho, el cual es un queso fresco típico de la cocina brasileña elaborado con leche fermentada de cabra. En este caso fue suplementado con probióticos de bacterias ácido lácticas y se registró proteína soluble y liberación de aminoácidos desde el primer día de

almacenamiento. La concentración de tirosina al primer día fue de 10 mg/100 g de queso con una concentración de 6.5 log de cultivo. A pesar de que el queso de Bezerra y el de este proyecto fue inoculado con una concentración de cultivo parecida, es posible que las bacterias ácido lácticas inoculadas en el queso Coalho tuvieran un sistema más complejo de enzimas, por ser elaborado con leche de cabra.

El sistema proteolítico descrito en BAL está compuesto por distintas enzimas que dependiendo del mecanismo de acción pueden dividirse en: endopeptidasas (PepO, PepE y PepF) que hidrolizan enlaces peptídicos internos, aminopeptidasas (PepN, PepC, PepA y PepL) que hidrolizan residuos N-terminales; carboxipeptidasas que hidrolizan residuos C-terminales; di- y tripeptidasas (PepV y PepT) que hidrolizan dos o tres aminoácidos del terminal amino; y peptidasas específicas de prolina (PepX, PepI, PepP, PepQ y PepR). Aparte, los procesos catabólicos que ocurren dependen tanto del género bacteriano y su fisiología como de procesos metabólicos específicos, es por ello que la capacidad de formación de compuestos volátiles de las bacterias lácticas se ha considerado como un proceso cepa-dependiente (Escobar-Zepeda *et al.*, 2016)

6.5 Perfil proteico en el queso tipo panela

6.5.1 Urea PAGE

Se realizó Urea PAGE de los quesos con cultivo protector (Figura 10) y de los quesos sin cultivo protector (Figura 11), durante su almacenamiento: 0, 1, 7, 14 y 21 días a 4 °C

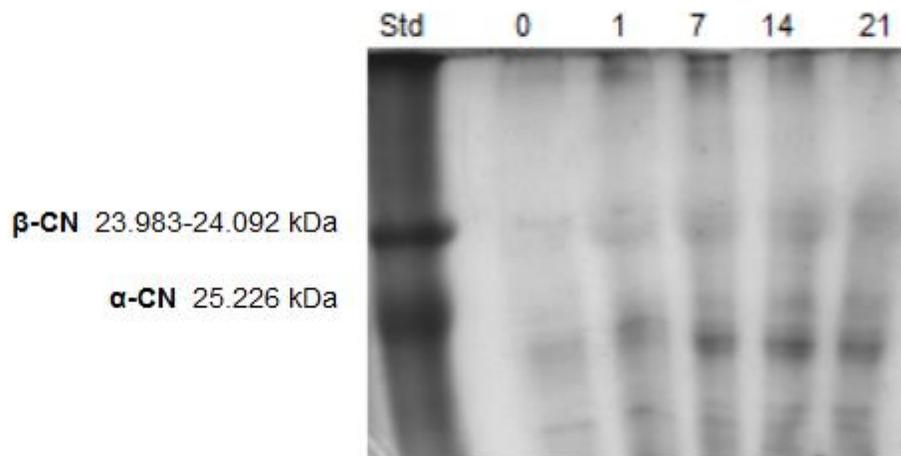


Figura 10 Gel urea PAGE en queso con cultivo protector. Días 0, 1, 7, 14 y 21; Std: estándar de caseína bovina. β -CN: β -Caseína; α -CN: α -Caseína.

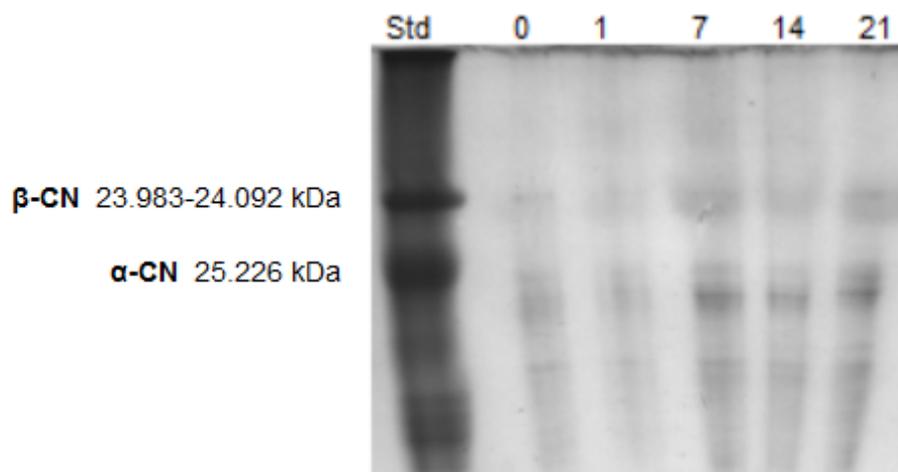


Figura 11. Gel urea PAGE en queso sin cultivo protector. Días 0, 1, 7, 14 y 21; Std: estándar de caseína bovina. β -CN: β -Caseína; α -CN: α -Caseína.

Las Figuras. 10 y 11 muestran la hidrólisis de las caseínas y los perfiles de proteólisis durante los días de almacenamiento. En la Figura 10, desde el séptimo de almacenamiento se observa que las bandas de los productos de la hidrólisis de las caseínas se intensifican presentando movilidad electroforética para el veintiún día de almacenamiento. En la Figura 11, el gel del queso sin cultivo protector, las bandas de los productos de hidrólisis también se van incrementando presentando movilidad electroforética conforme los días de almacenamiento, pero a menor medida que el gel con cultivo protector.

Esto demuestra que sí hay evidencia de hidrólisis de caseína y productos de bajo peso molecular. En la electroforesis Tris-tricina se podrán observar mejor los péptidos de bajo peso molecular.

En ambas Figuras (10 y 11) el perfil electroforético indica que la banda de α -caseína se intensificó durante los días de almacenamiento. Park (2001), concluyó en quesos de leche de cabra y Veloso *et al.* (2004) en queso Terrincho con leche bovina que la α -caseína de estos quesos va disminuyendo conforme al tiempo de almacenamiento. En este estudio, la caseína α fue en aumento conforme a los días de almacenamiento pudiendo deberse a los productos de la hidrólisis de la β -caseína.

Moatsou *et al.* (2002), investigaron el nivel de proteólisis en los quesos Feta producidos mediante el uso de una mezcla de leche de oveja y cabra (4:1) en 3 plantas lecheras diferentes durante 4 meses de almacenamiento. El yogur se usó como un cultivo inicial. El análisis de Urea PAGE en el estudio de Moatsou *et al.* mostró mayor hidrólisis de la α -caseína y una hidrólisis constante de la β -caseína; la diferencia en la cantidad de hidrólisis se relacionó con el pH y el contenido de sal en la humedad de los quesos. En este estudio, también hubo mayor hidrólisis de α -caseína en el queso con cultivo protector.

Di Cagno *et al.* (2003), reportaron una ligera degradación de los fragmentos de caseína α y β -caseína en los quesos italianos Canestrato Pugliese, Fiore Sardo y Pecorino Romano elaborados a partir de leche de oveja sin añadir cultivo inicial. Lo que fue contrario a este estudio, en donde sí se tuvo hidrólisis de ambas caseínas en el queso sin cultivo.

6.5.2 Tris-tricina

Se realizó electroforesis Tris-tricina en los quesos con cultivo protector y en el queso sin cultivo protector para observar el cambio proteolítico y péptidos de bajo peso molecular, durante los días 0, 1, 7, 14 y 21 de almacenamiento (Figura 12 y Figura 14). De acuerdo al software AlphaView (Protein Sample, California, E.U.) se obtuvieron los pesos de las bandas y el análisis densitométrico.

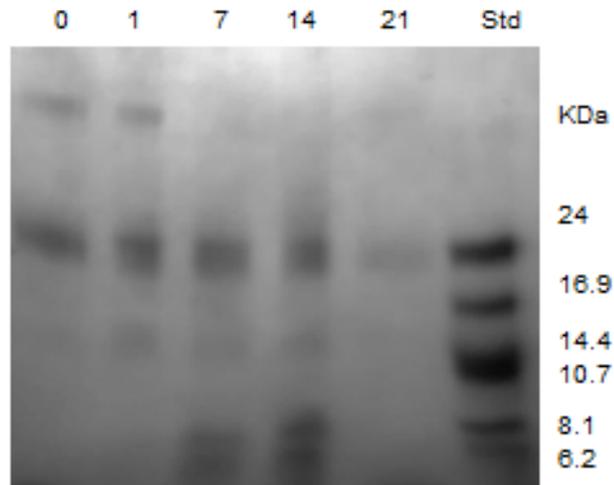


Figura 12. Gel Tris- tricina PAGE de queso tipo panela con cultivo protector. Días 0, 1, 7, 14 y 21; Marcador de PM (Amersham, para péptidos)

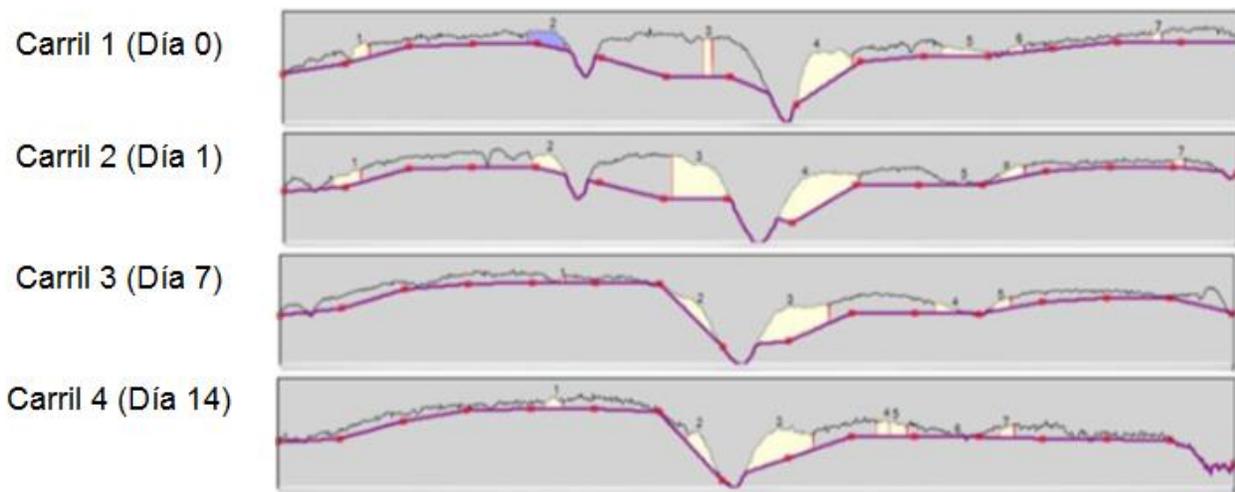


Figura 13. Análisis densitométrico del gel Tris- tricina PAGE de queso tipo panela con cultivo protector.

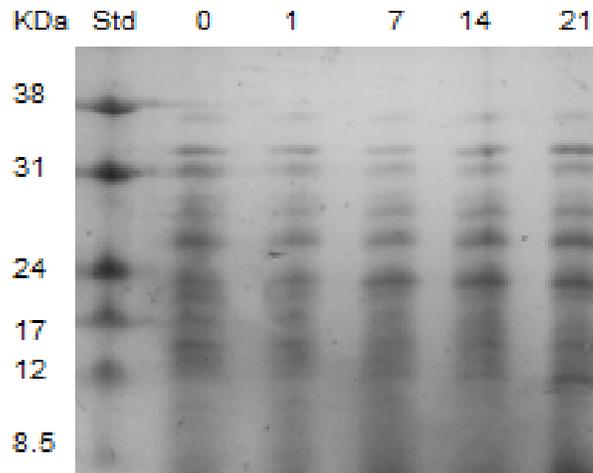


Figura 14. Gel Tris- tricina PAGE de queso tipo panela sin cultivo protector. Días 0, 1, 7, 14 y 21; Marcador de PM (Amersham RPN755E)

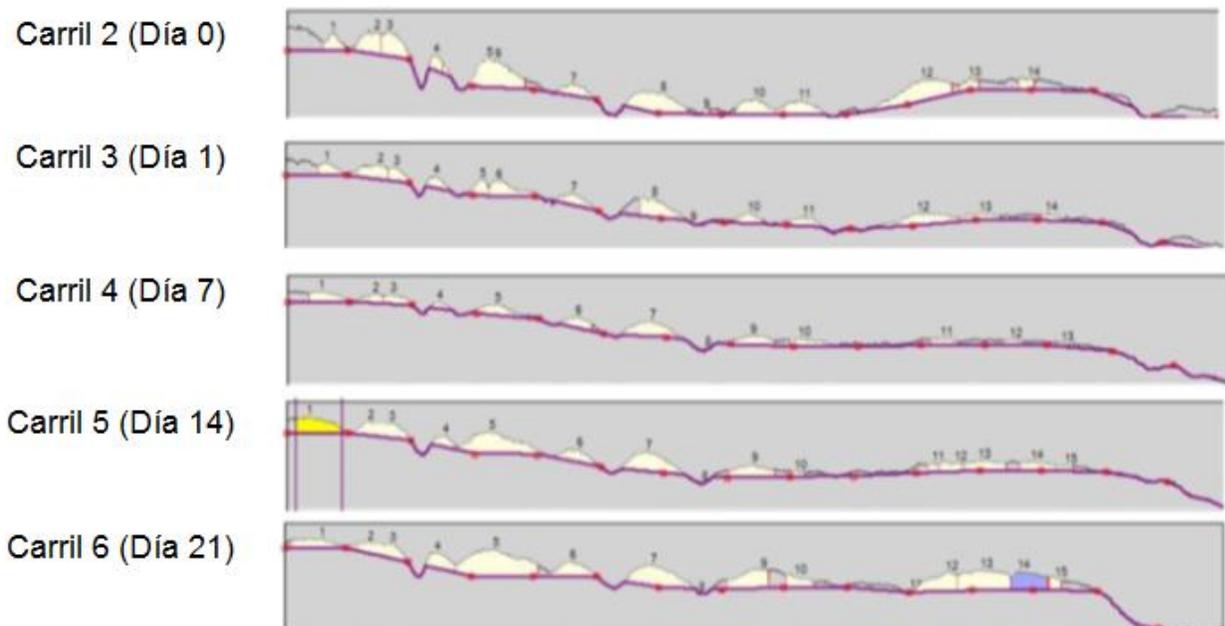


Figura 15. Análisis densitométrico del gel Tris- tricina PAGE de queso tipo panela sin cultivo protector.

Ambas figuras muestran perfiles distintos y diferencia en el número de bandas. En la Figura 12, gel con muestras de queso con cultivo protector, se aprecia una clara diferencia entre los tiempos de almacenamiento; para los días 0 y 1 se observan 4 bandas prominentes con pesos de 36.7, 24.7, 23, 21 y 14.9 kDa; para los días 7 y 14 también sobresalen 5 bandas de 24.7, 23, 14.9, 7.6 y 7 kDa; para el día 21 sólo se aprecia visiblemente la banda de 24.7 kDa. Las bandas constantes de 23 y 24.7 kDa podrían corresponder a la caseína α_1 , α_2 o β con pesos de 23, 25 y 23 kDa respectivamente (Badui, 2006).

A los 21 días sólo se observa 1 banda, sin embargo pueden haber péptidos menor a 6.2 kDa. Esto debido a que durante el almacenamiento del queso los principales sustratos proteicos (α y β -caseína) son hidrolizados por las enzimas del coagulante residual, del sistema proteínasa de la leche y de las bacterias lácticas añadidas conforme su tiempo de almacenamiento (Mendia *et al*, 2000). Esta proteólisis se puede ver reflejada en el sabor del producto, ya que ciertos péptidos pequeños pueden generar amargor en el alimento (Sánchez-Ponte, 2013).

Par las muestras sin cultivo, Figura 14, no se observa una notable diferencia entre los tiempos de almacenamiento. A los 21 días de almacenamiento, se observan 7 bandas de pesos moleculares mayores a 24 kDa, una banda de 24.6 kDa, 4 bandas entre 12 y 24 kDa así como un barrido de 3 bandas menores a 8kDa.

En la Figura 13 y en la Figura 15 se observa el análisis densitométrico de las bandas de proteína teñidas en gel Tris-tricina de queso con cultivo protector y sin cultivo protector. Los resultados confirman que en ambos quesos hubo degradación de caseína, generando péptidos de bajo peso molecular. Los péptidos de bajo peso molecular en el queso con cultivo protector muestran un patrón más ordenado, menos bandas pero de mayor densidad óptica que el queso sin cultivo protector.

6.5.3 DGGE

Durante el proceso de almacenamiento se van acumulando diferentes clases de compuestos (aminas, aldehídos, cetonas, ácidos grasos libres) que contribuyen al aroma. Estos compuestos, generalmente ausentes o en baja concentración en la cuajada, surgen como consecuencia de las transformaciones sufridas por los componentes mayoritarios de la leche (lactosa, lípidos, sobre todo los triglicéridos, y proteínas, especialmente las caseínas). Todas estas transformaciones están catalizadas por las enzimas de diferentes microorganismos de diversa procedencia: unos llegan al queso directamente de la leche y otros son añadidas en el procesado del queso.

El análisis del DGGE se realizó con el fin de comprobar la diversidad bacteriana y confirmar la presencia de ADN del cultivo protector en el queso.

En la Figura 16 se presenta el perfil DGGE PAGE de queso tipo panela con y sin cultivo protector a los 14 días de almacenamiento. La línea 1 es proveniente del queso sin cultivo protector y la línea 2 del queso con cultivo protector. Los 2 patrones de bandas que se observan se consideran la "imagen" de la comunidad microbiana que está presente en los quesos.

La línea 1 presenta 4 bandas, mientras que la línea 2 presenta 3 bandas y una de ellas muy concentrada. La primera y la última banda de las 2 líneas presentan similar peso molecular, mientras que la línea 2 tiene una banda con densidad mayor que pudiera deberse al cultivo protector, *L. lactis* UQ2. Este resultado pudiera indicar que la cepa inoculada predominó en el queso durante el almacenamiento.

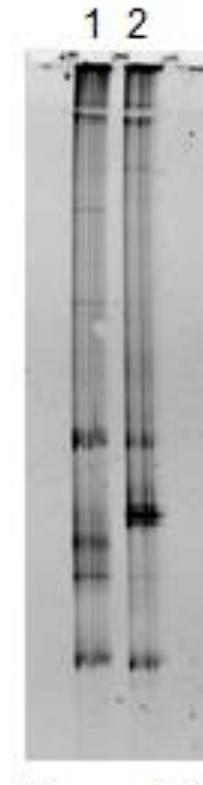


Figura 16. Gel DGGE PAGE de queso tipo panela con cultivo protector y sin cultivo protector. 1. Sin cultivo protector; 2. Con cultivo protector. En cada patrón (carril) se visualiza el ADN de la comunidad microbiana (microorganismo por banda) que se encuentra en la muestra de estudio.

Cárdenas *et al.* (2014), evaluaron la supervivencia de dos cepas de *Lactobacillus salivarius* (CECT5713 y PS2) durante el almacenamiento de queso fresco durante 28 días a 4°C. Para el perfil de DGGE del queso fresco utilizaron los primers universales U968-GC-f y L1401-r. Obtuvieron 4 bandas predominantes, 1 perteneciente a *Lactobacillus salivarius* ESI153 y 3 pertenecientes a *Lactobacillus salivarius* PS2. Apreciándose únicamente bandas de los cultivos iniciadores.

Para nuestro caso, es importante determinar la secuencia de ADN de las muestras para saber con certeza la presencia de la microbiota en el queso tipo panela con cultivo protector.

7. Conclusiones

Se creció LUQ2 a partir de fase exponencial a nivel biorreactor con suero lácteo suplementado. La fermentación tardó 8 h y se obtuvo nisina *in situ* con una actividad de 7.07 UI/mL

La microencapsulación de la nisina tuvo una eficiencia de 77.71 % de recuperación de sólidos con una actividad 6,260 UI/g; mientras que la microencapsulación de LUQ2 tuvo una eficiencia de 42.13 % de recuperación de sólidos con una población de 9.44 log UFC/g.

En el queso panela se registró una producción de 7.5 log UFC/g de *L. lactis* y se pudo obtener nisina *in situ* con 46 UI/g a los 7 días de almacenamiento; concentración permitida en quesos frescos de acuerdo al Comité FAO / OMS del Codex sobre la Leche y los Productos Lácteos. Por lo tanto, la adición de UQ2 en el proceso del queso resultó un medio favorable para este cultivo e indujo la producción de nisina *in situ*. La nisina en el queso panela pudo prevenir la presencia de microorganismos patógenos.

Asimismo, LUQ2 apoyó el proceso de proteólisis en el queso. La concentración máxima de tirosina libre en el queso con cultivo protector fue de 0,197 mg/100 g de queso mientras que en el queso sin cultivo protector fue de 0.165 mg/100 g de queso. Esto indica que el queso tipo panela con cultivo protector tuvo mayor actividad enzimática, formación de péptidos y liberación de aminoácidos.

Las técnicas electroforéticas mostraron hidrólisis de caseína, generando péptidos de bajo peso molecular. La técnica de Urea PAGE mostró mayor hidrólisis de α -caseína en el queso con cultivo protector y la hidrólisis de β -caseína aumentó muy poco conforme a los días de almacenamiento. Por otra parte, la técnica de tris-Tricina PAGE para los quesos con cultivo protector mostró evidencia sobre un proceso más controlado de péptidos de bajo peso molecular, menos bandas pero de mayor densidad óptica que el queso sin cultivo protector.

El perfil proteolítico confirmó que el cultivo protector tiene un doble efecto, ya que brinda efecto bioprotector al queso y también desarrolla nuevos perfiles preteicos que pueden generar compuestos de sabor y aroma agradables al consumidor, de acuerdo a lo que ya se había visto en investigaciones anteriores.

Un cultivo protector del género *Lactococcus* tiene un enorme potencial en la industria de alimentos y sobre todo en la industria quesera. LUQ2 se puede crecer en un medio de bajo costo y genera nisina *in situ* mediante autoinducción. Es factible su microencapsulación y su adición en el queso panela. El queso panela se presenta con un medio favorable para su crecimiento y generación de nisina *in situ*, lo cual permite que el producto final presente una buena calidad microbiológica.

8. Referencias

- Almli, V.L., Verbeke, W., Vanhonacker, F., Naes, T., Hersleth, M. (2011). General image and attribute perceptions of traditional food in six European countries. *Food quality and preference*, 22:129–138
- Álvarez-Sieiro, P., Montalbán-López, M., Mu, D., Kuipers, O. (2016). Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Applied Microbiology Biotechnology*, 100:2939–2951
- Ammor, S., Tauveron, G., Dufour, E., Chevallier, I. (2006). Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility: 1—screening and characterization of the antibacterial compounds. *Food Control*, 17(6), 454-461.
- Andrews, A. T. (1983). Proteinases in normal bovine milk and their action on caseins. *Journal of Dairy Research*, 50(1), 45-55.
- Arcuri, E. F., El Sheikha, A. F., Rychlik, T., Piro-Métayer, I., Montet, D. (2013). Determination of cheese origin by using 16S rDNA fingerprinting of bacteria communities by PCR–DGGE: Preliminary application to traditional Minas cheese. *Food Control*, 30(1), 1-6.
- Arnison, P. G., Bibb, M. J., Bierbaum, G., Bowers, A. A., Bugni, T. S., Bulaj, G., Cotter, P. D. (2013). Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: overview and recommendations for a universal nomenclature. *Natural Product Reports*, 30(1), 108-160.
- Ausubel, F.M.; Brent, R.; Kingston, R.E.; Moore, D.; Seidman, J., Smith, J.; Struhl, K. (1999). Short Protocols in Molecular Biology, 4th edición. Vol. 1. New York: Wiley. 10-18
- Ayad, E. H., Verheul, A., Engels, W. J., Wouters, J. T. M., Smit, G. (2001). Enhanced flavour formation by combination of selected lactococci from industrial and artisanal origin with focus on completion of a metabolic pathway. *Journal of Applied Microbiology*, 90(1), 59-67.
- Ayad, E.H.E., Verheul, A., Engels, W.J.M., Wouters, J.T.M., Smit, G. (2001). Enhanced flavour formation by combination of selected lactococci from industrial and

- artisanal origin with focus on completion of a metabolic pathway. *Journal of Applied Microbiology*, 90:59–67
- Bajpai, V. K., Han, J. H., Rather, I. A., Park, C., Lim, J., Paek, W. K., Park, Y. H. (2016). Characterization and antibacterial potential of lactic acid bacterium *pediococcus pentosaceus* 4I1 isolated from freshwater fish zacco koreanus. *Frontiers in Microbiology*, 7.
- Ballesteros, C., Poveda, J.M., Gonzalez-Vinas, M.A., Cabezas, L. (2006). Microbiological, biochemical and sensory characteristics of artisanal and industrial Manchego cheeses. *Food Control*, 17:249-255
- Barbosa, A. A. T., Mantovani, H. C., Jain, S. (2016). Bacteriocins from lactic acid bacteria and their potential in the preservation of fruit products. *Critical Reviews in Biotechnology*, 37:1-13.
- Baruzzi, F., Lagonigro, R., Quintieri, L., Morea, M., Caputo, L. (2012). Occurrence of non-lactic acid bacteria populations involved in protein hydrolysis of cold-stored high moisture Mozzarella cheese. *Food Microbiology*, 30(1), 37-44.
- Beristain-Bauza, S. C., Palou, E., López Malo, A. (2012). Bacteriocinas: antimicrobianos naturales y su aplicación en los alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 6(2), 64-78
- Bezerra, T. K. A., de Araujo, A. R. R., do Nascimento, E. S., de Matos Paz, J. E., Gadelha, C. A., Gadelha, T. S., Madruga, M. S. (2016). Proteolysis in goat “coalho” cheese supplemented with probiotic lactic acid bacteria. *Food Chemistry*, 196, 359-366.
- Bonetta, S., Bonetta, S., Carraro, E., Rantsiou, K., Cocolin, L. (2008). Microbiological characterisation of Robiola di Roccaverano cheese using PCR–DGGE. *Food Microbiology*, 25(6), 786-792.
- Bozoudi, D., Kotzamanidis, C., Hatzikamari, M., Tzanetakis, N., Menexes, G., Litopoulou-Tzanetaki, E. (2015). A comparison for acid production, proteolysis, autolysis and inhibitory properties of lactic acid bacteria from fresh and mature Feta PDO Greek cheese, made at three different mountainous areas. *International Journal of Food Microbiology*, 200, 87-96.

- Breukink, E. y Kruijff, B. (2006). Lipid II as a target for antibiotics. *Nature Reviews Drug Discovery*, 10:1038
- British Standards Institution (1974). Methods for the estimation and differentiation of nisin in processed cheese. BS 4020.
- Brutti, C. B., Pardo, M. F., Caffini, N. O., Natalucci, C. L. (2012). *Onopordum acanthium* L.(Asteraceae) flowers as coagulating agent for cheesemaking. *LWT-Food Science and Technology*, 45(2), 172-179
- Candioti, M. C., Hynes, E., Quiberoni, A., Palma, S. B., Sabbag, N., Zalazar, C. A. (2002). Reggianito Argentino cheese: influence of *Lactobacillus helveticus* strains isolated from natural whey cultures on cheese making and ripening processes. *International Dairy Journal*, 12(11), 923-931.
- Cárdenas, N., Calzada, J., Peirotén, Á., Jiménez, E., Escudero, R., Rodríguez, J. M., Fernández, L. (2014). Development of a potential probiotic fresh cheese using two *Lactobacillus salivarius* strains isolated from human milk. *BioMed Research International*, 2014.
- Carrillo-Reyes, J., Celis, L. B., Alatraste-Mondragón, F., Razo-Flores, E. (2012). Different start-up strategies to enhance biohydrogen production from cheese whey in UASB reactors. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(7), 5591-5601.
- Castro G. (2007). Evaluación del efecto biopreservador del *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* en queso blanco. Trabajo de Grado. Universidad del Zulia. Facultad de Ingeniería. División de Postgrado. Maracaibo
- CDC (2017). Outbreak Studies. Septiembre 2017, de CDC Sitio web: <https://www.cdc.gov/foodsafety/rawmilk/rawmilk-outbreaks.html>
- Cervantes Escoto, F., Villegas de Gante, A., Cesín Vargas, A., Espinosa Ortega, A. (2008). Los quesos mexicanos genuinos. Patrimonio cultural que debe rescatarse. Mexico: Mundi Prensa
- Cisneros-Pérez, C., Carrillo-Reyes, J., Celis L., Alatraste-Mondragón, F., Etchebehere, C. Razo-Flores, E. (2015) Inoculum pretreatment promotes differences in hydrogen production performance in EGSB reactors. *International Journal of Hydrogen Energy*. 6329-6339.

- Codex Alimentarius. (1999). Norma general para Queso. CODEX STAN-61978
- Collins, Y. F., McSweeney, P. L., Wilkinson, M. G. (2003). Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. *International Dairy Journal*, 13(11), 841-866
- Corr, S.C., Li, Y., Riedel, C.U., O'Toole, P.W., Hill, C., Gahan, C.G. (2007). Bacteriocin production as a mechanism for the antiinfective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 104: 7617–7621.
- Cotter P., Hill, C., Ross, R. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*. 3:777–788.
- Davidson, P., Sofos, J., Branen, A. (2005). Antimicrobials in Food. CRC Press. Third edition. Pág. 659
- de Kruijff, B., van Dam, V., Breukink, E. (2008). Lipid II: a central component in bacterial cell wall synthesis and a target for antibiotics. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 79(3), 117-121.
- Desai, K. G. H. y Jin Park, H. (2005). Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying Technology*, 23(7), 1361-1394.
- Di Cagno, R., Banks, J., Sheehan, L., Fox, P. F., Brechany, E. Y., Corsetti, A., Gobbetti, M. (2003). Comparison of the microbiological, compositional, biochemical, volatile profile and sensory characteristics of three Italian PDO ewes' milk cheeses. *International Dairy Journal*, 13(12), 961-972.
- Dolci, P., Alessandria, V., Zeppa, G., Rantsiou, K., Cocolin, L. (2008). Microbiological characterization of artisanal Raschera PDO cheese: analysis of its indigenous lactic acid bacteria. *Food Microbiology*, 25(2), 392-399.
- Dolci, P., Zenato, S., Pramotton, R., Barmaz, A., Alessandria, V., Rantsiou, K., Cocolin, L. (2013). Cheese surface microbiota complexity: RT-PCR-DGGE, a tool for a detailed picture?. *International Journal of Food Microbiology*, 162(1), 8-12.
- Engels, W.J.M. and Visser, S. (1994) Isolation and comparative characterization of components that contribute to the flavour of different types of cheese. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 48, 127±140.

- Eren-Vapur, U. y Ozcan, T. (2012). Determination of free amino acids in whole-fat Turkish White Brined Cheese produced by animal and microbial milk-clotting enzymes with and without the addition of starter culture. *Mljekarstvo/Dairy*, 62(4).
- Escobar, M. C., Van Tassell, M. L., Martínez-Bustos, F., Singh, M., Castaño-Tostado, E., Amaya-Llano, S. L., Miller, M. J. (2012). Characterization of a Panela cheese with added probiotics and fava bean starch. *Journal of Dairy Science*, 95(6), 2779-2787
- Escobar-Zepeda, A., Sanchez-Flores, A., Baruch, M. Q. (2016). Metagenomic analysis of a Mexican ripened cheese reveals a unique complex microbiota. *Food Microbiology*, 57, 116-127
- Farrell, H. M., Jimenez-Flores, R., Bleck, G. T., Brown, E. M., Butler, J. E., Creamer, L. K., Swaisgood, H. E. (2004). Nomenclature of the proteins of cows' milk—sixth revision. *Journal of Dairy Science*, 87(6), 1641-1674.
- FDA (2016). Classification of illnesses attributable to foods (A classification by symptoms, incubation periods, and types of agents). Investigation Operation Manual. Exhibit 8-6
- Fernández de Palencia, P., de la Plaza, M., Amárita, F., Requena, T., Peláez, C. (2006). Diversity of amino acid converting enzymes in wild lactic acid bacteria. *Enzyme and Microbial Technology*. 38: 88–93.
- Flórez, A. B. y Mayo, B. (2006). Microbial diversity and succession during the manufacture and ripening of traditional, Spanish, blue-veined Cabrales cheese, as determined by PCR-DGGE. *International Journal of Food Microbiology*, 110(2), 165-171
- Franco, B., De Martinis, E., Todorov, S.D. (2011). Bioconservação de produtos lácteos probióticos e não probióticos empregando bacteriocinas de bactérias lácticas. In: Saad SMI, da Cruz AG, Faria JAF (eds) Probióticos e Prebióticos em Alimentos. Fundamentos e Aplicações Tecnológicas. Varela, São Paulo.
- Gad, S. A., El-Baky, R. M. A., Ahmed, A. B. F., & Gad, G. F. M. (2016). In vitro evaluation of probiotic potential of five lactic acid bacteria and their

- antimicrobial activity against some enteric and food-borne pathogens. *African Journal of Microbiology Research*, 10(12), 400-409.
- García-Almendárez, B. E., Cann, I. K. O., Martin, S. E., Guerrero, I., Regalado, C. (2008). Effect of *Lactococcus lactis* UQ2 and its bacteriocin on *Listeria monocytogenes* biofilms. *Food Control*. 19: 670-680.
- García-Parra, M. D., Campelo, A. B., García-Almendárez, B. E., Regalado, C., Rodríguez, A., Martínez, B. (2010). Enhancement of nisin production in milk by conjugal transfer of the protease-lactose plasmid pLP712 to the wild strain *Lactococcus lactis* UQ2. *International Journal of Dairy Technology*, 63(4), 523-529.
- Gharsallaoui, A., Oulahal, N., Joly, C., Degraeve, P. (2016). Nisin as a food preservative: part 1: physicochemical properties, antimicrobial activity, and main uses. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(8), 1262-1274.
- González, T. y Rojas, R. (2005). Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico. *Salud pública de México*, 47(5), 388-390.
- González-sánchez, F., Azaola, A., Gutiérrez-López, G. F., Hernández-Sánchez, H. (2010). Viability of microencapsulated *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB12 in kefir during refrigerated storage. *International Journal of Dairy Technology*, 63(3), 431-436.
- Guerra-Martínez, J. A., Montejano, J. G., Martín-del-Campo, S. T. (2012). Evaluation of proteolytic and physicochemical changes during storage of fresh Panela cheese from Queretaro, Mexico and its impact in texture. *CyTA-Journal of Food*, 10(4), 296-305.
- Haider, S. R., Reid, H. J., Sharp, B. L. (2012). Tricine-SDS-PAGE. Protein Electrophoresis: Methods and Protocols. *Methods in Molecular Biology*, 869:81-91.
- Hamama, A., El Hankouri, N., El Ayadi, M. (2002). Fate of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in the presence of nisin-producing *Lactococcus lactis* strain during manufacture of Jben, a Moroccan traditional fresh cheese. *International Dairy Journal*, 12: 933-938.

- Hillman, J.D., Brooks, T.A., Michalek, S.M., Harmon, C.C., Snoep, J.L., van der Weijden, C.C. (2000). Construction and characterization of an effector strain of *Streptococcus mutans* for replacement therapy of dental caries. *Infection and Immunity*, 68:543–549.
- Hinz, K., O'Connor, P. M., O'Brien, B., Huppertz, T., Ross, R. P., Kelly, A. L. (2012). Proteomic study of proteolysis during ripening of Cheddar cheese made from milk over a lactation cycle. *Journal of Dairy Research*, 79(2), 176-184.
- Hsu, S. T. D., Breukink, E., Tischenko, E., Lutters, M. A., de Kruijff, B., Kaptein, R., van Nuland, N. A. (2004). The nisin-lipid II complex reveals a pyrophosphate cage that provides a blueprint for novel antibiotics. *Nature Structural and Molecular Biology*, 11(10), 963.
- Huq, T., Riedl, B., Bouchard, J., Salmieri, S., Lacroix, M. (2014). Microencapsulation of nisin in alginate-cellulose nanocrystal (CNC) microbeads for prolonged efficacy against *Listeria monocytogenes*. *Cellulose*, 21(6), 4309-4321.
- Jiménez-Guzmán, J., Flores-Nájera, A., Cruz-Guerrero, A. E., García-Garibay, M. (2009). Use of an exopolysaccharide-producing strain of *Streptococcus thermophilus* in the manufacture of Mexican Panela cheese. *LWT-Food Science and Technology*, 42(9), 1508-1512.
- Jozala, A. F., de Lencastre Novaes, L. C., Junior, A. P. (2015). Nisin. In concepts, compounds and the alternatives of antibacterials. *Inmunology and Microbiology*. 5,103-119.
- Kafili, T., Razavi, S. H., Djomeh, Z. E., Naghavi, M. R., Álvarez-Martín, P., Mayo, B. (2009). Microbial characterization of Iranian traditional Lighvan cheese over manufacturing and ripening via culturing and PCR-DGGE analysis: identification and typing of dominant lactobacilli. *European Food Research and Technology*, 229(1), 83-92.
- Kaškonienė, V., Stankevičius, M., Bimbraitė-Survilienė, K., Naujokaitytė, G., Šernienė, L., Mulkytė, K., Maruška, A. (2017). Current state of purification, isolation and analysis of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(4):1323-1335.

- Khaksar, R., Hosseini, S. M., Hosseini, H., Shojaee-Aliabadi, S., Mohammadifar, M. A., Mortazavian, A. M., Komeily, R. (2014). Nisin-loaded alginate-high methoxy pectin microparticles: preparation and physicochemical characterisation. *International Journal of Food Science and Technology*, 49(9), 2076-2082.
- Knerr, P. J. y van der Donk, W. A. (2012). Discovery, biosynthesis, and engineering of lantipeptides. *Annual review of biochemistry*, 81, 479-505.
- Kommineni, S., Bretl, D.J., Lam, V., Chakraborty, R., Hayward, M., Simpson, P., Cao, Y., Bousounis, P., Kristich, C.J., Salzman, N.H. (2015). Bacteriocin production augments niche competition by enterococci in the mammalian gastrointestinal tract. *Nature*, 526(7575): 719–722.
- Kunitz, M. (1947). Crystalline soybean trypsin inhibitor. *The Journal of General Physiology*, 30(4), 291-310.
- Laridi, R., Kheadr, E. E., Benech, R. O., Vuillemand, J. C., Lacroix, C., Fliss, I. (2003). Liposome encapsulated nisin Z: optimization, stability and release during milk fermentation. *International Dairy Journal*, 13(4), 325-336
- Lawuyi, B., Chen, H., Afkhami, F., Kulamarva, A., Prakash, S. (2007). Microencapsulated engineered *Lactococcus lactis* cells for heterologous protein delivery: preparation and in vitro analysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 142(1), 71-80.
- Le Lay, C., Dridi, L., Bergeron, M. G., Ouellette, M. (2016). Nisin is an effective inhibitor of *Clostridium difficile* vegetative cells and spore germination. *Journal of Medical Microbiology*, 65(2), 169-175.
- Leroy, F., De Vuyst, L. (2004) Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science and Technology*. 15(2), 67-78.
- Lewus, C.B., Sun, S., Monteville, T.J. (1992). Production of an amylase-sensitive bacteriocin by an atypical *Leuconostoc paramesenteroides* strain. *Applied Environmental Microbiology*, 58 (1), 143-149.
- Liu, S-Q., Holland, R., Crow, V. L. (2001). Purification and properties of intracellular esterases from *Streptococcus thermophilus*. *International Dairy Journal*, 11, 27–35.

- Lopez, C., Maillard, M. B., Briard-Bion, V., Camier, B., Hannon, J. A. (2006). Lipolysis during ripening of Emmental cheese considering organization of fat and preferential localization of bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(16), 5855-5867.
- Lozo, J., Jovcic, B., Kojic, M., Dalgalarrrondo, M., Chobert, J. M., Haertlé, T., Topisirovic, L. (2007). Molecular characterization of a novel bacteriocin and an unusually large aggregation factor of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8, a natural isolate from homemade cheese. *Current Microbiology*, 55(3), 266-271
- Lubelski, J., Rink, R., Khusainov, R., Moll, G. N., Kuipers, O. P. (2008). Biosynthesis, immunity, regulation, mode of action and engineering of the model lantibiotic nisin. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(3), 455-476.
- Macaluso, G., Fiorenza, G., Gaglio, R., Mancuso, I., Scatassa, M. L. (2016). In vitro evaluation of bacteriocin-like inhibitory substances produced by lactic acid bacteria isolated during traditional Sicilian cheese making. *Italian Journal of Food Safety*, 5(1), 5503
- Malheiros Da Silva, Daroit P, Silveira D. J., Brandelli, A. (2012). Inhibition of *Listeria monocytogenes* in minas frescal cheese by free and nanovesicle-encapsulated nisin. *Brazilian Journal of Microbiology*. 43,1414-1418
- Malvido, M. C., González, E. A., Guerra, N. P. (2016). Nisin production in realcalized fed-batch cultures in whey with feeding with lactose-or glucose-containing substrates. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(18), 7899-7908.
- Maresca, D., De Prisco, A., La Stora, A., Cirillo, T., Esposito, F., Mauriello, G. (2016). Microencapsulation of nisin in alginate beads by vibrating technology: Preliminary investigation. *LWT-Food Science and Technology*, 66, 436-443.
- Marilley, L. y Casay, M. (2004) Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. *International Journal of Food Microbiology*. 90 (2), 139-159.
- Martinez-Cuesta, M.C., Fernandez de Palencia, P., Requena, T., Pelaez, C. (2001): Enzymatic ability of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* IFPL731 for flavour development in cheese. *International Dairy Journal*, 11 (8), 577-585.

- Masotti, F., Cattaneo, S., Stuknytė, M., Battelli, G., Vallone, L., De Noni, I. (2017). Composition, proteolysis, and volatile profile of Strachitunt cheese. *Journal of Dairy Science*, 100(3), 1679-1687
- Masoud, W., Takamiya, M., Vogensen, F. K., Lillevang, S., Al-Soud, W. A., Sørensen, S. J., Jakobsen, M. (2011). Characterization of bacterial populations in Danish raw milk cheeses made with different starter cultures by denaturing gradient gel electrophoresis and pyrosequencing. *International Dairy Journal*, 21(3), 142-148.
- Mendia, C., Ibáñez, F.C., Torre, P., Barcina, Y. (2000). Influence of the season on proteolysis and sensory characteristics of Idiazabal cheese. *Journal of Dairy Science*, 83 (9), 1899-1904.
- Messens, W. y De Vuyst, L. (2002). Inhibitory substances produced by Lactobacilli isolated from sourdoughs-a review. *International Journal of Food Microbiology*, 72:31- 43
- Moatsou, G., Massouras, T., Kandarakis, I., Anifantakis, E. (2002). Evolution of proteolysis during the ripening of traditional Feta cheese. *Le Lait*, 82(5), 601-611
- Mondragón Preciado, G., Escalante Minakata, P., Osuna Castro, J. A., Ibarra Junquera, V., Morlett Chávez, J. A., Aguilar González, C. N., Rodríguez Herrera, R. (2013). Bacteriocinas: características y aplicación en alimentos. *Investigación y Ciencia*, 21(59), 64.69.
- Monteville, T.J., Winkowski, K., Ludescher, R.D.(1995). Models and mechanisms for bacteriocin action and application. *International Dairy Journal*, 5: 797-814.
- Mora, M. T. y Marcos, A. (1981). Proteolisis del queso manchego: primeros polipéptidos solubles. *Archivos de Zootecnia*, 118, 253
- Narsaiah, K., Jha, S. N., Wilson, R. A., Mandge, H. M., Manikantan, M. R. (2014). Optimizing microencapsulation of nisin with sodium alginate and guar gum. *Journal of Food Science and Technology*, 51(12), 4054-4059.
- Nazzaro, F., Orlando, P., Fratianni, F., Coppola, R. (2012). Microencapsulation in food science and biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(2), 182-186.

- Nesterenko, A., Alric, I., Silvestre, F., Durrieu, V. (2013). Vegetable proteins in microencapsulation: A review of recent interventions and their effectiveness. *Industrial Crops and Products*, 42, 469-479.
- Ni, J., Teng, K., Liu, G., Qiao, C., Huan, L., Zhong, J. (2011). Autoregulation of lantibiotic bovicin HJ50 biosynthesis by the BovK-BovR two-component signal transduction system in *Streptococcus bovis* HJ50. *Applied Environmental Microbiology*, 77(2), 407–415.
- Nishie, M., Nagao, J. I., Sonomoto, K. (2012). Antibacterial peptides “bacteriocins”: an overview of their diverse characteristics and applications. *Biocontrol science*, 17(1), 1-16.
- NOM-092-SSA1-1994. Norma Oficial Mexicana de Bienes y Servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa. Diario Oficial de la Federación. Gobierno constitucional de los estados unidos mexicanos. México D.F.
- NOM-092-SSA1-1994. Norma Oficial Mexicana de Bienes y Servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos. Diario Oficial de la Federación. Gobierno constitucional de los estados unidos mexicanos. México D.F.
- NOM-121-SSA1-1994. Norma Oficial Mexicana de Bienes y Servicios. Quesos frescos, madurados y procesados. Especificaciones sanitarias. Diario Oficial de la Federación. Gobierno constitucional de los estados unidos mexicanos. México D.F.
- NOM-243-SSA1-2010. Norma Oficial Mexicana de Bienes y Servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Diario Oficial de la Federación. Gobierno constitucional de los estados unidos mexicanos. México D.F.
- Ochoa, V. (2011). Incorporación de *Lactococcus lactis* UQ2 rif L+ en queso panela y su efecto en la bioconservación y desarrollo de compuestos de sabor (tesis maestría). Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, México.
- Ochoa-Flores, A. A. (2013). Rendimiento, firmeza y aceptación sensorial de queso panela adicionado con estabilizantes. *Universidad y Ciencia*, 29(3), 277-286.

- Ortega, M. A., Hao, Y., Zhang, Q., Walker, M. C., van der Donk, W. A., Nair, S. K. (2015). Structure and mechanism of the tRNA-dependent lantibiotic dehydratase NisB. *Nature*, 517(7535), 509.
- Ozcan, T., Kurdal, E. (2012). The effects of using a starter culture, lipase and protease enzymes on ripening of Mihalic Cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 65 (4), 585-593.
- Ozturkoglu-Budak, S., Wiebenga, A., Bron, P. A., de Vries, R. P. (2016). Protease and lipase activities of fungal and bacterial strains derived from an artisanal raw ewe's milk cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 237, 17-27.
- Park, Y. W. (2001). Proteolysis and lipolysis of goat milk cheese. *Journal of Dairy Science*, 84, E84-E92.
- Patiño, H. (2014). Microencapsulación de nisina a partir de *Lactococcus lactis* UQ2 y su incorporación en queso tipo panela (tesis maestría). Universidad Autónoma de Querétaro. Facultad de Química.
- Perin, L. M., Nero, L. A. (2014). Antagonistic lactic acid bacteria isolated from goat milk and identification of a novel nisin variant *Lactococcus lactis*. *BMC Microbiology*, 14(1), 36.
- Piña, M. (2012) Producción de compuestos volátiles y evaluación sensorial de queso tipo panela incorporado con *Lactococcus lactis* UQ2 rif L⁺ como cultivo protector (tesis maestría). Universidad Autónoma de Querétaro. Facultad de Química.
- Piña, M., Uribe, C., Regalado, C., Amaya, S., Castaño, E., García Almendárez, B. (2011). Producción de nisina por *Lactococcus lactis* UQ2 usando suero lácteo suplementado y evaluación de su actividad después del secado por aspersión. *CIENCIA@UAQ*. 4(2):2011
- PROFECO. (2007). Queso Panela y sus imitaciones: Cómo y quiénes nos engañan. *Revista del consumidor*, 361, 46–55.
- Randazzo, C. L., Vaughan, E. E., Caggia, C. (2006). Artisanal and experimental Pecorino Siciliano cheese: microbial dynamics during manufacture assessed by culturing and PCR–DGGE analyses. *International Journal of Food Microbiology*, 109(1), 1-8.

- Rodríguez, E., Calzada, J., Arqés, J., Rodríguez, J., Nuñez, M., Medina, M. (2005). Antimicrobial activity of pediocin-producing *Lactococcus lactis* on *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7 in cheese. *International Dairy Journal*. 15(1), 51-57.
- Ross, R., Morgan, S., and Hill, C. (2002). Preservation and fermentation: past, present and future. *International Journal of Food Microbiology*, 79 (1), 3-16.
- Rossi-Márquez, G., Han, J. H., García-Almendárez, B., Castaño-Tostado, E., Regalado-González, C. (2009). Effect of temperature, pH and film thickness on nisin release from antimicrobial whey protein isolate edible films. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(14), 2492-2497.
- Rossi-Márquez, G., Han, J. H., García-Almendárez, B., Castaño-Tostado, E., y Regalado-González, C. (2009). Effect of temperature, pH and film thickness on nisin release from antimicrobial whey protein isolate edible films. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 89(14), 2492-2497.
- Salinas, B. (2001) Producción de queso tipo blanco, utilizando como cultivos iniciadores bacterias productoras de bacteriocinas. Facultad de Ciencias, Universidad del Zulia. Enero 2014, de Universidad del Zulia Sitio web: http://tesis.luz.edu.ve/tde_arquivos/59/TDE-2011-06-21T11:34:14Z-1141/Publico.pdf
- Sánchez-Hidalgo, M., Montalbán-López, .M, Cebrián, R., Valdivia, E., Martínez-Bueno, M., Maqueda, M. (2011). AS-48 bacteriocin: close to perfection. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68 (17), 2845–2857.
- Sánchez-Valdés, J. J., Colín-Navarro, V., López-González, F., Avilés-Nova, F., Castelán-Ortega, O. A., Estrada-Flores, J. G. (2016). Diagnostic of health quality in artisanal cheese dairies of Zacazonapan municipality, State of Mexico. *Salud pública de México*, 58(4), 461-467.
- Sankarankutty, M. y Palav, S. (2016). Isolation of lactic acid bacteria (Lab) producing bacteriocin from Piyush and Aagal (Kokum concentrate). *Journal of Food Processing and Dairy Technology* , 4, 21–25.
- Schägger, H. (2006). Tricine-SDS-page. *Nature protocols*, 1(1), 16.

- Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) (2017) Boletín de Leche. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). Octubre 2017, de SAGARPA Sitio web: <http://infosiap.siap.gob.mx/opt/boletlech/Bolet%C3%ADn%20de%20Leche%20abril-junio%202017%20.pdf>
- Slattery, L., O'Callaghan, J., Fitzgerald, G. F., Beresford, T., Ross, R. P. (2010). Invited review: *Lactobacillus helveticus* - a thermophilic dairy starter related to gut bacteria. *Journal of Dairy Science*, 93(10), 4435-4454.
- Sloan, E. (2015). The top ten food trends. *Food Technology*. Volume 69. No.4
- Smit, G., Verheul, A., van Kranenburg, R., Ayad, E., Siezen, R., Engels, W. (2000). Cheese flavour development by enzymatic conversions of peptides and amino acids. *Food Research International*, 33:153-160
- Suda, S., Cotter, .PD., Hill, C., Ross, R.P. (2012). Lacticin 3147—biosynthesis, molecular analysis, immunity, bioengineering and applications. *Current Protein and Peptide Science*, 13:193–204.
- Tetra Pak (1996) Manual de industrias lácteas. Lund, Suecia. 287-331
- Torres-Torres, B., Díaz-Rodríguez, A., Castro-Georgana, V. (2007) Análisis de la calidad sanitaria de las queserías y los quesos en el Estado de Tabasco en el período del 2002-2005. *Salud en Tabasco [en línea]*. ISSN 1405-2091
- Tramer, J. y Fowler, G. (1964). Estimation of nisin in foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 15:877-903.
- USDA (2017). Dairy products 2016 summary. Octubre 2017, de USDA Sitio web: <http://usda.mannlib.cornell.edu/MannUsda/viewDocumentInfo.do?documentID=1054>
- Vanderzant, C. y Splittstoesser, D. (1992). Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 3a Ed., American Public Health Association. Washington. 75-97.
- Veloso, A. C., Teixeira, N., Ferreira, I. M. (2002). Separation and quantification of the major casein fractions by reverse-phase high-performance liquid chromatography and urea–polyacrylamide gel electrophoresis: Detection of milk adulterations. *Journal of Chromatography A*, 967(2), 209-218

- Veloso, A. C., Teixeira, N., Peres, A. M., Mendonça, A., Ferreira, I. M. (2004). Evaluation of cheese authenticity and proteolysis by HPLC and urea–polyacrylamide gel electrophoresis. *Food Chemistry*, 87(2), 289-295.
- Villegas, A., Cervantes, F. (2011). La genuinidad y tipicidad en la revalorización de los quesos artesanales mexicanos. *Estudios Sociales*, 19 (38):146-164.
- Widyastuti, Y. y Febrisiantosa, A. (2014). The role of lactic acid bacteria in milk fermentation. *Food and Nutrition Sciences*, 5(04), 435.
- Wilkinson, M.G., Kilcawley, K.N. (2005). Mechanism of enzyme incorporation and release of enzymes in cheese during ripening. *International Dairy Journal*, 15 (6), 817-830.
- Xiao, D. y Zhong, Q. (2011). In vitro release kinetics of nisin as affected by Tween 20 and glycerol co-encapsulated in spray-dried zein capsules. *Journal of Food Engineering*, 106(1), 65-73.
- Xiao, D., Davidson, P. M., Zhong, Q. (2011). Release and antilisterial properties of nisin from zein capsules spray-dried at different temperatures. *LWT-Food Science and Technology*, 44(10), 1977-1985
- Xiao, D., Davidson, P. M., Zhong, Q. (2011). Release and antilisterial properties of nisin from zein capsules spray-dried at different temperatures. *LWT-Food Science and Technology*, 44(10), 1977-1985.
- Yuceer, Y. K., Tuncel, B., Guneser, O., Engin, B., Isleten, M., Yasar, K., Mendes, M. (2009). Characterization of aroma-active compounds, sensory properties, and proteolysis in Ezine cheese. *Journal of Dairy Science*, 92(9), 4146-4157

9. Anexos

Anexo 1. Crecimiento de *L. lactis* durante fermentación

Muestra	UFC			UFC/mL				Promedio UFC/mL	Promedio log UFC/mL	Desv. Estándar
1 (4 activación)	98	102	115	4.900E+06	5.100E+06	5.750E+06	5.250E+06	6.719	0.002	
2 (2 h)	78	73	70	3.900E+07	3.650E+07	3.500E+07	3.683E+07	7.565	0.001	
3 (4 h)	85	86	90	4.250E+08	4.300E+08	4.500E+08	4.350E+08	8.638	0.0003	
4 (6 h)	52	53	50	2.600E+09	2.650E+09	2.500E+09	2.583E+09	9.412	0.0003	
5 (8 h)	63	60	67	3.150E+09	3.000E+09	3.350E+09	3.167E+09	9.500	0.001	

Anexo 2. Actividad de nisina en queso tipo panela

Tiempo (días)	UI/g de queso			Promedio UI/g de queso	Desv. Estándar
	Queso 1	Queso 2	Queso 3		
1	34.669	35.877	34.747	35.098	0.551
7	43.806	47.332	47.907	46.348	1.813
14	30.614	32.401	32.344	31.786	0.829
21	30.57	32.184	34.16	32.305	1.467

Anexo 3. Viabilidad de *L. lactis* en queso tipo panela

Tiempo (días)	Log (UFC/g) de queso			Log (UFC/g) de queso	Desv. Estándar
	Queso 1	Queso 2	Queso 3		
1	7.158	7.118	7.142	7.139	0.016
7	7.542	7.571	7.576	7.563	0.015
14	7.541	7.558	7.562	7.554	0.009
21	7.527	7.547	7.523	7.532	0.010

Anexo 4. Curva estándar de tirosina

Concentración tirosina (mg/L)	Absorbancia 600 nm	Promedio Absorbancia	Desv. Estándar
0	0		
0	0		
0	0	0	0
4.530	0.036		
4.530	0.045		
4.530	0.04	0.040	0.004
9.060	0.07		
9.060	0.073		
9.060	0.076	0.073	0.003
18.121	0.249		
18.121	0.23		
18.121	0.352	0.277	0.065
36.2420	0.742		
36.24	0.748		
36.24	0.854	0.781	0.063
45.3025	1.174		
45.30	1.25		
45.30	1.246	1.223	0.042
54.3630	1.444		
54.36	1.447		
54.36	1.452	1.447	0.004

Anexo 5. Prueba de efecto de la actividad proteolítica en queso tipo panela con y sin cultivo protector

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Razón F	Prob > F
Tiempo (días)	4	0.02536989	199.3964	<.0001
Tipo de queso	1	0.00505182	158.8206	<.0001
Tiempo (días)*Tipo de queso	4	0.00038433	3.0207	0.0422

Anexo 6. Prueba de Tukey de la actividad proteolítica en queso tipo panela con y sin cultivo protector

Nivel		Mínimo promedio cuadrado
21, Queso cultivo	A	0.197
14, Queso cultivo	B	0.178
21, Queso no cultivo	B C	0.165
7, Queso cultivo	C	0.161
14, Queso no cultivo	C	0.151
7, Queso no cultivo	D	0.133
1, Queso cultivo	D E	0.121
0, Queso cultivo	D E	0.120
1, Queso no cultivo	E	0.1090
0, Queso no cultivo	F	0.089

Los niveles no conectados por la misma letra son significativamente diferentes