

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

Evaluación de mezclas a partir de la endolisina PlyP100, nisina, arginato laurico y 8-polilisina con efecto antimicrobiano sobre *Listeria monocytogenes* en queso panela

Tesis

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

Presenta:

IAG. Alma Rosa Martínez Ramos

Dirigido por:

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano
Director

Dr. Michael J Miller
Co-director

Dr. Eduardo Castaño Tostado
Asesor

Dra. Sofía María Arvizu Medrano
Asesor

Dra. Beneranda Murúa Pagola
Asesor

Firma

Firma

Firma

Firma

Firma

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano
Director de la Facultad

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Director de Investigación y Posgrado

RESUMEN

Listeriosis es una enfermedad con un alta tasa de letalidad que va del 25-50% y es provocada por *Listeria monocytogenes*, bacteria fuertemente asociada al queso panela. Una alternativa para mitigar este problema es el uso de antimicrobianos naturales, por lo que en este trabajo se evaluaron la endolisina PlyP100 (PlyP100), nisina (NIS), arginato laurico (LAE) y ϵ -polilisina (EPL) contra el desarrollo del patógeno en queso panela. Se utilizó un coctel de 5 cepas de *L. monocytogenes* y se evaluó la concentración mínima inhibitoria (CMI) en caldo de cultivo así como el efecto sinérgico, aditivo o antagónico mediante una prueba de tablero. Posteriormente, el queso fue elaborado en un modelo miniaturizado de laboratorio (MLQF), inoculado con 4 log UFC/g del coctel, adicionado con los antimicrobianos solos y en combinaciones dobles a sus concentraciones máximas permitidas por la FDA y almacenado a 4°C durante 28 días.

El CMI fue 3.12-6.25 $\mu\text{g/mL}$, 12.5 $\mu\text{g/mL}$ y 62.50-125 $\mu\text{g/mL}$ para NIS, LAE and EPL respectivamente. En el queso, el tratamiento con PlyP100 fue el más efectivo inhibiendo el crecimiento de la bacteria en 3.50 ± 0.38 log, EPL provocó una inhibición de 1.60 ± 0.67 log, LAE de 1.24 ± 0.06 log y NIS de 0.38 ± 0.44 log en comparación con el control, el cual alcanzó 9.14 ± 0.19 log UFC/g. Sin embargo, la combinación entre EPL y LAE inhibió el crecimiento en 3.50 ± 0.35 log, al igual que PlyP100, incluso utilizando una concentración más baja de LAE en la mezcla. Se encontró un efecto sinérgico entre LAE y EPL tanto en caldo de cultivo como también en la matriz alimentaria. Estos compuestos, EPL y LAE, son generalmente reconocidos como seguros (GRAS) lo cual favorece el uso de esta mezcla para inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes* en queso panela.

Palabras clave: endolisina PlyP100, nisina, arginato laúrico, ϵ -polilisina, *L. monocytogenes*, queso panela, GRAS.

ABSTRACT

Listeriosis has one of the highest lethality rates among foodborne pathogens; it remains approximately 25-50%. The involved bacteria in this important disease is *Listeria monocytogenes* which is strongly associated with panela cheese. An alternative to reduce this problem has been the use of natural antimicrobial, therefore in this work, mixtures from phage endolysin PlyP100 (PlyP100), nisin (NIS), lauric arginate (LAE) and ϵ -polylysine (EPL) were evaluated against the pathogen bacteria in panela cheese. It was used a cocktail of 5 strains of *L. monocytogenes* determining the minimum inhibitory concentration (MIC) and the synergistic, additive or antagonist effect by a checkerboard test. Later, cheese manufactured in a miniaturized of laboratory model Queso Fresco production (MLQF), was inoculated with 4 log CFU/g of the cocktail, added with antimicrobial compounds alone and in double combinations as the maximum permissible concentration by FDA and then storage at 4°C during 28 days.

The MIC was 3.12-6.25 $\mu\text{g/mL}$, 12.5 $\mu\text{g/mL}$ and 62.50-125 $\mu\text{g/mL}$ for NIS, LAE and EPL respectively. In cheese, treatment with endolysin was the most effective inhibiting *Listeria* growth in 3.50 ± 0.38 log CFU/g, EPL inhibited the count in 1.60 ± 0.67 log, LAE 1.24 ± 0.06 and NIS only 0.38 log CFU/g compared with the control that achieved 9.14 ± 0.19 log CFU/g. Nevertheless, combination between EPL and LAE inhibited the growth 3.50 ± 0.35 log, as PlyP100, even at using lower concentrations than the maximum permissible of LAE in the mixture. Synergistic effect was found between EPL and LAE in broth culture as food matrix. Those compounds, EPL and LAE, are generally recognized as safe (GRAS) level which favors the use of this mixture to order decreased the *L. monocytogenes* growth in panela cheese.

Key words: phage endolysin PlyP100, nisin, lauric arginate, ϵ -polylysine, *L. monocytogenes*, panela cheese.

Dedicado a mis padres,
Angela Ramos Enríquez y Alejandro Martínez Molina.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Querétaro por ser una segunda casa, un hogar y un espacio en donde he aprendido a soñar.

Al Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos de la Facultad de Química de la UAQ, al *Department of Food Science and Human Nutrition* de la Universidad de Illinois y a CONACYT por el apoyo a este proyecto de investigación.

A mis sinodales y profesores quienes me han guiado y apoyado con disciplina y calidez; la Dra. Silvia Amaya, el Dr. Michael Miller, el Dr. Eduardo Castaño, La Dra. Sofía Arvizu y la Dra. Benerada Murúa.

A mi compañero y amigo Luis Alberto Ibarra Sánchez quien me compartió de su gran conocimiento y me acompañó durante el proyecto.

A mis padres Angela y Alejandro y a mis hermanos Andrea y Alberto quienes me apoyan incondicionalmente siempre.

A Rommel, mi novio, compañero y amigo quien cree en mí, me apoya y siempre me anima a seguir mis sueños.

INDICE

	Página
RESUMEN.....	i
ABSTRACT	ii
INDICE	v
INDICE DE TABLAS	viii
INDICE DE FIGURAS.....	ix
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Queso.....	3
2.2 <i>Listeria monocytogenes</i>	5
2.2.1 Fuentes de aislamiento de <i>L. monocytogenes</i>	6
2.2.2 Listeriosis	6
2.2.3 Patogenicidad.....	8
2.2.4 Incidencia de <i>L. monocytogenes</i> en queso	9
2.3 Bacteriófagos y endolisinas	10
2.3.1 Endolisina PlyP100	16
2.4 Nisina.....	16
2.4.1 Mecanismo de acción	18
2.4.2 Aplicación en alimentos.....	19
2.5 Arginato Laurico.....	22
2.5.1 Mecanismo de acción	24
2.5.2 Aplicación en alimentos.....	26
2.6 ϵ -polilisina.....	29
2.6.1 Mecanismo de acción	36
2.6.2 Aplicación en alimentos.....	37
III. OBJETIVO GENERAL.....	39
3.1 Objetivos particulares	39
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	40
4.1 Material biológico y medio de cultivo.....	40

4.2	Evaluación de la actividad antimicrobiana de PlyP100, NIS, LAE y EPL en caldo de cultivo.....	40
4.2.1	Sobreexpresión y purificación de PlyP100	40
4.2.2	Determinación de la actividad lítica de PlyP100.....	41
4.2.3	Compuestos antimicrobianos nivel GRAS.....	42
4.2.4	Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria.....	42
4.2.5	Estudio de los compuestos antimicrobianos GRAS mediante una prueba de tablero. 42	
4.3	Evaluación de la actividad antimicrobiana de PlyP100, NIS, LAE y EPL en queso panela mediante el modelo MLQF.....	44
4.3.1	Producción de queso elaborado con el modelo MLQF.	44
4.3.2	Evaluación de PlyP100, NIS, LAE y EPL solos y en combinaciones binarias en queso elaborado mediante el modelo MLQF.	45
4.3.3	Evaluación de combinaciones binarias a partir de EPL y LAE en queso elaborado con el modelo MLQF.....	46
4.3.4	Análisis microbiológicos	46
4.3.5	Susceptibilidad de <i>L. monocytogenes</i> a NIS, LAE y EPL	47
4.4	Evaluación sensorial	47
4.4.1	Producción de queso panela mediante el proceso tradicional.....	47
4.4.2	Adición de compuestos antimicrobianos al queso panela elaborado mediante el proceso tradicional.....	48
4.4.3	Determinación de la similaridad entre el queso adicionado con antimicrobianos y sin antimicrobianos.	48
4.5	Análisis Estadístico.	50
V.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51
5.1	Evaluación de la actividad antimicrobiana en caldo de cultivo.	51
5.1.1	Sobreexpresión y purificación de PlyP100	51
5.1.2	Determinación de la actividad lítica de PlyP100.....	52
5.1.3	Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria.....	53
5.1.4	Determinación del efecto sinérgico, aditivo o antagonico entre los compuestos GRAS.....	55
5.2	Evaluación de la actividad antimicrobiana en queso mediante el modelo MLQF.....	57
5.2.1	Evaluación de PlyP100, NIS, EPL y LAE solos y en combinaciones binarias en MLQF	57

5.2.2	Evaluación de EPL y LAE en combinaciones binarias a menores concentraciones.....	63
5.2.3	Susceptibilidad de <i>L. monocytogenes</i> a NIS, LAE y EPL	65
5.3	Evaluación sensorial de queso panela adicionado con los compuestos antimicrobianos.....	66
VI.	CONCLUSIONES	69
VII.	REFERENCIAS	71

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Condiciones óptimas de crecimiento para <i>L. monocytogenes</i>	6
Tabla 2. Productos comerciales que contienen bacteriófagos y que son utilizados en la industria de alimentos.....	12
Tabla 3. Resumen de los niveles propuestos para el uso en alimentos de ϵ -polilisina (FDA, 2010).....	32
Tabla 4. Concentración mínima inhibitoria de ϵ -polilisina para diferentes especies de bacterias.	35
Tabla 5. Cepas de <i>Listeria</i> utilizadas en este trabajo	40
Tabla 6. Tratamientos evaluados a partir de los antimicrobianos solos y en combinaciones binarias.....	45
Tabla 7. Tratamientos evaluados a partir de LAE y EPL en combinaciones binarias a menores concentraciones.	46
Tabla 8. Concentración Mínima Inhibitoria para NIS, LAE y EPL.....	53
Tabla 9. Interacción entre compuestos antimicrobianos GRAS en caldo de cultivo	56
Tabla 10. Susceptibilidad de aislados ^a de <i>L. monocytogenes</i> a los compuestos GRAS a los 28 días de almacenamiento.....	65
Tabla 11. Parámetros fisicoquímicos del queso producido a escala tradicional	67

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de acción de las endolisinas.....	14
Figura 2. Estructura química de Nisina.....	17
Figura 3. Mecanismo de acción de nisina. Formación del poro transmembrana.....	20
Figura 4. Estructura química de LAE.	22
Figura 5. Ruta de biotransformación de arginato laurico.	24
Figura 6. Mecanismo de acción del LAE	26
Figura 7. Estructura química de ϵ -polilisina	30
Figura 8. Esquema del proceso de producción de ϵ -polilisina	31
Figura 9. Esquema de la ruta de biosíntesis de ϵ -polilisina a partir de ácido L-aspartático (Pandey & Kumar, 2014).....	33
Figura 10. Arreglo correspondiente a la prueba de tablero en microplaca de 96 pozos. ...	43
Figura 11. Hoja de evaluación para la prueba triangular (ISO 4120, 2004).	49
Figura 12. Secuencia de presentación de muestras a cada evaluador	49
Figura 13. Purificación de la proteína recombinante PlyP100	51
Figura 14. Inhibición en el crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> en queso a los 28 días de almacenamiento a 4°C..	59
Figura 15. Comportamiento del crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> en el modelo MLQF durante el periodo de almacenamiento a 4°C.	61
Figura 16. Inhibición en el crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> a los 28 días de almacenamiento a 4°C utilizando mezclas entre EPL y LAE.	64

I. INTRODUCCIÓN

El queso es un alimento de amplio consumo en el mundo, cuyas características nutricionales, funcionales y sensoriales son diferentes en cada tipo, los hay madurados, semicurados y frescos (Ramírez-López & Vélez, 2012). En México, los quesos frescos como el panela son los preferidos y su consumo ha estado aumentando. El consumo de queso en 2010 fue de 338 mil toneladas mientras que en 2016 el consumo alcanzó las 400 mil toneladas, un 15.5% más que en 2010 (SAGARPA, 2016).

En los Estados Unidos, el consumo de queso fresco ha ido en aumento gracias al crecimiento de la población y la popularidad de la cocina hispana. Sin embargo, la Centers for *Disease Control and Prevention* (CDC) ha reportado diversos brotes de enfermedades causadas por el consumo de este producto. Uno de los principales microorganismos asociados con el consumo y brotes de enfermedades de queso fresco es *L. monocytogenes*, principalmente debido a sus cualidades psicrófilas, es decir que desarrolla a temperaturas de refrigeración. En los Estados Unidos, *L. monocytogenes* es la segunda causa de muerte por enfermedades transmitidas por los alimentos y se han reportado pérdidas económicas de hasta \$2.6 billones anuales por este motivo (Hoffmann *et al.*, 2012; Scallan *et al.*, 2011).

Listeria monocytogenes causa una enfermedad conocida como listeriosis que infecta principalmente a mujeres embarazadas, recién nacidos y adultos mayores, así como también a personas inmunodeprimidas. La enfermedad en mujeres embarazadas es característicamente parecida a la gripe, presentando mialgias, fiebre y escalofríos. Un total de 70-90% de los fetos portados por madres infectadas por *L. monocytogenes* son afectados por la bacteria y de estos, aproximadamente el 50% sucumbe a la infección en el útero.

Para disminuir la incidencia de este tipo de patógenos, desde hace tiempo se han utilizado compuestos antimicrobianos en los alimentos con el objetivo de inhibir o eliminar al patógeno. Ha sido común el uso de sorbatos, benzoatos, nitritos y sulfatos en la industria alimentaria, sin embargo, el interés en la biopreservación

de alimentos ha aumentado en años recientes generando preferencia entre la industria y los consumidores, por compuestos provenientes de fuentes naturales. De esta manera, es necesario realizar investigación acerca de antimicrobianos de origen natural.

Por lo anteriormente mencionado, en este trabajo se evaluaron antimicrobianos naturales tales como la endolisina PlyP100, nisina, arginato laurico y ϵ -plilisina, solos y en combinación contra *L. monocytogenes* en queso panela, el cual fue elaborado con un modelo miniaturizado de laboratorio de producción de queso fresco (MLQF).

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Queso

Desde hace mucho tiempo y en la actualidad el ganado ha sido utilizado como una herramienta de trabajo y no se convirtió en una fuente importante de leche hasta hace poco tiempo relativamente. El hombre pronto reconoció el valor nutritivo de la leche producida por tales animales y fue así que se convirtió en un importante componente de la dieta humana, así como también sus productos derivados que conocidos como productos lácteos. El crecimiento bacteriano y la producción de ácido láctico se produjeron en la leche durante el almacenamiento en el clima cálido y seco del Medio Oriente de tal forma que los primeros alimentos lácteos fermentados como el queso fueron producidos accidentalmente (Fox *et al.*, 2017).

La producción de queso requiere de la coagulación de la leche, en la mayoría de los casos a través de la acción de la quimosina sobre la capa estabilizante estérica k-caseína de la micela de caseína. Es esencialmente la deshidratación de la leche en combinación con otros efectos conservantes como la acidificación, la salazón, el envasado y la refrigeración. El coágulo de leche inducido por el cuajo se corta y se calienta para expulsar la humedad en un proceso denominado sinéresis. Las cuajadas se escurren, se salan y se envasan obteniendo un queso fresco. El pH disminuye continuamente a lo largo del proceso a un valor de 4.6 – 6.0 para la mayoría de las variedades de queso (Everett & Auty, 2017).

Una vez producido, el queso consta de una compleja serie de componentes; glóbulos de grasa, células bacterianas y minerales contenidos en una red de caseína entremezclada con canales de suero. Esta red de caseína está formada por micelas de leche que se fusionan para formar cadenas durante las primeras etapas de la fabricación del queso. Las micelas contienen fosfato de calcio coloidal insoluble que se une a las moléculas de caseína a través de la interacción con Serina fosforilada. Todos estos componentes estructurales, además de minerales solubles y ácidos orgánicos, no contribuyen directamente a la estructura pero sí desempeñan un papel importante en el desarrollo del perfil de sabor del queso (Everett & Auty, 2017).

Los quesos coagulados con renina pueden ser madurados por períodos que van desde aproximadamente dos semanas hasta dos o más años, dependiendo de la variedad. Durante la maduración, ocurren cambios microbiológicos y bioquímicos que resultan en el desarrollo del sabor y textura característicos de la variedad. Los cambios bioquímicos en el queso durante la maduración se pueden agrupar en eventos primarios: lipólisis, proteólisis y metabolismo de la lactosa residual, del lactato y del citrato; o secundarios: metabolismo de los ácidos grasos y de los aminoácidos. La proteólisis es el evento bioquímico más complejo que ocurre durante la maduración y es catalizada por enzimas del propio coagulante residual, es decir la renina, enzimas de la leche particularmente plasmina, y las proteinasas y peptidasas provenientes de las bacterias ácido lácticas; además en ciertas variedades, por otros microorganismos que son estimulados a crecer en el queso (McSweeney, 2004)

Aunque la fabricación de queso es un arte antiguo, la producción actual de queso se basa en la aplicación de mucha ciencia y tecnología, incluyendo el uso de enzimas industriales, fermentaciones complejas, ingeniería sofisticada y una dinámica bioquímica durante la maduración (Fox *et al.*, 2004).

Además, la diversidad de tipos de queso es verdaderamente impresionante. Una gran variedad de quesos se producen a partir de las mismas materias primas, generalmente leche bovina, ovina, caprina o de búfalo, bacterias ácido lácticas, coagulante y NaCl, y a pesar de ser limitado el rango de ingredientes necesarios, se han reconocido más de 1000 variedades de queso (Fox *et al.*, 2004; McSweeney, 2007). Para facilitar su estudio, se han realizado varios intentos para clasificar las variedades de queso en grupos o familias significativas. Los esquemas de clasificación tradicionales se han basado principalmente en el contenido de humedad, describiéndose como duro, semiduro o blando (McSweeney, 2007).

La mayoría de los quesos frescos (sin madurar), generalmente se caracterizan por ser suaves, es decir que tienen un alto contenido de humedad, su sabor es suave y a leche fresca y están listos para el consumo inmediatamente después de su

fabricación (Ibarra-Sánchez *et al.*, 2017). Dentro de esta clasificación se encuentra el queso panela.

El queso panela se realiza mediante la coagulación de la cuajada, cocción y corte de ésta, una remoción parcial del suero y la adicción de sal en el lote, posteriormente un moldeo en canastos con la total remoción del suero y almacenamiento y refrigeración (Fox *et al.*, 2004; Ibarra-Sánchez *et al.*, 2017). Sus características fisicoquímicas son: 49 – 59.4% de humedad, 16.24 – 20.56% de proteína, 15.44 – 22.16% de grasa y un pH de 4.92 – 6.53 (Ibarra-Sánchez *et al.*, 2017).

La calidad del producto final se verá afectada por la fuente y calidad microbiana de la leche. Además, puede suscitarse una contaminación con patógenos en cualquier etapa del proceso de manufactura. A lo largo de la historia se han realizado 3 innovaciones importantes para cambiar esto: el uso de leche pasteurizada, refrigeración y el uso de agentes antimicrobianos (Johnson, 2017). A pesar de esto, en la producción de queso puede haber una contaminación en las etapas posteriores a la pasteurización y además, existen patógenos como *L. monocytogenes* que sobreviven y crecen a temperaturas de refrigeración.

2.2 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes es una bacteria Gram positiva, en forma de bacilo corto (0,4–0,5 μm \times 1–2 μm) que se encuentra en una amplia gama de entornos naturales y artificiales. Es un anaerobio facultativo, y produce ácidos (lactato y otros productos) a partir de la fermentación de la glucosa, sin embargo no produce gas (Rees *et al.*, 2017). La especie está subdividida en 13 serovares y la gran mayoría de los casos humanos de infección por esta bacteria, están asociados con los serovares 4b, 1/2a y 1/2b, siendo 4b el más común (McMullen & Freitag, 2015; Saldivar *et al.*, 2018). La Tabla 1 muestra las condiciones óptimas de crecimiento de esta bacteria.

Tabla 1. Condiciones óptimas de crecimiento para *L. monocytogenes*

	Temperatura	pH	Aa	NaCl
Óptimo	30-37 °C	6-8	0.97	-
Mínimo	2°C	4	0.90	10%
Máximo	42°C	9	-	-

(McMullen & Freitag, 2015; Rees *et al.*, 2017).

2.2.1 Fuentes de aislamiento de *L. monocytogenes*

Listeria monocytogenes está ampliamente distribuida en el medio ambiente y por lo tanto, a menudo se describe como ubicuo. Como un saprófito, capaz de utilizar azúcares vegetales, a menudo se encuentra asociado con material vegetal, en la vegetación en descomposición y el ensilaje, así como también en los suelos. Además, se ha aislado de heces animales y humanas y por tanto, también se encuentra asociado con aguas residuales y de otras fuentes de agua. Se cree que aproximadamente del 2 al 6% de las personas sanas son portadores fecales asintomáticos del organismo, pero los animales salvajes y domésticos, las aves y los peces también pueden transportar el organismo en su tracto gastrointestinal. Incluso se ha demostrado que los insectos como las moscas y los escarabajos pueden contaminarse con *Listeria* y actuar como un vector para la transmisión en entornos agrícolas y de producción de alimentos (Rees *et al.*, 2017).

Adicionalmente, también se ha encontrado en biopelículas asociadas con superficies de maquinaria y tuberías, y se han notificado brotes recurrentes en asociación con plantas de procesamiento de alimentos (McMullen & Freitag, 2015).

2.2.2 Listeriosis

Esta bacteria causa una enfermedad conocida como listeriosis. En los seres humanos, cierto sector demográfico de la población se consideran de mayor riesgo: mujeres embarazadas, recién nacidos y adultos inmunocomprometidos; además, las infecciones graves pueden provocar bacteriemia, meningoencefalitis, aborto o sepsis neonatal (Saldivar *et al.*, 2018).

Las infecciones dadas por *L. monocytogenes* se asocian más comúnmente con brotes transmitidos por alimentos que involucran en la mayoría de los casos quesos frescos. La tasa de mortalidad por Listeriosis es de aproximadamente del 25 al 50% (McMullen & Freitag, 2015).

El período de incubación de listeriosis depende de la susceptibilidad del individuo y de la dosis ingerida, pero se ha documentado que varía de 24 horas a 91 días (Rees *et al.*, 2017).

Una gastroenteritis puede ser evidente dentro de las primeras 48 horas de exposición, puede incluir náuseas, diarrea acuosa o sanguinolenta, dolor abdominal y fiebre. La aparición de estos síntomas tempranos puede depender del tamaño del inóculo ingerido (McMullen & Freitag, 2015). Los síntomas varían desde aquellos similares a los de la gripe, con o sin vómitos y diarrea, hasta septicemia y meningitis. La listeriosis se refiere a las enfermedades más graves que amenazan la vida, mientras que la gastroenteritis causada por este organismo rara vez se diagnostica y resulta en una enfermedad leve experimentada por adultos sanos (Rees *et al.*, 2017).

En mujeres embarazadas, la enfermedad puede resultar en aborto, muerte fetal o nacimiento de un bebé gravemente enfermo. *Listeria* es una de las pocas bacterias capaces de atravesar la placenta y de obtener acceso directo al feto (Rees *et al.*, 2017). Los síntomas en mujeres embarazadas son característicamente similares a los de la gripe, presentando mialgias y fiebre. De un total del 70 – 90% de los fetos portados por madres, aproximadamente el 50% sucumben a la infección en el útero, mientras que los recién nacidos vivos infectados tienen una tasa de mortalidad del 24%. Una manifestación en el neonato es una condición llamada *granulomatosis infantisepticum*, y se encuentra entre las formas más graves de la enfermedad. Se caracteriza por una erupción eritematosa difusa sobre el cuerpo del neonato, granulomas en el hígado y el bazo, y es fatal para los infectados (McMullen & Freitag, 2015)

Listeria monocytogenes también puede causar formas invasivas de encefalitis y bacteremia en seres humanos, y estas manifestaciones generalmente resultan en lesiones permanentes. Por otro lado, las secuelas de la infección se desarrollan a medida que las bacterias se replican y se extienden más hacia el parénquima cerebral desde las meninges, produciendo cavitación y posterior destrucción del tejido neuronal (McMullen & Freitag, 2015).

2.2.3 Patogenicidad

Una vez que *L. monocytogenes* alcanza el intestino delgado, obtiene acceso a los enterocitos luminales que actúan como la barrera entre el lumen del intestino delgado y la linfa; obtienen acceso entonces a los canales sanguíneos dentro de las vellosidades intestinales y subsecuentemente hacia la sangre y la linfa. La sangre del intestino delgado se transporta hacia el hígado, donde las fagocitos residentes absorben a *Listeria* (McMullen & Freitag, 2015; Rees *et al.*, 2017). Posteriormente, la bacteria lisa la vacuola de la célula huésped y se replican dentro del citosol propagándose a las células vecinas. Una vez que se ha establecido un nicho de replicación en un órgano o tejido, *L. monocytogenes* es capaz de volver a inocular la sangre y viajar a sitios adicionales dentro del huésped (McMullen & Freitag, 2015).

Como se esperaba, numerosos genes están implicados en la invasión de *L. monocytogenes* a las células diana del huésped. Los más estudiados incluye *inIA* e *inIB*, ambos forman parte de la familia multigénica internalina y codifican las proteínas internalina A e internalina B, respectivamente. La proteína de la superficie celular de *Listeria*, internalina A (InIA), inicia el contacto con E-cadherina, un receptor de células eucariotas. Se ha demostrado que InIA está involucrada en la fase intestinal de la infección, e InIB, ha sido implicada en la fase hepática de la infección (Saldivar *et al.*, 2018).

La diversidad de los factores de virulencia que *Listeria* posee, le permiten infectar a una amplia gama de tejidos, incluido el cerebro o, en mujeres embarazadas, la

placenta y de esta manera, dar lugar a las diversas formas de la enfermedad (Rees *et al.*, 2017).

2.2.4 Incidencia de *L. monocytogenes* en queso

Listeria monocytogenes puede sobrevivir en varios productos alimenticios y crecer siempre que las condiciones proporcionadas por la matriz alimentaria sean favorables. El queso panela, es un producto que proporciona tales condiciones caracterizándose por su alto contenido de humedad, un bajo nivel de sal (1 – 3%), y un pH casi neutro (Ibarra-Sánchez *et al.*, 2017).

De acuerdo con Buchanan *et al.*, (2017), las mejoras en las metodologías de detección han logrado en los últimos años, identificar un mayor número de brotes de *Listeria* aunque con un menor número de casos por brote. Sin embargo, los brotes recientes indicaron un aumento en las poblaciones susceptibles incluyendo niños. Además, la posibilidad de infección por el consumo de una dosis baja.

Por otro lado, las iniciativas regulatorias y acciones por parte de la industria, han reducido los brotes en alimentos listos para su consumo (RTE, por sus siglas en inglés), carnes rojas y pollo. Por el contrario, los brotes de listeriosis asociados con productos lácteos no han mostrado ser disminuidos (Buchanan *et al.*, 2017).

Gould *et al.*, (2014) analizaron los brotes reportados desde 1998 a 2011 por la *Foodborne Disease Outbreak Surveillance System*, en los cuales el queso fue el alimento implicado como vehículo. Encontraron que el patógeno más asociado a queso fresco producido con leche pasteurizada fue *L. monocytogenes*. Además, del total de muertes reportadas por el consumo de este alimento, 83% fueron causadas por *Listeria*. De entre los distintos tipos de queso involucrados, el más común reportado fue el queso fresco, siendo provenientes de México, el 38% del total.

Es importante resaltar que en México, son pocos los estudios realizados para la detección de *L. monocytogenes* en las distintas variedades de queso y en general, en los alimentos (Castañeda-Ruelas *et al.*, 2014; Ibarra-Sánchez *et al.*, 2017), no

obstante, reflejan una prevalencia similar a la identificada en otros países (Castañeda-Ruelas *et al.*, 2014).

Algunos autores reportaron la presencia de *L. monocytogenes* en quesos frescos en un 15% (18/120) en la Ciudad de México, 9% (18/200) en Jalisco y 3.4% (5/149) en Sonora (Moreno-Enriquez *et al.*, 2007; Saltijeral *et al.*, 1999; Torres-Vitela *et al.*, 2012). Siendo el queso panela, el más contaminado según (Saltijeral *et al.*, 1999).

En México, la información sobre *L. monocytogenes* y la listeriosis es escasa pero los pocos estudios realizados, sugieren que representa un riesgo potencial para la ocurrencia de brotes (Castañeda-Ruelas *et al.*, 2014).

Es necesario el uso, investigación y desarrollo de antimicrobianos para disminuir la incidencia de este tipo de patógenos en queso.

2.3 Bacteriófagos y endolisinas

Un bacteriófago es un virus que infecta y se replica a través de un ciclo lítico o un ciclo lisogénico dentro de una bacteria como un parásito. Los bacteriófagos, o simplemente los fagos, son los microorganismos más abundantes en la Tierra y están ampliamente distribuidos. Los bacteriófagos se consideran seguros para los seres humanos, animales y plantas (Yusuf, 2018). Adicionalmente, su aplicación ha sido un enfoque prometedor para el manejo de *L. monocytogenes* en alimentos (Siringan *et al.*, 2014; Van Tassell *et al.*, 2016).

El uso de bacteriófagos para detectar bacterias patógenas de humanos ha revolucionado la microbiología moderna. Su uso representa una divergencia significativa con respecto al cultivo tradicional y podría tener el potencial de proporcionar rápidamente información para diagnosticar y prescribir una estrategia de tratamiento para infecciones bacterianas en humanos y animales (Cooper, 2016). Las primeras investigaciones sobre los bacteriófagos se enfocaron en la identificación de microorganismos como *L. monocytogenes*.

Loessner & Busse (1990) desarrollaron un esquema de tipificación de bacteriófagos para diferenciar aislados de *Listeria* de productos lácteos y en general varios productos alimenticios. Dieciséis fagos seleccionados aislados de fuentes ambientales y cepas lisogénicas se utilizaron para la tipificación y, según sus espectros líticos, se dividieron en cuatro grupos. Se observaron 41 patrones distintos de lisis cuando se usó este conjunto de fagos en la tipificación de 57 cepas de referencia definidas, representando las cinco especies confirmadas y 16 serotipos, además de 454 aislados de *Listeria* de origen principalmente alimentario. Este sistema de tipificación de fagos proporcionaría información importante para el reconocimiento y eliminación de las fuentes de contaminación por *Listeria* spp. Posteriormente comenzaron investigaciones acerca del uso de bacteriófagos contra microorganismos patógenos en alimentos.

Dykes & Moorhead (2002) evaluaron el efecto de NIS y el listeriofago LH7, solos y en combinación en el crecimiento de dos cepas de *L. monocytogenes*. Se obtuvieron las curvas de crecimiento para ambas cepas bacterianas en caldo de cultivo soya-tripticosa (TSB) incubado a 7 y 30 °C, y con la adición de NIS y/o el listeriofago y se midió la absorbancia a 550 nm. Como resultado, en el caldo de cultivo adicionado con NIS, se previno el crecimiento de las dos cepas bajo las condiciones estudiadas pero posteriormente se desarrolló a niveles equivalentes a los de las células no tratadas. El listeriofago LH7, por otra parte, no tuvo efecto en caldo en las condiciones estudiadas. Sin embargo, una mezcla de nisina y el listeriofago mostró un efecto combinado, reduciendo los niveles y sin que hubiera un crecimiento posterior.

Carlton *et al.* (2005) estudiaron al bacteriófago P100, del cual proviene la endolisina PlyP100. Este fago puede infectar y eliminar a la mayoría de las cepas de *L. monocytogenes*. Se determinó la secuencia completa de nucleótidos del genoma de P100, que codifica 174 productos génicos y 18 tRNAs. Además, se realizó un estudio de toxicidad oral de dosis repetidas en ratas, que no produjo cambios histológicos anormales, morbilidad o mortalidad. Por lo tanto, no se encontraron indicaciones de ningún riesgo potencial asociado con el uso de P100

como aditivo alimentario. Para determinar los parámetros de aplicación de P100 a los alimentos sensibles a la contaminación por *L.*, se produjo un queso madurado suave por dentro. Los quesos se contaminaron con *L. monocytogenes* al inicio del período de maduración y P100 se aplicó a la corteza del producto. Dependiendo de los tiempos, frecuencia y dosis de las aplicaciones de fagos, se obtuvo una reducción significativa (al menos 3.5 log) o una erradicación completa de los recuentos de *Listeria* viables. No encontraron evidencia de resistencia a los fagos en los aislados de *Listeria* recuperados de las muestras.

Actualmente existen productos antimicrobianos en el mercado que contienen bacteriófagos y estos productos son utilizados por la industria de alimentos. Algunos ejemplos se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Productos comerciales que contienen bacteriófagos y que son utilizados en la industria de alimentos.

Producto	Especie bacteriana	Mecanismo de liberación objetivo
Agriphage (Omnilytics Ltd.)	<i>Xanthomonas campestris</i> <i>Pseudomonas syringae</i>	Suspensión de bacteriófagos específicos a cada especie en polvo para aspersión sobre cultivos infectados vía manual o mecánica.
ListShield® (Intralix Ltd.)	<i>L. monocytogenes</i>	Suspensión de bacteriófagos específicos a cada especie
EcoShield® (Intralix Ltd.)	<i>E. coli</i> O157	añadidos a muestras, después del sacrificio para la reducción de células bacterianas.
SalmFresh® (Intralix Ltd.)	<i>Salmonella</i>	Incubados para las temperaturas utilizadas en la refrigeración.
Listex (Mircos, Ltd.)	<i>L. monocytogenes</i>	Suspensión de bacteriófagos específicos de <i>Listeria</i> . El fabricante declara que el producto puede aplicarse por cualquiera de los siguientes métodos: pulverizar sobre el producto antes del envasado, pulverizar en el envase, pulverizar sobre las cuchillas en los equipos o por inmersión dentro de la suspensión Listex.

(Cooper, 2016).

A pesar de esto, las ventajas y desventajas del uso de fagos ya han sido ampliamente documentadas. Una de las desventajas más notables es el riesgo de encontrar patógenos bacterianos resistentes a tales fagos, o de favorecer la aparición de cepas insensibles a ellos (Labrie *et al.*, 2010). La vía lítica de los fagos virulentos mediante la cual infectan a la bacteria puede resultar en la integración del genoma del fago en el cromosoma bacteriano huésped (Hagens & Loessner, 1999). De tal forma, los fagos y los mecanismos de resistencia a los fagos desempeñan un papel clave en la regulación de las poblaciones bacterianas en la mayoría de los hábitats, si no en todos (Labrie *et al.*, 2010). *Listeria monocytogenes* puede desarrollar resistencia a los fagos (Kim & Kathariou, 2009). Zhang *et al.* (2015) encontraron que los genes *cadA1* y *cadC* contenidos en el genoma de *L. monocytogenes* están asociados con la resistencia a los bacteriófagos.

Un método alternativo prometedor y viable para el uso de bacteriófagos en alimentos, es el uso de preparaciones que contengan suspensiones altamente purificadas de enzimas provenientes de tales fagos, enzimas conocidas como endolisinas. Estas enzimas son hidrolasas de peptidoglicano y su función es degradar la capa de peptidoglicano de las membranas celulares bacterianas en la vía lítica, lo que conduce a la ruptura de la célula y la posterior liberación de la progenie viral en el entorno circundante (Cooper, 2016).

Los bacteriófagos infectan las células bacterianas para replicarse pero la liberación de la progenie del fago requiere una lisis desde adentro que resulta de la penetración de las endolisinas en la membrana celular con asistencia de las proteínas holin. Las endolisinas generalmente evitan la membrana celular a través de estas proteínas holin, y su función es degradar el peptidoglicano, logrando en conjunto hidrolizar la pared celular (Van Tassell *et al.*, 2016). Las bacterias Gram positivas también son susceptibles a la degradación de la pared por endolisinas aplicadas de forma exógena (Fischetti, 2010; Van Tassell *et al.*, 2016). El peptidoglicano de la pared celular puede ser hidrolizado por diferentes clases de enzimas dependiendo de los enlaces específicos dados. Las N-acetil- β -D-

muramidasa, también llamadas lisozimas, y las N-acetil-β-D-glucosaminidasas hidrolizan los enlaces glicosídicos del esqueleto del peptidoglicano, las N-acetilmuramil-L-alanina amidasa cortan el residuo de alanina inicial de los péptidos enlazados al ácido N-acetil murámico y las endopeptidasas cortan enlaces específicos dentro de los tallos peptídicos y puentes cruzados al interior de los polímeros formados por los ácidos N-acetil glucosamida y N-acetil murámico del peptidoglicano (Figura 1).

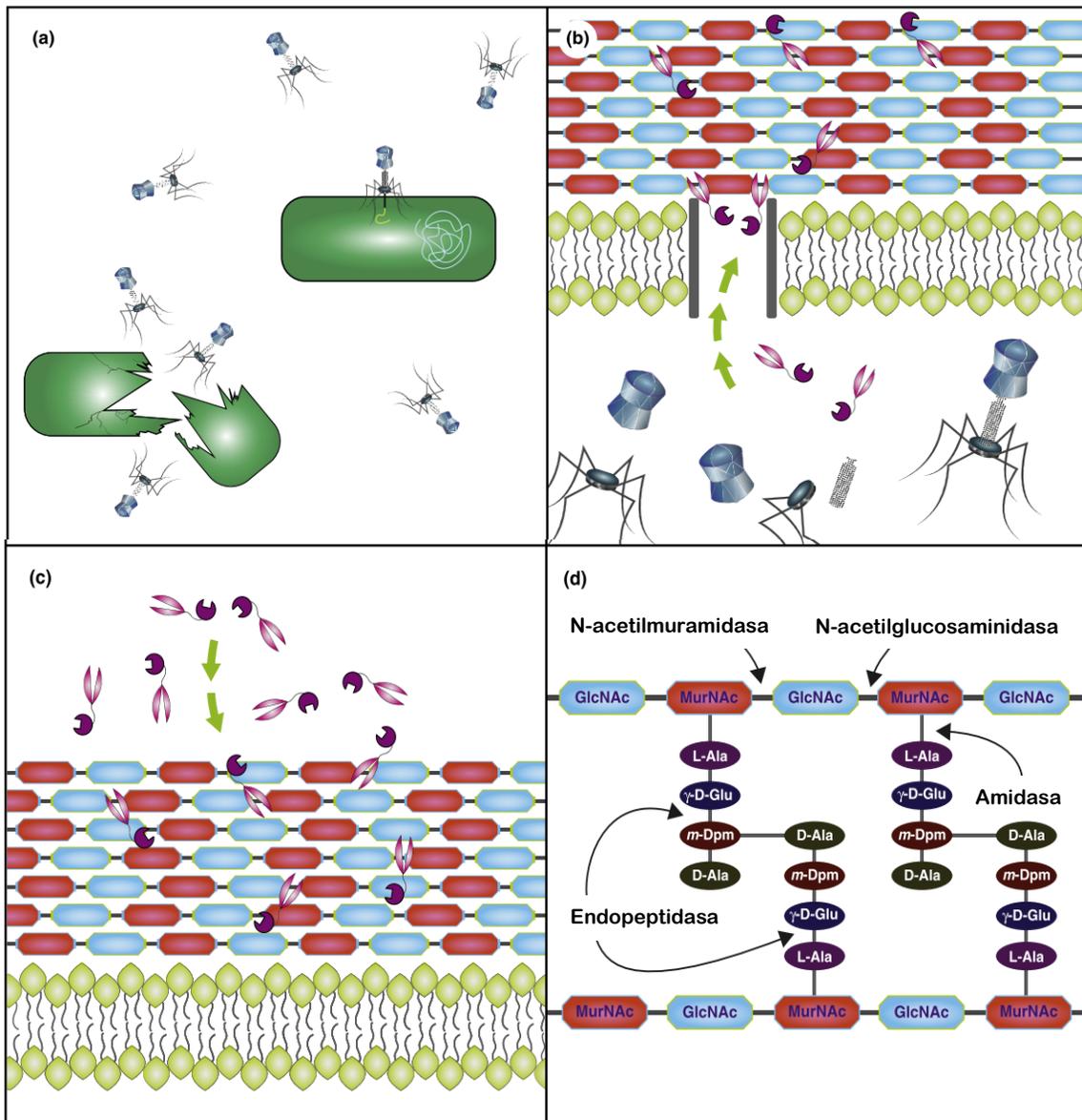


Figura 1. Mecanismo de acción de las endolisinas (Van Tassell *et al.*, 2016).
GlcNAc: ácido N-acetil glucosamina; MurNAc: ácido N-acetil murámico.

Según Loessner *et al.* (2002), las endolisinas Ply118 y Ply500 comparten una actividad enzimática única y son específicas para las células de *Listeria*. Ellos determinaron bases moleculares sobre la especificidad lítica de estas enzimas y examinaron la estructura y función de sus dominios de unión a las paredes celulares C-terminales (CDB) no relacionados. Encontraron que los 140 aminoácidos C-terminales de Ply500 y los 182 C-terminales de Ply118 son necesarios y suficientes para dirigir las hidrolasas de mureína a la pared celular bacteriana. Ellos mostraron que los CBDs son responsables de dirigir las endolisinas del fago a sus sustratos y que su función es conferir reconocimiento y especificidad sobre las proteínas. Dado que las secuencias CBD no contienen repeticiones y carecen de todos los motivos de secuencia conocidos para el anclaje de proteínas a la célula bacteriana, concluyen que utilizan motivos estructurales únicos para la asociación específica con la superficie de bacterias Gram-positivas.

Zhang *et al.* (2012) clonaron en *E. coli* y caracterizaron el gen de la endolisina (lysZ5) del genoma del fago FWLLm3 de *L. monocytogenes*. El análisis de la secuencia comparativa reveló que LysZ5 se asemejaba a la mureína hidrolasa Ply511. La adición de proteína purificada mostró que LysZ5 podría lisar *L. monocytogenes*, *L. innocua* y *L. welshimeri*, pero no *Staphylococcus aureus* o *Enterococcus faecalis*. La proteína purificada fue capaz de eliminar *L. monocytogenes* que crecía en leche de soja, con una reducción de más de 4 log UFC/mL después de 3 h de incubación a 4 °C.

En base a estos y otros antecedentes, en el grupo de trabajo del Dr Michael Miller, en el departamento de *Food Science and Human Nutrition* en la Universidad de Illinois, Estados Unidos, se propuso realizar investigación concerniente a la endolisina PlyP100, que como ya se mencionó antes en este apartado, proviene del bacteriofago P100. Este fago fue aprobado en 2005 por la Food and Drug Administration de los Estados Unidos (FDA) como un compuesto antimicrobiano generalmente reconocido como seguro (GRAS) e incluso, es actualmente comercializado como LISTEX P100 (Micareos, Ltd.).

2.3.1 Endolisina PlyP100

Poca información ha sido generada sobre la endolisina PlyP100, sin embargo a continuación se presentan resultados obtenidos en el grupo de trabajo.

Van Tassell *et al.* (2017) expresaron la endolisina PlyP100 mediante recombinación genética y la evaluaron en un modelo de queso fresco (MLQF) descrito por Van Tassell *et al.* (2015) utilizando con un cóctel de cepas de *L. monocytogenes*. Fue demostrado que PlyP100 tiene una actividad óptima bajo un pH y concentraciones de sal consistente con el queso fresco. Además, PlyP100 mostró una especificidad para las Gram positivas resultando en una actividad inhibitoria considerable contra *L. monocytogenes* en queso fresco durante al menos 4 semanas en almacenamiento refrigerado.

Posteriormente, Ibarra-Sánchez *et al.* (2018) reportaron que PlyP100 mostró una reducción bacteriana independiente del tamaño del inóculo utilizado de *L. monocytogenes* en el queso. Además, la combinación de PlyP100 con NIS mostró una fuerte sinergia en QF obteniendo niveles no contables de *L. monocytogenes* después de 4 semanas de almacenamiento a 4°C. Los aislados de *L. monocytogenes* de los quesos tratados con NIS, PlyP100, y su combinación no desarrollaron resistencia a la NIS o PlyP100. Finalmente, PlyP100 mostró también poseer un alto coeficiente de retención en la cuajada de queso.

2.4 Nisina

La nisina (NIS) es una sustancia polipeptídica o bacteriocina, producida por la fermentación de un sustrato adecuado por ciertas cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*. Este polipéptido consta de 34 aminoácidos y un peso molecular de 3510 Daltons (Breukink & de Kruijff, 2006; Delves-Broughton & Weber, 2011). De estos 34 aminoácidos, hay varios de ellos que son inusuales y que incluyen a dehidroalanina (Dha), deshidrobutirina (Dhb), ácido aminobutírico (Aba), lantionina (Ala-S-Ala) y β -metillantionina (Aba-S-Ala) (Punyauppa-path & Phumkhachorn, 2015). Además, contiene cinco anillos basados en lantionina de los cuales, los tres primeros están separados de los anillos cuatro y cinco (que se encuentran

entrelazados), por una región relativamente más flexible de tres residuos (Figura 2) (Breukink & de Kruijff, 2006).

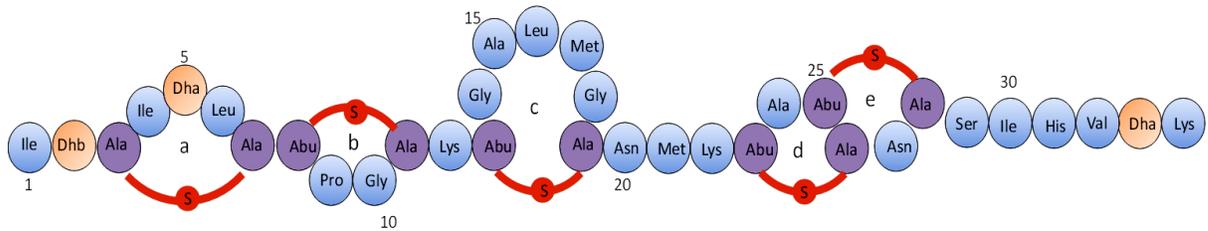


Figura 2. Estructura química de Nisina (Breukink & de Kruijff, 2006).

Este antimicrobiano es el lantibiótico más antiguo conocido y más ampliamente estudiado. Los lantibióticos son una gran familia de antibióticos peptídicos. Sus precursores son biosintetizados ribosomalmente (Hansen, 1993) y los aminoácidos inusuales como la lantionina presentes en sus estructuras, son el resultado de modificaciones pos-traduccionales y el procesamiento proteolítico de sus péptidos precursores (Breukink & de Kruijff, 2006).

En la actualidad se han descubierto diversas variantes naturales de NIS. Nisina Z por ejemplo, tiene una sustitución de Asn27 por His27. La potencia y espectro para las variantes NIS A y NIS Z son similares, pero se ha observado que NIS Z se difunde más fácilmente a través del gel de agar y tiene una carga positiva de 2 en comparación con una carga positiva de 3 para la NIS A. En las preparaciones comerciales solo se utilizan estas dos variantes, sin embargo, la mayoría de la información científica publicada es acerca de NIS A. La solubilidad de NIS A depende del pH, de esta manera, a un pH de 2.2 la solubilidad es de 56 000 µg/mL mientras que a pH 5 es de 3000 µg/mL, es decir que a mayor pH, menor solubilidad; a pesar de esto, la solubilidad no es un problema en alimentos ya que los niveles que se utilizan deben ser inferiores a 250 µg/mL de acuerdo a la FDA (Delves-Broughton & Weber, 2011).

Debido a su potente actividad bactericida y baja toxicidad en humanos, NIS se utiliza como conservador natural en la industria alimentaria (Breukink & de Kruijff, 2006). Tiene actividad antimicrobiana contra varias especies de bacterias Gram positivas, pero no contra bacterias Gram negativas debido a su membrana

externa. Sin embargo, cuando se usa en combinación con otros tratamientos químicos o físicos que desestabilizan estas membranas externas, NIS puede inhibir también bacterias Gram negativas (Punyaappa-path & Phumkhachorn, 2015).

El desarrollo o aplicación como conservador en alimentos comenzó en la década de 1950. El primer reporte de su uso fue para evitar deterioro en queso suizo. El desarrollo de una preparación de NIS en polvo fue primero desarrollada por Aplin and Barrett Ltd. en el Reino Unido; esto dio lugar a la introducción en 1953 de la primera preparación de NIS con el nombre comercial de Nisaplin®. Los primeros usos de la nisina fueron para la prevención del deterioro del queso procesado pero desde entonces se han identificado muchas otras aplicaciones y su uso ahora está aprobado en más de 50 países. El producto Nisaplin® todavía es actualmente fabricado por Danisco, quien adquirió Aplin y Barrett en 1999 (Delves-Broughton & Weber, 2011).

El compuesto fue aprobado en Estados Unidos por la FDA como GRAS en 1988. En México también está permitido su uso en diferentes alimentos, siendo la máxima concentración permitida 12.5 µg/mL. De esta forma, NIS es un compuesto inocuo y adecuado para su uso en alimentos ya que además es estable a la temperatura y no pierde su actividad antimicrobiana después de la pasteurización, esterilización u otros métodos de procesamiento (Santos *et al.*, 2018).

2.4.1 Mecanismo de acción

Al principio, se sugirió que NIS destruía a las bacterias mediante la inhibición de la síntesis de la pared celular por su unión al lípido II. Sin embargo, avances importantes en el modo de acción de NIS contra las bacterias, indican que el precursor del peptidoglicano de la pared celular, el lípido II, actúa como una molécula de acoplamiento para NIS, y es el complejo NIS-lípido II, el que se inserta en la membrana citoplasmática creando poros que provocan fugas de material celular esencial (Breukink & de Kruijff, 2006; Delves-Broughton & Weber,

2011). El proceso puede describirse como sigue: un reconocimiento específico y enlace con el lípido II, seguido por la formación de poros.

Para pasar a través de la pared celular, NIS generalmente tiene interacciones electrostáticas o hidrófobas con componentes aniónicos tales como ácidos teicoicos, ácidos teicurónicos y ácidos lipoteicoicos, polisacáridos o fosfolípidos (Punyaappa-path & Phumkhachorn, 2015). Posteriormente, NIS se une al lípido II con los dos anillos de lantionina en el extremo N-terminal, formando una especie de jaula con el pirofosfato del lípido II alrededor de este (Prince *et al.*, 2016; Punyaappa-path & Phumkhachorn, 2015). Esto permite que el segmento C-terminal se inserte en la membrana celular. Inicialmente, el péptido se encuentra paralelo al plano de la membrana pero la inserción del extremo C, facilitada por la región flexible que se encuentra entre los anillos tres y cuatro del péptido, proporciona una orientación transmembranal del compuesto (Prince *et al.*, 2016). Varios complejos de NIS-lípido II se ensamblan para formar un poro estable con un diámetro de 2 nanómetros en la membrana celular. Algunos reportes indican que el poro está formado por 4 complejos de nisina-lípido II y 4 moléculas de nisina (Figura 3)

Una vez que el poro se forma en la membrana celular, causa un aumento en la permeabilidad que conduce a la disipación del potencial de membrana provocando el flujo de pequeños contenidos citoplasmáticos como aminoácidos, nucleótidos e iones de las células dañadas. En consecuencia, las células dañadas no pueden producir energía, al igual que las macromoléculas vitales que finalmente causan la muerte celular (Punyaappa-path & Phumkhachorn, 2015).

2.4.2 Aplicación en alimentos

Nisina ha sido ampliamente utilizada en diversas matrices alimentarias desde hace muchos años. Como fue mencionado antes, es un compuesto aprobado y regularizado tanto en México como Estados Unidos.

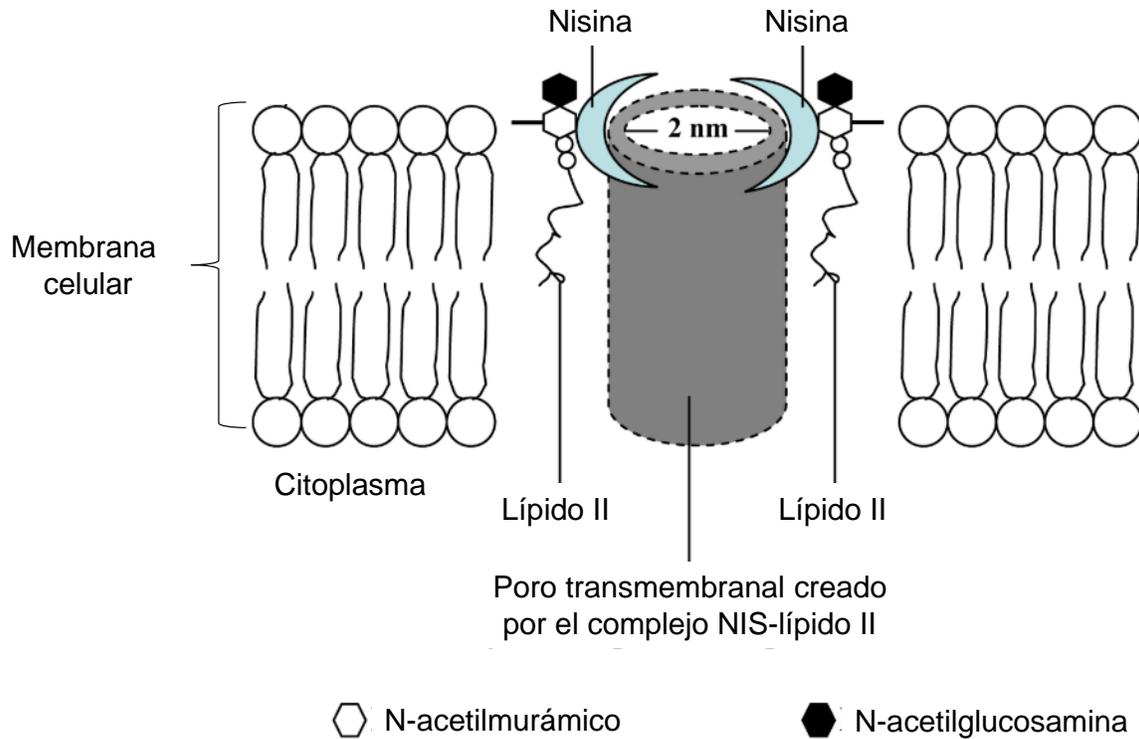


Figura 3. Mecanismo de acción de nisina. Formación del poro transmembrana (Punyauppa-path & Phumkhachorn, 2015).

Se evaluó el efecto inhibitorio de dos concentraciones de NIS (10.0 y 16.7 mg/kg) sobre *Staphylococcus aureus*, coliformes totales, *E. coli*, *Salmonella* spp y *L. monocytogenes* en queso blanco tipo “telita” elaborado en una quesera de Upata, Estado Bolívar. La cuenta de *S. aureus* fue significativamente menor ($P < 0.05$) en las muestras de queso “telita” con las dos concentraciones de NIS ensayadas con respecto a las muestras control. No se detectó *Salmonella* spp ni *L. monocytogenes* en ninguna de las muestras analizadas. Se encontró que las dos concentraciones de NIS adicionadas al queso “telita” ejercieron un efecto inhibitorio sobre la población de *S. aureus* presente como microflora contaminante en las mismas (Márquez & Rojas, 2007).

Gadotti *et al.*, (2014) evaluaron la adición de NIS, ácido caprílico (CA) como ingredientes antilisteria en queso fresco. El queso fue inoculado con aprox. 4 log UFC/g de un coctel de 5 o 6 cepas de *L. monocytogenes* y fue tratado con los

antimicrobianos. Las muestras se almacenaron a 4 °C durante tres semanas y los recuentos de *Listeria* se realizaron en agar PALCAM. Todas las combinaciones de NIS y CA ($\geq 0,4$ g/kg cada una) fueron efectivas contra *L. monocytogenes* y redujeron los recuentos finales en al menos 3 log UFC/g después de 20 días de almacenamiento en comparación con el control. Los resultados indicaron que las combinaciones de NIS y CA podrían controlar *L. monocytogenes* en queso fresco y con un poco impacto en la flora natural del queso.

Calderón-Oliver *et al.* (2016) optimizaron mediante la metodología de superficie de respuesta, una mezcla de NIS con semillas o extractos de cáscara de aguacate, para maximizar la actividad antioxidante y la respuesta antimicrobiana contra *Listeria*. Los extractos de cáscara o semillas utilizados en la mezcla mostraron una capacidad de eliminación de radicales y actividad antioxidante debido a su composición de polifenoles. Durante la optimización, los resultados mostraron que la respuesta antioxidante en la mezcla fue principalmente proporcionada por el extracto de la cascara de aguacate en comparación con NIS, las semilla y las combinaciones en diferentes proporciones. A pesar de esto, en la respuesta antimicrobiana, se observó un efecto sinérgico en las mezclas de cada extracto de subproducto de aguacate con NIS. La máxima respuesta antioxidante y antimicrobiana se obtuvo con la mezcla de 61% de extracto de la cascara con 39% de NIS a concentraciones de 1 mg/mL (1000 μ g/mL) de cada uno.

Martinez *et al.* (2016) determinaron el efecto antimicrobiano de NIS comercial (Nisaplin®) libre y encapsulada (agente encapsulador: goma arábica) contra *L. monocytogenes* ATCC 7644 y *B. cereus* IAL 55 en leche refrigerada 6 ± 1 °C durante 21 días. Se inocularon las muestras de leche desnatada y entera que contenían NIS libre y NIS encapsulada (0.25 - 1.0 mg/L), con las bacterias a evaluar y se realizaron los recuentos cada 3 días. La NIS encapsulada presentó rasgos característicos de productos de secado por pulverización y una actividad antimicrobiana estable bajo refrigeración durante 90 días. Además, tanto en la leche desnatada como en la leche entera, la combinación de NIS libre y encapsulada (0.5 mg/L de cada uno) exhibió un efecto antilisteria más fuerte ($P <$

0.05), a pesar de esto, también se observaron células de *Listeria* resistentes. Tanto NIS libre como la encapsulada (0.25 mg/L), resultaron altamente efectivas contra la germinación de esporas de *B. cereus* y para la inhibición del crecimiento de patógenos ($P < 0.05$) en ambos tipos de leche, mejorando así la seguridad microbiológica de los productos alimenticios.

2.5 Arginato Laurico

El arginato laurico (LAE) es un surfactante catiónico el cual fue aprobado en 2005 por la FDA como un compuesto GRAS y por la European Food Safety Authority como aditivo alimentario seguro en 2007 (EFSA, 2007; FDA, 2005). En México también se encuentra aprobado como aditivo desde 2012 (DOF, 2012). El rápido metabolismo de LAE a los componentes naturales de la dieta, ácido laurico y arginina, sugiere que es poco tóxico para el ser humano (Ma, 2015).

Su nombre químico es hidrocloreto de etil- N^{α} -lauroil-L-arginato (CAS 60372-77-2). Este compuesto es un polvo blanco higroscópico, con un peso molecular de 421 g/mol que se funde a temperaturas en el rango de 50.5 - 58°C y se descompone a temperaturas por encima de 107°C. Debido a sus propiedades polares, este compuesto tiene una buena solubilidad en agua, por arriba de 247 g/kg. Su estructura se muestra en la (Figura 4) (Nerin *et al.*, 2016).

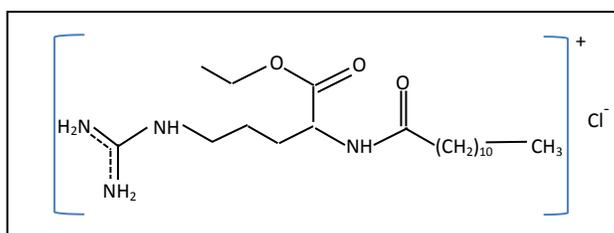


Figura 4. Estructura química de LAE (Nerin *et al.*, 2016b).

El LAE se sintetiza a través de esterificación de monohidrocloreto de L-arginina con etanol usando cloruro de tionilo como agente de esterificación. El éster formado entonces se condensa con cloruro de lauroil en un medio acuoso para formar LAE (Asker *et al.*, 2009; Kawamura & Whitehouse, 2008). Este proceso de producción fue patentado por la empresa española LAMIRSA e incluye las dos

etapas de síntesis antes mencionadas y un proceso de filtración final para recuperar el producto (FDA, 2005).

Es sabido que LAE interactúa con componentes aniónicos a través de interacciones electrostáticas. Tiende a precipitar en una solución a pH > 4,5 y con una alta fuerza iónica. Este compuesto también puede sufrir hidrólisis en presencia de nitritos o proteínas (Nerin *et al.*, 2016b).

El LAE es hidrolizado en el cuerpo humano por vías químicas y metabólicas que rápidamente rompen la molécula en sus componentes naturales, ácido laurico y L-arginina, liberando etanol y dando al compuesto su baja toxicidad conocida (Asker *et al.*, 2009). La L-arginina formada es transformada en ornitina y urea a través del ciclo de urea. Por su parte, la L-ornitina puede degradarse a citrulina en el ciclo de la urea o a α -cetoglutarato, un intermedio metabólico del ciclo del ácido cítrico, produciendo CO₂ como producto final. Por lo tanto, las dos vías principales de la excreción de metabolitos de LAE son aire expirado, en forma de CO₂ y orina, en forma de urea (Figura 5) (Nerin *et al.*, 2016b).

De acuerdo a LAMIRSA, LAE tiene una fuerte actividad antimicrobiana frente a una amplia gama de microorganismos que incluyen mohos, levaduras y bacterias gram-negativas y gram-positivas. Sin embargo, el número de investigaciones que tratan acerca de la actividad antimicrobiana de LAE es escaso. De esta manera, el número de cepas ensayadas es limitado y se centra principalmente en bacterias. De acuerdo con estos datos, la CMI's obtenidos en la literatura (de 8 a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) son consistentes con los mencionados por LAMIRSA (de 2 a 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$), lo que indica una fuerte actividad antimicrobiana de LAE (Nerin *et al.*, 2016b).

barrido (SEM) y microscopía electrónica de transmisión (TEM) así como ensayos de integridad celular (citometría de flujo y eflujo iónico) (Nerin *et al.*, 2016b).

En un estudio se determinaron los efectos del LAE y NIS Z, solos o en combinación, sobre el daño celular contra *E. coli* O157: H7, *L. monocytogenes* y *Brochothrix thermosphacta* mediante SEM y TEM, eflujo de potasio y fosfato, e inhibición del crecimiento. Una combinación de LAE con NIS Z causó cambios severos y dramáticos en la membrana citoplasmática y lisis celular de ambos tipos de bacterias, Gram positivas y Gram negativas. El tratamiento con LAE solo resultó en cambios en la morfología celular, coagulación del citoplasma y baja fuga de iones de potasio y fosfato en todas las bacterias estudiadas. Estos hallazgos demuestran que una combinación de LAE con nisina Z inhibe eficazmente tanto las bacterias Gram negativas como Gram positivas y que además se forman canales en la membrana dando como resultado lisis celular y la fuga de iones de potasio y fosfato (Pattanayaiying *et al.*, 2014).

Suksathit & Tangwatcharin (2013) realizaron un estudio para investigar las actividades *in vitro* del diacetato de sodio (SD), citrato de sodio (SC) y lactato sódico (SL) en combinación con LAE contra *L. monocytogenes* y *Salmonella* Rissen. Realizaron ensayos de SEM y TEM y sus resultados indicaron una pérdida y cambio del citoplasma y la membrana en las células de ambas bacterias. Las células de *L. monocytogenes* y *S. Rissen* tratadas con SD, SC, SL y LAE solos y en combinación, sufrieron alteraciones morfológicas considerables en comparación con el control cuando se analizaron mediante SEM. Los resultados demostraron que LAE provocó cambios dramáticos en la envoltura celular, lo que indica que la membrana son el principal objetivo de esta sustancia.

Los resultados anteriores coinciden con la hipótesis de que LAE interactúa con los lípidos de la membrana bacteriana perturbando el potencial de esta y causando cambios estructurales en la bacteria, además de que la actividad antimicrobiana de los tensioactivos catiónicos basados en arginina está directamente asociada con la presencia de la carga catiónica del grupo de guanidina protonada de este aminoácido (Figura 6) (Castillo *et al.*, 2004; Suksathit & Tangwatcharin, 2013).

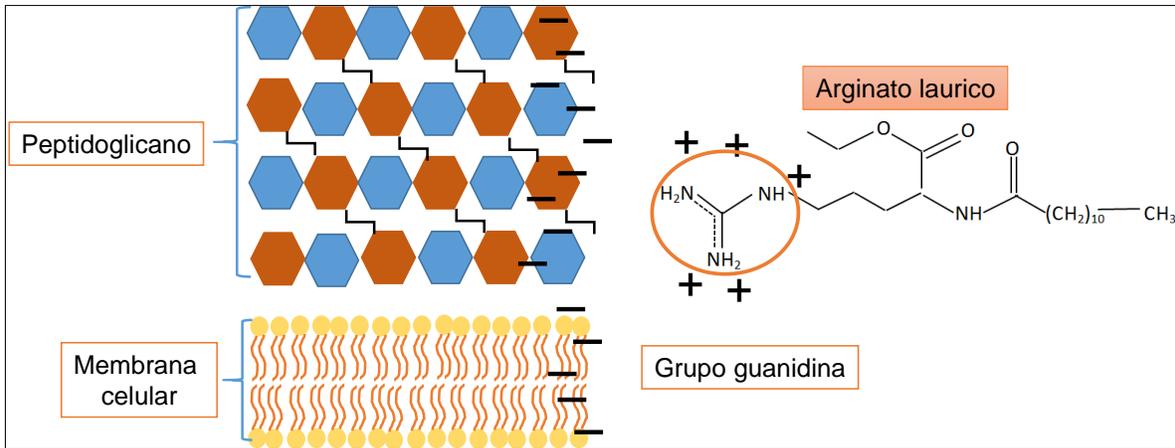


Figura 6. Mecanismo de acción del LAE (Castillo *et al.*, 2004; Suksathit & Tangwacharin, 2013).

2.5.2 Aplicación en alimentos

La EFSA (2007) reportó sus resultados sobre la estabilidad e interacción de LAE con otros compuestos que contiene los alimentos. Los resultados de su estudio sugieren que el efecto de la temperatura combinada con el pH influye en gran manera en la hidrólisis de LAE a LAS y posteriormente a L-arginina y ácido laurico como productos resultantes. A un bajo pH y a temperatura ambiente, esta molécula es bastante estable, sin embargo, la combinación de una alta temperatura (50°C) y bajo pH puede dar como resultado una hidrólisis más extensa.

Con el fin de establecer sus posibles incompatibilidades con diferentes hidrocoloides, se evaluó la interacción entre diferentes conservadores y antioxidantes usados en alimentos, así como también enzimas, aditivos y proteínas y el LAE. El grado de hidrólisis de LAE bajo diversas condiciones se determinó midiendo el porcentaje de LAE recuperado en muestras de diferente constitución con respecto a los parámetros mencionados, hidrocoloides, conservadores y antioxidantes de alimentos, enzimas, aditivos y proteínas.

En 24 de 33 muestras no se produjo hidrólisis. Sólo nueve muestras mostraron interacción entre LAE y los otros compuestos los cuales constituyeron la muestra. En cuatro de estas nueve muestras, LAE fue hidrolizado a LAS. En el resto de las

muestras, en las que se combinó LAE con nitrito, proteínas de carne o soja o lactoalbúmina y ovoalbúmina, se produjo una hidrólisis más extensa. Esta interacción resultó en la degradación del ingrediente activo a etanol, arginina y ácido láurico.

Además se evaluó la estabilidad del ingrediente activo de LAE en ocho matrices de alimentos diferentes. Cinco de estas matrices eran de alimentos procesados y el resto eran de alimentos frescos. La duración del estudio fue la de la vida de anaquel de cada producto variando de 18 horas (garbanzos) a 90 días (salchichas). El ingrediente activo se mostró estable en todos los alimentos frescos, pero sólo en dos de los alimentos procesados. Las matrices en las cuales el ingrediente activo no se mostró estable fueron bacalao seco y salado, y carne garbanzos marinados. En estos tres casos se observó una disminución de LAE, debido a la hidrólisis mediada por enzimas que dio como resultado la formación de LAS como principal metabolito.

El LAE es un tensioactivo catiónico natural con una actividad antimicrobiana de amplio espectro. Es un conservador de alimentos prometedor ya que es inodoro e incoloro y se considera un producto seguro ya que los estudios toxicológicos han demostrado que es metabolizado rápidamente por los seres humanos a los componentes naturales de la dieta, ácido láurico y arginina (Becerra *et al.*, 2013; Hawkins *et al.*, 2009).

Soni *et al.* (2012) evaluaron los efectos únicos y combinados de tres antimicrobianos GRAS (generalmente reconocidos como seguros), incluyendo el bacteriófago P100, LAE y la mezcla de diacetato sódico de lactato potásico (PL-SD) contra el crecimiento de *L. monocytogenes* en queso panela. El desarrollo del fago P100 cuando se expuso a LAE (200 µg/mL) o PL-SD (2,8% de PL y 0,2% de SD) se determinó a 4 y 30°C en un modelo de caldo de cultivo. Se encontró que P100 es estable en presencia de estos agentes antimicrobianos, ya que las unidades formadoras de placa (UFP) no variaron entre los tratamientos de control, LAE o PL-SD. Cuando se expusieron 9 log UFC/ml de células de fase estacionaria de *L. monocytogenes* a estos antimicrobianos en caldo de soja tripticasa, se

produjo una reducción de 3 a 5 log UFC/ml con el fago P100 y una reducción completa de 9 log UFC/ml con LAE pero no se encontró una reducción con PL-SD después de 24h a 4 o 30 °C. En el queso, las poblaciones de *L. monocytogenes* aumentaron desde los 3.5 log UFC/cm² iniciales a 7.7 log UFC/cm² en 28 días a 4 °C. El tratamiento con 7.8 log UFP/cm² del fago P100 en combinación con 200 µg/mL de LAE mostró un fuerte efecto listericida reduciendo los conteos de *L. monocytogenes* en 2, 3.5 y 4 log UFC/cm² sin embargo, hubo un recrecimiento posterior de *L. monocytogenes* a 4 °C. El tratamiento con PL-SD mostró un fuerte efecto listeristático, no disminuyó el conteo de *L. monocytogenes* pero se inhibió el crecimiento durante 28 días a 4 °C. Sólo el tratamiento combinado del fago P100, LAE y PL-SD redujo los conteos iniciales de *L. monocytogenes* a 2 - 4 log UFC/cm² y los mantuvo a ese nivel durante 28 días a 4°C.

Ma *et al.* (2013) evaluaron la actividad antimicrobiana de LAE solo o en combinación con aceite de hojas de canela, timol y eugenol. La concentración microbiana y las concentraciones bactericidas mínimas (MBC) para *L. monocytogenes*, *E. coli* O157: H7 y *Salmonella Enteritidis* se determinaron mediante el método de dilución de microbroth en TSB a sus temperaturas óptimas de crecimiento. La CMI para LAE fue de 11.8 µg/mL contra *L. monocytogenes* y *E. coli* O157: H7 y 23.5 µg/mL contra *Salmonella Enteritidis*. Se demostró actividad antimicrobiana sinérgica contra *L. monocytogenes* con combinaciones de LAE y el aceite de hoja de canela o eugenol. Por el contrario, se mostraron efectos antagónicos para todas las combinaciones contra *E. coli* O157: H7 y *Salmonella Enteritidis*. El extracto de una muestra de carne de res a 2 o 5% p/v en TSB, no mostró efectos sobre la CMI y MBC de LAE contra *L. monocytogenes*, mientras que en almidón soluble de papa, a 2-10% p/v en TSB, aumentó la CMI y MBC. Cuando se probaron en leche reducida a 2% de grasa, se requirieron niveles significativamente mayores de antimicrobianos para lograr inhibiciones similares a las de la TSB. Las curvas de crecimiento de las bacterias a 21 °C siguieron tendencias similares a las de la TSB, mostrando sinergismo frente a las *L. monocytogenes* una Gram positiva, y antagonismo frente a las dos bacterias Gram negativas. En sus resultados ellos sugieren que la aplicación de LAE podría

mejorar la seguridad microbiana de los alimentos, especialmente cuando se utiliza en combinación con EOC para inhibir el crecimiento de bacterias Gram-positivas.

Pattanayaiying *et al.* (2014) investigaron los efectos de LAE y la nisina Z, solos y en combinación, sobre el daño celular contra *E. coli* O157: H7, *L. monocytogenes* y *Brochothrix thermosphacta*, mediante la observación de iones de potasio y fosfato por medio de SEM y TEM, y la inhibición del crecimiento. Una combinación de LAE con nisina Z causó cambios severos y dramáticos en la membrana citoplasmática y lisis celular de bacterias Gram positivas y Gram negativas. El tratamiento combinado también causó fugas significativas de iones de potasio y fosfato de *E. coli* O157: H7, *L. monocytogenes* y *Brochothrix thermosphacta*, en comparación con otros tratamientos: 16.62 ± 1.05 , 50.35 ± 0.81 y 45.47 ± 1.15 mg/L del ion potasio y 122.66 ± 8.81 , 97.96 ± 3.31 y 26.47 ± 13.97 mg/L del ion fosfato después de tratamiento durante 6 h, respectivamente. Las bacterias se redujeron en aproximadamente 7 log UFC/mL dentro de la primera hora de tratamiento y, a continuación, las células fueron incapaces de crecer para el resto del experimento. El tratamiento con LAE solo resultó en cambios en la morfología celular, coagulación del citoplasma y baja fuga de iones de potasio y fosfato en todas las bacterias ensayadas. El tratamiento de NIS Z (320 UA/mL) en *L. monocytogenes* y de *Brochothrix thermosphacta*, dio lugar a la formación de canales en la membrana y fuga de los iones de potasio y fosfato a niveles bastante altos; sin embargo la bacteriocina no fue eficaz contra *E. coli* O157:H7. El LAE y la NIS Z redujeron el crecimiento tanto de *L. monocytogenes* como de *Brochothrix thermosphacta* en aproximadamente 7 log UFC/mL. Por el contrario, *E. coli* O157:H7 no fue inhibida por los tratamientos con NIS Z, pero disminuyó en aproximadamente 4.45 log UFC/mL después del tratamiento con LAE. Ellos concluyen que estos resultados proporcionan información adicional sobre el modo de acción de estos compuestos sobre las poblaciones bacterianas.

2.6 ϵ -polilisina

Epsilon-polilisina (EPL) es un homopolímero catiónico que contiene aproximadamente 30 subunidades de L-lisina, uno de los aminoácidos esenciales.

Estas subunidades se encuentran unidas a través del enlace isopeptídico entre los grupos ϵ -amino y α -carboxilo. La fórmula química de este compuesto se muestra en la Figura 7. Epsilon-polilisina es uno de los dos únicos homopolímeros conocidos en la naturaleza (Yamanaka *et al.*, 2008)

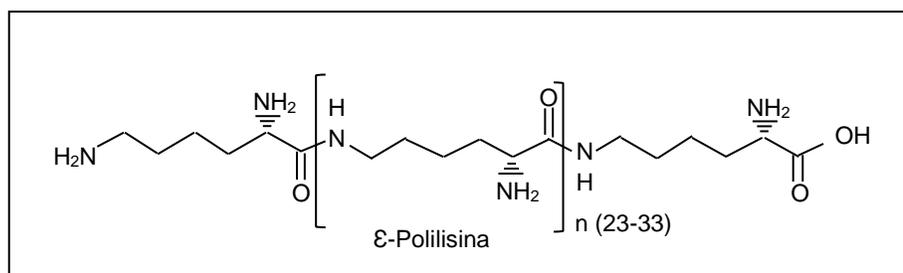


Figura 7. Estructura química de ϵ -polilisina (Yamanaka *et al.*, 2008).

El polímero fue descubierto en 1977, hace más de 25 años (Nampoothiri *et al.*, 2014; Shih *et al.*, 2006). El polímero es estable al calor, e incluso puede soportar la esterilización durante 20 min (Nampoothiri *et al.*, 2014).

Epsilon-polilisina se fabrica mediante un proceso de fermentación aeróbica utilizando el microorganismo no patógeno *Streptomyces albulus* subsp. *Lysinopolymerus*. Todos los materiales utilizados en este proceso son aptos para alimentos y se utilizan de acuerdo con las reglamentaciones federales de los Estados Unidos. Después de la fermentación, el microorganismo se elimina de los medios de cultivo a través de una etapa de esterilización y posterior filtración con un filtro de membrana de 0.1 μm , el filtrado se purifica luego mediante separación cromatográfica. Un esquema de este proceso se muestra en la Figura 8 (FDA, 2010).

La producción del compuesto está influenciada sustancialmente por el pH del medio (Nampoothiri *et al.*, 2014). Kahar *et al.* (2001) realizaron un estudio para mejorar la producción microbiana de EPL con una estrategia de control de pH. El cultivo de *S. albulus* se llevó a cabo en medio M3G en un fermentador. El control de pH se dividió en dos fases. En la fase I, el crecimiento celular se aceleró manteniendo el pH a más de 5; en la fase II, la producción de EPL se incrementó

al mantener el pH en aproximadamente 4. Esta estrategia de control mejoró exitosamente la producción de EPL de 5.7 g/L a 48.3 g/L. en el cultivo

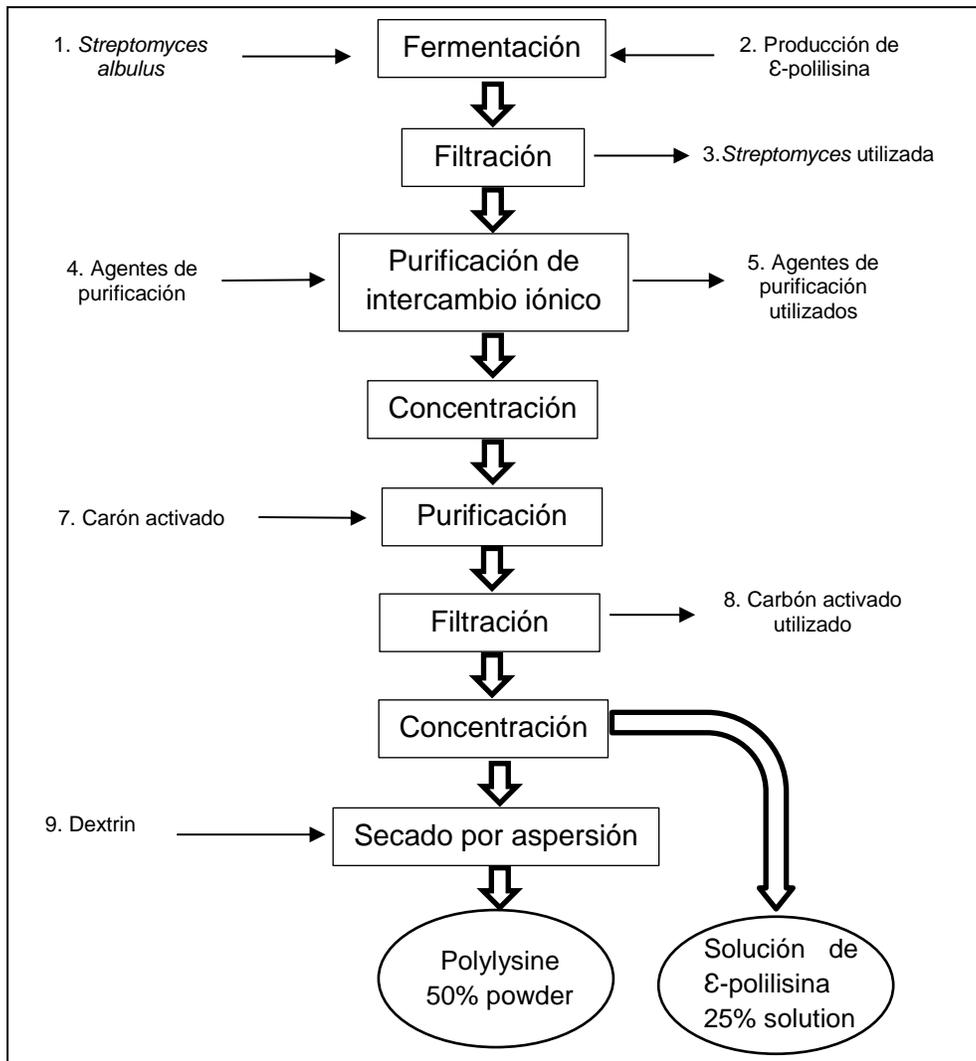


Figura 8. Esquema del proceso de producción de ϵ -polilisina (FDA, 2010).

El proceso biotecnológico para producir EPL fue patentado por Hiraki y Suzuki (1999) (Patente de Estados Unidos Número 5 900 363). En 2003 fue aprobado como GRAS por la FDA, para uso como conservador en productos de arroz a un nivel de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Posteriormente, este compuesto se produjo de acuerdo con el proceso patentado, por Purac Biochem y en 2010, el compuesto sería GRAS para su uso como conservador en diversos tipos de alimentos. Posteriormente Purac extendió su uso para incluir numerosos tipos de alimentos con niveles adicionales

de hasta 250 µg/mL. En la Tabla 1 se muestra la cantidad recomendada para el uso de EPL en diferentes alimentos (Yu *et al.*, 2010).

Tabla 3. Resumen de los niveles propuestos para el uso en alimentos de ϵ -polilisina (FDA, 2010).

Categoría de alimento	Alimentos propuestos	Concentración (µg/mL)
Bebidas alcohólicas	Cerveza	100
	Vino	50
Productos de panadería	Tarta de queso	100
	Muffins	100
	Pay (sin fruta)	250
Bebidas y bases para bebidas	Energéticas, dietéticas, deportivas e isotónicas	250
	Bebidas a base de carne, azúcar, arroz y gelatinas	250
Queso	Mezclas de diferentes quesos	250
	Cottage, ricotta y queso crema	250
	Feta, mozzarella, y mexicanos	250
	Procesados y untables	250
Café y té	Café y bebidas de café	250
	Té y bebidas de té	250
Huevo	Platillos a base de huevo	250
Aceites y grasa	Margarina libre o reducida en grasa	50
	Aderezos para ensaldas	250
Productos del mar	Mariscos y pescado fresco	250
	Alimentos basados en mariscos y pesacado fresco	250
Productos cárnicos	Carne fresca de res y puerco	600
	Alimentos preparados a base de carne	200 – 300
Productos lácteos	Bebidas de leche sabor chocolate	100
	Crema	100
	Yogurt	100
Productos avícolas	Alimentos preparados a base de aves	250
Vegetales y vegetales procesados	Frijoles y alimentos a base de frijoles	250
	Papas y alimentos a base de papa (excepto las fritas)	250
	Alimentos preparados a base de vegetales	100 - 250
	Jugos de tomate	250

Epsilon-polilisina se ha utilizado durante las últimas décadas para una amplia gama de aplicaciones industriales. Desafortunadamente, los rendimientos de EPL

utilizando cepas silvestres son comparativamente bajos con respecto a lo que se desea para la producción industrial.

Bhattacharya *et al.* (2017) realizaron un modelo para optimizar los parámetros del medio y mejorar la producción de EPL utilizando la bacteria marina *Bacillus licheniformis*. Nutrientes que incluían glucosa, extracto de levadura, sulfato de magnesio y sulfato ferroso se incorporaron como variables de entrada y EPL como la variable de salida. Esta técnica de optimización podría mejorar significativamente la producción de EPL en un 196%, en comparación con un medio no optimizado.

En la biosíntesis de EPL, el precursor se identificó como L-lisina desde 1983, y es este, el precursor de EPL en distintas bacterias (Pandey & Kumar, 2014). Un sistema péptido sintetasa no ribosomal podría estar involucrado en la biosíntesis utilizando L-lisina como sustrato. Todas las enzimas involucradas en la biosíntesis de EPL aún deben ser caracterizadas; sin embargo, investigación concerniente ha revelado que la aspartoquinasa, es una enzima clave en la biosíntesis de L-lisina durante la fermentación (Yoshida & Nagasawa, 2003). La aspartoquinasa es la primera enzima clave en la vía de L-aspartato de la biosíntesis de EPL y se encuentra regulada por treonina y lisina (Pandey & Kumar, 2014). La Figura 9 muestra un esquema de la ruta de biosíntesis de EPL.

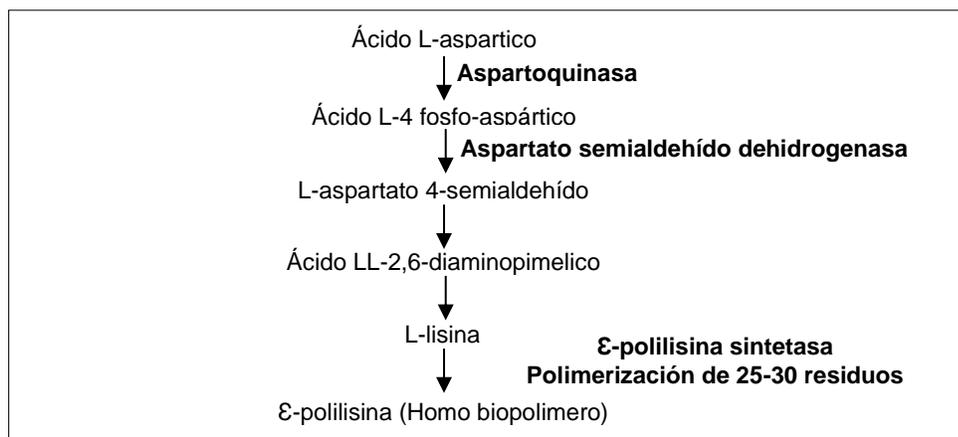


Figura 9. Esquema de la ruta de biosíntesis de ε-polilisina a partir de ácido L-aspartático (Pandey & Kumar, 2014).

Además, la EPL sintetasa también es una enzima importante involucrada en el proceso. Yamanaka *et al.* (2008) la caracterizaron con una masa molecular de 130 kg/mol y como una proteína de membrana con dominios de adenilación y tiolación característicos de las sintetasas de péptidos no ribosómicos.

Por otro lado, Kito *et al.* (2002) purificaron y caracterizaron una enzima que degrada a EPL de una cepa de *S. albulus*. La enzima estaba fuertemente unida a la membrana celular y su masa molecular fue de 54 kg/mol. La enzima liberó L-lisinas con extremos N-terminales y se clasificó como una aminopeptidasa. Además, *Streptomyces virginiae* IFO 12827 y *Streptomyces norsei* IFO 15452 mostraron una fuerte actividad degradante de EPL, ambas cepas producen EPL, lo que indica una correlación entre la distribución de la enzima de degradación de EPL unida a membrana y la actividad productora del mismo.

Hiraki *et al.* (2003) reportaron que la ϵ -polilisisina resultó prácticamente no tóxica en un estudio oral en ratas. No hubo mortalidad ni mutagénesis hasta en 5 g/kg en ensayos bacterianos. Los estudios de absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME) de la ϵ -polilisisina en los cuales fueron administrados 100 mg/kg en una sola dosis a ratas macho en ayunas, revelaron una baja absorción del tracto gastrointestinal. Todas las cantidades de la radioactividad dosificada fueron eliminadas por excreción; 97% en la orina y en las heces dentro de las 168 h posteriores, y 3% en el aire expirado en las siguientes 48 h. La radiografía de todo el cuerpo no mostró concentraciones de ϵ -polilisisina absorbida en ningún tejido u órgano. Basándose en los resultados de los estudios de ADME y la falta de toxicidad en los estudios de seguridad, propusieron que el uso de ϵ -polilisisina como conservador en los alimentos se considera seguro.

De esta manera, EPL se usa ampliamente para preservar diferentes alimentos gracias a su amplia actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas, Gram negativas, levaduras y hongos. La Tabla 4 muestra algunos valores de CMI para diferentes especies de bacterias.

Tabla 4. Concentración mínima inhibitoria de ϵ -polilisina para diferentes especies de bacterias.

Microorganismo	CMI ($\mu\text{g/mL}$)	Reference
<i>Listeria monocytogenes</i>	20 - 100	(Kozak <i>et al.</i> , 2017)
<i>Listeria innocua</i>	750	(Hyldgaard <i>et al.</i> , 2014)
<i>E. coli</i>	15.63	(Liu <i>et al.</i> , 2015)
	12.5	(Li <i>et al.</i> , 2014)
	75	(Hyldgaard <i>et al.</i> , 2014)
	600-900	(Miya <i>et al.</i> , 2014)
	50	(Yoshida & Nagasawa, 2003)
	2	(Shima <i>et al.</i> , 1984)
	62.5	(Liu <i>et al.</i> , 2015)
<i>Bacillus subtilis</i>	33	(Yoshida & Nagasawa, 2003)
	13	(SHIMA <i>et al.</i> , 1984; Yoshida & Nagasawa, 2003)
	31.25	(Liu <i>et al.</i> , 2015)
<i>Staphylococcus aureus</i>	12.5	(Li <i>et al.</i> , 2014)
	12.5	(Yoshida & Nagasawa, 2003)

Adicionalmente, se ha sugerido que EPL tiene una acción anti-obesidad ya que puede suprimir la absorción de grasas en intestino delgado al inhibir la actividad de la lipasa pancreática, incluso después de la incubación con enzimas digestivas como tripsina y pepsina (Hyldgaard *et al.*, 2014).

2.6.1 Mecanismo de acción

La investigación concerniente al mecanismo de acción de EPL se lleva a cabo en la actualidad.

Hyldgaard *et al.* (2014) utilizaron *E. coli* (Gram negativa) y *L. innocua* (Gram positiva) para elucidar el mecanismo de acción de EPL. Ellos propusieron que EPL en el caso de *E. coli*, interactúa con la membrana a través de un mecanismo de formación de vesículas o micelas por la interacción con los grupos de fosfolípidos de la membrana bacteriana. Debido a que EPL interactúa más fácilmente con grupos cargados negativamente, tiene una toxicidad relativamente baja contra células de mamíferos y de levadura, así mismo, las diferencias en la susceptibilidad entre las Gram positivas y Gram negativas podrían deberse a diferencias en la composición de la membrana. Tal es el caso de la membrana de *L. innocua* la cual contiene fosfatidil-glicerol derivado de lisina y lisil-cardiolipina. La lisil-cardiolipina es bipolar y por lo tanto, no tiene carga negativa neta lo que provoca que la bacteria disminuya su afinidad por los péptidos catiónicos.

Ye *et al.* (2013) hipotetizaron el mecanismo de acción de EPL contra *E. coli* O157:H7 y de acuerdo con sus resultados, la actividad de EPL involucra otras acciones además de la ruptura de la membrana. La presencia de EPL aumenta la concentración de las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés). Además, induce un aumento en la expresión de los genes relacionados con ROS *oxyR* y *sodA*, y redujo la transcripción de los genes de virulencia *eaeA* y *espA*.

Adicionalmente, Lin *et al.* (2018) propusieron el modo de acción de EPL contra *L. monocytogenes*. Inicialmente, las cargas positivas de la solución de EPL neutralizan las cargas negativas de la membrana celular. En segundo lugar, ocurre la pérdida de materiales intracelulares, enzimas y proteínas solubles después del tratamiento con EPL. Ellos encontraron que EPL que mostró un efecto destructivo contra las enzimas hexoquinasa, fosfofructoquinasa y piruvato quinasa de la glicólisis. Además, EPL posee actividad inhibitoria en el metabolismo respiratorio

de *L. monocytogenes* que se ve reflejado en la producción de energía y acumulación de biomasa.

2.6.2 Aplicación en alimentos

Geornaras *et al.* (2007) estudiaron los efectos antimicrobianos de la ϵ -polilisina contra *E. coli* O157: H7, *Salmonella Typhimurium* y *L. monocytogenes* en 6 extractos de alimentos y en caldo de cultivo. Los extractos de alimentos (10% (p/p) en agua destilada) fueron leche entera y sin grasa, carne de res, mortadela, arroz y verduras (proporción 50:50 de brócoli y coliflor). Epsilon-polilisina se probó a 0.005% y 0.02% (p/v) contra *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes*, y 0.02% y 0.04% (p/v) contra *S. Typhimurium*. Los sustratos se inocularon (5 log UFC/mL) y se analizaron periódicamente durante 6 días de almacenamiento a 12 °C. En general, los 3 patógenos alcanzaron 7 a 9 log UFC/mL en 2 días en los sustratos control. Se obtuvieron efectos bactericidas inmediatos ($P < 0.05$) después de la exposición a EPL en los extractos de arroz (todos patógenos) y vegetales (*E. coli* O157:H7 y *S. Typhimurium*). Los recuentos se redujeron por debajo del límite de detección. En los otros extractos alimenticios (leche sin grasa, leche entera, carne de res y mortadela), ambas concentraciones de EPL estudiadas dieron como resultado niveles de patógenos más bajos ($P < 0.05$) al final del almacenamiento comparados con los conteos iniciales, obteniendo mejores efectos bactericidas con la mayor de las concentraciones estudiadas de EPL.

Miya *et al.* (2014) evaluaron a EPL combinada con el método de envasado con CO₂ para el control de *E. coli* y *Salmonella* en carne fresca. A una temperatura de incubación de 4 °C, se observó una reducción a los 7 días de 4.3 log y 2.4 log para *E. coli* O157: H7 y *Salmonella*, respectivamente, al aplicar EPL. Cuando se observó el efecto del empaquetamiento con CO₂ combinado con EPL, el CO₂ no tuvo un efecto inhibitor adicional sobre el crecimiento bacteriano en comparación con las muestras tratadas solo con EPL. Sin embargo, se observó un efecto del CO₂ cuando se incubó a 10 °C, al obtener una reducción de 2.9 log y 4.4 log para *E. coli* en muestras tratadas únicamente con EPL y aquellas tratadas con EPL y

CO₂, respectivamente. Para *Salmonella*, se observaron 1.7 log y 3.5 log de reducción en muestras con EPL y en muestras con EPL y CO₂, respectivamente.

Zahi *et al.* (2017) investigaron el sinergismo entre EPL y D-limoneno para desarrollar un sistema de nanoemulsión. Los resultados del método de tablero mostraron que EPL y el D-limoneno presentan fuertes efectos sinérgicos y útiles contra *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis* y *Saccharomyces cerevisiae*. Los resultados demostraron una amplia mejora de la actividad antimicrobiana de la nanoemulsión de D-limoneno luego de la inclusión de EPL. Estos resultados contribuyen al desarrollo de un sistema antimicrobiano más eficiente en la industria alimentaria.

III. OBJETIVO GENERAL

Elucidar los mejores tratamientos resultantes de la mezcla de la endolisina PlyP100, nisina, arginato laurico y ϵ -polilisina solos y en combinación contra *L. monocytogenes* en queso panela.

3.1 Objetivos particulares

- a. Evaluación de la actividad antimicrobiana de la endolisina PlyP100, nisina, arginato laurico, ϵ -polilisina contra *L. monocytogenes* en caldo de cultivo.
- b. Evaluación de la actividad antimicrobiana de la endolisina PlyP100, nisina, arginato laurico y ϵ -polilisina contra *L. monocytogenes* en queso panela utilizando un modelo de laboratorio miniaturizado de producción de queso fresco (MLQF).
- c. Evaluación sensorial de la similaridad de las propiedades del queso panela adicionado y sin adición de los compuestos antimicrobianos.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Material biológico y medio de cultivo

La Tabla 5 muestra las cepas de *Listeria* utilizadas en este experimento. Cada cepa se recuperó de una reserva de glicerol almacenada a -80 °C y se cultivó en caldo de cultivo infusión cerebro-corazón (BHI, por sus siglas en inglés; Difco, Becton Dickinson and Co., Sparks, MD) a 37 °C, con agitación de 250 µg/mL durante 24 horas para obtener un inóculo de aproximadamente 9 log UFC/mL. Las diluciones se prepararon utilizando *Listeria innocua* y un cóctel de las cinco cepas de *L. monocytogenes* para obtener un inóculo de 5 log en BHI doblemente concentrado y 4 log en un amortiguador de fosfato salino (PBS, por sus siglas en inglés; KCl 200 mg/L; KH₂PO₄, 200 mg/L; NaCl, 8 g/L; Na₂HPO₄, 1,15 g/L; pH 7.2) para la evaluación en MLQF. El conteo de *Listeria* se llevó a cabo en placas PALCAM con agar *Listeria*-Selective (EMD-Millipore) las cuales fueron suplementadas con 20 µg/ml de ceftazidima (Tokyo Chemical Industry Co. Ltd.), sembradas y posteriormente incubadas a 37 °C durante 48 h. La endolisina se obtuvo con la sobreexpresión del plásmido pRSETB-plyP100 contenido en la cepa modificada de *Escherichia coli* BL21 (DE3) (Van Tassell *et al.*, 2017). Esta cepa modificada fue incubada en caldo de lisogenia (LB) suplementado con 50 µL/mL de ampicilina.

Tabla 5. Cepas de *Listeria* utilizadas en este trabajo

<i>Listeria</i>	Serotipo	Fuente de aislamiento
<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090	6a	Animal, cerebro de vaca
<i>Listeria monocytogenes</i> NRRL B-33104	4b	Alimento, epidemia, queso Jalisco
<i>Listeria monocytogenes</i> NRRL B-33513	4b	Alimento, epidemia, pate
<i>Listeria monocytogenes</i> NRRL B-33420	4b	Alimento, epidemia, productos cárnicos
<i>Listeria monocytogenes</i> NRRL B-33424	1/2b	Humano, epidemia, chocolate y leche
<i>Listeria monocytogenes</i> NRRL B-33419	1/2a	Humano, epidemia, Pavo rebanado

4.2 Evaluación de la actividad antimicrobiana de PlyP100, NIS, LAE y EPL en caldo de cultivo.

4.2.1 Sobreexpresión y purificación de PlyP100

La endolisina se obtuvo de acuerdo a lo descrito previamente por Van Tassell *et al.* (2017). Se inoculó *E. coli* BL21 (DE3) en LB con ampicilina (50 µg/mL) y se incubaron durante 14 – 16 horas a 37 °C y 250 rpm, posteriormente se transfirió 1 mL de este inóculo a matraces con 100 mL del caldo LB también suplementado con ampicilina y se incubaron a las condiciones antes mencionadas hasta que se obtuvo una densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) de 0.5 – 0.6. El matraz se almacenó en refrigeración durante 30 min. A continuación, los cultivos se indujeron a la producción de la enzima mediante la adición de Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) a una concentración final de 1 mM. La incubación continuó a 25 °C y 300 rpm durante 20 h, las células se centrifugaron a 4000 rpm durante 30 min a 4 °C y se almacenaron durante la noche a -20 °C. Posteriormente, las células se lisaron en prensa francesa a 1500 psi, se centrifugaron a 20 000 x g durante 30 min a 4 °C y se utilizó posteriormente el sobrenadante. Se utilizó cromatografía de afinidad mediante el protocolo del kit QIA express Ni-NTA Fast Start (Qiagen) para obtener la proteína recombinante PlyP100 purificada y finalmente se confirmó la pureza de esta a través de electroforesis SDS-PAGE (SDS-PAGE estándar de amplio alcance, Bio-Rad). La concentración se cuantificó mediante el kit de proteína Quick Start Bradford (Bio-Rad) utilizando albúmina de suero bovino como proteína estándar.

4.2.2 Determinación de la actividad lítica de PlyP100

La cuantificación de la actividad lítica se realizó con *L. innocua* de acuerdo a lo descrito por Ibarra-Sánchez *et al.* (2018) y Van Tassell *et al.* (2017). La bacteria se incubó a 37°C y 250 rpm durante la noche hasta obtener una $DO_{600} = 1$. Las células se centrifugaron a 14 000 rpm durante 2 minutos y el sedimento se resuspendió en un amortiguador de fosfato frío hasta $DO_{600} = 1.5$. Posteriormente, en una microplaca estéril de 96 pozos, se añadieron 100 µl de suspensión bacteriana, 80 µl del amortiguador de fosfato frío y 20 µl de PlyP100 purificada. Inmediatamente se midió la disminución en DO_{600} cada 30 s durante 30 min a 25 °C en un espectrofotómetro. La actividad de endolisina se calculó usando la pendiente más inclinada de la curva obtenida y su factor de dilución, 1 U se definió

como la cantidad de enzima necesaria para disminuir la DO_{600} de células de *L. innocua* en suspensión en 0.01/min.

4.2.3 Compuestos antimicrobianos nivel GRAS

Los compuestos antimicrobianos GRAS utilizados en este proyecto fueron NIS (Nisaplin® 2.5%, Danisco, Kansas, Estados Unidos), EPL (ϵ -polilisina > 98%, Wilshire Technologies ©, Nueva Jersey, Estados Unidos) y LAE (CytoGuard™ LA 20 10%, amablemente proporcionado por A&B Ingredients, Inc, Nueva Jersey, Estados Unidos). Los stocks de antimicrobianos se prepararon en el momento de ser utilizados con agua desionizada y esterilizada a diferentes concentraciones dependiendo de la prueba.

4.2.4 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria

La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) se determinó mediante el método de dilución en caldo para cada antimicrobiano GRAS descrito por Van Tassell *et al.* (2015) de la siguiente manera: se inocularon las cepas de *Listeria* (Tabla 5) en caldo de cultivo BHI e incubaron durante la noche a 37°C y 250 rpm para posteriormente preparar un inóculo de 5 log UFC/mL en caldo doblemente concentrado (2x), se prepararon diluciones seriadas por triplicado de NIS en una microplaca estéril de 96 pozos para obtener concentraciones finales de 1600, 800, 400, 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.562 y 0.781 $\mu\text{g/mL}$. Se realizó de la misma manera para LAE y para EPL se prepararon las diluciones para obtener concentraciones finales de 2000, 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.62, 7.81, 3.90, 1.95 y 0.97 $\mu\text{g/mL}$. Finalmente, cada pozo de la microplaca contenía 100 μL de las diluciones antimicrobianas seriadas y 100 μL del inóculo. Se realizó por triplicado. La CMI se definió como la concentración antimicrobiana más baja que previno visiblemente el crecimiento después de la incubación durante la noche a 37 °C.

4.2.5 Estudio de los compuestos antimicrobianos GRAS mediante una prueba de tablero.

La interacción entre los antimicrobianos se determinó utilizando la prueba de tablero de acuerdo a lo descrito por (Kozak *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2015; Ma *et al.*, 2013; Smith *et al.*, 2016). Los experimentos se realizaron en una microplaca estéril de 96 pozos utilizando combinaciones dobles de los antimicrobianos, NIS-LAE, NIS-EPL y LAE-EPL. Para cada combinación, el primer compuesto antimicrobiano (A) se diluyó en serie horizontalmente en seis filas, mientras que el segundo compuesto antimicrobiano (B) se diluyó verticalmente en seis columnas coincidiendo con las filas mencionadas donde se encontraba el antimicrobiano A. Las diluciones de cada antimicrobiano comenzaron con el valor CMI de cada uno. Las cepas de *Listeria* se inocularon en caldo BHI e incubaron durante la noche a 37 °C y 250 rpm para preparar un inóculo final de 5 log UFC/mL en caldo 2x. Finalmente, cada pozo de la microplaca contenía 50 µL de las diluciones de A, 50 µL de las diluciones de B y 100 µL del inóculo. Se realizó por triplicado. La Figura 10 muestra el arreglo final con los dos antimicrobianos en la microplaca de 96 pozos.

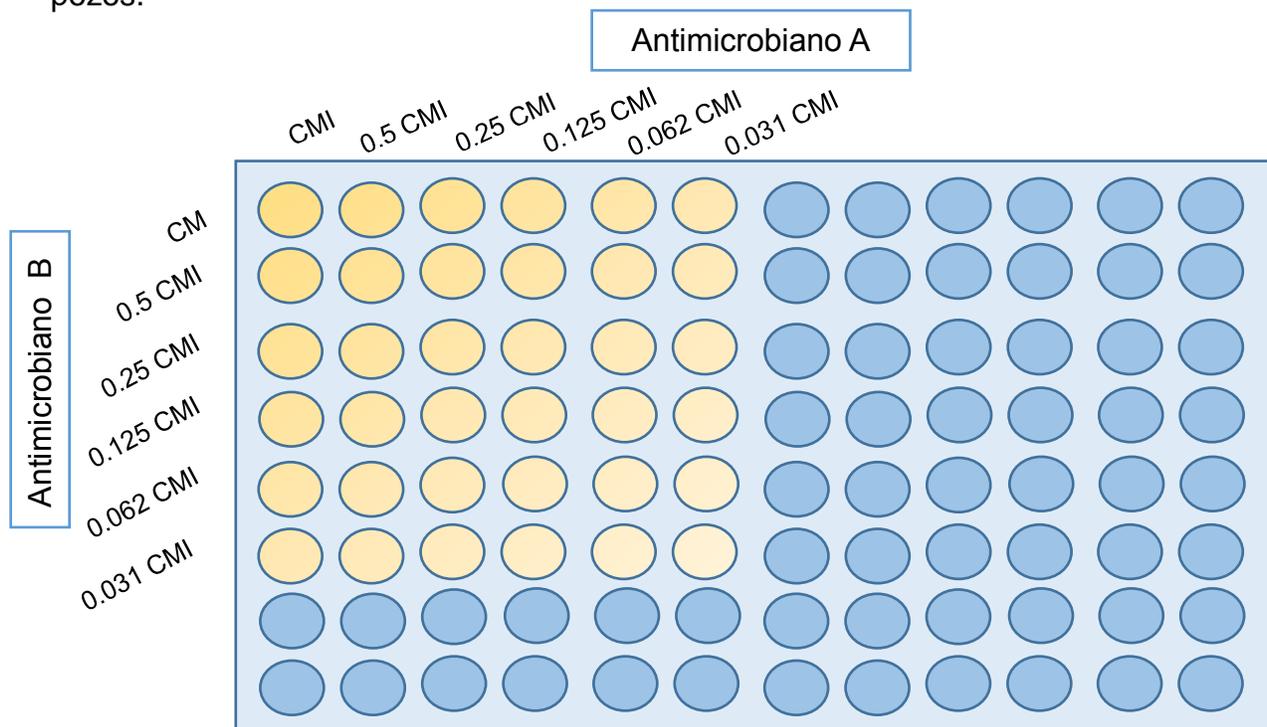


Figura 10. Arreglo correspondiente a la prueba de tablero en microplaca de 96 pozos.

El índice de concentración inhibitoria fraccional (CIF_I) fue calculado después para caracterizar las interacciones entre los antimicrobianos GRAS como sinérgicas, aditivas o antagónicas utilizando la siguiente fórmula (Kozak *et al.*, 2017):

$$CIF_I = CIF_A + CIF_B$$
$$CIF_I = \frac{CIF \text{ de } A \text{ en combinación}}{CIF \text{ de } A} + \frac{CIF \text{ de } B \text{ en combinación}}{CIF \text{ de } B}$$

Las clasificaciones de las interacciones antimicrobianas fueron definidas con los siguientes parámetros: sinergismo cuando $CIF_I \leq 0.5$, aditivo cuando $0.5 < CIF_I \leq 4.0$ y antagonismo cuando $CIF_I > 4.0$.

4.3 Evaluación de la actividad antimicrobiana de PlyP100, NIS, LAE y EPL en queso panela mediante el modelo MLQF.

4.3.1 Producción de queso elaborado con el modelo MLQF.

El queso se elaboró mediante el uso del modelo MLQF de acuerdo a lo descrito previamente por Van Tassell *et al.* (2015). La leche pasteurizada que contenía 20 μL de una solución CaCl_2 al 50% (CaCl_2 50%; 5 g de CaCl_2 /10 mL de agua esterilizada) y 15 μL de cuajo por cada 50 mL de leche, se dividió en lotes de 1 mL en tubos de microcentrífuga, la coagulación se llevó a cabo a 35 °C durante 45 min y posteriormente se cortó la cuajada y se cocinó durante 30 min aumentando la temperatura lentamente en 1 °C cada 6 min de 35 °C a 40 °C. En seguida se eliminaron 200 μL de suero de cada tubo de microcentrífuga y se reemplazaron con 50 μL de una solución de NaCl (NaCl; 0.16 g/1 mL de agua esterilizada). La cocción siguió a 40 °C durante 20 min. Finalmente, los tubos de 1 mL se centrifugaron a 8000 rpm durante 5 y 10 min, se les retiró el suero y se almacenaron a 4 °C. Los tubos centrifugados durante 5 min fueron aquellos a los que se les aplicaron los tratamientos a evaluar y posteriormente se centrifugaron durante otros 5 min.

4.3.2 Evaluación de PlyP100, NIS, LAE y EPL solos y en combinaciones binarias en queso elaborado mediante el modelo MLQF.

Durante el procedimiento descrito en el paso anterior, después de la cocción final a 40°C durante 20 min, se inocularon los tubos de microcentrífuga con el coctel de 5 cepas de *L. monocytogenes* descritos en la Tabla 5 y se dejaron a temperatura ambiente durante 15 min para permitir la adherencia de la bacteria al queso. Posteriormente, los tubos de microcentrífuga con tratamiento control (sin ningún compuesto antimicrobiano) se centrifugaron a 8000 rpm durante 10 min y los tubos a los que se les aplicarían los tratamientos antimicrobianos se centrifugaron a 8000 rpm solo durante 5 min. Los compuestos antimicrobianos se evaluaron solos y en combinaciones binarias utilizando la concentración máxima permitida por la FDA, dichos tratamientos evaluados se muestran en la Tabla 6. La concentración de PlyP100 se eligió en base a los resultados reportados por Ibarra-Sánchez *et al.* (2018), donde además fueron evaluadas las combinaciones entre NIS y PlyP100 por lo que se descartaron en el presente estudio.

Tabla 6. Tratamientos evaluados a partir de los antimicrobianos solos y en combinaciones binarias.

Tratamiento	Antimicrobiano			
	PlyP100 (U/mL) ^a	NIS (µg/mL)	LAE (µg/mL)	EPL (µg/mL)
Control	-	-	-	-
PlyP100	2.5	-	-	-
NIS	-	200	-	-
LAE	-	-	200	-
EPL	-	-	-	250
PlyP100-LAE	2.5	-	200	-
PlyP100-EPL	2.5	-	-	250
NIS-LAE	-	200	200	-
LAE-EPL	-	-	200	250

* PlyP100: endolisina PlyP100; NIS: nisina; LAE: arginato laurico; EPL: ϵ -polilisina

^aU=cantidad de enzima necesaria para disminuir la DO600 de las células de *Listeria* en una suspensión a 0.01/min.

Todos los tratamientos fueron realizados por duplicado y el experimento se realizó tres veces.

4.3.3 Evaluación de combinaciones binarias a partir de EPL y LAE en queso elaborado con el modelo MLQF.

A partir de los resultados obtenidos en la sección 4.3.2, se realizó la evaluación de combinaciones dobles utilizando menores concentraciones de LAE y EPL de forma similar a la descrita anteriormente, mediante el uso del modelo MLQF. Se tomaron dos puntos equidistantes entre cero y el límite máximo permitido por la FDA de cada antimicrobiano. Los tratamientos evaluados se muestran en la siguiente tabla (Tabla 7).

Tabla 7. Tratamientos evaluados a partir de LAE y EPL en combinaciones binarias a menores concentraciones.

Tratamiento	Antimicrobiano			
	EPL		LAE	
	Concentración (µg/mL)	Proporción	Concentración (µg/mL)	Proporción
A	-	-	-	-
B	250.00	1	-	-
C	-	-	200.00	1
D	250.00	1	200.00	1
E	250.00	1	133.33	2/3
F	250.00	1	66.66	1/3
G	166.66	2/3	200.00	1
H	83.33	1/3	200.00	1

*LAE: arginato laurico; EPL: ϵ -polilisina

Todos los tratamientos fueron realizados por duplicado y el experimento se realizó tres veces.

4.3.4 Análisis microbiológicos

El conteo de *L. monocytogenes* se realizó mediante sembrado en placas de PALCAM suplementadas con 20 µg/mL de ceftazidime como se describe en el paso 4.1 de esta metodología. Los conteos se realizaron a los 0, 7, 14 y 28 días durante el periodo almacenamiento y las placas PALCAM se incubaron a 37 °C

durante 48 h. Las colonias se recuperaron de las placas PALCAM del día 28 y se cultivaron para realizar una prueba de susceptibilidad antimicrobiana.

4.3.5 Susceptibilidad de *L. monocytogenes* a NIS, LAE y EPL

Un total de 63 colonias de *L. monocytogenes* aisladas de los tratamientos descritos en Tabla 6 fueron inoculados en caldo BHI e incubados a 37 °C por 24 h. La susceptibilidad antimicrobiana por parte de *L. monocytogenes* a los antimicrobianos GRAS se determinó mediante la determinación de la CMI de cada antimicrobiano correspondiente a cada tratamiento y se comparó con el valor obtenido inicialmente para cada antimicrobiano.

4.4 Evaluación sensorial

4.4.1 Producción de queso panela mediante el proceso tradicional.

Se realizó una producción de queso panela con la técnica tradicional a partir de leche pasteurizada de vaca de la marca comercial Querétaro. Dieciocho punto nueve litros de leche a una temperatura de 35°C fueron adicionados con 4.15 g de CaCl y 8 mL de cuajo, ambos en solución 1:10 en agua purificada. Se dejó reposar la leche durante 45 min y posteriormente se cortó la cuajada en cubos pequeños. Se dejó reposar 5 min y se agitó durante otros 10 min manteniendo la temperatura a 35°C. Se realizó una rampa de calentamiento para llegar a 40°C durante 30 min (incremento de 1°C cada 6 min) y se prosiguió a realizar un desuerado parcial retirando aproximadamente 2/3 del suero y se agregaron 151.2 g de NaCl, se agitó durante 10 min y se realizó el desuerado total para lo cual se moldeó la cuajada en canastos de 500 g aproximadamente. Los canastos se estibarón de tres en tres alternando su posición durante 30 min, se voltearon las cuajadas de cada uno de los canastos y se realizó el mismo proceso, se cubrieron dichos canastos estibados con bolsas de plástico y se refrigeraron durante 24 h a 4°C. Finalmente, pasadas las 24 h se empacaron al vacío en presentación de 250 g y se refrigeraron a 4°C.

4.4.2 Adición de compuestos antimicrobianos al queso panela elaborado mediante el proceso tradicional.

La adición de la mezcla de antimicrobianos a evaluar se realizó en la etapa previa al desuerado total, justo antes de colocar el producto en los canastos. Se separó la cuajada en dos partes, a una se le agregó la mezcla de antimicrobianos (QCA) y a la otra se le realizó el procedimiento como fue descrito en la sección anterior (QSA).

A partir de los resultados encontrados en la sección 4.3.3, se evaluó el tratamiento F (EPL 250 µg/mL + LAE 66.66 µg/mL). Para obtener dichas concentraciones en el queso, se diluyeron 0.99 mL de Cytoguard 20 y 375 mg de ϵ -polilisina en 20 mL de agua purificada y se agregaron con una pipeta homogéneamente sobre la cuajada QCA.

4.4.3 Determinación de la similaridad entre el queso adicionado con antimicrobianos y sin antimicrobianos.

El objetivo de la evaluación sensorial fue conocer si la adición de la mezcla de antimicrobianos modificaba las propiedades sensoriales del alimento. De esta manera entonces, se utilizó una prueba triangular de acuerdo a la ISO 4120 (2004) la cual permite identificar si existe similaridad entre dos productos, es decir una situación en la que las diferencias entre estos productos, en este caso QCA y QSA, son tan pequeñas que ellos pueden usarse indistintamente.

Previo a la evaluación se realizaron los análisis microbiológicos correspondientes para asegurar la inocuidad del alimento. El siguiente procedimiento fue aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Química de la UAQ con número de aprobación CBQ17/062.

Sesenta y cuatro evaluadores, cantidad seleccionada en base a los requerimientos mencionados en la ISO 4120 (2004), recibieron un set de tres muestras, cada muestra contenía un cubo de 1.5 cm³ de queso. Les fue informado que dos de las muestras eran iguales y una era distinta, ellos identificaron cuál de las tres era la

distinta aunque su decisión solo estuviera basada en adivinar. La Figura 11 muestra la hoja de evaluación proporcionada a los evaluadores.

<u>Prueba Triangular</u>		
No. Evaluador _____	Nombre _____	Fecha _____
Instrucciones		
Pruebe las muestras de izquierda a derecha. Dos de las muestras son iguales y una es diferente. Escriba el número de la muestra que es diferente en el espacio de abajo. Si usted no está seguro elija una al azar y escriba que así lo hizo en la parte de comentarios.		
La muestra que es diferente de las otras dos es: _____		
Comentarios:		

Gracias por su participación		

Figura 11. Hoja de evaluación para la prueba triangular (ISO 4120, 2004).

Las muestras fueron codificadas con tres números generados al azar y se presentaron a los evaluadores en seis distintas secuencias siendo A, el queso QSA y B, el producto QCA (Figura 12).

ABB	AAB	ABA
BAA	BBA	BAB

Figura 12. Secuencia de presentación de muestras a cada evaluador

Finalmente, se contó el número de respuestas correctas y la significancia fue determinada. Para determinar si las muestras evaluadas eran similares se utilizó la siguiente ecuación:

$$[1.5(x/n) - 0.5] + 1.5^{z\beta} \sqrt{(nx - x^2)/n^3}$$

donde,

x es el número de respuestas correctas; n es el número de evaluadores; $z_{\beta} = 1.28$ para $\beta = 0.10$. Fue utilizado $\beta = 0.10$, $\alpha = 0.20$ and $p_d = 20\%$.

Si el valor calculado es menor que el limite p_d seleccionado, entonces se declara que las muestras son similares con un 90% de nivel de significancia.

La prueba se realizó el día 1 y 15 del periodo de almacenamiento del queso a 4°C.

4.5 Análisis Estadístico

Todos los experimentos se realizaron de forma independiente tres veces con muestras duplicadas para cada punto de tiempo y las diluciones se sembraron por triplicado. Los experimentos se analizaron como diseños completamente aleatorizados utilizando el paquete estadístico JMP versión 7.0.1. El análisis de varianza (ANOVA) se realizó para establecer la importancia de los factores, y el análisis de medias (ANOM) se aplicó para determinar cuál de los aislados de *L. monocytogenes* del queso mostraba una susceptibilidad antimicrobiana significativamente diferente de la general. El crecimiento de la población se evaluó mediante la prueba de Tukey para determinar la importancia estadística de las diferencias medias entre los tratamientos. Los resultados se expresaron como la media \pm el error estándar.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Evaluación de la actividad antimicrobiana en caldo de cultivo

5.1.1 Sobreexpresión y purificación de PlyP100

La endolisina recombinante se sintetizó como una fusión N-terminal 6x-His que permitió la purificación mediante quelato metálico inmovilizado en cromatografía de afinidad. Las fracciones activas se analizaron mediante SDS-PAGE y se observó una banda de proteína principal de una masa molecular estimada de 46 kDa. La Figura 13 muestra la purificación de la endolisina PlyP100, en la columna 1 se observa el marcador de peso molecular estándar en kDa (Estándar SDS-PAGE de Amplio Rango, BioRad) y en las columnas 2 y 3 se encuentran dos muestras de fracción eluida de la cromatografía que contiene la endolisina PlyP100.

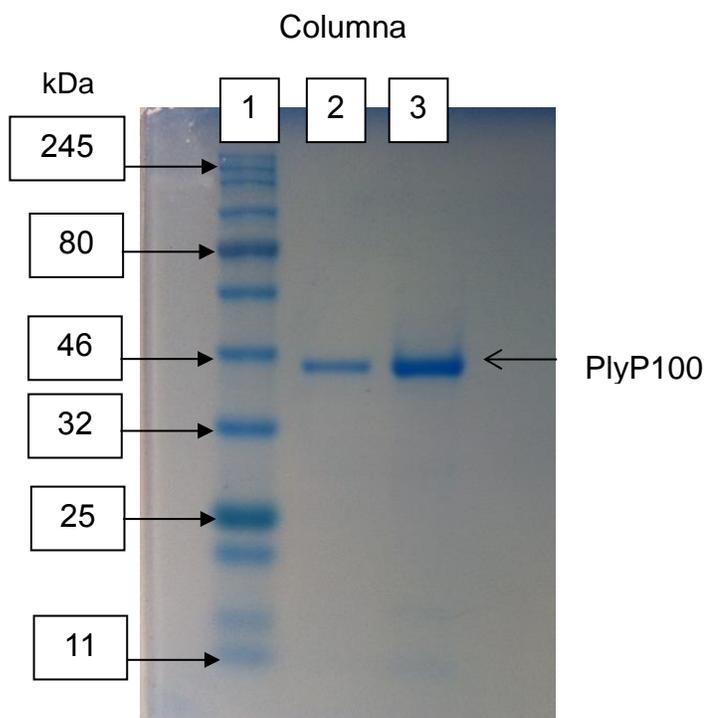


Figura 13. Purificación de la proteína recombinante PlyP100

Se ha reportado para otras endolisinas un peso molecular de 33,4 kDa a Ply500, 42 kDa a LysZ5, 48 kDa a LysB5 o incluso 55 kDa a LysH5 (Chang *et al.*, 2017; Loessner *et al.*, 1995; Obeso *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2012); sin embargo, el

peso molecular observado de la proteína purificada en este trabajo coincide con los valores previamente encontrados por Ibarra-Sánchez *et al.* (2014) para PlyP100.

La concentración se cuantificó mediante la prueba de proteína Quick Start Bradford (Bio-Rad) usando BSA como proteína estándar y el resultado fue 0.5 mg/mL. Schmelcher *et al.* (2012) encontraron valores de 2.0 mg/mL para la endolisina HPLP35, 3.3 para HPL118, 3.8 para HPL500 y 9.5 para HPL511; además, ellos observaron una relación lineal entre la concentración de la enzima y la actividad lítica en los experimentos de lisis fotométrica usando células de *Listeria* como sustrato. Sin embargo, Guo *et al.* (2017) encontraron que la actividad lítica de LysPA26, una endolisina del bacteriófago JD010 que lisa a *Pseudomonas aeruginosa*, no aumentó más cuando la concentración de LysPA26 fue más de 0.5 mg/mL, por lo que se utilizó esta concentración en sus experimentos; por otro lado, Solanki *et al.* (2013) sugieren que las concentraciones <1 mg/mL pueden evitar la agregación de la proteína en la etapa de almacenamiento.

5.1.2 Determinación de la actividad lítica de PlyP100

La cuantificación de la actividad lítica se realizó midiendo la disminución en la DO_{600} cada 30 s durante 30 min a 25 °C en un espectrofotómetro. La actividad de la endolisina se calculó usando la pendiente más pronunciada de la curva obtenida y su factor de dilución. La actividad lítica para PlyP100 purificada fue de 5.73 ± 0.65 U/mL.

Loessner *et al.* (1996) obtuvieron una actividad lítica de 13 U/mL para Ply118, endolisina que proviene del bacteriófago A511 y ataca a *L. monocytogenes*, y 59 U/mL en el extracto crudo de células antes de la purificación. Esto podría sugerir que parte de la enzima se translocó en el periplasma o formó cuerpos de inclusión. Hay cuatro razones por las cuales las proteínas recombinantes se translocan al periplasma: (1) el entorno oxidante facilita la formación de enlaces disulfuro, (2) estas proteínas representan solo el 4% de la proteína celular total (~ 100 proteínas

diferentes), (3) existe una menor degradación de ellas, y (4) que la purificación haya sido realizada mediante choque osmótico. La formación de enlaces disulfuro también puede producirse espontáneamente después de la purificación de la proteína (Schumann & Ferreira, 2004). La formación correcta de enlaces disulfuro es vital para alcanzar su conformación tridimensional biológicamente activa pero la formación de enlaces disulfuro erróneos puede conducir al plegamiento incorrecto de las proteínas y la agregación en cuerpos de inclusión (Rosano & Ceccarelli, 2014). Es posible que parte de la endolisina PlyP100 evaluada en este trabajo se translocara en el periplasma o que formara cuerpos de inclusión.

A pesar de esto, varias investigaciones han obtenido resultados utilizando 5 U/mL o incluso un valor de actividad lítica más bajo. Chang *et al.* (2017) evaluaron a la endolisina LysSA97 codificada por el bacteriófago SA97 contra una variedad de *Staphylococcus*; utilizaron una actividad lítica de 0.6 U/mL obteniendo una reducción de la bacteria de 4.5 ± 0.2 log UFC/mL, cuando se aplicó en combinación con carvacrol en caldo de cultivo.

5.1.3 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria

Los antimicrobianos NIS, LAE y EPL fueron evaluados contra *L. innocua* y *L. monocytogenes*. Los resultados obtenidos de CMI se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Concentración Mínima Inhibitoria para NIS, LAE y EPL

Bacteria	Antimicrobiano GRAS		
	NIS (µg/mL)	LAE (µg/mL)	EPL (µg/mL)
<i>L. innocua</i> ATCC 33090	12.5	12.5	125
<i>L. monocytogenes</i> NRRL B-33104	6.25	12.5	125
<i>L. monocytogenes</i> NRRL B-33513	6.25	12.5	125
<i>L. monocytogenes</i> NRRL B-33420	6.25	12.5	125
<i>L. monocytogenes</i> NRRL B-33424	3.12	12.5	62.5
<i>L. monocytogenes</i> NRRL B-33419	6.25	12.5	125

*NIS: nisina; LAE: arginato laurico; EPL: ε-polilisina

Como se observa en la Tabla 8, se obtuvieron resultados similares entre las dos especies para LAE y EPL; sin embargo, para el caso de NIS, *L. monocytogenes*

resultó ser más susceptible que *L. innocua*. El valor CMI varía dependiendo de la bacteria. Algunas investigaciones han reportado distintos valores de CMI para los antimicrobianos GRAS evaluados en este estudio, utilizando diferentes especies y cepas de bacterias obteniendo diversos resultados. Becerril *et al.* (2013) reportaron un CMI de 25 µg/mL para LAE contra *L. innocua*, *E. coli* y *S. enterica*, 100 µg/mL contra *P. aeruginosa* y 12.5 µg/mL contra *S. aureus*. En otras investigaciones han sido reportados valores para LAE de 12.5 µg/mL contra *L. monocytogenes*, valor que coincide con el encontrado en este trabajo (Brandt *et al.*, 2010; Ma *et al.*, 2013). Liu *et al.* (2015) reportaron que el valor de CMI para EPL contra *E. coli*, *S. aureus* y *B. subtilis* fue 15.63, 31.25 y 62.5 µg/mL respectivamente y el valor para NIS contra *S. aureus* y *Micrococcus luteus* fue de 250 µg/mL, mientras que para *B. subtilis* fue 125 µg/mL.

Por otro lado, los compuestos GRAS evaluados mostraron diferentes actividades antimicrobianas. Las concentraciones para NIS y LAE fueron de 12.5 µg/mL, mientras que la CMI para EPL fue de 125 µg/mL, el cual es un valor muy cercano a la concentración máxima permitida por la FDA, y además, diez veces mayor que el valor encontrado para LAE y NIS. Es posible que las bacterias Gram positivas sean más susceptibles a EPL que las Gram negativas como lo es *L. monocytogenes*. Li *et al.* (2014) investigaron las características y mecanismos antibacterianos de EPL contra *E. coli* y *S. aureus* (bacterias Gram positivas) obteniendo un valor CMI de 12.5 µg/mL y Ye *et al.* (2013) evaluaron EPL contra *E. coli* usando 5 µg/mL del compuesto. Adicionalmente, ellos sugirieron que cuando una carga positiva de EPL entra en contacto con la bacteria, el compuesto es unido a la superficie de la membrana por atracción electrostática. La acumulación de tal interacción resulta en la alteración de la membrana celular y conduce a cambios que dan como resultado fracturas en la estructura de la membrana. Sin embargo, las bacterias Gram negativas tienen una capa de membrana externa que podría dificultar el acceso de EPL a la membrana celular. Esto concuerda con los resultados reportados por Kozak *et al.* (2017) quienes evaluaron EPL contra *L. monocytogenes* en caldo de cultivo a pH de 5.5, obteniendo un valor de CMI de 100 µg/mL; y de acuerdo con los resultados obtenidos por Geornaras *et al.* (2007)

la adición de EPL al 0.02% y al 0.04% (200 y 400 µg/mL) a caldo de cultivo no tuvo efecto bactericida sobre *L. monocytogenes*.

A pesar de esto, el valor de CMI encontrado en este trabajo para EPL está dentro de los valores permitidos por la FDA, así como los encontrados para LAE y NIS; y ambas bacterias exhiben claramente una mayor susceptibilidad a LAE y a NIS que a EPL.

5.1.4 Determinación del efecto sinérgico, aditivo o antagónico entre los compuestos GRAS

En los últimos años, varias investigaciones se han enfocado en realizar mezclas entre diversos compuestos antimicrobianos con el objetivo de mejorar su efecto y preservar las propiedades sensoriales del alimento. A partir de estas mezclas pueden resultar diferentes interacciones o efectos tales como sinergismo, adición o antagonismo.

Con el fin de conocer las interacciones entre los compuestos GRAS en caldo de cultivo, se determinó una prueba de tablero utilizando *L. innocua* y *L. monocytogenes* NRRL B-33104 (aislado de queso de Jalisco). Se encontró una interacción sinérgica para LAE y NIS obteniendo un CIF_1 de 0.40 ± 0.10 contra *L. innocua* y 0.50 ± 0.14 contra *L. monocytogenes*, lo cual indica una interacción sinérgica; así mismo se encontró esta interacción para LAE y EPL obteniendo un CIF_1 de 0.44 ± 0.07 contra *L. innocua* y 0.34 ± 0.09 contra *L. monocytogenes* mientras que para NIS y EPL se obtuvo 1.33 ± 0.33 contra *L. innocua* y 0.92 ± 0.08 contra *L. monocytogenes* lo cual representa un efecto aditivo para ambas bacterias. Estos resultados se muestran en la Tabla 9.

Los resultados obtenidos en este estudio podrían deberse al mecanismo de acción de cada antimicrobiano.

Recientemente, Lin *et al.* (2018) estudiaron el mecanismo de acción de EPL contra *L. monocytogenes* y reportaron que las cargas positivas de EPL pueden

neutralizar las cargas negativas de la membrana celular en la superficie de la bacteria, dando como resultado la destrucción de esta.

Tabla 9. Interacción entre compuestos antimicrobianos GRAS en caldo de cultivo

Antimicrobiano		Bacteria			
		<i>L. innocua</i>		<i>L. monocytogenes</i> NRRL B-33104	
		CIF ₁	Efecto	CIF ₁	Efecto
LAE	NIS	0.40±0.10	Sinergismo	0.50±0.14	Sinergismo
EPL	LAE	0.44±0.07	Sinergismo	0.34±0.09	Sinergismo
NIS	EPL	1.33±0.33	Aditivo	0.92±0.08	Aditivo

^aNIS: nisina; LAE: arginato laurico; EPL: ϵ -polilisina

^bCIF₁: índice de concentración inhibitoria fraccional; CIF₁ ≤ 0.5 sinergismo, 0.5 < CIF₁ ≤ 4.0 adición, CIF₁ > 4.0 antagonismo.

^cLos valores representan la media ± Error estándar

Además, se produce una pérdida de materiales intracelulares, enzimas y proteínas solubles; finalmente, EPL posee actividad de inhibición en el metabolismo de respiración de *L. monocytogenes*, lo cual se refleja directamente en la producción de energía. También Hyldgaard *et al.* (2014) plantearon que EPL desestabiliza las membranas al interactuar con grupos fosfolípidos cargados negativamente lo cual desplaza los cationes divalentes y obligan a la formación de vesículas o micelas. A pesar de esto, EPL es un compuesto muy similar a NIS. Ambos compuestos se producen por la fermentación de bacterias como *L. lactis* en el caso de NIS, y *S. albulus* para EPL; además, ambos están formados por aminoácidos. El mecanismo de acción de NIS ha sido reportado como la unión de este péptido a los lípidos aniónicos insertándose luego entre los grupos fosfolípidos de la membrana. La acumulación de NIS en la monocapa lipídica externa de la membrana impulsa a la agregación de monómeros de NIS, seguida por la formación de poros en la estructura (Breukink & de Kruijff, 2006). Es posible que EPL al ser un compuesto de la misma naturaleza que NIS, actúe de manera similar evitando la posible sinergia, mientras que LAE por su parte, actúa como un surfactante permitiendo la combinación de diferentes mecanismos de acción al mezclarse con EPL y NIS.

Esto coincide con los resultados encontrados por Najjar *et al.* (2007) quienes reportaron un valor de CIF_1 de 0.83 para NIS y EPL contra *L. monocytogenes* lo cual representa un efecto aditivo. Además, Liu *et al.* (2015) reportaron un CIF_1 de 0.50 contra *B. cereus*, este valor de acuerdo con los cálculos indica sinergia, sin embargo, está en el límite.

En este sentido, con respecto a los resultados obtenidos para la combinación entre NIS y LAE, es importante observar que aunque se obtuvo una interacción sinérgica, el valor de CIF_1 para *L. monocytogenes* está en el límite (0.5) y el resultado podría ser más bien un efecto aditivo y finalmente no tener el comportamiento sinérgico en la matriz alimentaria. Esta sugerencia coincide con los resultados encontrados por Brandt *et al.* (2010) quienes evaluaron la combinación de LAE y NIS en 4 cepas de *L. monocytogenes* obteniendo valores de CIF_1 de 0.63 a 1.0, lo que indica un efecto aditivo. Contrario a esto, el valor de CIF_1 para la combinación de EPL y LAE contra *L. monocytogenes* se encuentra en el rango de sinergia con un resultado de 0.34, esto coincide con Kozak *et al.* (2017) que observaron sinergismo y un fuerte efecto inhibitorio y bactericida para la combinación de EPL y LAE en caldo a pH 7.4 contra la misma bacteria mencionada.

La prueba de tablero se realiza en caldo de cultivo, sin embargo es una opción para estimar la interacción y seleccionar las combinaciones a evaluar en el alimento, en este caso el queso; así que en base a los resultados encontrados en esta prueba, se seleccionaron los tratamientos a evaluar en el siguiente paso de esta investigación, de esta manera, la combinación EPL - NIS fue descartada.

5.2 Evaluación de la actividad antimicrobiana en queso mediante el modelo MLQF.

5.2.1 Evaluación de PlyP100, NIS, EPL y LAE solos y en combinaciones binarias en MLQF

Los tratamientos a evaluar en el modelo MLQF se seleccionaron de acuerdo a los resultados obtenidos en la sección 5.1.4. El tratamiento con PlyP100 fue el más

efectivo inhibiendo el crecimiento de la bacteria en 3.50 ± 0.38 log, EPL provocó una inhibición de 1.60 ± 0.67 log, LAE de 1.24 ± 0.06 log y NIS de 0.38 ± 0.44 log en comparación con el control, el cual alcanzó 9.20 ± 0.23 log UFC/g. Así mismo, las mezclas de EPL y LAE con la endolisina inhibieron el crecimiento en 3.60 ± 0.21 log y 3.74 ± 0.31 log UFC/g respectivamente, sin embargo no existe una diferencia significativa entre los tratamientos en combinación y la aplicación de la endolisina por sí sola. Las mezclas binarias de NIS y LAE obtuvieron el mismo resultado que al utilizar NIS y LAE por sí solos y únicamente la mezcla entre EPL y LAE, la cual provocó una inhibición de 3.51 ± 0.35 log UFC/g, mostró un comportamiento sinérgico al ser evaluado en el modelo MLQF, ya que los compuestos por separado obtuvieron 1.25 ± 0.09 log para LAE y 1.66 ± 0.67 log UFC/g para EPL. La inhibición en el crecimiento de *L. monocytogenes* para cada tratamiento en el modelo MLQF al final del periodo de almacenamiento a 4°C se muestra en la Figura 14.

Actualmente la investigación concerniente a la endolisina PlyP100 apenas se está generando, no existen mucha información acerca de ella, sin embargo, es de gran interés para la aplicación en alimentos ya que proviene del fago P100 el cual ya ha sido aprobado por la FDA y es comercializado tanto en Europa como en USA, además, PlyP100 es una opción contra *Listeria* en queso de acuerdo a los resultados encontrados recientemente por Ibarra-Sánchez *et al.* (2018) los cuales coinciden con los encontrados en el presente estudio referentes a NIS y PlyP100. Los resultados para NIS difieren con los encontrados por Lourenço *et al.* (2017) quienes reportaron una reducción de *Listeria* de 3 log UFC/g con respecto al Control a los 21 días de almacenamiento, sin embargo ellos utilizaron una concentración mucho más alta de nisina (500 µg/mL).

Por otro lado, es importante puntualizar que a pesar de que *Listeria* mostró ser más susceptible a LAE y a NIS que a EPL en caldo de cultivo (sección 5.1.3), al ser evaluados en MLQF se obtuvieron distintos resultados.

Nisina alcanzó la misma población de *Listeria* que el Control al final del almacenamiento; LAE y EPL obtuvieron una pequeña inhibición en comparación

con el control, sin embargo, son significativamente iguales entre ellos mientras que en caldo de cultivo resultaron muy diferentes.

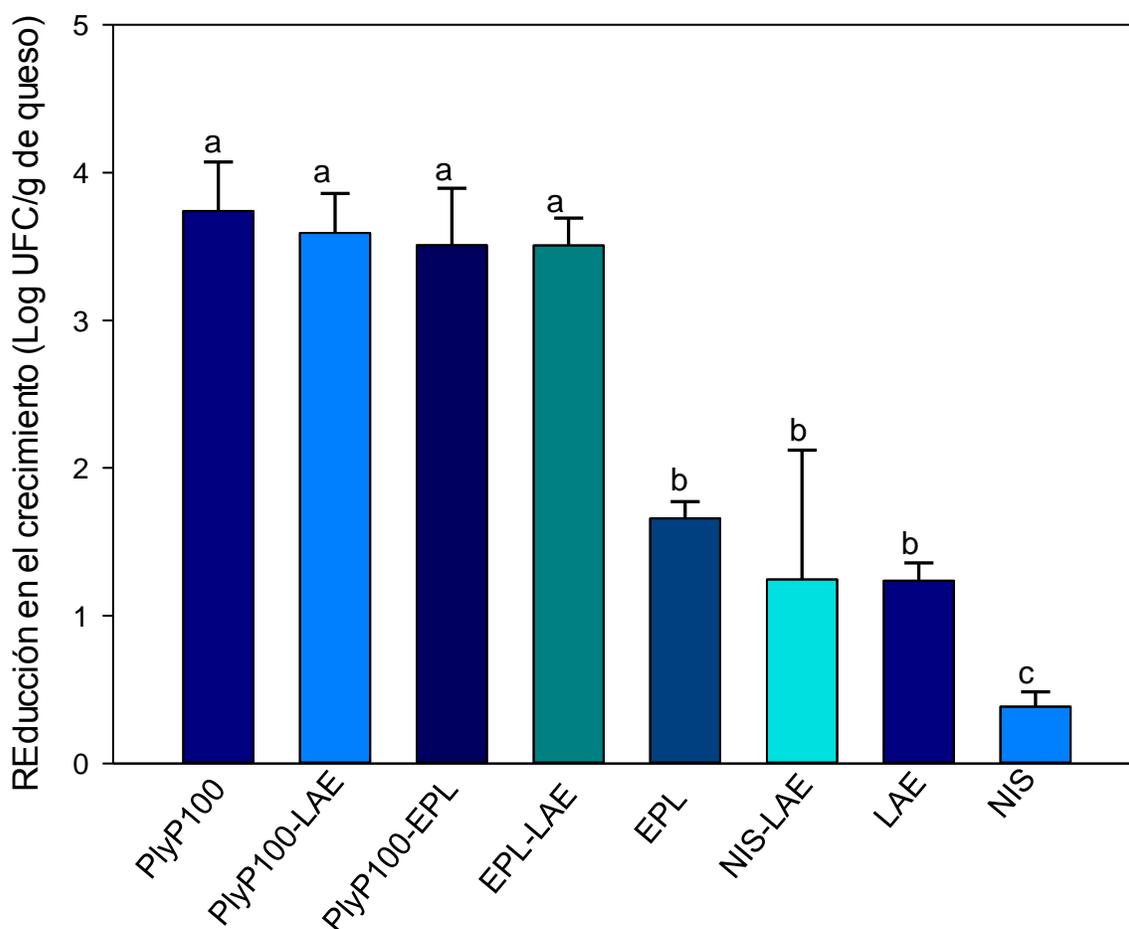


Figura 14. Inhibición en el crecimiento de *L. monocytogenes* en queso a los 28 días de almacenamiento a 4°C. Tratamiento Control: ningún antimicrobiano; NIS: nisina (200 µg/mL); LAE: arginato láurico (200 µg/mL); NIS-LAE: nisina (200 µg/mL) + arginato láurico (200 µg/mL); EPL: ε-polilisina (250 µg/mL); EPL-LAE: ε-polilisina (250 µg/mL) + arginato láurico (200 µg/mL); PlyP100: endolisina PlyP100 (2.5 U/mL); PlyP100-LAE: endolisina PlyP100 (2.5 U/mL) + arginato láurico (200 µg/mL); PlyP100-EPL: endolisina PlyP100 (2.5 U/mL) + ε-polilisina (250 µg/mL). Los valores indican la media ± el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas utilizando la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$).

Esto sugiere que ocurrieron interacciones entre los compuestos antimicrobianos y el queso al ser evaluados en el modelo MLQF. De acuerdo con Kawamura & Whitehouse (2008) LAE puede sufrir hidrólisis en presencia de nitritos o proteínas, el queso es un alimento que contiene al menos 18.25% de proteína; por tal razón,

es posible que LAE no mostrara actividad antimicrobiana significativa mientras que en caldo de cultivo si lo hizo. Teniendo en cuenta la influencia del contenido de grasa, la prueba de MIC realizada en caldo de cultivo el cual no contiene grasa, mostró una gran susceptibilidad por parte de *Listeria* a LAE, mientras que en el queso que contiene 22.45% de grasa, se obtuvieron diferentes resultados. Esto coincide con Sharma *et al.* (2013) quienes obtuvieron una mayor actividad de LAE para filete de pechuga de pollo, que para pollo molido que contiene un mayor contenido de grasa. Muchos autores han destacado que LAE posee una actividad mucho menor cuando se usa en productos alimenticios reales en comparación con estudios *in vitro* (Nerin *et al.*, 2016a).

Por otro lado, EPL ha demostrado ser susceptible y degradado por enzimas proteasas y peptidasas de diferentes bacterias comercialmente disponibles (Nampoothiri *et al.*, 2014) y Kito *et al.* (2002) sugieren que hay microorganismos tolerantes a EPL y que tienen algún tipo de proteasa que hidroliza el EPL. En la evaluación en queso, no solo se encontraba *L. monocytogenes*, sino también aquellas bacterias que son propias del alimento, bacterias ácido lácticas; este tipo de bacterias poseen enzimas proteasas y peptidasas que posiblemente degradaron a EPL evitando así una mayor actividad contra *Listeria* (Teusink & Molenaar, 2017).

Adicionalmente, en la Figura 15 se muestra el crecimiento de la bacteria evaluada en el modelo MLQF a lo largo de los 28 días de almacenamiento. Se observó que NIS provocó un comportamiento muy similar al Control mientras que con LAE, la bacteria siguió un crecimiento idéntico al control pero solo hasta los 14 días del periodo de almacenamiento, después de este tiempo el compuesto provocó un efecto bacteriostático al mantenerse la misma cantidad en Log hasta el día 28 (Figura 15a). Por su parte EPL mostró una tendencia hacia un efecto bacteriostático durante los primeros 14 días, sin embargo en los siguientes días el compuesto parece haber perdido estabilidad al permitir el recrecimiento de la bacteria. La endolisina retardó el crecimiento pareciendo tener un efecto bacteriostático durante los 28 días de almacenamiento.

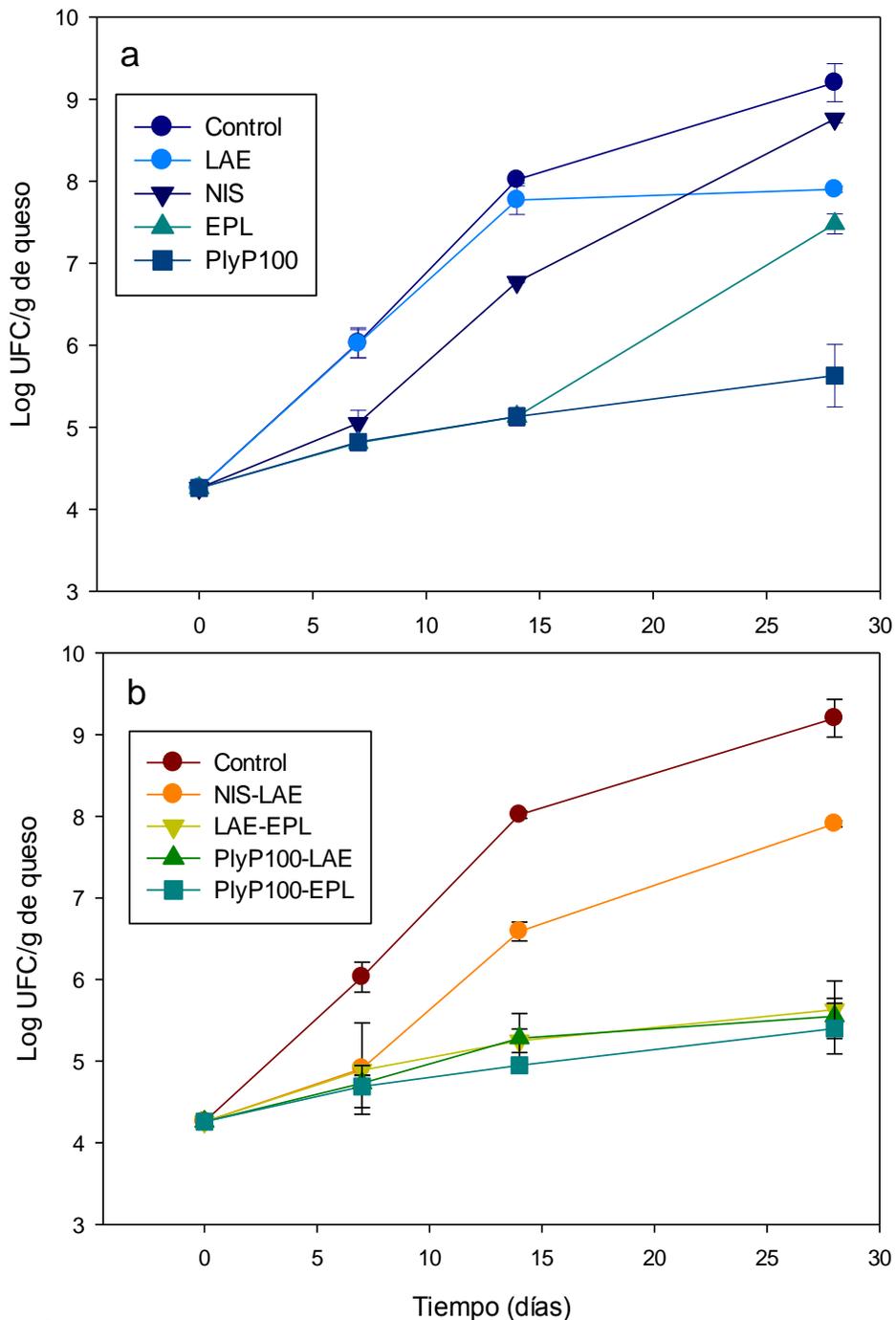


Figura 15. Comportamiento del crecimiento de *L. monocytogenes* en el modelo MLQF durante el periodo de almacenamiento a 4°C. a: Antimicrobianos evaluados solos; b: antimicrobianos evaluados en combinaciones dobles. Control: ningún antimicrobiano; PlyP100: endolisina PlyP100 (2.5 U/mL); NIS: nisina (200 µg/mL); LAE: arginato laurico (200 µg/mL); EPL: ε-polilisina (250 µg/mL); NIS – LAE: nisina (200 µg/mL) + arginato laurico (200 µg/mL); LAE – EPL: arginato laurico (200 µg/mL) + ε-polilisina (250 µg/mL); PlyP100 – LAE: endolisina PlyP100 (2.5 U/mL) + arginato laurico (200 µg/mL); PlyP100 – EPL: endolisina PlyP100 (2.5 U/mL) + ε-polilisina (250 µg/mL). Los valores representan la media ± error estándar.

Con respecto a los tratamientos con mezclas (Figura 15b), la mezcla entre NIS – LAE no mostró ninguna diferencia en comparación con los compuestos evaluados por separado ni con el Control al haber alcanzado casi 9 log UFC/g. Las mezclas que contenían a la endolisina obtuvieron resultados y un comportamiento similar a la de LAE – EPL; estos tratamientos obtuvieron los mejores resultados alcanzando una cuenta final de alrededor de 5 Log UFC/g. A pesar de esto, las mezclas con PlyP100 no mostraron diferencias significativas al ser comparadas con la aplicación de la endolisina por sí sola. De esta manera, la única mezcla significativamente diferente en comparación con sus compuestos evaluados por separado fue LAE – EPL, mezcla que muestra un efecto sinérgico.

Este resultado es consistente con lo anteriormente mencionado. Es posible que bacterias propias del queso degradaran a EPL y por esta razón, después de 14 días de almacenamiento, el compuesto perdió su actividad contra *Listeria*; y que además, el LAE empezó su actividad bacteriostática a este tiempo complementando así a EPL y resultando en una mezcla con efecto sinérgico. La Figura 15a muestra el comportamiento de estos compuestos por separado y la Figura 15b muestra la complementación de ellos en la mezcla.

El sinergismo no fue resultado del tamaño del inóculo reducido por EPL a los 14 días de almacenamiento, dado que el tratamiento solo con LAE también comenzó su actividad bacteriostática a este tiempo, es decir con un mayor tamaño de inóculo; esto coincide con lo reportado por Becerril *et al.* (2013) quienes evaluaron la actividad antimicrobiana de LAE sobre *S. aureus*, *L. innocua*, *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. enterica* reportando que la actividad del compuesto no fue afectada por el tamaño del inóculo. El resultado se debe a las interacciones de EPL y LAE con los componentes del alimento y al efecto bacteriostático que produjeron. Otras investigaciones se han enfocado en el estudio de la combinación de efectos bacteriostático y bactericida para el control de *L. monocytogenes* y de otras bacterias (Ibarra-Sánchez *et al.*, 2018; Kang *et al.*, 2014; Sharma *et al.*, 2013; Soni *et al.*, 2012; Takahashi *et al.*, 2015).

Finalmente, resulta interesante observar que los resultados encontrados en MLQF coinciden con los experimentos realizados en caldo de cultivo mediante la prueba de tablero, en la cual, si bien la mezcla entre NIS – LAE mostró tener efecto sinérgico según los cálculos de CIF_I , el valor se encuentra en el límite (0.5) sugiriendo que podría no haber sinergismo, y sólo la mezcla LAE – EPL mostró un resultado claro en tal interacción de forma que esto quedó reflejado cuando fue evaluada en el queso.

5.2.2 Evaluación de EPL y LAE en combinaciones binarias a menores concentraciones.

En base a los resultados obtenidos en la sección anterior, se evaluaron combinaciones binarias entre LAE y EPL utilizando concentraciones más bajas a las máximas permitidas por la FDA con el fin de determinar si el efecto sinérgico se mantenía. Las concentraciones evaluadas se muestran en la Tabla 7.

Como resultado a este experimento se obtuvieron valores consistentes con los encontrados en la Sección 5.2.1. El LAE provocó una inhibición de 0.58 ± 0.06 log, EPL de 2.37 ± 0.04 log y la mezcla entre EPL y LAE a sus máximas concentraciones mostró una inhibición de 3.35 ± 0.02 log UFC/g con respecto al Control, el cual mostró una cuenta total de 9.35 ± 0.16 log UFC/g al final del almacenamiento.

Adicionalmente, en los tratamientos en los que se disminuyó la concentración de EPL, se perdió el efecto sinérgico al obtener una inhibición de 2.52 ± 0.19 log y 1.80 ± 0.05 log UFC/g. Sin embargo, los tratamientos en los que se disminuyó la concentración de LAE, obtuvieron valores de 3.30 ± 0.13 log y 3.35 ± 0.10 log de UFC/g; estos valores son significativamente similares a los obtenidos en el tratamiento con las máximas concentraciones de ambos compuestos. La inhibición en el crecimiento de *L. monocytogenes* al final del almacenamiento para cada tratamiento se muestra en la Figura 16.

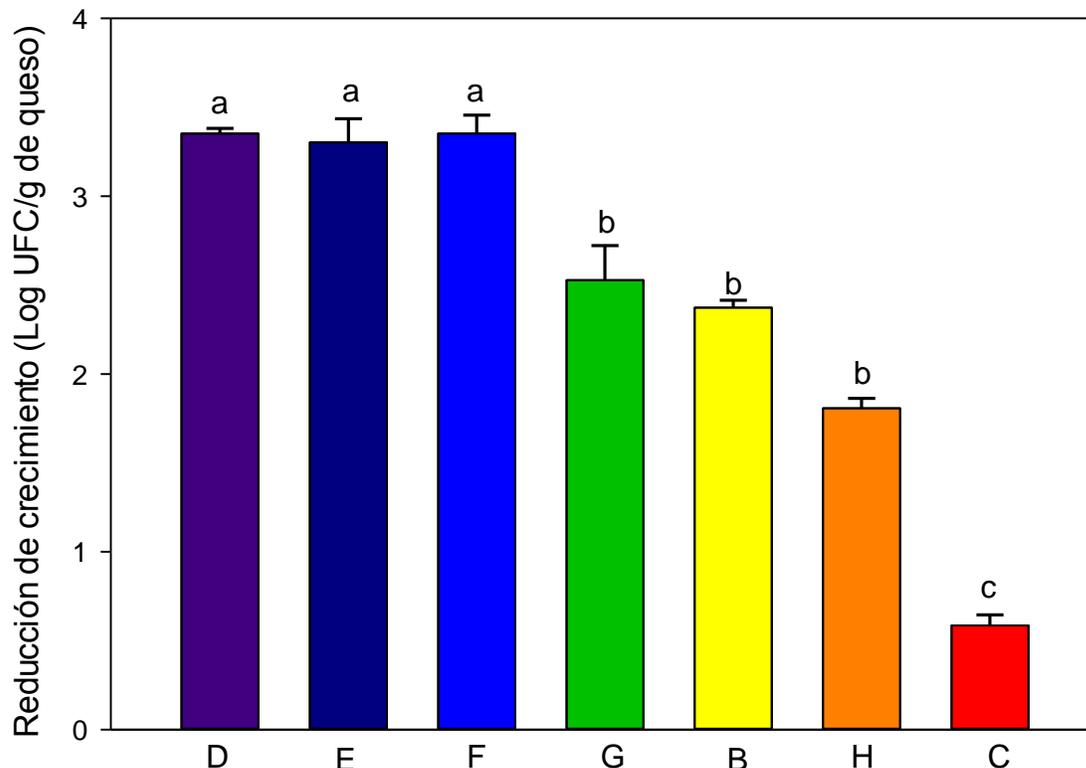


Figura 16. Inhibición en el crecimiento de *L. monocytogenes* a los 28 días de almacenamiento a 4°C utilizando mezclas entre EPL y LAE. B: EPL (250 µg/mL); C: LAE (200 µg/mL); D: EPL (250 µg/mL) + LAE (200 µg/mL); E: EPL (250 µg/mL) + LAE (133.33 µg/mL); F: EPL (250 µg/mL) + LAE (66.66 µg/mL); G: EPL (166.66 µg/mL) + LAE (200 µg/mL); H: EPL (83.33 µg/mL) + LAE (200 µg/mL). Los valores representan la media ± error estandar.

^{a,b,c} Letras diferentes indican valores significativamente diferentes ($\alpha = 0.05$)

Estos resultados confirman que mientras EPL actúa al inicio del periodo de almacenamiento, LAE tiende a mostrar un efecto bacteriostático pero al final del periodo. De esta manera, al reducir las concentraciones de EPL hubo un mayor crecimiento de *Listeria* desde el inicio. Posteriormente a los 14 días LAE mostró su actividad, sin embargo, la cuenta era mayor que en el tratamiento donde se utilizó la máxima concentración de EPL y esto finalmente quedó reflejado en una menor inhibición a los 28 días de almacenamiento.

En adicción, estos resultados sugieren que *L. monocytogenes* es muy susceptible a LAE al mostrarse la misma tendencia bacteriostática cuando las concentraciones fueron reducidas; esto coincide con lo reportado por Nair *et al.* (2014) quienes encontraron que no existe diferencia significativa entre tratamientos con 200 y 400

mg/kg de LAE contra *C. jejuni* en filetes de pollo. Contrario a lo que sucedió con EPL, que solo utilizando la máxima concentración permitida, mantuvo su actividad en el queso al inicio del periodo de almacenamiento. Esto coincide con el resultado de CMI mostrado en la Tabla 8 de la Sección 5.3.1, dónde los compuestos fueron evaluados en caldo de cultivo.

Por lo anterior, el mejor tratamiento fue el de la mezcla de 250 µg/mL de EPL y 66.66 µg/mL de LAE, tratamiento que fue seleccionado para ser evaluado en una prueba sensorial.

5.2.3 Susceptibilidad de *L. monocytogenes* a NIS, LAE y EPL

La susceptibilidad de los aislados de *L. monocytogenes* de los tratamientos evaluados en el modelo MLQF, se evaluó mediante la determinación de la CMI de los compuestos GRAS al final del almacenamiento. Después de la exposición antimicrobiana en QF durante 28 días a temperaturas de refrigeración, las bacterias aisladas de muestras de QF tratadas con NIS (200 µg/mL), LAE (200 µg/mL) y EPL (250 µg/mL), solos y en combinaciones binarias, mostraron una susceptibilidad similar en comparación con los rangos de susceptibilidad antes encontrados (NIS: 3.12 a 12.5 µg/mL; LAE: 12.5 µg/mL; EPL: 62.5 a 125 µg/mL) y con los de los aislados del queso no tratado como control de referencia. Estos resultados se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. Susceptibilidad de aislados^a de *L. monocytogenes* a los compuestos GRAS a los 28 días de almacenamiento

Tratamiento	NIS (µg/mL)^b	LAE (µg/mL)^b	EPL (µg/mL)^b
Control	3.12 - 12.5	12.5	125
LAE	-	12.5	-
EPL	-	-	125 - 250
PlyP100-LAE	-	12.5	-
Ply100-EPL	-	-	125 - 250
NIS-LAE	6.25 - 12.5	12.5	-
LAE-EPL	-	12.5	125 - 250

^aTres aislados aleatorios de *L. monocytogenes* por tratamiento, por experimento independiente (n = 63).

^bNo se encontraron diferencias significativas con la susceptibilidad antimicrobiana general en la población ($\alpha = 0.05$).

Actualmente, diversos estudios han proporcionado evidencia y resaltado la importancia de la resistencia bacteriana a distintos antimicrobianos (Fister *et al.*, 2016; Labrie *et al.*, 2010; Maria-Neto *et al.*, 2015; Takahashi *et al.*, 2015). Los mecanismos de resistencia exhibidos por patógenos transmitidos por los alimentos, les permiten adaptarse y evolucionar con las condiciones ambientales cambiantes (Nair *et al.*, 2014). De aquí la importancia de este experimento en la presente investigación.

Los resultados encontrados refuerzan lo propuesto acerca de su comportamiento en el modelo MLQF, es decir, en el queso. De esta manera, el hecho de que el EPL haya perdido estabilidad entonces, no se debió a que *L. monocytogenes* generara después de un tiempo de exposición, resistencia al compuesto. Eso coincide con lo sugerido por Shukla *et al.* (2012), microorganismos tales como las bacterias u hongos, difícilmente desarrollan resistencia a EPL.

Por el contrario, aunque los péptidos antimicrobianos son capaces de controlar infecciones bacterianas al interferir con el metabolismo microbiano y procesos fisiológicos de diversas maneras, también se ha reportado un gran número de casos de resistencia a los péptidos, como lo es NIS (Maria-Neto *et al.*, 2015). Los mecanismos de adquisición de resistencia a NIS son complicados y pueden diferir entre las cepas. Debido a la importancia del lípido II para la actividad antimicrobiana de NIS, disminuir la cantidad de este, sería un mecanismo simple para la generación de resistencia por parte de la bacteria, ya que el Lípido II, es un precursor esencial de la pared celular (Zhou *et al.*, 2013). A pesar de esto, en el presente estudio no se encontró una menor susceptibilidad al compuesto por parte de *L. monocytogenes*, después de haber sido expuesta al mismo.

De igual manera, no se encontró el desarrollo de resistencia por parte de *L. monocytogenes* a LAE y no ha sido reportado por otras investigaciones que exista tal efecto.

5.3 Evaluación sensorial de queso panela adicionado con los compuestos antimicrobianos.

Se produjo queso panela con un 15.87% de rendimiento y los siguientes parámetros fisicoquímicos (Tabla 11):

Tabla 11. Parámetros fisicoquímicos del queso producido a escala tradicional

	Parámetro			
	Grasa	Proteína	Humedad	pH
QSA	19.50 ± 2.12	20.38 ± 1.30	53.58 ± 0.98	6.48±0.04
QCA	19.00 ± 1.41	20.54 ± 0.99	51.18 ± 1.16	6.45±0.03

^aQSA: Queso sin antimicrobianos; QCA: Queso con antimicrobianos.

^bLos valores representan la media ± desviación estándar

En el día 1 del periodo de almacenamiento del queso, un total de 27 de los 64 evaluadores identificaron correctamente la muestra que era diferente en la prueba. Refiriéndose a la Tabla A.2 en la norma BS ISO 4120, se utilizó la ecuación de la Nota 1 para determinar si se concluye que las dos muestras eran similares. Debido a que se quería evitar concluir que no hay diferencias cuando si las hay, se eligió $\beta = 0.1$, que es un 90% de nivel de confianza. De los cálculos con la ecuación mencionada, 27 evaluadores representaron que un 25% pudo distinguir las dos diferentes muestras; el límite fue previamente establecido en 20%, por lo que el resultado fue que el queso con EPL – LAE en el día 1 del almacenamiento, es diferente al queso sin esta mezcla.

Después de 15 días de almacenamiento en refrigeración, se realizó la segunda prueba triangular. Un total de 33 de los 64 evaluadores identificaron correctamente la muestra que era diferente, de tal forma que utilizando la ecuación, el 39% logró distinguir las dos diferentes muestras. Con un nivel de confianza del 90%, el resultado es que el queso con EPL – LAE a los 15 días de almacenamiento, es diferente al queso sin la mezcla de antimicrobianos.

A pesar de estos resultados, se obtuvieron diferentes comentarios en cada una de las dos evaluaciones realizadas. Los participantes comentaron haber encontrado una diferencia en la textura y el nivel de sal en el día 1, el QCA era más seco y salado; mientras que encontraron diferencias en el sabor en el día 15, QCA tenía un mal sabor.

Anteriormente se ha reportado que EPL produce un sabor amargo en los alimentos. Hyldgaard *et al.* (2014) encontraron que aunque EPL es biodegradable, no provoca citotoxicidad y es seguro para el consumo humano, la adición de grandes cantidades del compuesto a productos alimenticios produce un sabor amargo. El sabor amargo de EPL, es producido por su larga cadena de lisina por lo que el control de la longitud de esta, es importante para mejorar el sabor de EPL para su consumo en alimentos (Nishikawa & Ogawa, 2006). Del mismo modo, ha sido sugerido que una concentración alta de LAE puede conducir a un sabor amargo por lo que, se necesitan estrategias para disminuir el nivel de este compuesto en los productos alimenticios (Ma *et al.*, 2016). Esta información coincide con los resultados encontrados en el presente estudio para la evaluación a los 15 días de la vida de anaquel del queso, los evaluadores comentaron que identificaron un sabor amargo en QCA.

A pesar de esto, aunque los evaluadores identificaron la diferencia entre las muestras el día 1, esta selección no estuvo relacionada con el sabor, sino con la textura y la cantidad de sal. Por lo tanto, es posible que estos resultados puedan atribuirse a la forma en que se agregó la mezcla de antimicrobianos durante el proceso de producción de queso y no al sabor que los compuestos pudieran producir. La mezcla se agregó antes de la etapa de moldeo del queso en los canastos lo que provocó que perdiera más humedad que el QSA, el cual, se colocó rápidamente en los canastos.

Los resultados encontrados en esta prueba sensorial sugieren que si bien al inicio de la vida de anaquel del producto la mezcla EPL – LAE no fue identificada, al día 14 había generado un sabor amargo que finalmente pudo ser identificado por los evaluadores; y además, es necesario explorar la manera óptima de adicionar este tipo de compuestos al queso en una producción a escala tradicional.

VI. CONCLUSIONES

Listeria monocytogenes es una bacteria de gran importancia en la industria alimentaria dada su incidencia, alta tasa de letalidad y además la poca susceptibilidad a compuestos antimicrobianos así como también su habilidad de desarrollar resistencia a estos. A pesar de haber utilizado 4 diferentes compuestos y mezclas entre ellos contra esta bacteria, únicamente la mezcla de dos de tales compuestos logró solamente inhibir su crecimiento. Por tales razones, es necesario continuar con investigación acerca de este patógeno así como de estrategias para inhibir y eliminar totalmente la bacteria del alimento.

A pesar de que *Listeria* resultó ser más susceptible a NIS y a LAE, estos compuestos tienen importantes interacciones con el queso que evitaron su eficacia en este alimento; EPL por su parte, mostró menor actividad antimicrobiana sobre la bacteria, sin embargo, obtuvo mejores resultados que NIS y LAE al ser evaluado en queso.

También es importante puntualizar, que los resultados encontrados en MLQF coincidieron con los experimentos realizados en caldo de cultivo mediante la prueba de tablero, en la cual, si bien la mezcla entre NIS – LAE mostró tener efecto sinérgico según los cálculos de CIF_1 , el valor se encontraba en el límite (0.5) sugiriendo que podría no haber sinergismo, solo la mezcla LAE – EPL mostró un resultado confiable en tal interacción, de manera que esto quedó reflejado en los experimentos en queso. La prueba de tablero se realiza en caldo de cultivo, sin embargo es una opción para estimar las interacciones que un par de compuestos puede tener y así, seleccionar las combinaciones a evaluar en el alimento.

De acuerdo a los resultados de la evaluación sensorial, la mezcla entre EPL – LAE puede ser utilizada sin generar sabores extraños durante los primeros días de su vida de anaquel, no obstante, es necesario profundizar en los métodos de aplicación del compuesto en una producción de queso a gran escala.

Esta investigación se proporciona un alternativa para inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes* en queso, a partir de una mezcla de los compuestos naturales

antimicrobianos, EPL – LAE, los cuales mostraron tener una interacción sinérgica aun cuando fue disminuida la concentración de LAE. Estos compuestos además son GRAS y se encuentran regulados tanto en México como en Estados Unidos por lo que son una opción para disminuir la incidencia de este patógeno en queso.

VII. REFERENCIAS

- Asker, D., Weiss, J., & McClements, D. J. (2009). Analysis of the Interactions of a Cationic Surfactant (Lauric Arginate) with an Anionic Biopolymer (Pectin): Isothermal Titration Calorimetry, Light Scattering, and Microelectrophoresis. *Langmuir*, 25(1), 116–122. <https://doi.org/10.1021/la803038w>
- Becerril, R., Manso, S., Nerin, C., & Gómez-Lus, R. (2013). Antimicrobial activity of Lauroyl Arginate Ethyl (LAE), against selected food-borne bacteria. *Food Control*, 32(2), 404–408. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.01.003>
- Bhattacharya, S., Dineshkumar, R., Dhanarajan, G., Sen, R., & Mishra, S. (2017). Improvement of ϵ -polylysine production by marine bacterium *Bacillus licheniformis* using artificial neural network modeling and particle swarm optimization technique. *Biochemical Engineering Journal*, 126, 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2017.06.020>
- Brandt, A. L., Castillo, A., Harris, K. B., Keeton, J. T., Hardin, M. D., & Taylor, T. M. (2010). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by food antimicrobials applied singly and in combination. *Journal of Food Science*, 75(9), M557-63. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01843.x>
- Breukink, E., & de Kruijff, B. (2006). Lipid II as a target for antibiotics. *Nature Reviews Drug Discovery*, 5(4), 321–323. <https://doi.org/10.1038/nrd2004>
- Buchanan, R. L., Gorris, L. G. M., Hayman, M. M., Jackson, T. C., & Whiting, R. C. (2017). A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. *Food Control*, 75, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.12.016>
- C. Ramírez-López, J. F. V.-R., & . (2012). Quesos frescos: propiedades, métodos de determinación y factores que afectan su calidad. *Temas Selectos De Ingeniería De Alimentos*, 2, 131–148. Retrieved from <http://web.udlap.mx/tsia/files/2013/12/TSIA-62Ramirez-Lopez-et-al-2012.pdf>

- Calderón-Oliver, M., Escalona-Buendía, H. B., Medina-Campos, O. N., Pedraza-Chaverri, J., Pedroza-Islas, R., & Ponce-Alquicira, E. (2016). Optimization of the antioxidant and antimicrobial response of the combined effect of nisin and avocado byproducts. *LWT - Food Science and Technology*, *65*, 46–52.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.07.048>
- Carlton, R. M., Noordman, W. H., Biswas, B., De Meester, E. D., & Loessner, M. J. (2005). Bacteriophage P100 for control of *Listeria monocytogenes* in foods: Genome sequence, bioinformatic analyses, oral toxicity study, and application. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, *43*(3), 301–312.
<https://doi.org/10.1016/j.yrtph>
- Castañeda-Ruelas, G., Eslava-Campos, C., Campo, N. C. del, León-Félix, J., & Chaidez-Quiroz, C. (2014). Listeriosis en México: Importancia clínica y epidemiológica. *Salud Publica de Mexico*, *56*(6), 654–659.
- Castillo, J. A., Pinazo, A., Carilla, J., Infante, M. R., Alsina, M. A., Haro, I., & Clapés, P. (2004). Interaction of Antimicrobial Arginine-Based Cationic Surfactants with Liposomes and Lipid Monolayers. *Langmuir*, *20*(8), 3379–3387. <https://doi.org/10.1021/la036452h>
- Chang, Y., Yoon, H., Kang, D.-H., Chang, P.-S., & Ryu, S. (2017). Endolysin LysSA97 is synergistic with carvacrol in controlling *Staphylococcus aureus* in foods. *International Journal of Food Microbiology*, *244*, 19–26.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.12.007>
- Cooper, I. R. (2016). A review of current methods using bacteriophages in live animals, food and animal products intended for human consumption. *Journal of Microbiological Methods*, *130*(4), 38–47.
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.07.027>
- Delves-Broughton, J., & Weber, G. (2011). Nisin, natamycin and other commercial fermentates used in food biopreservation. In *Protective Cultures, Antimicrobial Metabolites and Bacteriophages for Food and Beverage Biopreservation* (pp.

63–99). Elsevier. <https://doi.org/10.1533/9780857090522.1.63>

Dykes, G. A., & Moorhead, S. M. (2002). Combined antimicrobial effect of nisin and a listeriophage against *Listeria monocytogenes* in broth but not in buffer or on raw beef. *International Journal of Food Microbiology*, 73(1), 71–81. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11883676>

EFSA. (2007). Opinion of the Scientific Panel on Food Additives , Flavourings , Processing Aids and Materials in Contact with Food on a request from the Commission related to an application on the use of ethyl lauroyl arginate as a food additive. *EFSA*, 511, 1–27.

Everett, D. W., & Auty, M. A. E. (2017). *Cheese microstructure. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology* (Fourth Edi). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4/00021-1>

FDA. (2005). *I. GRAS Exemption claim for ethyl-N-lauroyl-L-arginate hydrochloride.*

Fischetti, V. A. (2010). Bacteriophage endolysins: A novel anti-infective to control Gram-positive pathogens. *International Journal of Medical Microbiology*, 300(6), 357–362. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2010.04.002>

Fister, S., Robben, C., Witte, A. K., Schoder, D., Wagner, M., & Rossmanith, P. (2016). Influence of Environmental Factors on Phage–Bacteria Interaction and on the Efficacy and Infectivity of Phage P100. *Frontiers in Microbiology*, 7(July), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01152>

Fox, P. F., Ottogalli, G., & P.F.Fox. (2004). Diversity and Variety of Cheese: An Overview. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology (Volume 2)* (Fourth Edi, Vol. 2, pp. 781–808). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4/00031-4>

Fox P.F., Guinee T.P., Cogan T.M., M. P. L. H. (2017). Cheese : Historical Aspects. In *Fundamentals of Cheese Science* (pp. 1–10). Boston, MA:

Springer.

- Gadotti, C., Nelson, L., & Diez-Gonzalez, F. (2014). Inhibitory effect of combinations of caprylic acid and nisin on *Listeria monocytogenes* in queso fresco. *Food Microbiology*, 39, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.10.007>
- García, P., Rodríguez, L., Rodríguez, A., & Martínez, B. (2010). Food biopreservation: promising strategies using bacteriocins, bacteriophages and endolysins. *Trends in Food Science & Technology*, 21(8), 373–382. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.04.010>
- Geornaras, I., Yoon, Y., Belk, K. E., Smith, G. C., & Sofos, J. N. (2007). Antimicrobial Activity of ϵ -Polylysine against *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, and *Listeria monocytogenes* in Various Food Extracts. *Journal of Food Science*, 72(8), M330–M334. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00510.x>
- Gould, L. H., Mungai, E., & Barton Behravesh, C. (2014). Outbreaks Attributed to Cheese: Differences Between Outbreaks Caused by Unpasteurized and Pasteurized Dairy Products, United States, 1998–2011. *Foodborne Pathogens and Disease*, 11(7), 545–551. <https://doi.org/10.1089/fpd.2013.1650>
- Guo, M., Feng, C., Ren, J., Zhuang, X., Zhang, Y., Zhu, Y., ... Qin, J. (2017). A Novel Antimicrobial Endolysin, LysPA26, against *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology*, 8(FEB), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00293>
- Hagens, S., & Loessner, M. J. (1999). Bacteriophages of *Listeria*. In *Listeria monocytogenes: Pathogenesis and Host Response* (pp. 265–279). Boston, MA: Springer US. https://doi.org/10.1007/978-0-387-49376-3_13
- Hansen, J. N. (1993). The Molecular Biology of Nisin and Its Structural Analogues. In *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria* (pp. 93–120). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-355510-6.50013-0>

- Hawkins, D. R., Rocabayera, X., Ruckman, S., Segret, R., & Shaw, D. (2009). Metabolism and pharmacokinetics of ethyl N α -lauroyl-L-arginate hydrochloride in human volunteers. *Food and Chemical Toxicology*, 47(11), 2711–2715. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.07.028>
- Hiraki, J., Ichikawa, T., Ninomiya, S., Seki, H., Uohama, K., Seki, H., ... Barnett, J. W. (2003). Use of ADME studies to confirm the safety of ϵ -polylysine as a preservative in food. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 37(2), 328–340. [https://doi.org/10.1016/S0273-2300\(03\)00029-1](https://doi.org/10.1016/S0273-2300(03)00029-1)
- Hoffmann, Sandra Batz, Michael B. Morris, J. G. (2012). Annual Cost of Illness and Quality-Adjusted Life Year Losses in the United States Due to 14 Foodborne Pathogens. *Journal of Food Protection*, 75(7), 1292–1302. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-417>
- Hyltdgaard, M., Mygind, T., Vad, B. S., Stenvang, M., Otzen, D. E., & Meyer, R. L. (2014). The Antimicrobial Mechanism of Action of Epsilon-Poly-L-Lysine. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(24), 7758–7770. <https://doi.org/10.1128/AEM.02204-14>
- Ibarra-Sánchez, L. A., Amaya-Llano, S. L., & Miller, M. J. (2014). *Control de Listeria monocytogenes en queso fresco tipo panela mediante endolisinas recombinantes y antimicrobianos naturales*. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Ibarra-Sánchez, L. A., Van Tassell, M. L., & Miller, M. J. (2017). Invited review: Hispanic-style cheeses and their association with *Listeria monocytogenes*. *Journal of Dairy Science*, 100(4), 2421–2432. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12116>
- Ibarra-Sánchez, L. A., Van Tassell, M. L., & Miller, M. J. (2018). Antimicrobial behavior of phage endolysin PlyP100 and its synergy with nisin to control *Listeria monocytogenes* in Queso Fresco. *Food Microbiology*, 72, 128–134. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.11.013>

- Johnson, M. E. (2017). A 100-Year Review: Cheese production and quality. *Journal of Dairy Science*, *100*(12), 9952–9965.
<https://doi.org/10.3168/jds.2017-12979>
- Kahar, P., Iwata, T., Hiraki, J., Park, E. Y., & Okabe, M. (2001). Enhancement of ϵ -polylysine production by *Streptomyces albulus* strain 410 using pH control. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *91*(2), 190–194.
[https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(01\)80064-5](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(01)80064-5)
- Kang, J., Stasiewicz, M. J., Murray, D., Boor, K. J., Wiedmann, M., & Bergholz, T. M. (2014a). Optimization of combinations of bactericidal and bacteriostatic treatments to control *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology*, *179*, 1–9.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.03.017>
- Kang, J., Stasiewicz, M. J., Murray, D., Boor, K. J., Wiedmann, M., & Bergholz, T. M. (2014b). Optimization of combinations of bactericidal and bacteriostatic treatments to control *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology*, *179*, 1–9.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.03.017>
- Kawamura, Y., & Whitehouse, B. (2008). ETHYL LAUROYL ARGINATE Chemical and Technical Assessment. *69th JEFCA 5: FAO JEFCA Monographs*, *1*(5), 1–5.
- Kim, J.-W., & Kathariou, S. (2009). Temperature-Dependent Phage Resistance of *Listeria monocytogenes* Epidemic Clone II. *Applied and Environmental Microbiology*, *75*(8), 2433–2438. <https://doi.org/10.1128/AEM.02480-08>
- Kito, M., Onji, Y., Yoshida, T., & Nagasawa, T. (2002). Occurrence of O-poly- L -lysine-degrading enzyme in O-poly- L -lysine-tolerant *Sphingobacterium multivorum* OJ10 : puri ϕ cation and characterization. *Enzyme*, *207*, 0–4.
- Kito, M., Takimoto, R., Yoshida, T., & Nagasawa, T. (2002). Purification and characterization of an ϵ -poly- L -lysine-degrading enzyme from an ϵ -poly- L -

- lysine-producing strain of *Streptomyces albulus*. *Archives of Microbiology*, 178(5), 325–330. <https://doi.org/10.1007/s00203-002-0459-6>
- Kozak, S. M., Margison, K. M., & D'amico, D. J. (2017). Synergistic Antimicrobial Combinations Inhibit and Inactivate *Listeria monocytogenes* in Neutral and Acidic Broth Systems. *Journal of Food Protection*, 80(8), 1266–1272. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-17-035>
- Labrie, S. J., Samson, J. E., & Moineau, S. (2010). Bacteriophage resistance mechanisms. *Nature Reviews Microbiology*, 8(5), 317–327. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2315>
- Li, Y.-Q., Han, Q., Feng, J.-L., Tian, W.-L., & Mo, H.-Z. (2014). Antibacterial characteristics and mechanisms of ϵ -poly-lysine against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Food Control*, 43, 22–27. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.02.023>
- Lin, L., Gu, Y., Li, C., Vittayapadung, S., & Cui, H. (2018). Antibacterial mechanism of ϵ -Poly-lysine against *Listeria monocytogenes* and its application on cheese. *Food Control*, 91, 76–84. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.03.025>
- Liu, H., Pei, H., Han, Z., Feng, G., & Li, D. (2015). The antimicrobial effects and synergistic antibacterial mechanism of the combination of ϵ -Polylysine and nisin against *Bacillus subtilis*. *Food Control*, 47, 444–450. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.07.050>
- Loessner, M. J., & Busse, M. (1990). Bacteriophage typing of *Listeria* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(6), 1912–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2116763>
- Loessner, M. J., Kramer, K., Ebel, F., & Scherer, S. (2002). C-terminal domains of *Listeria monocytogenes* bacteriophage murein hydrolases determine specific recognition and high-affinity binding to bacterial cell wall carbohydrates. *Molecular Microbiology*, 44(2), 335–349. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02889.x>

- Loessner, M. J., Schneider, A., & Scherer, S. (1996). Modified *Listeria* bacteriophage lysin genes (ply) allow efficient overexpression and one-step purification of biochemically active fusion proteins. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(8), 3057–60. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8702301>
- Loessner, M. J., Wendlinger, G., & Scherer, S. (1995). Heterogeneous endolysins in *Listeria monocytogenes* bacteriophages: a new class of enzymes and evidence for conserved holin genes within the siphoviral lysis cassettes. *Molecular Microbiology*, 16(6), 1231–1241. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.tb02345.x>
- Lourenço, A., Kamnetz, M. B., Gadotti, C., & Diez-Gonzalez, F. (2017). Antimicrobial treatments to control *Listeria monocytogenes* in queso fresco. *Food Microbiology*, 64, 47–55. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.12.014>
- Ma, Q. (2015). *Improving antimicrobial activity of lauric arginate by combination with essential oils for novel applications.*
- Ma, Q., Davidson, P. M., Critzer, F., & Zhong, Q. (2016). Antimicrobial activities of lauric arginate and cinnamon oil combination against foodborne pathogens: Improvement by ethylenediaminetetraacetate and possible mechanisms. *LWT - Food Science and Technology*, 72, 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.04.021>
- Ma, Q., Davidson, P. M., & Zhong, Q. (2013). Antimicrobial properties of lauric arginate alone or in combination with essential oils in tryptic soy broth and 2% reduced fat milk. *International Journal of Food Microbiology*, 166(1), 77–84. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.06.017>
- Magrinyà, N., Terjung, N., Loeffler, M., Gibis, M., Bou, R., & Weiss, J. (2015). Influence of fat addition on the antimicrobial activity of sodium lactate, lauric arginate and methylparaben in minced meat. *International Journal of Food Microbiology*, 215, 86–94. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.08.017>

- Maria-Neto, S., de Almeida, K. C., Macedo, M. L. R., & Franco, O. L. (2015). Understanding bacterial resistance to antimicrobial peptides: From the surface to deep inside. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1848(11), 3078–3088. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.02.017>
- Márquez, J. G., & Rojas, C. E. (2007). Efecto de la nisina sobre la microflora patógena del queso blanco artesanal tipo “telita” elaborado en una quesera de Uputa, Estado Bolívar, Venezuela. *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología*, 27, 108–111. Retrieved from <http://www.scielo.org.ve/pdf/rvsm/v27n2/art10.pdf>
- Martinez, R. C. R., Alvarenga, V. O., Thomazini, M., Fávaro-Trindade, C. S., & Sant’Ana, A. de S. (2016). Assessment of the inhibitory effect of free and encapsulated commercial nisin (Nisaplin®), tested alone and in combination, on *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus* in refrigerated milk. *LWT - Food Science and Technology*, 68, 67–75. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.12.027>
- McMullen, P. D., & Freitag, N. E. (2015). *Listeria monocytogenes*. In *Molecular Medical Microbiology* (Vol. 2–3, pp. 1345–1361). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397169-2.00074-3>
- McSweeney, P. L. H. (2004). Biochemistry of cheese ripening. *International Journal of Dairy Technology*, 57(2–3), 127–144. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2004.00147.x>
- McSweeney, P. L. H. (2007). Principal families of cheese. In *Cheese Problems Solved* (pp. 176–188). Elsevier. <https://doi.org/10.1533/9781845693534.176>
- Microbiol, A., Zhou, H., Fang, J., Tian, Y., & Lu, X. Y. (2013). Mechanisms of nisin resistance in Gram-positive bacteria, (Table 1). <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0679-9>
- Miya, S., Takahashi, H., Hashimoto, M., Nakazawa, M., Kuda, T., Koiso, H., & Kimura, B. (2014). Development of a controlling method for *Escherichia coli*

O157:H7 and Salmonella spp. in fresh market beef by using polylysine and modified atmosphere packaging. *Food Control*, 37(1), 62–67.

<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.09.028>

Moreno-Enriquez, R. I., García-Galaz, A., Acedo-Felix, E., Gonzalez-Rios, H., CallL, J. E., Luchansky, J. B., & Diaz-Cinco, M. E. (2007). Prevalence, Types, and Geographical Distribution of *Listeria monocytogenes* from a Survey of Retail Queso Fresco and Associated Cheese Processing Plants and Dairy Farms in Sonora, Mexico. *Journal of Food Protection*, 70(11), 2596–2601.

<https://doi.org/10.4315/0362-028X-70.11.2596>

Nair, D. V. T., Nannapaneni, R., Kiess, A., Mahmoud, B., & Sharma, C. S. (2014). Antimicrobial efficacy of lauric arginate against *Campylobacter jejuni* and spoilage organisms on chicken breast fillets,. *Poultry Science*, 93(10), 2636–2640. <https://doi.org/10.3382/ps.2013-03858>

Najjar, M. B., Kashtanov, D., & Chikindas, M. L. (2007). -Poly- L -lysine and nisin A act synergistically against Gram-positive food-borne pathogens *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes*, 45, 13–18. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02157.x>

Nampoothiri, K. M., Gopinath, V., Anusree, M., Gopalan, N., & Dhar, K. S. (2014). Amino-Based Products from Biomass and Microbial Amino Acid Production. In *Bioenergy Research: Advances and Applications* (pp. 337–352). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59561-4.00019-X>

Nerin, C., Becerril, R., Manso, S., & Silva, F. (2016a). *Ethyl Lauroyl Arginate (LAE): Antimicrobial Activity and Applications in Food Systems. Antimicrobial Food Packaging*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800723-5.00023-1>

Nerin, C., Becerril, R., Manso, S., & Silva, F. (2016b). Ethyl Lauroyl Arginate (LAE): Antimicrobial Activity and Applications in Food Systems. In *Antimicrobial Food Packaging* (pp. 305–312). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800723-5.00023-1>

- Nishikawa, M., & Ogawa, K. (2006). Inhibition of Epsilon-Poly-L-Lysine Biosynthesis in Streptomycetaceae Bacteria by Short-Chain Polyols. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(4), 2306–2312.
<https://doi.org/10.1128/AEM.72.4.2306-2312.2006>
- Obeso, J. M., Martínez, B., Rodríguez, A., & García, P. (2008). Lytic activity of the recombinant staphylococcal bacteriophage ΦH5 endolysin active against *Staphylococcus aureus* in milk. *International Journal of Food Microbiology*, 128(2), 212–218. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.08.010>
- Oladunjoye, A., Soni, K. A., Nannapaneni, R., Schilling, M. W., Silva, J. L., Mikel, B., ... Sharma, C. S. (2013). Synergistic activity between lauric arginate and carvacrol in reducing *Salmonella* in ground turkey. *Poultry Science*, 92(5), 1357–1365. <https://doi.org/10.3382/ps.2012-02620>
- Pandey, A. K., & Kumar, A. (2014). Improved microbial biosynthesis strategies and multifarious applications of the natural biopolymer epsilon-poly-L-lysine. *Process Biochemistry*, 49(3), 496–505.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.12.009>
- Pattanayaiying, R., H-Kittikun, A., & Cutter, C. N. (2014). Effect of lauric arginate, nisin Z, and a combination against several food-related bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 188, 135–146.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.07.013>
- Prince, A., Sandhu, P., Ror, P., Dash, E., Sharma, S., Arakha, M., ... Saleem, M. (2016). Lipid-II Independent Antimicrobial Mechanism of Nisin Depends On Its Crowding And Degree Of Oligomerization. *Scientific Reports*, 6(1), 37908.
<https://doi.org/10.1038/srep37908>
- Punyaappa-path, S., & Phumkhachorn, P. (2015). Nisin: production and mechanism of antimicrobial action. *International Journal of Current Research and Review*, 7(2), 47–53.
- Rees, C. E. D., Doyle, L., & Taylor, C. M. (2017). *Listeria monocytogenes*. In

Foodborne Diseases (Vol. 30, pp. 253–276). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385007-2.00012-7>

Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 5(APR), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>

Saldivar, J. C., Davis, M. L., Johnson, M. G., & Ricke, S. C. (2018). *Listeria monocytogenes* Adaptation and Growth at Low Temperatures. In *Food and Feed Safety Systems and Analysis* (pp. 227–248). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811835-1.00013-0>

Saltijeral, J. A., Alvarez, V. B., & García, B. (1999). PRESENCE OF LISTERIA IN MEXICAN CHEESES. *Journal of Food Safety*, 19(4), 241–247.
<https://doi.org/10.1111/j.1745-4565.1999.tb00249.x>

Santos, J. C. P., Sousa, R. C. S., Otoni, C. G., Moraes, A. R. F., Souza, V. G. L., Medeiros, E. A. A., ... Soares, N. F. F. (2018). Nisin and other antimicrobial peptides: Production, mechanisms of action, and application in active food packaging. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 48, 179–194.
<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.06.008>

Scallan, E., Hoekstra, R. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V., Widdowson, M.-A., Roy, S. L., ... Griffin, P. M. (2011). Foodborne Illness Acquired in the United States—Major Pathogens. *Emerging Infectious Diseases*, 17(1), 7–15.
<https://doi.org/10.3201/eid1701.P11101>

Schmelcher, M., Waldherr, F. y L. (2012). *Listeria* bacteriophage peptidoglycan hydrolases feature high thermoresistance and reveal increased activity after divalent metal cation substitution. *Applied Microbiology Biotechnology*, 93, 633–643.

Schmelcher, M., & Loessner, M. J. (2016). Bacteriophage endolysins: applications for food safety. *Current Opinion in Biotechnology*, 37(3), 76–87.
<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.10.005>

- Schumann, W., & Ferreira, L. C. S. (2004). Production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Genetics and Molecular Biology*, 27(3), 442–453. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572004000300022>
- Sharma, C. S., Ates, A., Joseph, P., Soni, K. A., Schilling, M. W., & Kiess, A. (2013). Evaluation of antimicrobial effects of lauric arginate on reduction of *Salmonella* spp. in ground chicken. *International Journal of Food Science & Technology*, 48(7), 1410–1415. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12103>
- Shih, I., Shen, M., & Van, Y. (2006). Microbial synthesis of poly(ϵ -lysine) and its various applications. *Bioresource Technology*, 97(9), 1148–1159. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.08.012>
- SHIMA, S., MATSUOKA, H., IWAMOTO, T., & SAKAI, H. (1984). Antimicrobial action of ϵ -poly-L-lysine. *The Journal of Antibiotics*, 37(11), 1449–1455. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.37.1449>
- Shukla, S. C., Singh, A., Pandey, A. K., & Mishra, A. (2012). Review on production and medical applications of ϵ -polylysine. *Biochemical Engineering Journal*, 65, 70–81. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2012.04.001>
- Siringan, P., Connerton, P. L., Cummings, N. J., & Connerton, I. F. (2014). Alternative bacteriophage life cycles: the carrier state of *Campylobacter jejuni*. *Open Biology*, 4, 130200. <https://doi.org/10.1098/rsob.130200>
- Smith, M. K., Draper, L. A., Hazelhoff, P. J., Cotter, P. D., Ross, R. P., & Hill, C. (2016). A bioengineered nisin derivative, M21A, in combination with food grade additives eradicates biofilms of *Listeria monocytogenes*. *Frontiers in Microbiology*, 7(NOV), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01939>
- Solanki, K., Grover, N., Downs, P., Paskaleva, E. E., Mehta, K. K., Lee, L., ... Dordick, J. S. (2013). Enzyme-based listericidal nanocomposites. *Scientific Reports*, 3, 1–6. <https://doi.org/10.1038/srep01584>
- Soni, K. A., Desai, M., Oladunjoye, A., Skrobot, F., & Nannapaneni, R. (2012).

Reduction of *Listeria monocytogenes* in queso fresco cheese by a combination of listericidal and listeristatic GRAS antimicrobials. *International Journal of Food Microbiology*, 155(1–2), 82–88.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.01.010>

Suksathit, S., & Tangwatcharin, P. (2013). Activity of organic acid salts in combination with lauric arginate against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Rissen. *ScienceAsia*, 39(4), 346.
<https://doi.org/10.2306/scienceasia1513-1874.2013.39.346>

Takahashi, H., Takada, K., Tsuchiya, T., Miya, S., Kuda, T., & Kimura, B. (2015). *Listeria monocytogenes* develops no resistance to ferulic acid after exposure to low concentrations. *Food Control*, 47, 560–563.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.07.062>

Teusink, B., & Molenaar, D. (2017). Systems biology of lactic acid bacteria: For food and thought. *Current Opinion in Systems Biology*, 6, 7–13.
<https://doi.org/10.1016/j.coisb.2017.07.005>

Torres-Vitela, M. R., Mendoza-Bernardo, M., Castro-Rosas, J., Gomez-Aldapa, C. A., Garay-Martinez, L. E., Navarro-Hidalgo, V., & Villarruel-López, A. (2012). Incidence of *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, and Staphylococcal Enterotoxin in Two Types of Mexican Fresh Cheeses. *Journal of Food Protection*, 75(1), 79–84. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-258>

Van Hekken, D. L., Drake, M. a, Corral, F. J. M., Prieto, V. M. G., & Gardea, a a. (2006). Mexican chihuahua cheese: sensory profiles of young cheese. *Journal of Dairy Science*, 89(10), 3729–38. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72414-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72414-6)

Van Tassell, M. L., Angela Daum, M., Kim, J.-S., & Miller, M. J. (2016). Creative lysins: *Listeria* and the engineering of antimicrobial enzymes. *Current Opinion in Biotechnology*, 37, 88–96. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.10.006>

- Van Tassell, M. L., Ibarra-Sánchez, L. A., Hoepker, G. P., & Miller, M. J. (2017). Hot topic: Antilisterial activity by endolysin PlyP100 in fresh cheese. *Journal of Dairy Science*, *100*(4), 2482–2487. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11990>
- Van Tassell, M. L., Ibarra-Sánchez, L. A., Takhar, S. R., Amaya-Llano, S. L., & Miller, M. J. (2015). Use of a miniature laboratory fresh cheese model for investigating antimicrobial activities. *Journal of Dairy Science*, *98*(12), 8515–8524. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9967>
- Yamanaka, K., Maruyama, C., Takagi, H., & Hamano, Y. (2008). ϵ -Poly-L-lysine dispersity is controlled by a highly unusual nonribosomal peptide synthetase. *Nature Chemical Biology*, *4*(12), 766–772. <https://doi.org/10.1038/nchembio.125>
- Yang, S., Sadekuzzaman, M., & Ha, S.-D. (2017). Treatment with lauric arginate ethyl ester and commercial bacteriophage, alone or in combination, inhibits *Listeria monocytogenes* in chicken breast tissue. *Food Control*, *78*, 57–63. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.02.021>
- Ye, R., Xu, H., Wan, C., Peng, S., Wang, L., Xu, H., ... Wei, H. (2013). Antibacterial activity and mechanism of action of ϵ -poly-l-lysine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *439*(1), 148–153. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.08.001>
- Yoshida, T., & Nagasawa, T. (2003). epsilon-Poly-L-lysine: microbial production, biodegradation and application potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *62*(1), 21–6. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1312-9>
- Yu, H., Huang, Y., & Huang, Q. (2010). Synthesis and Characterization of Novel Antimicrobial Emulsifiers from ϵ -Polylysine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(2), 1290–1295. <https://doi.org/10.1021/jf903300m>
- Yusuf, M. (2018). *for Food Biopreservation. Food Packaging and Preservation*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811516-9.00012-9> 409

- Zahi, M. R., El Hattab, M., Liang, H., & Yuan, Q. (2017). Enhancing the antimicrobial activity of d -limonene nanoemulsion with the inclusion of ϵ -polylysine. *Food Chemistry*, 221, 18–23.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.10.037>
- Zhang, H., Bao, H., Billington, C., Hudson, J. A., & Wang, R. (2012). Isolation and lytic activity of the Listeria bacteriophage endolysin LysZ5 against *Listeria monocytogenes* in soya milk. *Food Microbiology*, 31(1), 133–136.
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.01.005>
- Zhang, H., Zhou, Y., Bao, H., Zhang, L., Wang, R., & Zhou, X. (2015). Plasmid-borne cadmium resistant determinants are associated with the susceptibility of *Listeria monocytogenes* to bacteriophage. *Microbiological Research*, 172, 1–6.
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.01.008>