



EVALUACIÓN DE LA INHIBICIÓN DE *Candida intermedia* POR EFECTO DE SOBRENADANTES DE BIOPROTECTORES Y SU EFECTO SINÉRGICO

EVALUATION OF INHIBITION OF THE *Candida intermedia* DUE TO THE EFFECT OF SUPERNATANTS FROM BIOPROTECTORS AND THEIR SYNERGISTIC EFFECT

A. Henao-Ardila¹, M.X Quintanilla-Carvajal¹, B.F Klotz-Ceberio² y J.A Serna-Jiménez^{1*}

¹Universidad de La Sabana, Facultad de Ingeniería de Producción Agroindustrial, Km. 7, Autopista Norte de Bogotá. Chía, Colombia.

²Instituto Alpina de Investigación, Alpina Corporativo S.A., Km 3 Vía Briceño- Sopó, Sopó, Cundinamarca, Colombia

Received March 23, 2014; Accepted May 28, 2015

Resumen

En este trabajo se evaluó el efecto inhibitorio de los sobrenadantes de tres bioprotectores comerciales (HOLDBAC YM-C® 100DCU, MicroGARD 200® y Lyofast FPR2®), con el fin de establecer el bioprotector con mayor efecto inhibitorio sobre la levadura alterante de alimentos *Candida intermedia*. De igual forma, se estudió el efecto sinérgico que tienen los bioprotectores, por medio de un diseño experimental de mezcla optimizada, para establecer el porcentaje óptimo de mezcla que maximice la inhibición de crecimiento de la *Candida intermedia* a una concentración de 10×10^5 UFC/mL. El mayor efecto inhibitorio se obtuvo empleando los sobrenadantes del bioprotector MicroGARD 200®, reduciendo la carga microbiana en 3.2 ciclos logarítmicos, mientras que HOLDBAC YM-C® y Lyofast FPR2® redujeron la carga microbiana en 1.7 y 1.2 ciclos logarítmicos respectivamente. Se determinó que existe un efecto sinérgico entre los sobrenadantes de los bioprotectores y la mezcla óptima que maximiza la inhibición de la *Candida intermedia* contenía 23.7% de HOLDBAC y 76.3% de MicroGARD, reduciendo la carga microbiana en 3.4 ciclos logarítmicos.

Palabras clave: bioprotectores, sobrenadantes, *Candida intermedia*, optimización de mezcla, inhibición.

Abstract

In this work, the inhibitory effect of the supernatants of three commercial bioprotectors (HOLDBAC YM-C® 100DCU, MicroGARD 200® y Lyofast FPR2®) was evaluated in order to establish the most effective bioprotector against the food spoilage yeast *Candida intermedia*. Additional, the synergistic effect of the bioprotectors was studied through an experimental design of optimized mixture to determine the optimum mixing ratio that maximizes inhibition of *Candida intermedia* at a concentration of 10×10^5 CFU/mL. The highest inhibition was obtained using the supernatants of MicroGARD 200®, reducing the microbial load in 3.2 logarithmic cycles, while HOLDBAC YM-C® and Lyofast FPR2® reduced the microbial load in 1.7 and 1.2 logarithmic cycles respectively. It was determined that there is a synergistic effect between the supernatants of the bioprotectors and that the optimum mixing of bioprotectors that maximized inhibition of *Candida intermedia* contained 23.7 % of HOLDBAC and 76.3 % of MicroGARD, reducing the microbial load in 3.4 logarithmic cycles.

Keywords: bioprotectors, supernatants, *Candida intermedia*, optimum mixing ratio, maximum inhibition.

1 Introducción

Una de las principales causas de deterioro en los alimentos se debe a la acción de diferentes tipos

de microorganismos (bacterias, levaduras y mohos) (Rodríguez, 2011). Las levaduras son consideradas un problema potencial en los jugos de naranja concentrados, jugos refrigerados y productos lácteos,

*Autora para la correspondencia. E-mail: andreasernajimenez@hotmail.com

debido a su habilidad para sobrevivir y crecer bajo condiciones ambientales adversas (Palop y col, 2000). Se ha demostrado que *Candida intermedia* es una levadura capaz de resistir los procesos normales de pasteurización comercial, ocasionando frecuentemente el deterioro de jugos y de productos lácteos pasteurizados (Medina y col, 2001).

La biopreservación es una herramienta eficaz para extender la vida útil y para mejorar la seguridad de los alimentos mediante la aplicación de microorganismos de origen natural y / o sus compuestos antibacterianos (Ghanbari, 2013, Romero-Bastida y col, 2011). Muchas bacterias ácido lácticas y ácido propiónicas secretan compuestos con actividad antimicrobiana como pueden ser ácidos grasos de cadena corta y bacteriocinas, entre otros. Los microorganismos secretores de compuestos antimicrobianos así como sus compuestos son empleados en la biopreservación de alimentos. Según Holzpfel y col (2001), para que un cultivo bioprotector sea considerado como un cultivo capaz de aumentar la seguridad biológica de los alimentos sin modificar las características sensoriales de un producto debe tener las siguientes características: a) no debe presentar ningún riesgo para la salud, b) debe tener efectos beneficiosos para el producto y c) no debe producir efectos sensoriales negativos (gas, mal sabor, etc.)

Los ácidos orgánicos, especialmente el ácido láctico, propiónico y acético, son reconocidos ampliamente como bioconservantes. Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos con gran potencial de aplicación como agentes bioconservantes pues se degradan durante la digestión del alimento sin generar resistencias u otros efectos secundarios (González-Olivares y col 2011). Estas pueden tener un espectro amplio o estrecho de acción y están clasificadas en cuatro clases: Lantibióticos (clase I), péptidos sin modificar (clase II), grandes proteínas (Clase III) y péptidos circulares (clase IV) (Verma y col 2014). Las bacteriocinas de la clase I son bacteriocinas pequeñas activas a nivel de membrana que contienen algunos aminoácidos poco comunes como lantionina, b-metil-lantionina y dihidroalanina (Singh y col, 2015 Garneau y col, 2002). Las bacteriocinas de la clase II son bacteriocinas pequeñas (<10 kDa) y resistentes al calor. Éstas a su vez se dividen en cuatro subclases: Subclase IIa, Subclase IIb, Subclase IIc, Subclase IId. A la subclase IIa pertenecen las bacteriocinas del tipo pediocina y que muestran una potente actividad anti *Listeria*. A la subclase IIb pertenecen las bacteriocinas complejas pequeñas (<10kDa) que consisten en dos péptidos

diferentes. Formadoras de complejos de poración. A la subclase IIc pertenecen las bacteriocinas pequeñas (<10kDa), cíclicas y termoestables. A la subclase IId pertenecen las bacteriocinas que no son tipo pediocina, lineares y de un péptido (Tolinački y col, 2010 Iwatani y col, 2011 Garneau y col, 2002 y Ghanbari y col, 2013 Todorov y col, 2006). Las bacteriocinas de la clase III son péptidos de gran tamaño termo sensibles (Singh y col, 2015). Las bacteriocinas de la clase IV son bacteriocinas resistentes al calor y con un enlace péptido cabeza - cola (Verma y col 2014).

El mecanismo de acción de las bacteriocinas consiste en una unión inicial a la membrana bacteriana por acción electrostática entre los lípidos de la membrana cargados negativamente y las bacteriocinas con su carga neta positiva. Luego se produce la inserción de la bacteriocina en la bicapa lipídica, formando poros en la membrana, causando la pérdida del contenido plasmático, resultando así en la muerte de la célula (Jaramillo, 2010; Pawlowska y col., 2013).

La bioconservación es actualmente un tema de estudio pues se requiere de mayor conocimiento para lograr una aplicación más efectiva. Por temas toxicología alimentaria y seguridad de los alimentos, los estudios se han centrado inicialmente en el control de bacterias patógenas transmitidas por alimentos y ya existe un buen número de publicaciones. Sin embargo, los estudios relacionados con microorganismos deteriorativos de alimentos, como son levaduras y mohos, son todavía escasos. Por este motivo el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto inhibitorio de sobrenadantes obtenidos de agentes bioprotectores sobre *Candida intermedia* y el posible efecto sinérgico de sus combinaciones.

2 Materiales y métodos

2.1 Identificación del microorganismo alterante

Para la identificación del microorganismo alterante, se aislaron y cultivaron colonias de levaduras que se encontraron en matriz láctea alterada. Las colonias se cultivaron en medio Potato Dextrosa Agar (PDA) (Scharlau, España) a 30 °C durante 48 horas en una incubadora (MMM Medcenter, Alemania). Para el aislamiento del ADN de las levaduras se utilizó el kit de extracción Mo Bio ULTRACLEAN PCR CLEAN - UP®, Estados Unidos.

Luego se construyeron los primers para la levadura según Fell, y col., 2000) como se describe a

continuación: 5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3' y 5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3'. La mezcla de reacción se preparó con: 15 μ L de Agua grado molecular, 20 μ L de Buffer, 3,2 μ L de dNTP, 3,2 μ L de Taq Polimerasa, 12 μ L de MgCl₂ y 5,6 μ L de cada primer; de esta mezcla se tomaron 50 μ L para cada reacción. Las condiciones de reacción se dieron mediante un ciclo de desnaturalización a 94°C por 10 minutos, 30 ciclos de amplificación con las siguientes etapas: desnaturalización 94°C por 30 segundos, anillado (según primer) a 58°C por 30 segundos, polimerización a 72°C por 30 segundos y un ciclo final a 72°C por 10 minutos. El producto de Polymerase Chain Reaction (reacción de la cadena de polimerasa) se corrió mediante una electroforesis en gel de agarosa al 3,0% (90 voltios por 45 minutos) para, evidenciar la obtención de fragmentos amplificados del ADN de cada uno de los cultivos. Como marcador de peso molecular se utilizó Hyperladder II de Bioline®, Reino Unido (50 a 2000bp). Los productos de PCR se llevaron a secuenciación. Los electroforetogramas recibidos como resultado de la secuenciación, fueron editados con ayuda del programa Chromas Lite®; esta nueva secuencia fue ingresada en la base de datos del National Center of Biotechnology Information; con la identificación arrojada y secuencia de la misma se compararon los productos con ayuda de la herramienta Clustal Wallis®.

2.2 Obtención de sobrenadantes de agentes bioprotectores

Los agentes bioprotectores que se emplearon durante el estudio fueron HOLDBAC YM-C® 100DCU (DuPont-Danisco, Niebüll, Alemania), MicroGARD 200® (DuPont-Danisco, Niebüll, Alemania), y Lyofast FPR2® (SACCO, Cadorago, Italia). HOLDBAC YM-C es un cultivo multiespecie liofilizado que contiene *Lactobacillus paracasei* y *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*. MicroGARD 200 consiste en metabolitos de fermentación de *P. Freudenreichii* subsp. *shermanii* con recuentos en placa de 5000/g (según ficha técnica) Lyofast FPR2 consiste en *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum* y *Enterococcus faecium*.

Para la obtención de los sobrenadantes producidos por los agentes bioprotectores, se cultivaron los bioprotectores en 100mL de caldo Man Rogosa Sharpe (MRS) (Scharlau, España) a 30 °C durante 24 horas, se centrifugaron los 100mL de caldo a 9000 rpm (Heitrich, Alemania) y 4 °C durante 10 minutos

para provocar lisis celular. Para eliminar las células presentes, con una jeringa estéril, se tomó una alícuota de 10mL de la parte superior de los sobrenadantes y se pasó por un filtro Sartorius de 0.22 μ m de diámetro.

2.3 Caracterización de los sobrenadantes por electroforesis

La elaboración de los geles para el desarrollo de la electroforesis se realizó mediante la técnica reportada por Schagger y Von Jagow (1987) (Tabla 1).

Se empleó el marcador 3546 Sigma (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) el cual registra pesos entre 1.06 y 17.0 kDa. Las bandas de proteínas se fijaron en una solución que contenía 50% de metanol (Vetec, Brasil) y ácido acético (Merk KGaA, Alemania) al 10% por 30 minutos, antes de que se tiñan con 0.025% de Serva blue G (SERVA Electrophoresis, Alemania) en ácido acético al 10%. Una completa decoloración de los geles se logró por agitación en ácido acético al 10% durante 2 horas: la solución decolorante se renovó cada 30 min. Cabe señalar que no todas las pequeñas proteínas podrían ser teñidas, porque o bien eluyen completamente y / o no se unen el tinte (Schagger y Jagow, 1987).

2.4 Diseño experimental de mezclas

Se empleó un diseño experimental de mezcla optimizada (Design Expert ® versión 8.0.7.1, Statase

Tabla 1. Composición de los geles de corrida, espaciador y separador (Schagger H., Von Jagow G. 1987)

	Gel de corrida	Gel espaciador	Gel separador
49.5% T ¹ , 3% solución C ²	1mL	6.1 mL	-
49.5% T, 6% solución C	-	-	10 mL
Gel buffer	3.1 mL	10 mL	10 mL
Glicerol	-	-	4g
Urea	-	-	-
Añadir agua hasta completar	12.5 mL	30 mL	30 mL

1. T denota la concentración en porcentaje de acrilamida y bisacrilamida.

2. C denota la concentración en porcentaje del agente de reticulación relativa a la concentración total T.

Tabla 2. Matriz de mezclas de bioprotectores propuestas por el diseño.

Ensayo	HOLDBAC YMC	MicroGARD 100	Lyofast LFPR-2
1	0%	50%	50%
2	50%	0%	50%
3	0%	60%	40%
4	30%	30%	30%
5	0%	40%	60%
6	40%	0%	60%
7	50%	50%	0%
8	100%	0%	0%
9	60%	20%	20%
10	0%	100%	0%
11	0%	0%	100%

Inc., Minneapolis, EE.UU.) para identificar la proporción óptima de cada bioprotector en términos de una respuesta de inhibición del crecimiento (reducción de ciclos logarítmicos) para levadura alterante. Las mezclas que el software propuso y que se probaron experimentalmente se listan en la Tabla 2.

2.5 Evaluación de la inhibición del crecimiento de *Candida intermedia* por acción de sobrenadantes

Para evaluar el efecto inhibitorio de los sobrenadantes y el posible efecto sinérgico de sus combinaciones sobre el crecimiento de *Candida intermedia*, se realizaron las mezclas propuestas en el diseño (Tabla 2).

Se inocularon 20 mL de caldo MRS (Scharlau, España) con 500 μ L de suspensión de levadura alterante y la cantidad correspondiente a la combinación de sobrenadantes. Los caldos se dejaron en incubadora (Friocell, País) durante 24 horas a 30°C.

Para la cuantificación de microorganismos viables se sembraron en la superficie de medios Rosa Bengala Agar (RBA, Scharlau, Spain) 50 μ L de la suspensión de sobrenadantes y levadura empleando un equipo WASP 2 Spiral plater (Don Whitley Scientific, West Yorkshire, United Kingdom) y se incubaron durante 72 horas a 30°C. Para hacer el conteo de las colonias que crecieron durante las 72 horas de incubación se empleó el equipo Colony Counter ProtoCOL 3 (Microbiology International, Maryland, USA).

3 Resultados y discusión

3.1 Obtención de microorganismos target

Después de realizar la identificación molecular se encontró que la levadura aislada de la matriz láctea correspondía a *Candida intermedia*, con una similitud del 99%. Los diferentes alimentos en los que se ha identificado esta levadura son comúnmente productos lácteos y algunos jugos ácidos, entre los que se pueden encontrar quesos madurados, jugos de naranja, marañón, uvas y coco, quesos artesanales de oveja, quesos Cambert, azul y Rokpol. (Quigley y col, 2011, Maciel y col, 2013, Pereira y col, 2000, Roostita y Fleet, 1996, Wojtatowicz y col, 2001).

3.2 Caracterización de bacteriocinas y sobrenadantes por electroforesis

La imagen 1 muestra el resultado de la electroforesis realizada para caracterizar las bacteriocinas presentes en los sobrenadantes. Los carriles 2 y 3 correspondientes a los sobrenadantes con metabolitos producidos por *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* de MicroGARD 200® y HOLDBAC YM-C® 100DCU presentaron bandaje sobre los 17 kDa lo que puede indicar presencia de propionicina la cual tiene un peso de 19.9 kDa. Los tres sobrenadantes mostraron una producción de péptidos entre los 6 kDa y los 5 kDa siendo mucho más prominente en el carril 1, correspondiente a los sobrenadantes de Lyofast FPR2®, lo que puede indicar la presencia de uno o varios tipos de plantaricina y enterocina.

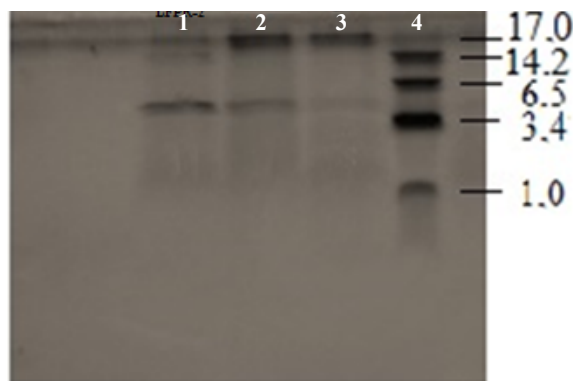


Imagen 1. Gel de corrida para la electroforesis tris-tricina. 1: Lyofast LFPR, 2: MicroGARD 200, 3: HOLDBAC YM-C, 4: Marcador.

Tabla 3. Bacteriocinas producidas por los microorganismos contenidos en los bioprotectores.

Microorganismo	Bacteriocinas	Clasificación	Peso molecular (kDa)	Referencia
<i>Lb. paracasei</i>	BacUB9	Clase II	3.5	Tolinački y col (2010)
<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	Propionicin F	Clase II	4.4	Thierry y col (2011)
<i>Lb. rhamnosus</i>	ST461BZ		2.8	Todorov y Holzapfel (2015)
	ST462BZ		8	
<i>Lb. Plantarum</i>	Plantaricin EF	Clase II	7.2	Garneau y col, (2002); Pinto y col, (2011); Song y col (2014); Monroy y col (2009); Van Reenen y col (1998); Moll y col, (1999)
	Plantaricin JK		6.4	
	Plantaricin A		2.9	
	Plantaricin S		>8.0	
	Plantaricin ZJ5		2.6	
	Plantaricin C19		3.8	
	Plantaricin W		3.3	
	ST194BZ		3 y 14	
	ST414BZ		3.7	
<i>Enterococcus</i>	ST664BZ		6.5	
	Enterocin A	Clase II	4.3	Ghanbari y col (2013)
	Enterocin B		5.5	Garneau y col (2002)
	Enterocin L50		3.9	Moll y col (1999)

Tabla 4. Matriz de diseño de mezclas de los bioprotectores y respuesta de la actividad antifúngica.

Mezcla No	Porcentaje de bioprotector			Ciclos reducidos (ciclos log ₁₀)
	HOLBAC (%)	MicroGARD(%)	Lyofast (%)	
1	0%	50%	50%	3.4
2	50%	0%	50%	2.3
3	0%	60%	40%	3.0
4	30%	30%	30%	2.3
5	0%	40%	60%	2.4
6	40%	0%	60%	2.4
7	50%	50%	0%	3.2
8	100%	0%	0%	1.7
9	60%	20%	20%	2.3
10	0%	100%	0%	3.2
11	0%	0%	100%	1.2

Se encontró que algunas de las bacteriocinas producidas por los agentes bioprotectores empleados (Tabla 3) pertenecen a la clase II, con peso molecular inferior a los 10kDa que presentan diferentes mecanismos de poración para la membrana de la levadura.

3.3 Diseño de mezclas

Se pudo evidenciar, después del conteo de las unidades formadoras de colonias en cada una de las cajas

de petri, que todas las mezclas de sobrenadantes produjeron resultados positivos, en todas las muestras se evidenció una reducción, reportada en ciclos logarítmicos, del crecimiento microbiano. En la Tabla 4 se puede observar que las mezclas de sobrenadantes con mejores resultados son la mezcla 1, la mezcla 3, la mezcla 7 y la mezcla 10. En la Tabla 4 se presentan los resultados de los ciclos de reducción logarítmica ejercido para cada una de las mezclas de bioprotectores propuestas por el software Design Expert.

Tabla 5. Análisis de varianza (ANOVA) para modelo cúbico especial. A: HOLDBAC, B: MicroGARD, C: Lyofast.

	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Mínimos cuadrados	Valor de F	Valor de P
Modelo	7.52	6	1.25	27.06	0.0002
Mezcla lineal	5.75	2	2.88	62.05	<0.0001
AB	1	0.71	15.26	0.0059	
AC	1	0.64	13.74	0.0076	
BC	1	0.97	20.95	0.0026	
ABC	0.5	1	0.50	10.70	0.0137
Residua	1	0.32	7	0.046	
Lack of fit	0.32	3	0.11		
Error	0.000	4	0.000		
Total	7.85	13			
Desv. Est.	0.22				
Media	-2.48				
R ²	0.959				
R ² -Ajustado	0.923				

Tabla 6. Optimización del diseño experimental de mezclas y respuesta de actividad antifúngica

Porcentaje de bioprotector			Ciclos log ₁₀ de reducción
HOLBAC (%)	MicroGARD(%)	Lyofast (%)	
23.7%	76.3%	0%	3.410

Se puede observar que todos los ensayos que mostraron buenos resultados tienen una concentración del bioprotector MicroGARD igual o superior al 50%. El bioprotector MicroGARD consiste en metabolitos de fermentación de *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*, por lo que además de las bacteriocinas que produce ésta bacteria tiene también otros metabolitos, entre los cuales se puede encontrar el ácido propiónico, (Lind y col, 2004) se ha visto que el ácido propiónico tiene efectos positivos en la inhibición de levaduras alterantes (Schwenninger y col, 2011).

La información experimental se introdujo en el software Design Expert con el fin de encontrar los coeficientes de la ecuación correspondiente que relacione la inhibición de la *Candida intermedia* y la fracción de los bioprotectores. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para los distintos modelos (Corona-González, y col, 2013). En la Tabla 5 se muestran los resultados de ANOVA para el modelo cúbico especial. Para cualquier término del modelo, un coeficiente de regresión alto y un valor de probabilidad bajo, indicaron un efecto significativo en la variable de respuesta respectiva. El coeficiente de determinación R² es la proporción de la variación en la respuesta atribuida al modelo y se recomienda

que para haya un buen ajuste del modelo, el R² no sea inferior a 80% para cualquier tipo de proceso que involucre el uso de materiales biológicos en la agroindustria (Rodríguez y col, 2014). Con un valor de p<0.001 se puede afirmar que el modelo y los términos del modelo son significativos, en este caso los componentes de la mezcla lineal (HOLDBAC, MicroGARD y Lyofast) son términos significativos y con un valor R² de 0.959 y R²-Ajustado de 0.923 se puede afirmar que la relación entre las variables independientes A, B y C se ajustan al modelo cúbico especial.

La ecuación (1) muestra la relación entre la inhibición en el crecimiento de la *Candida intermedia* y las siguientes variables independientes: A (%HOLBAC), B (%MicroGARD) y C (%Lyofast), y variable de respuesta son los ciclos de reducción logarítmica de *Candida intermedia* en términos de las variables independientes HOLDBAC, MicroGARD y Lyofast. La ecuación muestra un efecto positivo en la inhibición de *Candida intermedia* cuando se emplea la combinación ABC, se considera significativa la interacción del factor, por el contrario se observan

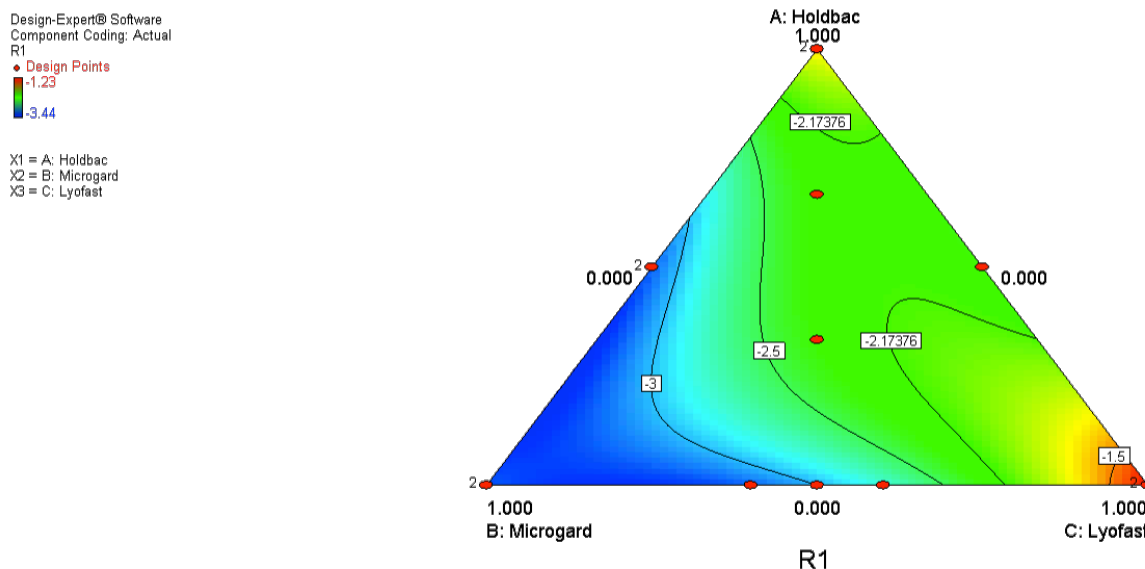


Fig. 1. Isopleta del diseño experimental con la respuesta de actividad antifúngica an término de ciclos reducción logarítmica. A: HOLDBAC, B: MicroGARD, C: Lyofast.

como las interacciones lineales y cuadráticas ejercen un efecto negativo sobre la inhibición de la levadura (Tabla 6). Bajo esa perspectiva los coeficientes en la ecuación son congruentes con los resultados obtenidos.

$$\begin{aligned} \text{Inhibición} = & (-1.72A) + (-3.25B) + (-1.21C) + \\ & (-2.91AB) + (-3.09BC) + (-3.54AC) \\ & + 21.52ABC \end{aligned} \quad (1)$$

3.4 Optimización del diseño experimental

La mezcla de bioprotectores se considera óptima si la inhibición del crecimiento de *C. Intermedia* se maximiza. Los resultados de la ecuación del modelo, se introdujeron en el software para calcular las concentraciones de bioprotectores óptimas de modo que la inhibición de la levadura *Candida intermedia* sea máxima. Los porcentajes de A, B y C que maximizan la inhibición de *Candida intermedia* son 23.7%, 76.3% y 0% respectivamente y los ciclos Log reducidos para esta mezcla son 3.410.

Se puede ver que para maximizar el efecto inhibitorio que tienen los bioprotectores sobre la levadura, la concentración de Lyofast debe ser mínima, pues no se observan efectos positivos al estar éste en altas concentraciones, mientras que, como se observa en la Figura 1, el MicroGARD y el HOLDBAC, tienen un efecto favorable para inhibir el crecimiento de la *Candida intermedia*, comprobando el efecto sinérgico

positivo, maximizando la inhibición del crecimiento de la levadura.

Conclusiones

Por medio de conteo en placas se logró evidenciar el efecto inhibitorio que ejercen los sobrenadantes de los bioprotectores y las mezclas de éstos sobre la *Candida intermedia*. Se observaron mejores resultados en la inhibición de la *Candida intermedia* al emplear los sobrenadantes del bioprotector HOLDBAC y MicroGARD, se comprobó el efecto sinérgico que existe entre éstos al presentar una mayor reducción en la carga microbiana cuando la levadura estuvo en contacto con las distintas mezclas de sobrenadantes de los bioprotectores; Estos resultados soportan que la aplicación de productos bioprotectores se convierte en una opción para la industria como sistemas en los que se da un control de la alteración y deterioro de productos de manera preventiva al adicionarse en la formulación. Se desarrolló un modelo que permite predecir la reducción de la carga microbiana en ciclos logarítmicos al introducir como variables las concentraciones en porcentaje de los sobrenadantes de los bioprotectores. A su vez se optimizó el modelo con el fin de encontrar las concentraciones de los sobrenadantes que maximizan la inhibición de la *Candida intermedia*.

Referencias

- Corona-González R.I., Ramos Ibarra J.R., Gutiérrez-González P., Pelayo-Ortiz C., Guatemala-Morales G.M., Arriola-Guevara E. (2013). The use of response surface methodology to evaluate the fermentation conditions in the production of tepache. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 12, 19-28
- Garneau S., Martin N. I., Vederas J. C. (2002). Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie* 84, 577-592.
- Ghanbari M., Jami M., Domig K.J., Kneifel W. (2013). Seafood biopreservation by lactic acid bacteria - A review. *Food Science and Technology* 54, 315-324.
- González-Olivares L.G., Jiménez-Guzmán J., Cruz-Guerrero A., Rodríguez-Serrano G., Gómez-Ruiz L., García-Garibay M. (2011). Liberación de péptidos bioactivos por bacterias lácticas en leches fermentadas comerciales. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 10, 179-188.
- Holzappel W.H., Haberer P., Geisen R., Björkroth J., Schillinger U. (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition* 73, 356-373.
- Iwatani S., Zendo T., Sonomoto K. (2011). Class Iid or Linear and Non-Pediocin-Like Bacteriocins. En: Prokaryotic Antimicrobial Peptides (HYPERLINK "http://link.springer.com/search?facet-author=%22Djamel+Drider%22" Drider D., HYPERLINK "http://link.springer.com/search?facet-author=%22Sylvie+Rebuffat%22" Rebuffat S.), Pp. 237-252. Springer, Nueva York.
- Jaramillo D., Meléndez A.P., Sánchez O.F. (2010). Evaluación de la producción de bacteriocinas a partir de lactobacilos y bifidobacterias. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología* 1, 193-209.
- Lind H., Jonsson H. Schnürer J. (2004). Antifungal effect of diary propionibacteria-contribution of organic acids. *International Journal of Food Microbiology* 98, 157-165.
- Maciel N.O.P., Piló F.B., Freitas L.F.D., Gomes F.C.O., Johann S., Nardi R.M.D., Lachance M.A., Rosa C.A. (2013). The diversity and antifungal susceptibility of the yeasts isolated from coconut water and reconstituted fruit juices in Brazil. *International Journal of Food Microbiology* 160, 201-205.
- Medina Z., Sulbarán B., Ferrer A., Ojeda G. (2001). Resistencia térmica de levaduras en jugo de naranja a diferentes concentraciones de sólidos solubles. *Alan* 51, 167-172.
- Moll G. N., Van Den Akker E., Hauge H. H., Meyer J. N., Nes I. F., Konings W.N., Dries A. J. M. (1999). Complementary and Overlapping Selectivity of the Two-Peptide Bacteriocins Plantaricin EF and JK. *Journal of Bacteriology* 181, 4848-4852.
- Monroy M. C., Castro T., Fernández F. J., Mayorga L. (2009). Revisión bibliográfica: Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas. *Contactos* 73, 63-72.
- Palop A., Alvarez I., Raso J., Condon S. (2000). Heat resistance of Alicyclobacillus acidocaldarius in water, various buffers, and orange juice. *Journal of Food Protection* 10, 1377-1380.
- Pawlowska A. M., Zannini E., Coffey A., Arendt E.K. (2013). "Green Preservatives": Combating Fungi in the Food and Feed Industry by Applying Antifungal Lactic Acid Bacteria. *Advances in Food and Nutrition Research* 66, 215-236.
- Pereira S., Potes M.E., Marinho A., Malfeita M., Loureiro V. (2000). Characterization of yeast flora isolated from an artisanal Portuguese ewe's cheese. *International Journal of Food Microbiology* 60, 55-63.
- Pinto D., Marzani B., Minervini F., Calasso M., Giuliani G., Gobetti M., De Angelis M. (2011). Plantaricin A synthesized by Lactobacillus plantarum induces in vitro proliferation and migration of human keratinocytes and increases the expression of TGF-1, FGF7, VEGF-A and IL-8 genes. *Peptides* 32, 1815-1824.
- Quigley L., O'Sullivan O., Beresford T.P., Ross P.R., Fitzgerald G.F, Cotter P.D. (2011). Molecular approaches to analysing the microbial composition of raw milk and raw milk cheese. *International Journal of Food Microbiology* 150, 81-94.

- Rodríguez E.N. (2011). Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. *Ra Ximhai* 7, 153-170.
- Rodríguez J.M., Serna J.A., Uribe M.A., Klotz B., Quintanilla M.X. (2014). Aplicación de la metodología de superficie de respuesta para evaluar el efecto de la concentración de azúcar y de cultivos iniciadores comerciales sobre la cinética de fermentación de yogurt. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 13, 213-225.
- Romero-Bastida C.A., Zamudio-Flores P.B., Bello-Pérez L.A. (2011). Antimicrobianos en películas de almidón oxidado de plátano: efecto sobre la actividad antibacteriana, microestructura, propiedades mecánicas y de barrera. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 10, 445-453.
- Roostita, R., Fleet G.H. (1996). The occurrence and growth of yeasts in Camembert and Blue-veined cheeses. *International Journal of Food Microbiology* 80, 393-404.
- Schagger H., Von Jagow G. (1987). Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry* 166, 368-379.
- Schwenninger S. M., Meile L., Lacroix C. (2011). Antifungal lactic acid bacteria and propionibacteria for food biopreservation. En: *Protective Cultures, Antimicrobial Metabolites and Bacteriophages for Food and Beverage Biopreservation* (Lacroix C.), Pp. 27-62. Woodhead Publishing, Oxford.
- Singh N. P., Tiwari A., Bansal A., Thakur S., Sharma G., Gabrani R. (2015). Genome level analysis of bacteriocins of lactic acid bacteria. *Computational Biology and Chemistry* 56, 1-6.
- Song, D. F., Zhu, M. Y., Gu, Q. (2014). Purification and Characterization of Plantaricin ZJ5, a New Bacteriocin Produced by *Lactobacillus plantarum* ZJ5. Disponible en: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0105549>. Accesado: 3 marzo 2015.
- Thierry A., Falentin H., Deutsch S. M., J., Jan G. (2011). Bacteria, Beneficial *Propionibacterium* spp. En: *Encyclopedia of Dairy Sciences* (Fuquay J. W.), Pp. 403-411. Academic Press, San Diego.
- Todorov S.D., Dicks L.M.T. (2006). Screening for bacteriocin-producing lactic acid bacteria from boza, a traditional cereal beverage from Bulgaria: Comparison of the bacteriocins. *Process Biochemistry* 41, 11-19.
- Todorov S.D., Holzapfel W. H. (2015). Traditional cereal fermented foods as sources of functional microorganisms. En: *Advances in Fermented Foods and Beverages Improving Quality, Technologies and Health Benefits* (Holzapfel W.), Pp. 123-153. Woodhead Publishing, Cambridge.
- Tolinački, M., y J. Lozo, A. Terzic-Vidojevic, L. Topisirovic, D. Fira M. Kojic. (2010). Characterization of the bacteriocin-producing strain *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* b9. *Archives of Biological* 62, 889-899.
- Van Reenen C. A., Dicks L. M., Chikindas M.L. (1998). Isolation, purification and partial characterization of plantaricin 423, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Applied Microbiology* 84, 1131-1137.
- Verma A. K., Banerjee R., Dwivedi H. P., Juneja V. K. (2014). BACTERIOCINS, Potential in food preservation. En: *Encyclopedia of Food Microbiology* (BattMary C. A., Tortorello L.), Pp. 180-186. Academic Press, Oxford.
- Wojtatowicz M., Chrzanowska J., Juszczak P., Skiba A., Gdula A. (2001). Identification and biochemical characteristics of yeast microflora of Rokpol cheese. *International Journal of Food Microbiology* 69, 135-140.