

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE
ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR DE ORIHUELA

Master Universitario Oficial de
Agroecología, Desarrollo Rural y Agroturismo



Aplicación de aceite esencial de *Origanum*
***compactum* ecológico para el control de**
levaduras alterantes en queso fresco.

TRABAJO FIN DE MASTER

Convocatoria 2015

AUTOR: Francisco José Larrosa Moreno

DIRECTOR/ES: Esther Sendra Nadal

Estrella Sayas Barberá



Se autoriza al alumno **D. FRANCISCO JOSÉ LARROSA MORENO** a realizar el Trabajo Fin de Máster titulado: “Aplicación de aceite esencial de *Oreganum compactum* ecológico para el control de levaduras alterantes en queso fresco”, bajo la dirección de Dña. Esther Sendra Nadal, y la codirección de Dña. Estrella Sayas Barberá debiendo cumplir las directrices para la redacción del mismo que están a su disposición en la asignatura.

Orihuela, 12 de febrero de 2015

Fdo.: Gema Romero Moraleda

Directora del Master Universitario en Agroecología, Desarrollo Rural y Agroturismo





**MASTER UNIVERSITARIO OFICIAL DE
AGROECOLOGÍA, DESARROLLO RURAL Y
AGROTURISMO**

VISTO BUENO DEL TRABAJO FIN DE MÁSTER

CURSO 2014/2015

Director/es del trabajo
Esther Sendra Nadal María Estrella Sayas Barberá

Dan su visto bueno al Trabajo Fin de Máster

Título del Trabajo
Aplicación de aceite esencial de <i>Origanum compactum</i> ecológico para el control de levaduras alterantes en queso fresco.
Alumno
Francisco José Larrosa Moreno

Orihuela, a 30 de Julio de 2015

	 por ausencia.
Esther Sendra Nadal	María Estrella Sayas Barberá
Firma/s directores/es trabajo	



MASTER UNIVERSITARIO OFICIAL DE AGROECOLOGÍA, DESARROLLO RURAL Y AGROTURISMO

REFERENCIAS DEL TRABAJO FIN DE MÁSTER

Título: Aplicación de aceite esencial de *Origanum compactum* ecológico para el control de levaduras alterantes en queso fresco.

Modalidad (proyecto/experimental/bibliográfico/caso práctico): Experimental.

Autor: Francisco José Larrosa Moreno

Director/es: Esther Sendra Nadal y Estrella Sayas Barberá

Convocatoria: 2015

Número de referencias bibliográficas: 22

Número de tablas: 8

Número de figuras: 10

Palabras clave: *Origanum compactum*, aceite esencial ecológico, *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia fermentans*, leche desnatada, leche entera y queso fresco.

RESUMEN:

Se evaluó el efecto antimicrobiano del aceite esencial (AE) de orégano (*Origanum compactum*) ecológico sobre las levaduras alterantes de productos lácteos: *Debaryomyces hansenii* (DH), *Kluyveromyces marxianus* (KM) y *Pichia fermentans* (PF), en los medios leche desnatada (LD) (0,3 % materia grasa), leche entera (LE) (3,6 % materia grasa) y queso fresco (> 25% materia grasa, 5 % proteína). Para ello se realizaron pruebas de microdilución para leche desnatada y leche entera y pruebas de inoculación en queso fresco. Los resultados obtenidos en la microdilución muestran un mayor poder de inhibición en leche desnatada que en leche entera para todas las levaduras. Podemos afirmar en base a ello que la grasa de la matriz ejerce un papel protector sobre las levaduras. Tras los resultados obtenidos en las pruebas de inoculación en queso fresco, vimos que la presencia de AE de orégano no afecta al crecimiento de *K. marxianus*, mientras que en *D. hansenii* y *P. fermentans* se produce un descenso en el recuento de colonias al aumentar la concentración de aceite esencial.

Contenido

1	Introducción y antecedentes del tema.....	9
1.1	Uso de <i>Origanum compactum</i> como antimicrobiano.	9
1.2	Conservantes químicos de uso en productos lácteos.	11
2	Objetivos.....	14
2.1	Principales.....	14
2.2	Específicos.	14
3	Materiales y métodos.....	16
3.1	Aceite esencial	16
3.2	Pruebas de microdilución en placa: concentración mínima inhibitoria.	17
3.2.1	Recuperación de las levaduras.....	17
3.2.2	Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC)	18
3.3	Pruebas de inoculación en queso fresco: efecto de la concentración.....	22
3.4	Pruebas de inoculación en queso fresco: conservación en refrigeración.	23
3.5	Tratamiento estadístico de los resultados.	24
4	Resultados y discusión.	26
4.1	Concentración mínima inhibitoria.	26
4.2	Control de levaduras en queso fresco mediante aceite esencial de <i>Origanum compactum</i>	29
5	Conclusiones.....	35
6	Referencias.	37

Índice de tablas

Tabla 1. Composición del aceite esencial de <i>Origanum compactum</i> determinado por cromatografía gaseosa. Fuente: Parra, 2014.....	16
Tabla 2. Concentraciones de AE en cada pocillo de la microplaca.....	21
Tabla 3. Resultados de inhibición obtenidos en la microdilución tras 48 horas de incubación (27/02/2015).....	27
Tabla 4. Concentración mínima inhibitoria (MIC) en medio de cultivo. Fuente: Parra, 2014.	28
Tabla 5. Concentración mínima inhibitoria (MIC) en leche desnata y leche entera.	29
Tabla 6. Resultados del control de <i>Debaryomyces hansenii</i> en queso fresco mediante aceite esencial de <i>Origanum compactum</i>.	30
Tabla 7. Resultados del control de <i>Kluyveromyces marxianus</i> en queso fresco mediante aceite esencial de <i>Origanum compactum</i>.	31
Tabla 8. Resultados del control de <i>Pichia fermentans</i> en queso fresco mediante aceite esencial de <i>Origanum compactum</i>.	32

Índice de Figuras

Figura 1. Estructura química de los compuestos principales del aceite esencial de orégano. Fuente: Adaptado de Hyldgaard, et al, (2012).	10
Figura 2. Esquema de la microplaca utilizada.	19
Figura 3. Microplacas preparadas para la incubación durante 24 horas.	20
Figura 4. Microplaca y placas Petri preparadas para la siembra de las muestras de cada pocillo.	21
Figura 5. Esquema de las etiquetas de cada muestra de queso fresco.	22
Figura 6. Procedimiento realizado en la pesada del queso fresco.	23
Figura 7. Preparación de la muestra previa a la introducción al Stomacher.	23
Figura 8. Placas para determinar la MIC de <i>Debaryomyces hansenii</i> en leche desnatada y leche entera.	27
Figura 9. Placas para determinar la MIC de <i>Kluyveromyces marxianus</i> en leche desnatada y leche entera	27
Figura 10. Placas para determinar la MIC de <i>Pichia fermentans</i> en leche desnatada y leche entera	28



Introducción

1 Introducción y antecedentes del tema.

Los aceites esenciales son compuestos volátiles, naturales y complejos caracterizados por un fuerte olor y que forman parte de plantas aromáticas donde son metabolitos secundarios. Por lo general, se obtienen por extracción con vapor o hidro-destilación desarrollado por primera vez en la Edad Media por los árabes. Conocidos por sus propiedades antisépticas, es decir, bactericidas, virucidas y fungicidas, y propiedades medicinales y por su fragancia. Se utilizan en conservación de los alimentos y como antimicrobiano, analgésico, sedante, anti-inflamatorio, espasmolítico y anestésico local en remedios. Hasta el día de hoy, estas características de uso no han cambiado mucho, excepto que ahora se conoce más sobre algunos de su composición y sus mecanismos de acción, sobre todo a nivel de los antimicrobianos (Bakkali *et al*, 2008).

1.1 Uso de *Origanum compactum* como antimicrobiano.

Numerosos informes científicos han puesto de manifiesto la importante actividad antimicrobiana de los aceites esenciales (Delamare *et al*, 2007; Oussalah *et al*, 2007). Estas actividades biológicas dependen de la composición química (Chun *et al*, 2005), que varía de acuerdo con el origen geográfico, el medio ambiente y condiciones agronómicas, la etapa de desarrollo del material vegetal y el método de extracción (Goodner *et al*, 2006). Por lo tanto, Bouhdid, *et al* (2008) tras citar a los anteriores autores, afirma que la evaluación de la actividad biológica de un aceite esencial debe ser complementada con la determinación de su composición química. En dicho trabajo, Bouhdid, *et al* (2008) comprobaron que el aceite esencial de *O. compactum* mostraba *in vitro* una buena actividad antioxidante y efecto antibacteriano y que esta actividad podría atribuirse a los compuestos fenólicos presentes en este aceite. El resultado obtenido puede explicar el uso tradicional de esta planta.

El presente trabajo continúa el realizado por Parra (2014), quien determinó la composición química del aceite esencial de *Origanum compactum* que se ha utilizado. Los componentes principales del mismo son el Carvacrol en un 46,78%, el Timol en un 16,76%, γ -terpineno en un 16,31% y el Para-cimeno en un 9,69%. Componentes que coinciden con los determinados por Bouhdid, *et al* (2008) en aceite de orégano de la misma especie cultivado en Marruecos.

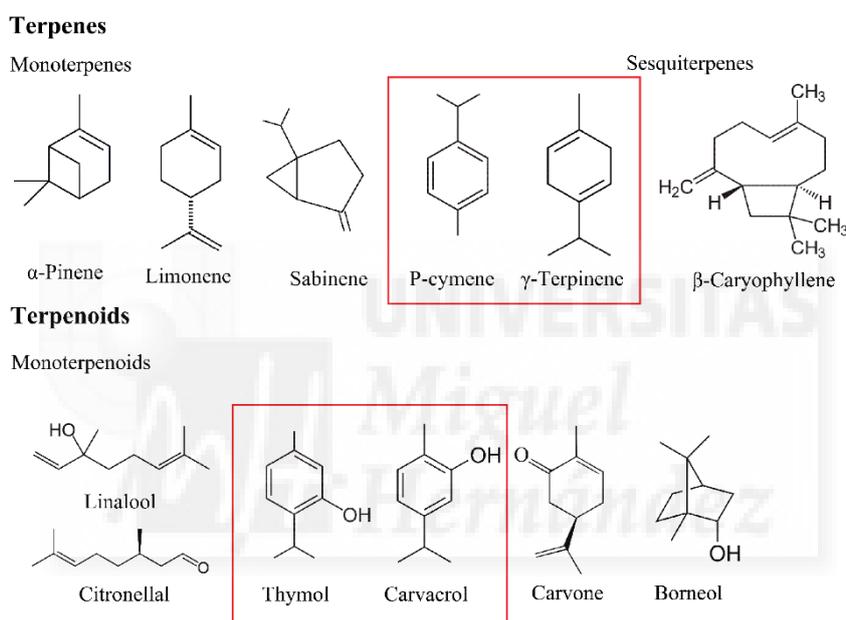


Figura 1. Estructura química de los compuestos principales del aceite esencial de orégano. Fuente: Adaptado de Hyldgaard, et al, (2012).

La estructura de los compuestos principales se muestra en la **Figura 1**. Muchos de ellos son de naturaleza fenólica y son los responsables de la acción antimicrobiana. Según Hyldgaard, Mygind and Meyerl, (2012) en su revisión del mecanismo de acción antifúngica de los aceites esenciales citan a autores que indican que el precursor del carvacrol, p-cimeno (**Figura 1**), es un mono-terpeno que tiene un anillo de benceno sin grupos funcionales en sus cadenas laterales. El p-cimeno no es un compuesto antimicrobiano eficaz cuando se usa solo, pero potencia la actividad de los compuestos como el carvacrol. Varios estudios indican que el p-cimeno es probable que actúe como

una impureza de sustitución en la membrana, lo que perturba parte de la membrana de los microorganismos. El p-cimeno tiene una alta afinidad por las membranas y provoca la expansión de la membrana y afecta el potencial de membrana de las células intactas.

En cuanto al carvacrol (**Figura 1**), Hyldgaard, *et al*, (2012), en un trabajo de revisión, lo definen como un monoterpenoide fenólico y un componente importante del orégano. Junto con el timol, isómero estrechamente relacionado, es uno de los constituyentes de aceite esencial más estudiado por su efecto antimicrobiano. El efecto antimicrobiano del carvacrol, similar al del timol, causa daños estructurales y funcionales a la membrana celular. En su revisión bibliográfica Hyldgaard, *et al*, (2012), comentan en alusión a otros autores que el mecanismo de la actividad antifúngica de carvacrol se asemeja a la de timol, que muestra la interrupción de Ca^{2+} y H^+ homeostasis, subiendo y bajando regulación de transcripción genética similar a Ca^{2+} el estrés y el hambre de nutrientes, la interrupción de la integridad y el deterioro de la biosíntesis de ergosterol en la membrana cepas de *Candida*.

El modo de acción del timol, un monoterpenoide fenólico uno de los principales componentes del aceite de tomillo, ha recibido mucha atención de por parte de los investigadores. El timol es estructuralmente muy similar al carvacrol, que tiene el grupo hidroxilo en una posición diferente en el anillo fenólico (**Figura 1**). La acción antimicrobiana de los compuestos fenólicos, tales como timol y carvacrol, causan daños estructurales y funcionales a la membrana citoplasmática (Sikkema *et al*, 1995).

1.2 Conservantes químicos de uso en productos lácteos.

El ácido sórbico y sus sales son los antifúngicos más empleados en la formulación de productos lácteos. De hecho, Luck, (1990) comenta que debido a su inercia fisiológica, su eficacia incluso en el rango de pH ligeramente ácido y su sabor neutro, el ácido

sorbico y sus sales se han convertido en los principales conservantes en el sector de alimentos en todo el mundo durante los últimos 30 años. Los productos más utilizados son el ácido sórbico en sí (E200) y el sorbato de potasio (E202), aunque en algunos países el sorbato de sodio (E201) y el sorbato de calcio (E203) también están permitidos. De todos ellos, el sorbato de sodio tiene una mejor solubilidad que el ácido sórbico (muy poco soluble en agua) y el sorbato de potasio es muy libremente soluble. Se prefieren los sorbatos solubles cuando se desea utilizar el conservante en forma líquida, o cuando los sistemas acuosos son los que se desean preservar. Este autor también comenta que el sorbato de sodio es inestable en forma sólida y se oxida muy rápidamente cuando se expone al oxígeno atmosférico, sin embargo, en soluciones acuosas de sorbato de sodio permanece estable durante algún tiempo. Por otro lado, el sorbato de calcio se utiliza en la fabricación de envolturas de fungistáticos porque es altamente estable a la oxidación, pero este uso es muy limitado. El ácido sórbico y los sorbatos se pueden añadir directamente a los productos aunque por lo general suelen ser sumergidos o rociados con soluciones acuosas de los sorbatos. Aplicar ácido sórbico seco a los alimentos también es posible, pero menos recomendable porque el ácido sórbico irrita la piel y las membranas mucosas. El ácido sórbico y, particularmente, el sorbato de calcio se pueden utilizar como sustancias activas en envolturas fungistáticas.

Fuselli, *et al*, (2012) en su trabajo sobre detección de conservantes en quesos indica que el ácido sórbico, o sus sales de Ca y K (E200-203), son utilizados como antimicrobianos en la prevención del desarrollo de mohos y levaduras en quesos. En elaboración de alimentos ecológicos se tiende a la eliminación de los conservantes químicos, dado que se ha probado el efecto inhibitor del aceite de *O. compactum* frente a diversas levaduras (Parra, 2014) se parte de la hipótesis de que este aceite también inhibirá a esas mismas levaduras en matrices alimentarias, concretamente leche y queso fresco.



Objetivos

2 Objetivos.

2.1 Principales.

- El objetivo principal es evaluar el efecto que tiene el aceite esencial de *Origanum compactum* procedente de cultivo ecológico en la inhibición de las levaduras *Kluyveromyces marxianus* CECT 1043, *Debaryomyces hansenii* CECT 11379 y *Pichia fermentans* CECT 1455 sobre matrices reales (leche entera, leche desnatada y queso fresco). Con ello se pretende contribuir a la conservación de productos lácteos mediante la reducción o sustitución de conservantes químicos por ingredientes de origen ecológico como el aceite esencial objeto de estudio.

2.2 Específicos.

- Determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) del crecimiento de las levaduras (*Kluyveromyces marxianus* CECT 1043, *Debaryomyces hansenii* CECT 11379 y *Pichia fermentans* CECT 1455) en leche entera (3,6% de materia grasa) y leche desnatada (0,3% de materia grasa) y con ello evaluar el posible efecto de la cantidad de materia grasa en el medio sobre la MIC de las levaduras objeto de estudio.
- Evaluar el efecto del aceite esencial de *Origanum compactum* de origen ecológico en el control de las citadas levaduras inoculadas en queso fresco de coagulación ácida.



Materiales y métodos

3 Materiales y métodos.

3.1 Aceite esencial

El aceite esencial de *O. compactum* proveniente de la empresa Herbes del Molí S.L. fue analizado por Parra (2014) mediante GC-MS y comparado los espectros obtenidos con la librería de identificación del software. En la siguiente **Tabla 1**, realizada por Parra (2014), se muestra el tiempo de retención de cada uno de los componentes así como el porcentaje relativo del área de cada compuesto respecto al área total del cromatograma determinado por la inyección en el GC/FID.

Tabla 1. Composición del aceite esencial de Origanum compactum determinado por cromatografía gaseosa. Fuente: Parra, 2014

Compuesto	Tiempo de retención (minutos)	% Área del perfil total
α -felandreno	9,091	0,51
Trans-beta-ocimeno	9,401	0,69
Canfeno	9,963	0,09
3-octanona	10,667	0,10
Mirceno	10,796	1,63
α -felandreno	11,629	0,23
Trans-beta-ocimeno	11,733	0,07
α -terpineno	11,986	2,10
Para-cimeno	12,287	9,69
Limoneno	12,444	0,33
Sabineno	12,579	0,20
1,8-cineol	12,665	0,08

trans-beta-cimeno	12,826	0,07
γ-terpineno	13,530	16,31
Terpinoleno	14,630	0,13
Para-cymenil	14,833	0,11
α-terpinoleno	15,018	1,34
3,5-heptadien-2-uno	15,884	0,05
Acetato de cis-carvyl	16,951	0,04
4-terpineol	18,944	0,39
thimyl metil éter	21,338	0,09
Timol	23,750	16,76
Carvacrol	24,330	46,78
Trans-cariofileno	30,259	1,93
α-humuleno	31,890	0,09
β-bisaboleno	33,852	0,05
δ-cadineno	34,461	0,06
Óxido de cariofileno	37,600	0,08

3.2 Pruebas de microdilución en placa: concentración mínima inhibitoria.

3.2.1 Recuperación de las levaduras.

Previo a las pruebas de microdilución en placa, tuvimos que hacer una recuperación de las tres levaduras objeto de estudio [*Debaryomyces hansenii* CECT 11379 (DH), *Kluyveromyces marxianus* CECT 1043 (KM) y *Pichia fermentans* CECT 1455 (PF)] que se hallaban congeladas en caldo de malta con un 30 % de glicerol.

Por recomendación, para la obtención de una buena concentración de microorganismos que puedan ser viables como cepas de trabajo, se realizaron 3 pases de siembra de las levaduras en placas Petri después de su recuperación. (CECT, 2012)

Para ello el primer día (16/02/15) vertimos el contenido de cada tubo Eppendorf en dos tubos con Caldo Patata-Dextrosa (PDB) estéril que se encubaron a 26°C. Pasadas 48 horas se comprobó turbidez. Se realizó el segundo pase en medio líquido (PDB) y en Agar Patata Dextrosa (PDA). Para el segundo y tercer pase el procedimiento que se siguió fue el siguiente: tras la incubación de las levaduras y previa preparación y esterilización en autoclave de tubos de ensayo con medio de cultivo PDB, se tomó una muestra de los microorganismos con la ayuda de un asa de siembra y se pasó a los tubos de ensayo. Seguidamente se tomó 0,1 mL de la suspensión y se depositó en placas Petri, 0,1mL en cada una de ellas, donde con la ayuda de un asa de Digralsky se esparció realizando de esta forma una siembra por tapizado, repitiéndose el procedimiento para cada levadura, llevándolas posteriormente a incubar a 26°C.

3.2.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC)

El método de dilución en agar o en caldo como test de susceptibilidad microbiana es utilizado para determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) (CLSI, 1999), la cual es definida como la concentración más baja de sustancia que puede inhibir el crecimiento visible de un microorganismo después de incubar por 24 horas.

En la técnica de dilución en caldo, son utilizados tubos o microplacas (microdilución) que contienen concentraciones crecientes del extracto vegetal. El organismo en estudio es inoculado en los diferentes tubos o pozos de las microplacas y la MIC es determinada después de la incubación (Wilkinson, 2006). Los métodos de microdilución en caldo son una técnica útil para determinar MIC en un gran número de muestras.

Por tanto, una vez conseguida una buena concentración de levaduras se realizó el ensayo de microdilución (23/02/15). El objetivo de este ensayo es conocer el comportamiento de las levaduras en presencia del aceite esencial de orégano (en adelante AE) utilizando como medio leche entera (3,6% grasa) y leche desnatada (0,3% grasa). Para ello se dispuso de una microplaca estéril (IWAKI, microplate 96 well with lid, flat bottom. IWAKI, Japón) por cada medio y donde se siguió el siguiente procedimiento:

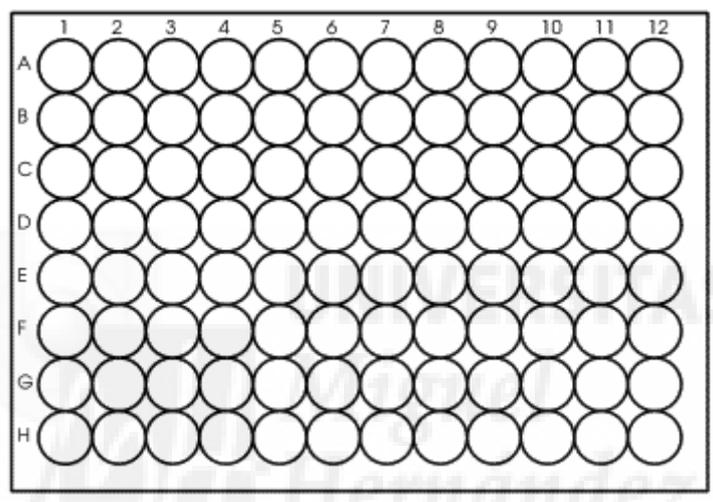


Figura 2. Esquema de la microplaca utilizada.

1. En primer lugar, a la primera columna de las 12 que forman la microplaca se adicionó 200 μ L de AE disuelto en Dimetil sulfóxido (DMSO) (concentración de 40 μ L/mL) en cada pocillo.
2. A continuación, en las 11 columnas restantes se adicionó 100 μ L de medio caldo extracto de malta con 2% de glucosa en cada pocillo.
3. Seguidamente, se tomaron 100 μ l de la solución de AE antes preparada y se mezclaron con los 100 μ L de medio de la columna contigua al AE, de esta mezcla se toman 100 μ L y se mezclan con la columna siguiente, repitiéndose el proceso hasta la columna 12, quedando disoluciones cada vez más pequeñas del AE.

4. Posteriormente, se adicionó nuevamente 95 μL de medio estéril en cada pocillo, quedando un total de 195 μl en cada pocillo.
5. Seguidamente, de los 8 pocillos que hay en el ancho de la microplaca, se dejaron los extremos como testigos y los 6 restantes se utilizaron 2 para cada levadura, en donde a cada pocillo se le adicionaron 5 μL del inóculo completándose un volumen total por pocillo de 200 μL . *Debaryomyces hansenii* en la fila B y C; *Kluyveromyces marxianus* en la fila D y E; *Pichia fermentans* en la fila F y G.
6. Finalmente se llevan las microplacas a un agitador a 150 rpm durante 2 minutos para su posterior incubación a 26°C durante 24 horas (**Figura 3**).

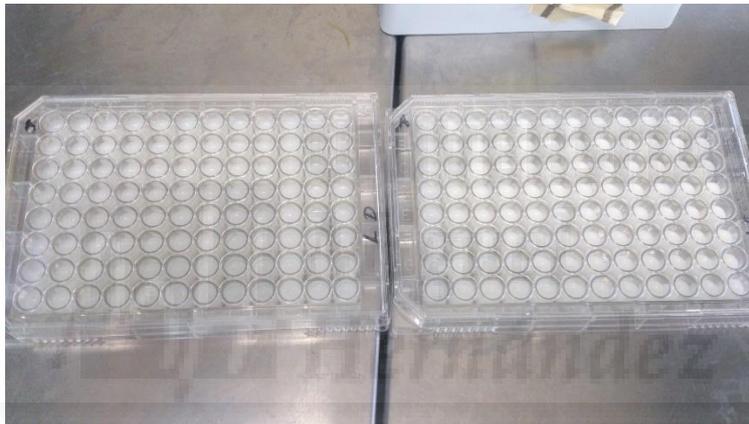


Figura 3. Microplacas preparadas para la incubación durante 24 horas.

En la microplaca se obtiene una concentración decreciente de AE que comienza con una concentración del 2% AE en el pocillo 1 y que dicha concentración se reduce a la mitad (1%) en el siguiente pocillo y así sucesivamente (concentraciones del 2% al 0,000975% de la columna 1 a la 12). (**Tabla 2**)

Tabla 2. Concentraciones de AE en cada pocillo de la microplaca

Nº de pocillo	Concentración (μL AE/ mL de medio)	Concentración (%)
1	20 μL / mL	2 %
2	10 μL / mL	1 %
3	5 μL / mL	0,5 %
4	2,5 μL / mL	0,25 %
5	1,25 μL / mL	0,125 %
6	0,625 μL / mL	0,0625 %
7	0,3125 μL / mL	0,03125 %
8	0,156 μL / mL	0,0156 %
9	0,078 μL / mL	0,0078 %
10	0,039 μL / mL	0,0039 %
11	0,0195 μL / mL	0,00195 %
12	0,00975 μL / mL	0,000975 %

Tras la incubación de las microplacas a 26 °C en la estufa, se toma muestra de cada pocillo y se siembra en placas Petri de YMA (Yeast Malt Agar, Oxoid) (25/02/2015) mediante asas de siembra estériles desechables y se deja crecer durante 24 horas a 26°C. Se realizaron lectura de los pocillos a las 24 y 48 horas. Como se puede observar en la **Figura 4** cada placa Petri se dividió en 12 porciones.



Figura 4. Microplaca y placas Petri preparadas para la siembra de las muestras de cada pocillo.

3.3 Pruebas de inoculación en queso fresco: efecto de la concentración.

Con los resultados obtenidos en la microdilución se decidió trabajar con concentraciones del 2%, 1% y 0.5% de AE para su aplicación a queso fresco de coagulación ácida (queso crema). Los ensayos se realizaron en queso blanco pasteurizado comercial cuyos ingredientes eran leche pasteurizada de vaca, nata pasteurizada de vaca, sal, estabilizantes (E-410 y E-407) y fermentos lácteos.

Para la inoculación en queso fresco se necesitó de la preparación de bolsas estériles con 5 gramos de queso fresco (± 0.1 g), preparadas en condiciones asépticas (**Figura 6**). A continuación, en dichas condiciones, se realizó el inóculo de la levadura y su correspondiente concentración de AE, en cada una de las bolsas y siguiendo el siguiente esquema:

	0	5 g de queso + 25 μ L AE 0.5 % AE A	5 g de queso + 50 μ L AE 1 % AE B	5 g de queso + 100 μ L AE 2 % AE C
0	00	0A	0B	0C
125 μ L DH	DH-0	DH-A	DH-B	DH-C
125 μ L KM	KM-0	KM-A	KM-B	KM-C
125 μ L PF	PF-0	PF-A	PF-B	PF-C

Figura 5. Esquema de las etiquetas de cada muestra de queso fresco.

Para cada una de las 16 muestras se realizaron ensayos por triplicado, obteniéndose un total de 48 muestras (02/03/2015). La contaminación inicial fue de 125 μ L de cada levadura, para conseguir una contaminación inicial de 2500 UFC/g de queso fresco.

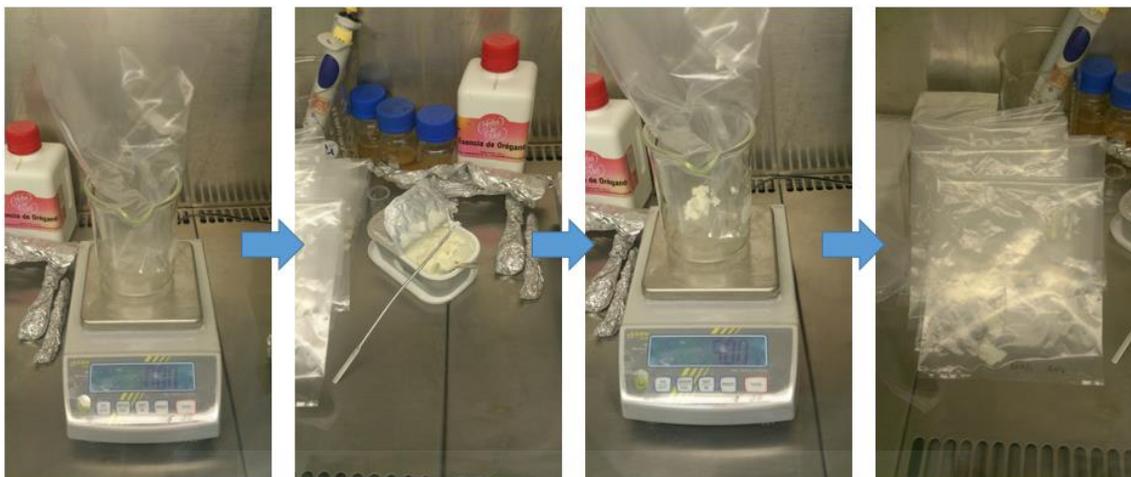


Figura 6. Procedimiento realizado en la pesada del queso fresco.

3.4 Pruebas de inoculación en queso fresco: conservación en refrigeración.

Las 48 muestras se conservaron en refrigeración y se muestrearon a los 7, 14 y 21 días. Para el análisis microbiológico, a cada bolsa que contenía 5 g de queso se adicionaron 45 mL de agua de peptona (AP) estéril (**Figura 7**) y se homogeneizó en Stomacher, obteniéndose una dilución 1:10. A partir de esta dilución se prepararon las diluciones 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} . Se realizaron las siembras de 0,1 ml en YMA, repartiendo la muestra por toda la superficie con un asa de Digralsky y en condiciones asépticas (10/03/2015; 18/3/2015; 25/03/2015).



Figura 7. Preparación de la muestra previa a la introducción al Stomacher.

3.5 Tratamiento estadístico de los resultados.

Para el estudio del efecto del aceite esencial en las poblaciones de levaduras en queso fresco se realizó un Procedimiento Lineal General con dos factores (concentración de aceite y tiempo de almacenamiento en refrigeración). A continuación, vista la ausencia total de diferencias causadas por el factor tiempo se realizó un análisis de la varianza ANOVA ONEWAY con factor concentración de aceite. La comparación de medias se realizó mediante test de Tukey con un 95% de confianza. El programa utilizado fue el IBM® SPSS® Statistics, versión 23.0.0.0.





Resultados y discusión

4 Resultados y discusión.

Respecto a la composición del aceite de *O. compactum* analizado por Parra (2014) por cromatografía gaseosa los componentes que se encuentran en mayor proporción son el Carvacrol con 46,78% del área total del perfil, el Timol con 16,76%, γ -terpineno con 16,31% y el Para-cimeno con 9,69%. Como pudo comprobar Parra (2014) en el análisis posterior, sus valores son similares con los obtenidos por otros autores. Por lo que podemos ver en los resultados anteriores, el AE de *O. compactum* y en general de la mayoría de especies de orégano, 2 de los componentes mayoritarios son el carvacrol y el timol los cuales según García y Palou (2008) son compuestos fenólicos que están presentes de manera natural en especies como el orégano y el tomillo; éstos presentan actividad antimicrobiana en ciertos microorganismos de interés en alimentos. Básicamente, su mecanismo de acción consiste en cambiar la permeabilidad de la membrana citoplasmática provocando la salida del material intracelular y por consiguiente provocando la muerte de los microorganismos.

4.1 Concentración mínima inhibitoria.

Con las placas de microdilución realizadas para leche entera y leche desnatada obtuvimos los resultados reflejados en la **Tabla 3**. Tras los resultados obtenidos podemos afirmar que *Debaryomyces hansenii* (**Figura 8**), *Kluyveromyces marxianus* (**Figura 9**), *Pichia fermentans* (**Figura 10**) se ven afectadas por la concentración de grasa del medio, ya que se inhiben en lechera entera (3.6% grasa) con una concentración de 10 μ L/mL de AE, mientras que en leche desnatada (0.3% grasa) se obtiene inhibición con una concentración menor (5 μ L/mL de AE en leche), de modo que la grasa tuvo un efecto protector para estas levaduras.

Tabla 3. Resultados de inhibición obtenidos en la microdilución tras 48 horas de incubación (27/02/2015).

Levadura	Tipo de medio	Inhibición en nº pocillo	
PF (CECT 1455)	Leche desnatada	1, 2 y 3	
	Leche entera	1 y 2	
KM (CECT 1043)	Leche desnatada	1, 2 y 3	1, 2, 3 y 4
	Leche entera	1 y 2	
DH (CECT 11379)	Leche desnatada	1, 2 y 3	
	Leche entera	1 y 2	



Figura 8. Placas para determinar la MIC de *Debaryomyces hansenii* en leche desnatada y leche entera.

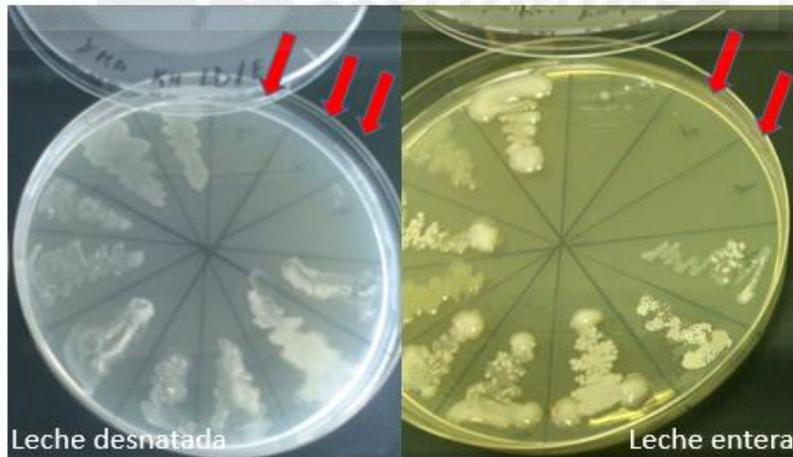


Figura 9. Placas para determinar la MIC de *Kluyveromyces marxianus* en leche desnatada y leche entera

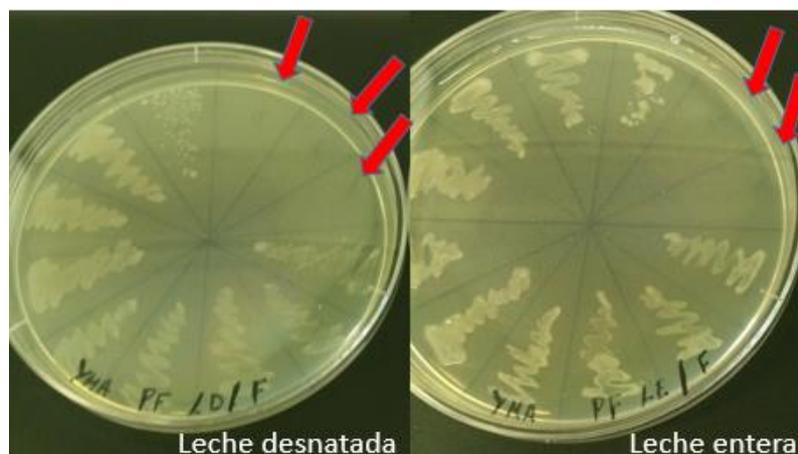


Figura 10. Placas para determinar la MIC de *Pichia fermentans* en leche desnatada y leche entera

El presente trabajo continúa el realizado por Parra (2014), destacar que él ensayó las mismas levaduras en medio de cultivo para MIC y realizó ensayos de inhibición en disco (medio sólido). En medio de cultivo extracto de malta con 2% de glucosa, el aceite esencial de *O. compactum* presentó una actividad antimicrobiana muy superior a la observada en leche desnatada y aún mayor en leche entera, por lo que el efecto de la matriz claramente ha interferido en los mecanismos de acción del aceite esencial de *O. compactum*. Pasar de una matriz simple, como un medio de cultivo, a una matriz compleja, como es la leche desnatada (con cantidad proteica alta) o leche entera (con una cantidad mayor de grasa), afecta negativamente al poder de inhibición del crecimiento que ejerce el AE de *O. compactum* sobre las levaduras objeto de estudio. Estas diferencias quedan claramente reflejadas en el MIC (**Tabla 4**) obtenido por Parra (2014) en comparación con nuestros resultados (**Tabla 5**).

Tabla 4. Concentración mínima inhibitoria (MIC) en medio de cultivo. Fuente: Parra, 2014.

LEVADURA	MIC en $\mu\text{l/ml}$
<i>Kluyveromyces marxianus</i> (CECT 1043)	0,625
<i>Debaryomyces hansenii</i> (CECT 11379)	0,312
<i>Pichia fermentans</i> (CECT 1455)	0,312

Tabla 5. Concentración mínima inhibitoria (MIC) en leche desnatada y leche entera.

Levadura	MIC en $\mu\text{L}/\text{mL}$	
	Leche desnatada	Leche entera
<i>Debaryomyces hansenii</i> (CECT 11379)	5 $\mu\text{L}/\text{mL}$	10 $\mu\text{L}/\text{mL}$
<i>Kluyveromyces marxianus</i> (CECT 1043)	5 $\mu\text{L}/\text{mL}$	10 $\mu\text{L}/\text{mL}$
<i>Pichia fermentans</i> (CECT 1455)	5 $\mu\text{L}/\text{mL}$	10 $\mu\text{L}/\text{mL}$

4.2 Control de levaduras en queso fresco mediante aceite esencial de *Origanum compactum*.

La adición de aceites esenciales modifica las propiedades sensoriales de los alimentos, son los alimentos habitualmente condimentados los mejores candidatos a la incorporación de aceites esenciales en su formulación. Ese sería el caso de quesos frescos con finas hierbas y otras especias y condimentos. Otra aplicación posible es su aplicación a la superficie de los quesos curados para inhibir el crecimiento de mohos y levaduras.

En cuanto al control de las levaduras en queso fresco mediante AE de *O. compactum* hemos obtenido resultados diferentes para cada una de las levaduras. En inóculo inicial de levaduras en queso fresco fue de 2500 UFC/g o lo que es lo mismo 3,4 log UFC/g. Tal y como se ha comentado en la sección de materiales y métodos (Tratamiento estadístico de los resultados.), los tiempos de conservación ensayados no dieron lugar a ninguna diferencia en los recuentos de levaduras entre los días 7 y 21 de almacenamiento, es por ello que se han simplificado las tablas a un único valor medio. Como se verá a continuación durante los 7 primeros días de almacenamiento del queso fresco las levaduras inoculadas pudieron crecer hasta valores de entre 5,2 y 6,7. La presencia de aceite ralentizó el crecimiento para algunas especies como se detallará a continuación.

Los resultados obtenidos para *Debaryomyces hansenii* quedan reflejados en la **Tabla 6** en la que se muestra la concentración de AE, la media de los logaritmos de UFC/g y la desviación estándar de los mismos. Como se puede observar en los resultados el crecimiento de *D. hansenii* para una concentración del 0,5 % de AE es similar al que se produce sin la presencia de AE, esto nos podría llevar a pensar que el AE de *O. compactum* no tiene efecto inhibitorio del crecimiento de *D. hansenii*, sin embargo, los resultados para una concentración del 1% nos muestran una reducción de 0,6 unidades logarítmicas. Finalmente para una concentración del 2% de AE se obtiene un descenso superior a la unidad logarítmica con respecto a lo observado en ausencia de AE. Los resultados obtenidos muestran una inhibición del crecimiento de *D. hansenii* en queso fresco a medida que aumenta la concentración de aceite esencial de *O. compactum*.

Tabla 6. Resultados del control de Debaryomyces hansenii en queso fresco mediante aceite esencial de Origanum compactum.

CEPA	ACEITE	MEDIA log	STD log
DH	0	6,65 ^c	0,17
	0,5	6,70 ^c	0,19
	1	6,09 ^b	0,31
	2	5,21 ^a	0,29

^{a,b,c} Valores con diferente letra difieren de forma significativa (p<0,05) según test de Tukey

Los resultados obtenidos para *Kluyveromyces marxianus* quedan reflejados en la **Tabla 7**. Como podemos observar el AE de *O. compactum* no reduce el crecimiento de *K. marxianus* inoculado en queso fresco. *K. marxianus* fue la levadura que experimentó un menor crecimiento en queso fresco, incluso en el control sin aceite, por tanto es la que menos se ve favorecida en el ambiente ácido del queso (pH 4,72).

Tabla 7. Resultados del control de Kluyveromyces marxianus en queso fresco mediante aceite esencial de Origanum compactum.

CEPA	ACEITE	MEDIA log	STD log
KM	0	5,49 ^a	0,23
	0,5	5,26 ^a	0,23
	1	5,28 ^a	0,18
	2	5,38 ^a	0,06

^{a,b,c} Valores con diferente letra difieren de forma significativa (p<0,05) según test de Tukey

Los resultados obtenidos para *Pichia fermentans* quedan reflejados en la **Tabla 8**. Como se puede observar, dichos resultados nos indican que el AE de *O. compactum* tiene un efecto inhibitorio del crecimiento de *P. fermentans* en queso fresco, ya que al aumentar la concentración de AE se va observando una reducción del crecimiento de la levadura. Con un 0,5% de AE se produce una reducción a la mitad del crecimiento observado en ausencia de AE. Con una concentración de 2% de AE se produce una reducción superior a una unidad logarítmica con respecto al obtenido en ausencia de AE. Los resultados para *P. fermentans* resultan prometedores al evidenciar inhibición de crecimiento, que al no haberse obtenido con las otras dos levaduras (*D. hansenii* y *K. marxianus*) apunta a que para su aplicación a la práctica industrial requeriría del estudio de la combinación del AE estudiado con otros para ampliar el espectro inhibitorio.

El estudio de la combinación de nuestro AE de *O. compactum* con otros similares sería interesante en la adición de los diferentes AE a quesos frescos especiados a las finas hierbas y otros productos similares que admitan la adición de especias.

Tabla 8. Resultados del control de *Pichia fermentans* en queso fresco mediante aceite esencial de *Origanum compactum*.

CEPA	ACEITE	MEDIA log	STD log
PF	0	6,56 ^c	0,10
	0,5	5,91 ^b	0,12
	1	5,69 ^b	0,35
	2	5,21 ^a	0,11

^{a,b,c} Valores con diferente letra difieren de forma significativa (p<0,05) según test de Tukey

A la vista de los resultados de Parra (2014) y los del MIC del presente estudio era esperable que al estar las levaduras en una matriz alimentaria compleja como el queso (el queso contiene más de un 25% de materia grasa y 5% de proteína) el efecto antifúngico fuera todavía menor al observado en leche. De hecho, mientras que un 1% de aceite inhibió totalmente a las levaduras en leche entera, la adición de un 2% de aceite en queso solo redujo 1,3 unidades logarítmicas en crecimiento de PF y 1,4 unidades a DH, mientras que no afectó a KM. Se precisan más estudios, en especial de combinación de este aceite con otros para evaluar la obtención de mayores niveles de inhibición.

El pH de nuestro queso fresco no presentó diferencias significativas entre las muestras sin aceite esencial y las que lo llevaban, estos datos coinciden con los obtenidos por Zantar *et al* (2014). Estos autores evaluaron el efecto de los aceites esenciales de *O. compactum* y de *Thymus vulgaris*, ambos procedentes del norte de Marruecos, sobre la vida útil del queso fresco de cabra, determinando que el más efectivo era el aceite esencial de *O. compactum*. Relativo al pH los autores Tserennadmid *et al* (2011) determinaron que *Origanum majorana*, procedente de Hungría, no tenía ningún efecto sobre la tasa de crecimiento ni fase de latencia de la levadura *Geotrichum candidum* (es

un problema común en leche cruda utilizada para la producción de quesos blandos y otros productos lácteos) a pH 5, pero en todos los demás valores de pH (rango de 4-7) la fase de latencia fue alargada y la tasa de crecimiento disminuida.

Por otro lado, Oussalah, Caillet, Saucier, Lacroix, (2006) comprobaron que *O. compactum* tiene un gran poder antimicrobiano para *Pseudomonas putida* un con un MIC de 0,05% de aceite esencial. El conocido poder antimicrobiano es la razón por la que se eligió el aceite esencial de *O. compactum*. El poder de retardar el crecimiento de microorganismos recae según Bouhdid, Abrini, Zhiri, Espuny, y Manresa (2009) en que el aceite esencial de *O. compactum* consigue alterar el potencial de membrana y la permeabilidad; la coagulación de materiales citoplasmática; liberación de vesículas de la membrana y la formación del mesosoma. Además el aceite esencial de *O. compactum* tiene otras propiedades, como pudieron constatar Raut y Karuppayil (2014) en su revisión sobre las propiedades medicinales de los aceites esenciales. En esta revisión citan en varias ocasiones el aceite *O. compactum* por las propiedades antimutagénicas y antioxidantes de sus componentes principales.

Los autores Gammariello, Conte, Lucera, Mastromatteo, Del Nobile (2014) realizaron un estudio para evaluar la efectividad de componentes naturales en la inhibición de levaduras en zumo de uva llegando a determinación que la combinación de varios de esos compuestos aumentaba la eficacia de inhibición. Además la temperatura no afectaba a la eficacia. Estos resultados obtenidos por Gammariello *et al* (2014) apoyan nuestra propuesta de investigación en la combinación del aceite esencial de *O. compactum* con otros similares que complementen y aumenten la efectividad del mismo.



Conclusiones

5 Conclusiones.

El aceite esencial de *Origanum compactum* de cultivo ecológico es capaz de inhibir a las levaduras *Pichia fermentans* CECT 1455, *Kluyveromyces marxianus* CECT 1043, *Debaryomyces hansenii* CECT 11379 en medio de cultivo, en leche desnatada y leche entera:

- La matriz de la leche reduce su capacidad inhibidora de modo que la efectividad disminuye en leche desnatada respecto al medio de cultivo
- La presencia de grasa reduce la efectividad antifúngica pues la efectividad en leche entera es menor que en leche desnatada.

En queso fresco de coagulación ácida inoculado con levaduras y con adición de aceite de *O. compactum* es posible el crecimiento de las levaduras durante los 7 primeros días de almacenamiento y posteriormente permanecen estables hasta los 21 días. Para *Pichia fermentans* CECT 1455 y *Debaryomyces hansenii* CECT 11379 a mayor concentración de aceite (entre 0 y 2%) menores son las poblaciones de levaduras. En cambio el crecimiento de *Kluyveromyces marxianus* CECT 1043 en queso fresco no se ve alterado por la presencia de aceite, de modo que la matriz queso fresco el aceite de *O. compactum* pierde toda su efectividad frente a esta levadura.

En el futuro es necesario evaluar la combinación del aceite de *O. compactum* con otros aceites o compuestos naturales con actividad antifúngica para proporcionar a la industria de alimentos ecológicos sustitutos adecuados para los antifúngicos de superficie de quesos y otros ingredientes saborizantes de origen ecológico para productos lácteos frescos.



Referencias

6 Referencias.

- BAKKALI, F., AVERBECK, S., AVERBECK, D., IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*. 2008. Vol. 46 pág. 446–475.
- BOUHDID, S., ABRINI, J., ZHIRI, A., ESPUNY, M. J., & MANRESA, A. Investigation of functional and morphological changes in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* cells induced by *Origanum compactum* essential oil. *Journal of Applied Microbiology*. 2009. Vol. 106, pages 1558-1568.
- BOUHDID, S., SKALI, S. N., IDAOMAR, M., ZHIRI, A., BAUDOUX, D., AMENSOUR, M. AND ABRINI, J. Antibacterial and antioxidant activities of *Origanum compactum* essential oil. *African Journal of Biotechnology*. 2008. Vol. 7 (10), p. 1563-1570.
- CECT.org. Yeast. [en línea]. [Consulta de 30 Junio de 2015]. Disponible en:
 1. <http://www.cect.org/vstrn2.php?cect=1043&lan=es>
 2. <http://www.cect.org/vstrn2.php?cect=11379&lan=es>
 3. <http://www.cect.org/vstrn2.php?cect=1455&lan=es>
- CHUN SS, VATTEM DA, LIN YT, SHETTY K. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. *Process Biochem*. 2005. Vol. 40: 809-816.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). "Methodology for the serum bactericidal test. Document M21-A. 1999. vol. 19, N° 17. ISBN 1-56238-383-3. [Consulta de 30 Junio de 2015]. Disponible en:
http://shopping.sandbox.netsuite.com/c.1253739/site/Sample_pdf/M21A_sample.pdf

- COLECCIÓN ESPAÑOLA DE CULTIVOS TIPO (CECT). Instrucciones para la recuperación de cultivos liofilizados. 2012. Ed. 09. [en línea]. [Consulta de 30 Junio de 2015]. Disponible en:

http://www.cect.org/docs/recup_es.pdf
- DELAMARE APL, MOSCHEN-PISTORELLO IT, ARTICO L, ATTI-SERAFINI L, ECHEVERRIGARAY S. Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. *Food Chem.* 2007. Vol. 100: 603-608.
- FUSELLI, F. ET AL. Multi-detection of preservatives in cheeses by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B.* 906. (2012). p. 9– 18
- GAMMARIELLO, CONTE, LUCERA, MASTROMATTEO, DEL NOBILE. Anti-yeast activity of natural compounds: In vitro and in vivo tests. *Food packaging and shelf life.* 2014. Vol. 1, pages 30-37.
- GARCÍA GARCÍA, R. M. y PALOU GARCÍA, E. Mecanismos de acción antimicrobiana de timol y carvacrol sobre microorganismos de interés en alimentos. *Temas selectivos de Ingeniería de Alimentos.* 2008. vol.2, Nº. 2, p. 41-51.
- GOODNER KL, MAHATTANATAWEEA K, PLOTTO A, SOTOMAYOR JA, JORDAN MJ. Aromatic profiles of *Thymus hyemalis* and Spanish *T. vulgaris* essential oils by GC–MS/GC–O. *Ind. Crop Prod.* 2006. Vol. 24(3): 264-268.
- HYLDGAARD, M., MYGIND, T. AND MEYERL, R. L. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. 2012.

- LUCK, E. Food applications of sorbic acid and its salts. *Food Additives and Contaminants*. 1990. Vol. 7, issue 5, pag. 711-715
- OUSSALAH M, CAILLET S, SAUCIER L, LACROIX M. Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. *Meat Science*. 2006. Volume 73, pages 236–244.
- OUSSALAH M, CAILLET S, SAUCIER L, LACROIX M. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Contr.* 2007. Vol. 18: 414-420.
- PARRA TRIVIÑO, C. A. Control ecológico de levaduras alterantes en productos lácteos: ensayo de aceite esencial de *Origanum compactum*. Directoras Esther Sendra y Estrella Sayas [Trabajo Fin de Máster]. Septiembre de 2014.
- RAUT, KARUPPAYIL. A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial Crops and Products*. 2014. Vol. 62, pages 250–264.
- SIKKEMA, J., DEBONT, J. A. M., AND POOLMAN, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol.Rev.* 1995. Vol. 59, p. 201–222
- TSERENNADMID ET AL. Anti-yeast activities of some essential oils in growth medium, fruit juices and milk. *International Journal of Food Microbiology*. 2011. Vol. 144, pages 480–486.
- WILKINSON, J. M. Methods for testing the antimicrobial activity of extracts. *Modern Phytomedicine: Turning Medicinal Plants into Drugs*. 2006. P. 157-171.
- ZANTAR, S., YEDRI, F., MRABET, R., LAGLAOUI, A., BAKKALI, M., ZERROUK, M.H. Effect of *Thymus vulgaris* and *Origanum compactum* essential

oils on the shelf life of fresh goat cheese. *Journal of Essential Oil Research*. 2014.

Volume 26, Issue 2, 4, Pages 76-84

