

Tomillo (*Thymus vulgaris*) como agente antimicrobiano en la producción de queso fresco

Ana Mejía-López¹, Byron Herrera¹, Mario Salazar¹, Fernanda Rojas¹, Verónica Gavín¹, José Antonio Escobar²

¹Universidad Nacional de Chimborazo, Carrera de Ingeniería Agroindustrial

²Universidad Estatal Amazónica, Carrera de Ingeniería Agroindustrial

060111-RIOBAMBA-ECUADOR

anamejia@unach.edu.ec

Resumen

Se evaluó el efecto de la utilización de las hojas de tomillo (*Thymus vulgaris*) en el desarrollo de *Staphylococcus aureus*, microorganismo que está asociado con brotes de intoxicaciones alimentarias y que comúnmente se encuentra presente en queso fresco de tipo artesanal. Para ello se elaboró queso inoculando cepas de *S. aureus* ATCC 25923 previamente suspendida con una turbidez equivalente a la escala 0.5 de McFarland y se evaluó a través de un diseño completamente al azar con 3 repeticiones, donde los factores en estudio fueron 2 tipos de procesos (1) en hojas incorporadas en el queso, (2) en infusión en el agua de salado y 4 concentraciones (0, 1, 0,75 y 0,5%). Se determinaron las unidades formadoras de colonias siguiendo la metodología oficial APHA en los días 1, 8, 15, y 30 después de su producción. Como resultado se obtuvo una reducción significativa de la carga microbiana en las placas experimentales (1 y 0,75% con tomillo) en comparación con las placas de control (0%) en el proceso 1, mientras que existió reducción para todas las concentraciones ensayadas cuando se adicionó el tomillo en infusión durante el salado del queso. Se concluye que a mayor concentración de Tomillo mayor el efecto inhibitorio sobre *S. aureus* y que podría utilizarse en la conservación de alimentos como principales compuestos antimicrobianos naturales a fin de asegurar la producción de alimentos microbiológicamente estable.

Palabras claves: Queso, inhibición de *Staphylococcus aureus*, tomillo.

Summary

The effect of the use of the thyme *Thymus vulgaris* leaves in the development of *Staphylococcus aureus*, a microorganism that is associated with outbreaks of food poisoning and which is commonly present in fresh cheese of the artisanal type, for this purpose, cheese was prepared by inoculating strains of *S. aureus* ATCC 25923 previously suspended with a turbidity equivalent to the scale of

0.5 McFarland, and was evaluated through a completely randomized design with 3 replicates, where the factors under study were 2 types of processes (1) in sheets incorporated in cheese, (2) in infusion in salty water and 4 Concentrations (0, 1, 0.75 and 0.5%). Colony forming units were determined following the official APHA methodology on days 1, 8, 15, and 30 after their production. As a result, a significant reduction of the microbial load in the experimental plates (1 and 0.75% with thyme) was obtained in comparison to the control plates (0%) in process 1, whereas there was reduction for all the concentrations tested when added the infused thyme during the salting of the cheese. Concluding that at greater concentration of Thyme greater inhibitory effect on *S. aureus* and could be used in the preservation of food as the main natural antimicrobial compounds in order to ensure the production of microbiologically stable food.

Key words: Cheese, inhibition of *Staphylococcus aureus*, thyme

Introducción

El queso fresco es uno de los alimentos de mayor producción y consumo, que mayoritariamente se produce en forma artesanal, con el empleo en muchas ocasiones de leche sin pasteurizar, con procesos no tecnificados (Cervantes, Villegas, Vargas, & Ortega, 2006), con deficiencia en el proceso, manipulación, conservación, transporte y distribución o comercialización (Peña, 2013), esto trae como consecuencia que estos productos sean altamente perecederos y su consumo constituya un riesgo potencial para la salud (Díaz-Rivero, 2001).

Por otra parte estudios realizados en Ecuador sobre el perfil microbiológico del queso fresco concluyeron que la carga microbiana (bacterias aerobias mesofilas, *Staphylococcus aureus*, coliformes totales *Escherichia coli*) presentes en éstos, exceden los límites permitidos por la norma

NTE- INEN 1528-2012 (Castillo, 2013; Haro, 2016; Gómez 2017). También se ha señalado que cargas superiores a 105 UFC/g en los alimentos de *Staphylococcus* puede contener enterotoxinas que son los responsables de intoxicación alimentaria (Dinges, 2000). Debido al alto riesgo que presenta la contaminación microbiana en alimentos se han desarrollado diferentes métodos de conservación inclinándose en la actualidad a la utilización de productos naturales. En este sentido, han sido ampliamente estudiados y demostrados que los aceites esenciales y los extractos de cerca de 80 productos de origen vegetal como plantas medicinales y condimentos que contienen altos niveles de antimicrobianos con uso potencial en alimento (Nychas et al., 2003), algunas plantas que han sido estudiadas y han demostrado ser potenciales antibacterianos son ajo, cebolla, romero, cilantro, perejil, orégano, mostaza, tomillo y laurel entre otros

(Ismaiel y Pierson, 1990).

El *Thymus vulgaris* (Tomillo) es un subarbusto de la familia *Lamiaceae*, rica en aceite esencial, cuyo principal componente es el timol (Sartoratto et al., 2004 ; Falcone et al., 2007), compuesto responsable de la actividad antimicrobiana que actúa contra ciertos microorganismos de interés en alimentos como son: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Proteus vulgaris*, *Vibrio* spp, *Listeria monocytogenes* y *Propionibacterium acnes* (Mohsenzadeh, 2007; Snoussi et al., 2008), el mecanismo de acción consiste en cambiar la permeabilidad de la membrana citoplasmática provocando la salida del material intracelular lo que provoca la muerte de los microorganismos (García-García y Palou-García, 2008).

Con lo expuesto, el objetivo de este trabajo fue determinar el potencial antimicrobiano de las hojas deshidratadas de tomillo, como conservantes naturales, con el fin reducir la carga microbiana del *Staphylococcus aureus*, en el queso fresco como garantía de inocuidad y prolongación de la conservación en anaquel.

Materiales y Métodos

Este estudio fue desarrollado en el laboratorio de Procesos y de Control de Calidad de Alimentos de la Universidad Nacional de Chimborazo del cantón Riobamba, Provincia de Chimborazo, Ecuador.

Diseño experimental.

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar en dos procesos con tres repeticiones: Para el primer proceso se utilizó hojas de tomillo deshidratadas adicionadas directamente en el queso y para el segundo procesos se utilizó una infusión de las hojas durante el salado. Para cada proceso se trataron 48 unidades experimentales, que consistieron en la utilización del tomillo en 4 dosificaciones: 0% (muestra control); 1%; 0,75% y 0,5% analizados en 4 tiempos: a los 1, 8, 15 y 30 días después de la producción

Procedimientos

Tomillo: Se seleccionaron las hojas frescas que fueron lavadas en agua potable, desinfectadas con hipoclorito de sodio al 2% y secadas a una temperatura de 45°C durante 14 horas en un secador de bandejas con recirculación de aire caliente, luego fueron pulverizadas hasta un tamaño de partícula adecuado para la extracción.

Inóculo bacteriano: El procedimiento aplicado fue el descrito por Sacsquispe y Velásquez (2002). El inóculo fue preparado usando método directo de inoculación a partir de colonias aisladas, para lo cual con un asa bacteriológica se tomaron muestras de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y se suspendieron en un tubo de ensayo con 4.5 ml de suero fisiológico estéril hasta alcanzar una turbidez similar al tubo 0.5 de la escala de Mc

Farland, equivalente a una suspensión bacteriana de $1,5 \times 10^8$ UFC/ml. El estándar de turbidez se preparó agregado 0,5 ml de una solución de $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ al 1,175% P/V a 99,5 mL de una solución de H_2SO_4 0,18 M en constante movimiento para mantener la suspensión, la densidad correcta del estándar se verificó usando un espectrofotómetro Shimadshu, UV-1700, cuya absorbancia a 625 nm fue de 0,09.

Queso fresco: El procedimiento implicó las siguientes operaciones para el proceso 1: pasteurización de la leche a 70 °C por 10 minutos, enfriamiento rápido hasta alcanzar 40 °C, adición del 0.02% de cloruro de calcio, acondicionamiento de la leche a 36°C y adición de 1 ml del inóculo bacteriano por litro de leche. Seguidamente, a una temperatura de 35°C, se adicionó cuajo líquido y se dejó en reposo durante 30 minutos después se realizó el corte longitudinal y transversal de la cuajada, batido suave y reposo durante 15 minutos. Con la ayuda de una malla plástica estéril se elimina el suero, se realizó un lavado con agua pasteurizada, se ejecutó el segundo desuerado seguido por adición de 6 gramos de sal por litro de leche. Se adicionó hojas deshidratadas al 0 % (control), 0.5, 0.75 y 1% de concentración, se procedió al moldeado, enmallado, prensado por 3 horas y finalmente los quesos se sumergieron por 2 horas en una solución al 20% de sal en agua. Las muestras se sellaron al vacío y se almacenaron a 4°C.

Para el proceso 2 se realizaron los pasos descritos anteriormente hasta adición de 6 gramos de sal por litro de leche. Se continuó con el moldeado, enmallado y prensado por 3 horas. Los quesos se sumergieron por 2 horas en una solución al 20% de sal en agua (control) y otros se sumergieron por 2 horas en una solución al 20% de sal preparadas con infusión de las hojas de laurel al 0.5, 0.75 y 1% de concentración. Las muestras se sellaron al vacío y se almacenaron a 4°C

Pruebas microbiológicas: En los tiempos 1, 8, 15 y 30 días después de la producción se determinó *Staphylococcus aureus* según procedimientos de la APHA (Vanderzant y. Splittstoeser, 1992), por duplicado. Cada unidad experimental se trituró, cuarteó y se tomó una muestra 10 gramos que se homogeneizó con 90 ml de agua peptonada al 0.1 %, a partir de la cual se prepararon diluciones y se sembraron a profundidad en Agar Baird Parker y se incubó por 24 horas a 35° C.

Análisis estadístico.

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA, $p < 0.05$). Para ver diferencias entre las medias de los tratamientos, se llevó a cabo la prueba de Tukey utilizando el programa estadístico Minitab 17.

Resultados y Discusión

En la figura 2 se muestra el queso fresco elaborado con las hojas secas de tomillo al 1%, el mismo que

presentó una superficie de color blanco crema, con una débil brillantez, consistencia firme, ligeramente salado con puntos negruzcos aislados

por la presencia de las hojas de tomillo los mismos que no afectaron en su sabor ni en el olor.



Figura 2: Queso fresco fabricado con hojas de tomillo secas al 1%.

Fuente: Elaboración propia.

Morales (2015) analizó el efecto antimicrobiano del aceite esencial del Tomillo sobre la contaminación de *Listeria monocytogenes* en queso Ricotta y concluyó que las propiedades organolépticas del queso tratado con aceites esenciales de tomillo a concentraciones menores de 1,6% no afecta de manera significativa los aspectos sensoriales del queso.

En la figura 3 se representa el comportamiento de las bacterias durante el almacenamiento, se observó que, en la

muestra control el crecimiento del *S aureus* incrementa con el tiempo, mientras que los quesos que contenían 1% y 0,75% de tomillo existe una eliminación significativa del número de colonias desde el día 0 y tendiendo a una disminución progresiva con el tiempo de almacenamiento; los resultados de la determinación de *S aureus* en los quesos con contenido de tomillo del 0,5% muestran que desde el día 1 hasta el día 8 las colonias crecen, sin embargo a partir de este día existe una disminución de las unidades formado-

ras de colonias en la placa. En general, la adición de tomillo como ingrediente en la producción del queso fresco inhibió el crecimiento de *S. aureus* por lo

que la aplicación de este antimicrobiano natural proporcionaría una garantía de inocuidad y prolongación de la conservación en anaquel.

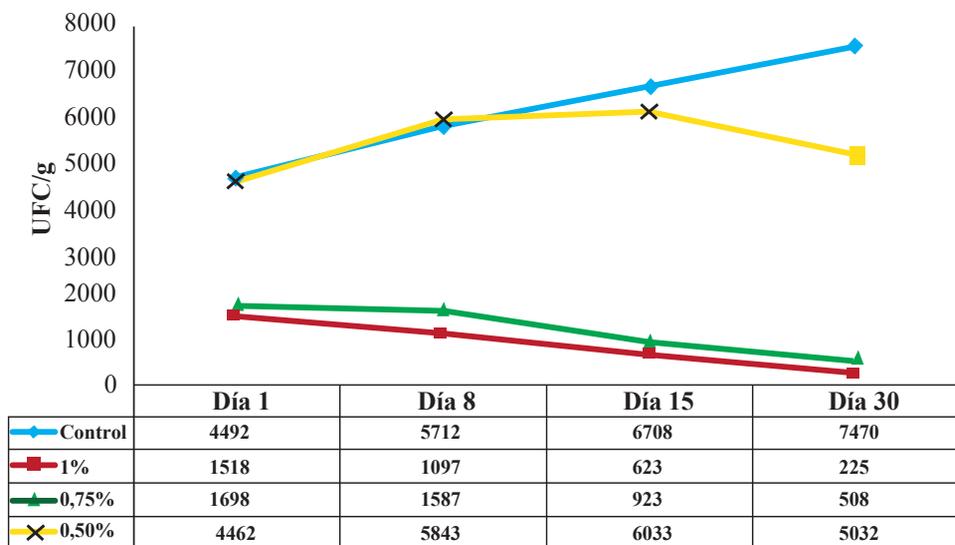


Figura 3: Comportamiento de *S. aureus* durante un periodo de 30 días de almacenamiento.

Fuente: Elaboración propia.

Con respecto a estos resultados en los estudios realizados por Juven *et al.* (1994) quienes utilizaron extractos de tomillo a diferentes concentraciones para tratar de inhibir *in vitro* bacterias gram positivas encontraron que había una concentración crítica donde el extracto tenía efecto, y a concentraciones menores no había actividad antimicrobiana. Así mismo en los estudios realizados por Elizari (2013) Determinó que la inhibición del crecimiento bacteriano aumentó con la concentración de los aceites esenciales, siendo óptima al 3% (p/p) aplica-

do en films de proteína del suero de leche.

En la figura 4 se muestran los valores medios de las unidades formadoras de colonias que mediante el análisis de Tukey a un nivel de significancia menor a 0,05 se puede observar que no hay diferencia significativa entre el control y los quesos con adición de 0,5% de hojas de tomillo, pero sí con los quesos con concentraciones de 0,75 y 1%, siendo estas dos concentraciones entre sí significativamente iguales.

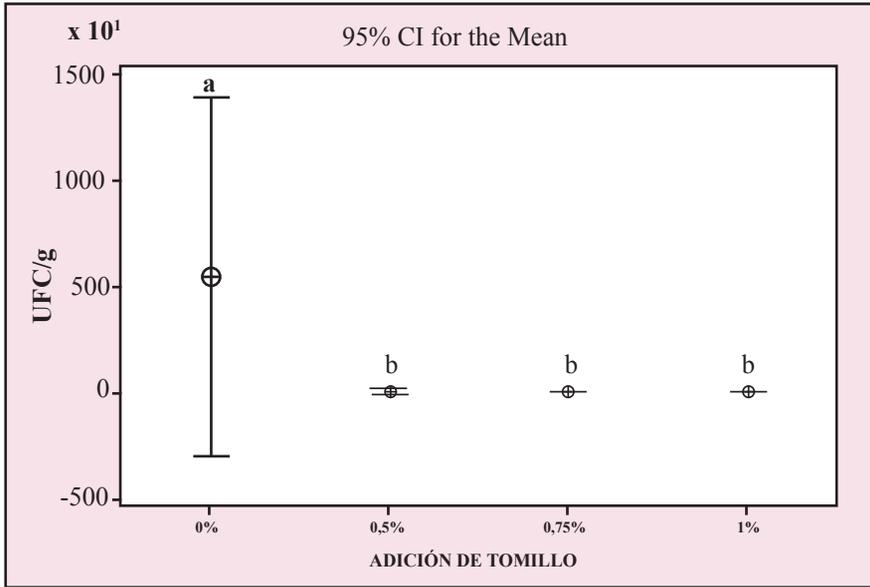


Figura 4: Medias y análisis de Tukey.

Los datos con letras iguales no presentan diferencias significativas.

Fuente: Elaboración propia.

En la figura 5 se observa el queso preparado por el proceso 2 indicado en el diagrama de la figura 1. El queso

presentó un ligero color amarillo sin alterar las otras propiedades organolépticas propias del queso fresco.



Figura 5: Queso fresco sumergido en solución de laurel 1% durante el salado.

Fuente: Elaboración propia.

Los resultados del análisis microbiológico en valores medios se reportan y grafican en figura 6.

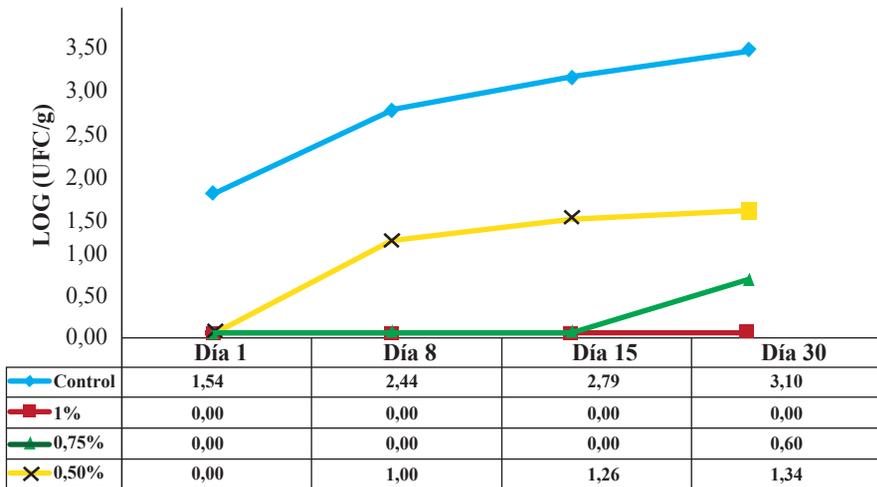


Figura 6. Comportamiento de *S. aureus* durante el almacenamiento (Proceso 2).
Fuente: Elaboración propia.

Se puede visualizar que el tomillo utilizado durante el salado del queso inhibió la cepa de *S. aureus* ATCC 25923 para todas las concentraciones

siendo significativamente diferentes en función del control e iguales entre sí como se observa en la figura 7.

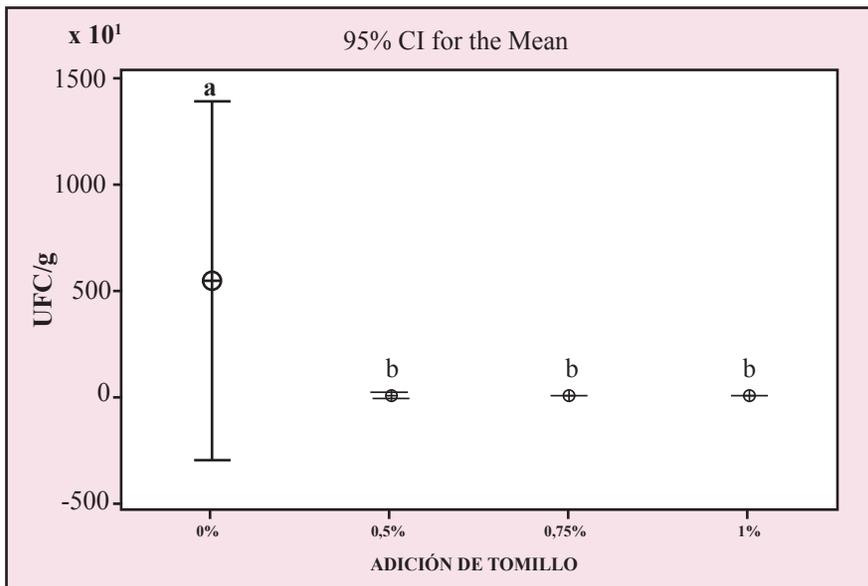


Figura 7. Medias y análisis de Tukey.

Conclusiones

El efecto inhibitorio del tomillo sobre el *S. aureus* fue dependiente de la cantidad de laurel agregada y de la carga microbiana inicial del microorganismo presente en el queso.

Se concluye que la adición de laurel al queso fresco disminuyó la supervivencia de *S. aureus* con mayor efectividad al adicionarlo en el salado del queso por lo cual podría ser utilizado en la industria de alimentos como agente antimicrobiano de origen natural para mejorar la calidad microbiológica del queso fresco

Literatura Citada

- Castillo Segovia, G. E. 2013. Prevalencia de Bacterias Patógenas *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus*, en Quesos Frescos Elaborados Artesanalmente en las Parroquias Rurales del Cantón Riobamba. Tesis de Bioquímico Farmacéutico. Escuela superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba, Ecuador, Pp.1-213.
- Cervantes, E. F., Villegas, G. A., Vargas, C. A., & Ortega, A. E. 2006. Los quesos mexicanos genuinos: un saber hacer que se debe rescatar y preservar. III Congreso Internacional de la Red SIAL "Alimentación y Territorios" (págs. 1-38). Baeza, España.
- Díaz-Rivero, C. 2001. *Staphylococcus aureus* en queso blanco fresco y su relación con diferentes microorganismos indicadores de calidad sanitaria. Revista de Salud Pública y Nutrición. Vol 2 (3).
- Dinges, M. P. 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev*, 13(1). 16-34.
- Elizari, R. 2013. Actividad antibacteriana de aceites esenciales de orégano y tomillo incorporados en soluciones formadoras de films sobre la microbiota superficial de filetes de merluza Tesis de maestría. Universidad Pública de Navarra. Pamplona, España. Pp 1-101
- Falcone, P., Mastromatteo, M., Del Nobile, M., Corbo, M., & Sinigaglia, M. 2007. Evaluating in vitro antimicrobial activity of thymol toward hygiene-indicating and pathogenic bacteria. *Journal of Food Protection*®, 70(2), 425-431.
- García-García y Palou-García. 2008. Mecanismos de acción antimicrobiana de timol y carvacrol sobre microorganismos de interés en alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 2(2): 41-51
- Gómez, B. J. P. 2017. Presencia de *Staphylococcus aureus* en quesos comercializados en la Ciudad de Milagro, Octubre–Noviembre 2013. Cumbres, 2(2).
- Haro, J. 2016. Análisis Microbiológico de los quesos frescos comercializados en el mercado Simón Bolívar (San Alfonso) de la ciudad de Riobamba Tesis de Bioquímico Farmacéutico. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba, Ecuador, Pp.1-85.
- Ismail, A. y Pierson, M.D. 1990. Inhibitory of growth and germination of *C. Botulinum* 33A, 40B y 1623E by essential oil of apices. *Journal of Food Science*, 55(6), 1676-1678
- Juven, B. J., Kanner, J., Schved, F., & Weisslowicz, H. 1994. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essen-

tial oil and its active constituents. *Journal of applied bacteriology*, 76(6), 626-631.

Mohsenzadeh M. 2007. Evaluation of antibacterial activity of selected Iranian essential oils against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in nutrient broth medium. *Pak J Biol Sci.* 10 (20):3693-7.

Morales, A. 2015. *Efecto Antimicrobiano del Aceite Esencial del tomillo (Thymus vulgaris) sobre la contaminación de Listeria monocytogenes en queso Ricotta* (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Colombia-Sede Medellín. Medellín, Colombia. 1-101

Nychas, G.J.E., P.N., Skandamis, C.C., Tassou. 2003. Antimicrobials from herbs and spices. En: *Natural Antimicrobials for the Minimal Processing of Foods*. Roller S. (Ed.). CRC Press. Washington, D.C. 9: 177-199)

Peña, Y. P. 2013. Agentes bacterianos asociados a brotes de enfermedades transmitidas por alimentos en *La Habana* 2016-2010. 51(1), 74-83.

Sartoratto A, Machado A, Delarmelina C, Figueira G, Duarte M, Rehder V. 2004. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian J. Microbiol.* 35:275-80

Snoussi M, Hajlaoui H, Noumi E, Usai D, Sechi L, Zanetti S, Bakhroul A. 2008. In-vitro anti-Vibrio spp. activity and chemical composition of some Tunisian aromatic plants. *World J Microbiol Biotechnol.* 24: 3071-6.

Vanderzant, C. and Splittstoesser, D. 1992. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. American Public Health Association. USA.