

**Efecto del pH en la actividad antimicrobiana
del aceite esencial de mostaza blanca contra
microorganismos de interés en alimentos**

Zoila Del Rosario Chévez Tepas

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano

Honduras

Noviembre, 2018

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

Efecto del pH en la actividad antimicrobiana del aceite esencial de mostaza blanca contra microorganismos de interés en alimentos

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniera en Agroindustria Alimentaria en el
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Zoila Del Rosario Chévez Tepas

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2018

Efecto del pH en la actividad antimicrobiana del aceite esencial de mostaza blanca contra microorganismos de interés en alimentos

Zoila del Rosario Chévez Tepas

Resumen. Las nuevas tendencias en la industria de los alimentos exigen reducir o eliminar el uso de aditivos sintéticos; una alternativa potencial es el uso de aceites esenciales de origen vegetal. El aceite esencial de mostaza blanca (WMEO) tiene como principal ingrediente activo el 4-hidroxi-bencil-isocianato (4-HBITC); y en limitadas investigaciones ha demostrado ser eficiente contra bacterias y levaduras. Para este estudio se determinó la relación que hay entre el pH y el efecto de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de mostaza blanca contra los microorganismos *Salmonella enterica* Typhimurium, *Candida krusei*, *Saccharomyces cerevisiae* en concentraciones de 0, 0.10 y 0.20% WMEO. Se usaron para *Salmonella* pH de 5, 6 y 7 y mediciones en el tiempo de 0, 8, 12, 24 y 48 horas. Para levaduras se usaron las mismas concentraciones de WMEO a pH de 4, 5 y 6 y las mediciones en el tiempo de 0, 24, 48 y 72 horas. Se encontró que la actividad antimicrobiana del aceite es más estable a pH 4 y 5, y funciona mejor con las levaduras. Hubo un sinergismo entre pH ácidos y concentración de WMEO. Para las levaduras no hubo diferencia estadística entre los tratamientos con pH 4 y 5, mientras que para *Salmonella* el efecto bactericida se demostró con tratamientos a pH 5. Se concluye que WMEO es más efectivo en pH 5 en los microorganismos estudiados, el pH por sí solo no demostró efectos antimicrobianos, para pH neutros se necesitan concentraciones más altas de WMEO.

Palabras clave: *Candida krusei*, *Saccharomyces cerevisiae* *Salmonella* Typhimurium

Abstract. New trends in the food industry are demanding the reduction or elimination of synthetic additives; a potential alternative is the use of essential oils from vegetable origin. The white mustard essential oil (WMEO) has as main active ingredient 4-hydroxy-benzyl-isocyanate (4-HBITC). Limited research has shown to be efficient against bacteria and yeasts. The main objective in this study was to determine the relationship between pH and the effect of antimicrobial activity of WMEO against foodborne microorganisms. The cultures used were *Salmonella enterica* Typhimurium, *Candida krusei*, *Saccharomyces cerevisiae*. Concentrations of 0, 0.10 and 0.20 % of WMEO were used for *Salmonella* at pH 5, 6 and 7. Measurements in time were 0, 8, 12, 24 and 48 hours, while for yeasts the same concentrations of WMEO were used, with pH of 4, 5, and 6. The measurements in time were 0, 24, 48 and 72 hours. The oil demonstrated to be more stable at pH within ranges 4 and 5. There was a synergy between low pH and WMEO concentration; for yeasts, there was no statistical difference between the treatments with pH 4 and 5, while for *Salmonella* the bactericidal effect was demonstrated in the treatments at pH 5. In conclusion, WMEO was more effective in treatment with pH in the microorganism studied. The pH itself did not show any antimicrobial effect, for neutral pH highest concentration of WMEO are needed.

Key words: *Candida krusei*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Salmonella* Typhimurium

CONTENIDO

Portadilla.....	i
Página de firmas.....	ii
Resumen.....	iii
Contenido.....	iv
Índice de Cuadros y Anexos	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	6
4. CONCLUSIONES.....	12
5. RECOMENDACIONES.....	13
6. LITERATURA CITADA.....	14
7. ANEXOS	17

ÍNDICE DE CUADROS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Tratamientos en <i>Salmonella enterica</i> Typhimurium con aceite esencial de mostaza blanca (WMEO)	4
2. Tratamientos usados para <i>Candida krusei</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i> con aceite esencial de mostaza blanca (WMEO)	5
3. Recuentos de <i>Salmonella enterica</i> Typhimurium (Log UFC/ml) según exposición a diferentes concentraciones de aceite esencial de mostaza blanca (WMEO) y pH.	7
4. Recuento de <i>Candida krusei</i> (Log UFC/ml) según exposición a diferentes concentraciones de aceite esencial de mostaza blanca (WMEO) y pH.	9
5. Recuentos de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Log UFC/ml) según exposición a diferentes concentraciones de aceite esencial de mostaza blanca (WMEO) y pH.	10
Anexos	Página
1. Resumen del análisis estadístico en experimentos con <i>Salmonella</i> Typhimurium.	17
2. Resumen del análisis estadístico en experimentos con <i>Candida krusei</i>	18
3. Resumen del análisis estadístico en experimentos con <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	18
4. Comportamiento de <i>Salmonella enterica</i> Typhimurium según exposición al aceite esencial de mostaza blanca (0.00, 0.10 y 0.20%) y pH (5, 6 y 7).	19
5. Comportamiento de <i>Candida krusei</i> según exposición al aceite esencial de mostaza blanca (0.00, 0.10 y 0.20%) y pH (4, 5 y 6).	20
6. Comportamiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> según exposición al aceite esencial de mostaza blanca (0.00, 0.10 y 0.20%) y pH (4, 5 y 6).	21

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad las personas se encuentran más interesadas por los alimentos que ingieren debido a que cuentan con mucha información. De acuerdo a la compañía de marketing MINTEL (MINTEL 2018) una de las tendencias para el presente año es la reducción del uso de aditivos sintéticos en los alimentos. El uso de aceites esenciales (EO) se considera una potencial alternativa para satisfacer la necesidad de los consumidores y de la misma forma brindar productos inocuos y de calidad. Por otra parte, los aceites esenciales son productos derivados de plantas, se caracterizan por ser hidrofóbicos y usualmente aromáticos (Capinera 2008). Poseen metabolitos secundarios generalmente volátiles que les otorgan propiedades antimicrobianas y antioxidantes por lo cual, la industria de los alimentos se ha interesado en el uso de estos. Además, son ingredientes biodegradables y tienen bajos niveles de toxicidad (Hyldgaard *et al.* 2012; Pino 2015).

Usar aceites esenciales en la industria alimentaria representa un reto debido a que los aislados de estos compuestos no son lo suficientemente potentes y pueden producir cambios organolépticos en los alimentos. Por lo tanto, es necesario tener conocimientos previos como la concentración mínima inhibitoria (MIC), propiedades del microorganismo objetivo, modo de acción de aceite y el efecto de los componentes de la matriz alimenticia en las propiedades del aceite (Hyldgaard *et al.* 2012).

El aceite esencial de mostaza blanca o conocido en inglés como: white mustard essential oil (WMEO). De acuerdo con el codex alimentarius es un producto extraído de la mostaza (*Sinapis alba*), principalmente de la semilla. Usado en limitadas investigaciones. En comparación con otros aceites, WMEO tiene una volatilidad baja e inestable en ambientes acuosos. El ingrediente activo es el 4-hidroxi-bencil-isocianato (4-HBITC) (Ekanayake *et al.* 2016). Se degrada con horas de exposición a la humedad eso lo convierte en un agente efectivo antibacteriano y antimicótico especialmente para productos sólidos (David 2014).

Por otra parte, WMEO ha demostrado ser efectivo contra microorganismos incluyendo bacterias como *Samonella* y *E. coli* además de algunas levaduras (Monu *et al.* 2014). *Salmonella* es una bacteria Gram negativa que no forma esporas, se caracteriza por ser móvil, con forma redondeada y pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y a la tribu *Salmonellae*. Crece en temperaturas entre 5 y 47 °C y se desarrolla en un rango de pH entre 4.5 y 9.0, debajo de un pH 4 puede ser inactivada (Pascual 2005). De acuerdo al CDC (2016) (Centers for Disease Control and Prevention), *Samonella* causa aproximadamente 1.2 millones de enfermedades y 450 muertes cada año en Estados Unidos.

Las levaduras son tipos de hongos unicelulares; hay diversas especies y algunas tienen roles importantes en los procesos de fermentación, en enfermedades de humanos y animales y el

deterioro de los alimentos (Fell *et al.* 2016). *Candida krusei* es una levadura que puede crecer en presencia de preservantes como el ácido sórbico y el ácido benzoico, crece a pH ácidos y en un rango de temperaturas entre 8 y 47 °C, esta levadura está relacionada a procesos fermentativos (Pitt y Hocking 2009). También se considera un microorganismo patógeno porque causa enfermedades en la piel afectando principalmente a pacientes inmunocomprometidos (Hayford y Jakobsen 1999; Pollyanna *et al.* 2018).

Por su parte, *Saccharomyces cerevisiae* es una levadura unicelular. Relacionada a la industria del vino, pan y cerveza por su capacidad fermentativa (Bom *et al.* 2001). Puede ser considerada un microorganismo deteriorador de alimentos, en vinos puede comenzar una segunda fermentación causando sabores indeseables (Rodríguez *et al.* 2013).

Se han realizado limitadas investigaciones con WMEO evaluando la interacción con otros aceites esenciales (Abrego *et al.* 2017). Con matrices alimenticias se han hecho investigaciones usando salsas (David *et. al* 2013) y pollo (Porter 2017). Sin embargo, no se han hecho investigaciones evaluando el pH, este puede variar dependiendo de la matriz alimentaria y se considera como una barrera para el desarrollo de los microorganismos. En este estudio se usarán diferentes rangos de pH junto con diferentes concentraciones de WMEO y se evaluará la actividad antimicrobiana, para lo cual se han establecido los siguientes objetivos:

- Evaluar la actividad antimicrobiana del aceite esencial de mostaza blanca usando diferentes rangos de pH contra microorganismos de interés en alimentos.
- Determinar la relación entre las variables pH, tiempo y concentraciones de WMEO contra el crecimiento de cada microorganismo.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación.

El proyecto fue realizado en la Universidad de Auburn situada en el estado de Alabama, Estados Unidos.

Cultivos utilizados.

Los cultivos utilizados para la investigación fueron *Salmonella enterica* Typhimurium obtenida del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA) Athens, Georgia. También se usó el cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex. E.C. Hansen (ATCC®9763™). *Candida krusei* fue obtenido de la Universidad de Tennessee, Estados Unidos.

Etapas 1. Efecto del pH en la actividad antimicrobiana del aceite esencial de mostaza blanca contra *Salmonella enterica* Typhimurium.

Preparación de cultivo. El cultivo de *Salmonella* se encontraba congelado por lo que primero se descongeló y fue inoculado en caldo de soya tripticasa (por sus siglas en inglés TSB) a 37 °C por 24 horas. Posteriormente se transfirieron 10 µL a TSB y se incubó a 37 °C por 24 horas. Se llevó el inóculo a 10⁷ UFC/mL, donde adicionalmente se realizó una siembra por superficie en agar de soya tripticasa (por sus siglas en inglés TSA) para comprobar la pureza y concentración del inóculo, se incubó a 37 °C por 24 horas.

Preparación de tratamientos con aceite esencial de mostaza blanca. Se usó una solución congelada de aceite esencia de mostaza blanca (WMEO) al 98% de pureza, se descongeló para crear dos concentraciones diferentes. La primera concentración se preparó añadiendo 0.376 mL de la solución descongelada de WMEO a 1.24 mL de dimetildisulfoxido (DMSO), resultando un tratamiento con un porcentaje de 0.20% de WMEO. Para la segunda concentración se tomaron 0.75 mL de la primera concentración y a esta se le añadieron 0.75 mL de TSB dando como resultado un porcentaje del 0.10%.

Se añadieron 0.2 mL de los tratamientos de WMEO a tres tubos de TSB con pH ajustado con HCl 0.1 N a 5, 6 y 7, y 20 µL del cultivo de *Salmonella*. Los controles no tenían ningún porcentaje de WMEO solamente 0.2 mL de DMSO. Los tubos de ensayo con los tratamientos fueron incubados a 25 °C durante dos días. Se realizaron muestreos de cada suspensión con tratamiento a 0, 8, 12, 24 y 48 horas. En cada muestreo se realizaron diluciones decimales con 9 mL de agua peptonada al 0.01% para realizar los conteos en

platos Petri con TSA que fueron incubados a 37 °C por 24 horas. Los tratamientos usados se encuentran descritos en el cuadro 1.

Cuadro 1. Tratamientos en *Salmonella enterica* Typhimurium con aceite esencial de mostaza blanca (WMEO).

pH	Concentración WMEO		
	0%	0.10%	0.20%
pH 5	T ₁ *	T ₂	T ₃
pH 6	T ₄ *	T ₅	T ₆
pH 7	T ₇ *	T ₈	T ₉

*Tratamientos control

Para cada tratamiento se tomaron datos de crecimiento a 0, 8, 12, 24 y 48 horas.

Diseño experimental.

Se usó un diseño experimental de Bloques Completos al Azar (BCA) con un arreglo factorial de 3x3x5, es decir, tres niveles de pH (5,6 y 7), tres concentraciones de WMEO (0, 0.10, 0.20%) y cinco mediciones en el tiempo (0, 8, 12, 24 y 48 horas). Se realizó una separación de medias Duncan y una separación de medias de cuadrados mínimos (LSMeans) para determinar las respectivas interacciones mediante el programa “Statistical Analysis System” SAS versión 9.4.

Etapas 2. Efecto del pH en la actividad antimicrobiana del aceite esencial de mostaza blanca contra *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida krusei*

Preparación de cultivo. Los cultivos de *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida krusei* se encontraban congelados por lo que primero se descongelaron y fueron inoculados en extracto de levadura-peptonada-dextrosa (por sus siglas en inglés YPD), a 32 °C por dos días. Posteriormente, se transfirieron 10 µL a YPD y se incubaron a 32 °C por 2 días. Se llevaron los inóculos a 10⁷ UFC/mL, donde adicionalmente se realizó una siembra por superficie para comprobar la pureza y concentración de cada uno de los inóculos, se incubaron a 32° por dos días.

Preparación de tratamientos con aceite esencial de mostaza blanca. Se realizó el mismo proceso descrito para *Salmonella*, hubo variaciones en cuanto al caldo y el agar usado, es decir YPD. Los pH evaluados fueron 4, 5 y 6. La temperatura de incubación fue de 32 °C por 48 horas para los platos Petri y 25 °C para los tubos con tratamientos. En el cuadro 2 se detallan los tratamientos usados.

Diseño experimental. Se usó un diseño experimental de Bloques Completos al Azar (BCA) con arreglo factorial de 3x3x4 que indica tres concentraciones diferentes de WMEO (0, 0.10 y 0.20%); tres pH diferentes (4, 5 y 6) y cuatro mediciones en el tiempo (0, 24, 48 y 72 horas). Se realizó una separación de medias Duncan y una separación de medias de

cuadrados mínimos (LSMeans) para determinar las respectivas interacciones mediante el programa “Statistical Analysis System” SAS versión 9.4.

Cuadro 2. Tratamientos usados para *Candida krusei* y *Saccharomyces cerevisiae* con aceite esencial de mostaza blanca (WMEO).

pH	Concentración WMEO		
	0%	0.10%	0.20%
pH 4	T ₁ *	T ₂	T ₃
pH 5	T ₄ *	T ₅	T ₆
pH 6	T ₇ *	T ₈	T ₉

*Tratamientos control

Para cada tratamiento se tomaron datos de crecimiento a 0, 24, 48 y 72 horas.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Etapla 1. Efecto del pH en la actividad antimicrobiana del aceite esencial de mostaza blanca contra *Salmonella enterica* Typhimurium.

En general todas las variables medidas tuvieron un valor $P < 0.0001$ es decir hubo diferencias estadísticamente significativas. Todos los tratamientos mostraron reducciones logarítmicas a partir de las 8 horas (Cuadro 3). Los tratamientos con pH 5 tuvieron una mayor reducción. Además, se demostró un efecto sinérgico entre bajos pH y concentraciones de WMEO. El pH, por sí solo no mostró ser una barrera eficiente debido a que los pH usados se encuentran en los rangos óptimos (pH 6-9) para *Salmonella* Typhimurium (Thayer *et al.* 1987).

Los tratamientos presentaron reducciones a partir de las 8 horas. Los tratamientos con WMEO y pH 5 demostraron ser los más estables a lo largo del tiempo. Fueron los que se encontraron por debajo del límite de detección mínimo (1 Log UFC/mL), lo cual indica que podrían ser usados en matrices alimenticias con pH bajos para obtener resultados efectivos. Sin embargo, es necesario tener en cuenta el tipo de estructura del alimento a ser usado ya que, en previas investigaciones se determinó que el uso de aceites esenciales en gelatinas inoculadas con *Salmonella* Typhimurium redujo el efecto antimicrobiano debido a la estructura (Burt 2004)

Una variable a tomar en cuenta es el tiempo para que ocurra la reacción de hidrolisis del compuesto activo del aceite que se caracteriza por ser pH dependiente y generalmente ocurre un proceso de hidrolisis más lento en pH ácidos que en pH alcalinos (David *et al.* 2013; Ekanayake *et al.* 2016). Se pudo comprobar que WMEO tuvo una mejor interacción con el pH 5 y por eso los tratamientos con esos pH fueron los más estables en el tiempo.

Los tratamientos con pH neutro al encontrarse en el rango de crecimiento óptimo para *Salmonella* solo presentaron reducciones logarítmicas hasta las 12 horas de exposición a WMEO, después de las 24 horas no tuvieron diferencia estadística significativa con los tratamientos control. Se ha determinado en previas investigaciones que las bacterias Gram negativas son más susceptibles a la actividad de WMEO que las bacterias Gram positivas (Monu *et al.* 2014). *Salmonella* es una bacteria Gram negativa y el uso de WMEO no fue tan eficiente debido a los pH usados que se encontraban en los rangos óptimos para el crecimiento de la bacteria por lo cual se infiere que hubo condiciones óptimas para el crecimiento de dicha bacteria que fuera afectado por los tratamientos usados a excepción de los tratamientos con pH 5.

Cuadro 3. Recuentos de *Salmonella enterica* Typhimurium (Log UFC/ml) según exposición a diferentes concentraciones de aceite esencial de mostaza blanca (WMEO) y pH.

Tratamiento		Tiempo de exposición				
Concentración WMEO	pH	0 h	8 h	12 h	24 h	48 h
0%	5	4.25 ± 0.25 ^{Ay}	5.24 ± 0.97 ^{Ax}	5.80 ± 1.59 ^{ABx}	7.97 ± 0.41 ^{Bw}	8.67 ± 0.29 ^{Aw}
0%	6	4.42 ± 0.30 ^{Az}	5.70 ± 1.16 ^{Ay}	6.69 ± 0.41 ^{Ax}	8.59 ± 0.20 ^{Bw}	8.70 ± 0.34 ^{Aw}
0%	7	4.34 ± 0.33 ^{Az}	5.18 ± 0.33 ^{Ay}	6.41 ± 0.24 ^{Ax}	8.94 ± 0.29 ^{Aw}	9.06 ± 0.62 ^{Aw}
0.10%	5	4.26 ± 0.29 ^{Aw}	0.70 ± 0.00 ^{Exβ}	1.36 ± 1.04 ^{Ex}	0.70 ± 0.00 ^{Exβ}	0.70 ± 0.00 ^{Dxβ}
0.10%	6	4.26 ± 0.29 ^{Ax}	4.09 ± 0.39 ^{Cx}	4.12 ± 0.68 ^{Cx}	4.22 ± 0.89 ^{Cx}	8.11 ± 0.63 ^{Aw}
0.10%	7	4.15 ± 0.18 ^{Ay}	4.91 ± 0.12 ^{ABx}	5.57 ± 0.30 ^{Bx}	8.37 ± 0.43 ^{Bw}	8.46 ± 0.53 ^{Aw}
0.20%	5	4.24 ± 0.21 ^{Aw}	0.70 ± 0.00 ^{Eyβ}	0.70 ± 0.00 ^{Eyβ}	0.70 ± 0.00 ^{Eyβ}	1.51 ± 0.99 ^{Cx}
0.20%	6	4.21 ± 0.26 ^{Ax}	1.66 ± 1.50 ^{Dy}	2.31 ± 1.11 ^{Dy}	1.80 ± 1.21 ^{Dy}	5.01 ± 1.05 ^{Bw}
0.20%	7	4.33 ± 0.18 ^{Ay}	4.09 ± 0.61 ^{Cy}	4.83 ± 0.29 ^{Cx}	8.28 ± 0.54 ^{Bw}	8.56 ± 0.95 ^{Aw}
R ²					0.95	
CV					13.39	

Los valores representados en el cuadro corresponden al promedio ± desviación estándar de tres repeticiones en duplicado.

^{ABC} Medias con letras mayúsculas diferentes en cada columna denotan diferencias entre tratamientos (P<0.05)

^{wxyz} Medias con letras minúsculas diferentes en cada fila denotan diferentes entre tiempos de exposición en cada tratamiento (P<0.05)

^β Valores reportados por debajo del límite de detección (1 Log UFC/mL)

En estudios previos realizados se determinó que a un pH 9 el compuesto se degrada instantáneamente reduciendo la vida de anaquel del aceite (Ekanayake *et al.* 2012). En otro estudio (Porter 2017) se usaron diferentes concentraciones de WMEO contra *Salmonella* Typhimurium pero solo con pH 7 y después de 24 horas, con una concentración de 0.21% WMEO y a 22 °C en TSB se obtuvo 8.08 Log UFC/ml similar con el resultado obtenido después de 24 horas a pH 7 y con 0.20% WMEO donde se encontró 8.28 ± 0.54 Log UFC/ml. En el mismo estudio se usaron diferentes serovares de *Salmonella* y se determinó que si es efectivo el uso de WMEO contra *Salmonella*. Para obtener mejores resultados se podrían usar diferentes combinaciones de aceites esenciales y de esta forma reducir cambios organolépticos en los alimentos.

Los aceites esenciales pueden ser usados mediante varias técnicas y ser efectivos. En un estudio se usó un coctel con varios EO (Kang y Song 2018) y se demostró una reducción logarítmica de *Salmonella* Typhimurium aplicado en un proceso de lavado de vegetales recién cosechados, se podría usar WMEO para reducir la carga microbiana en procesos de desinfección de vegetales como una posible alternativa para alimentos que se destinarán a procesado mínimo

Etapla 2. Efecto del pH en la actividad antimicrobiana del aceite esencia de mostaza blanca contra *Candida krusei*.

Todas las variables medidas tuvieron un valor $P < 0.0001$ es decir hubo diferencias estadísticamente significativas. Todos los tratamientos mostraron reducciones logarítmicas a partir de las 24 horas (Cuadro 4). Los tratamientos con pH 4 y 5 fueron estadísticamente iguales y tuvieron una mayor reducción en comparación con los tratamientos con pH 6. Además, se demostró un efecto sinérgico entre concentraciones de WMEO y valores de pH 4 y 5.

Candida krusei al ser una levadura tiende a desarrollarse mejor en ambientes extremos tales como pH ácidos, por dicha razón y basado en estudios anteriores (Abrego *et al.* 2017) se decidió usar rangos de pH más bajos comparados con *Salmonella enterica* Typhimurium. Las levaduras demoran más tiempo en reproducirse en comparación con las bacterias, por dicha razón para los experimentos con levaduras se realizaron conteos cada 48 horas y de esta forma se determinó si hubo diferencias estadísticas entre las variables evaluadas.

Ninguno de los tratamientos usados para *Candida krusei* mostró valores de células sobrevivientes por debajo del nivel de detección (1 Log UFC/ml). Sin embargo, los tratamientos con pH 4 y 5 fueron los más efectivos para este microorganismo. Asimismo, dichos tratamientos fueron los más estables a través del tiempo. *Candida krusei* se ha reportado en la literatura como una levadura que es resistente a preservantes como el ácido acético en concentraciones mayores a 1.5% (Casey y Dobson 2003) y generalmente se considera un microorganismo que sobrevive a los ambientes extremos. Sin embargo, en este estudio los resultados fueron diferentes ya que la levadura demostró un efecto fungistático a $\text{pH} \leq 5$.

Cuadro 4. Recuento de *Candida krusei* (Log UFC/ml) según exposición a diferentes concentraciones de aceite esencial de mostaza blanca (WMEO) y pH.

Tratamiento		Tiempo de exposición			
Concentración WMEO	pH	0 h	24 h	48 h	72 h
0%	4	4.51 ± 0.23 ^{Az}	6.06 ± 0.52 ^{Ay}	7.29 ± 0.25 ^{Ax}	7.62 ± 0.35 ^{Ax}
0%	5	4.45 ± 2.30 ^{Az}	6.34 ± 0.46 ^{Ay}	7.15 ± 0.31 ^{Ax}	7.60 ± 0.30 ^{Ax}
0%	6	4.53 ± 0.36 ^{Az}	6.58 ± 0.14 ^{Ay}	7.28 ± 0.62 ^{Axy}	7.71 ± 0.11 ^{Ax}
0.10%	4	4.61 ± 0.12 ^{Ax}	1.03 ± 0.52 ^{Dz}	1.70 ± 1.10 ^{Dyz}	2.03 ± 1.03 ^{Dy}
0.10%	5	4.54 ± 2.14 ^{Ax}	1.03 ± 0.52 ^{Dz}	2.66 ± 0.06 ^{Cy}	2.03 ± 1.03 ^{Dy}
0.10%	6	4.55 ± 0.21 ^{Az}	4.15 ± 2.01 ^{Bz}	5.81 ± 1.22 ^{By}	6.72 ± 0.64 ^{Bx}
0.20%	4	4.61 ± 0.15 ^{Ax}	1.03 ± 0.52 ^{Dz}	1.70 ± 1.10 ^{Dyz}	2.03 ± 1.03 ^{Dy}
0.20%	5	4.49 ± 2.14 ^{Ax}	1.03 ± 0.52 ^{Dz}	2.03 ± 1.03 ^{CDy}	2.03 ± 1.03 ^{Dy}
0.20%	6	4.61 ± 0.28 ^{Ay}	2.68 ± 2.47 ^{Cz}	5.10 ± 1.38 ^{Bxy}	5.84 ± 1.46 ^{Cx}
R ²				0.93	
CV				16.06	

Los valores representados en el cuadro corresponden al promedio ± desviación estándar de tres repeticiones en duplicado.

^{ABC} Medias con letras mayúsculas diferentes en cada columna denotan diferencias entre tratamientos (P<0.05).

^{wxyz} Medias con letras minúsculas diferentes en cada fila denotan diferentes entre tiempos de exposición en cada tratamiento (P<0.05).

Los recuentos de *Candida krusei* demostraron que todos los tratamientos con WMEO tuvieron un efecto de reducción logarítmica (Log UFC/ml). Hubo una mejor interacción con pH ácidos, por lo cual, podría ser usado en alimentos con pH ácidos como frutas o en procesos de fermentación de chocolate o café, ya que *Candida krusei* puede ser deteriorador de dichos productos. Sin embargo, al usar el aceite esencial de mostaza blanca junto con el bajo pH del proceso fermentativo del chocolate podría ser una alternativa para reducir los daños o incluso evitar que dicha levadura reduzca la vida útil del producto (Mazigh 1994).

El aceite esencial de mostaza blanca se caracteriza por ser un aceite más estable en temperaturas de congelamiento y en alimentos sólidos que en medios acuosos (David *et al.* 2013). Al tener dicha estabilidad en temperaturas de congelamiento podría usarse potencialmente en concentrados de frutas congelados donde se ha encontrado incidencias de *Candida krusei* y *Saccharomyces cerevisiae*. Del mismo modo, se ha encontrado que *Candida krusei* es un importante deteriorador en frutas con bajo pH e incluso que se puede encontrar en alimentos que tengan ácidos (Vaughn y Berhow 2005). Se podría usar en productos con pH bajos para alargar la vida anaquel y evitar que se produzca CO₂ en los alimentos (Casey and Dobson 2003). Se realizó un estudio previo donde se demostró que al usar 0.20% de WMEO se obtuvo una reducción del 100% de la levadura (Abrego *et al.* 2017).

Los tratamientos con pH 4 y 5 no presentaron diferencias estadísticas significativas en cuanto a crecimiento Log UFC/ml y las concentraciones tampoco indicaron diferencias estadísticas, por lo cual, WMEO se podría usar en alimentos con pH dentro del rango mencionado previamente y usando la concentración más baja lo cual genera una reducción de costos y al mismo tiempo disminuye posibles cambios organolépticos.

Efecto del pH en la actividad antimicrobiana del aceite esencia de mostaza blanca contra *Saccharomyces cerevisiae*.

Saccharomyces cerevisiae demostró ser una levadura más susceptible que *Candida krusei*. los tratamientos más efectivos nuevamente fueron los de pH 4 y 5, alcanzando valores por debajo del límite de detección (1 Log UFC/mL) después de 72 horas aplicado el tratamiento (Cuadro 5).

Cuadro 5. Recuentos de *Saccharomyces cerevisiae* (Log UFC/ml) según exposición a diferentes concentraciones de aceite esencial de mostaza blanca (WMEO) y pH.

Tratamiento		Tiempo de exposición			
Concentración WMEO	pH	0 h	24 h	48 h	72 h
0%	4	4.17 ± 0.34 ^{Ax}	6.95 ± 0.09 ^{Aw}	7.54 ± 0.47 ^{Aw}	7.36 ± 0.45 ^{Aw}
0%	5	4.28 ± 0.33 ^{Ay}	6.98 ± 0.44 ^{Aw}	7.62 ± 0.48 ^{Aw}	6.68 ± 1.27 ^{Awx}
0%	6	4.29 ± 0.31 ^{Ax}	6.61 ± 0.42 ^{Aw}	7.28 ± 0.27 ^{Aw}	7.21 ± 0.27 ^{ABw}
0.10%	4	4.22 ± 0.27 ^{Aw}	1.03 ± 0.52 ^{Bx}	1.03 ± 0.52 ^{Dx}	0.70 ± 0.00 ^{Dxβ}
0.10%	5	4.23 ± 0.27 ^{Aw}	1.03 ± 0.52 ^{Bx}	1.03 ± 0.52 ^{Dx}	0.70 ± 0.00 ^{Dxβ}
0.10%	6	4.60 ± 0.75 ^{Ax}	3.30 ± 0.65 ^{ABy}	5.55 ± 0.69 ^{Bw}	6.03 ± 0.52 ^{Bw}
0.20%	4	4.14 ± 0.24 ^{Aw}	1.20 ± 0.84 ^{Bx}	1.03 ± 0.52 ^{Dx}	0.70 ± 0.00 ^{Dxβ}
0.20%	5	4.02 ± 0.27 ^{Aw}	1.37 ± 1.21 ^{Bx}	1.03 ± 0.52 ^{Dx}	0.70 ± 0.00 ^{Dxβ}
0.20%	6	4.09 ± 0.23 ^{Aw}	1.03 ± 0.52 ^{BCz}	2.08 ± 0.69 ^{Cy}	3.03 ± 2.55 ^{Cx}
R²				0.95	
CV				17.43	

Los valores representados en el cuadro corresponden al promedio ± desviación estándar de tres repeticiones en duplicado.

^{ABC} Medias con letras mayúsculas diferentes en cada columna denotan diferencias entre tratamientos (P<0.05).

^{wxyz} Medias con letras minúsculas diferentes en cada fila denotan diferentes entre tiempos de exposición en cada tratamiento (P<0.05).

Saccharomyces cerevisiae comúnmente es asociada con la industria del pan o bebidas alcohólicas. Por otra parte, no se encuentra solamente como una levadura benéfica es considerada como un microorganismo deteriorador en alimentos debido a que puede reducir la vida anaquel de estos. *Saccharomyces cerevisiae* es una levadura que tiene la capacidad de fermentar azúcares y produce CO₂ durante este proceso (Stratford 2006) y pueden dañar vinos y otras bebidas como Champagne; estas bebidas se caracterizan por tener pH ácidos

por lo cual muchos organismos deterioradores pueden desarrollarse produciendo sabores indeseados. Los vinos al tener un pH ácido podrían usar pequeñas fracciones de WMEO, porque como se ha mencionado WMEO es estable en rangos de pH ácidos y se consideraría un potencial aditivo en vinos y productos fermentados donde pueda haber remanentes de levaduras deterioradoras. Además, podría usarse en frutas u otros productos con pH ácidos.

El aceite esencial de mostaza blanca se ha caracterizado por tener una limitada investigación científica en alimentos. Se ha determinado que *Saccharomyces cerevisiae* se asocia con causar daños en productos lácteos, salsas, y bebidas alcohólicas. Según estudios previos, el consumidor identifica la presencia de levaduras cuando la población entre 10^5 - 10^7 cel/g (Fleet 1992). Con los resultados obtenidos se pudo determinar que al usar WMEO como un aditivo natural se podría reducir la incidencia de levaduras en este tipo de productos, especialmente en salsas donde el sabor de mostaza es más común que en otro tipo de alimentos.

La mostaza blanca, al igual que otras especies pertenecen a la familia de las *Brassicaceas* que se caracterizan por tener varios compuestos fenólicos que como se mencionó previamente funcionan como sistema de defensa en las plantas, sin embargo, es mejor que estos se aislen y de esta forma puedan ser usados con diferentes técnicas como; nano emulsiones para lavado de productos frescos, *Salmonella* Typhimurium ha sido evaluada con diferentes aceites esenciales y se ha determinado que mientras más alta las concentraciones, más efectivo es el antimicrobiano (Kang y Song 2018). En el caso de las levaduras, pocas investigaciones se han realizado para esta área, sin embargo, por los resultados obtenidos el uso de WMEO puede servir como una posible alternativa para reducir incidencias de levaduras en alimentos.

4. CONCLUSIONES

- Se evaluó la actividad antimicrobiana del aceite esencial de mostaza blanca, siendo más efectivo a pH 5 en todos los microorganismos y sin diferencia estadística entre concentraciones, pudiéndose aplicar concentraciones de 0.10% en los alimentos para reducir costos y no afectar características sensoriales.
- Se demostró un efecto sinérgico entre pH ácidos y WMEO, además, los tratamientos con pH ácidos fueron más estables a través del tiempo. El pH, por sí solo no demostró un efecto antimicrobiano y a mayores concentraciones más efectivo WMEO en pH neutros.

5. RECOMENDACIONES

- Realizar investigaciones usando matrices alimenticias y evaluar la interacción entre componentes como agua, grasa, proteínas y carbohidratos.
- Evaluar los aspectos sensoriales de la interacción del aceite esencial de mostaza blanca en alimentos.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria para otros microorganismos deterioradores en alimentos como *Pseudomona spp.*
- Investigar el tiempo máximo de estabilidad de WMEO dependiendo del alimento.

6. LITERATURA CITADA

Abrego A, Márquez M, Monu E. 2017. Investigación de la actividad anti fúngica del aceite esencial de mostaza blanca, carvacrol y su interacción contra *Candida krusei* [Tesis]. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano-Honduras. 24 p.

Bom IJ, Klis FM, Nobel H de, Brul S. 2001. A new strategy for inhibition of the spoilage yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii* based on combination of a membrane-active peptide with an oligosaccharide that leads to an impaired glycosylphosphatidylinositol (GPI)-dependent yeast wall protein layer. *FEMS Yeast Res.* 1(3):187–194. Eng.

Burt S. 2004. Essential oils: their antimicrobial properties and potential applications in foods- a review. *International Journal of Food Microbiology.* 94(3): 223-253. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160504001680>.doi:0.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022.

Capinera JL, editor. 2008. *Encyclopedia of entomology*. 2da ed. Dordrecht, London: Springer (Springer reference). ISBN: 978-1-4020-6242-1; [accesado febrero 2 2017]. <https://link.springer.com/referencework/10.1007/978-1-4020-6359-6>.

CDC (Center for Disease Control and Prevention). 2016. *Salmonella* [internet]. Estados Unidos; [accesado abril 24 2018]. <https://www.cdc.gov/salmonella/pdf/CDC-Salmonella-Factsheet.pdf>.

Casey GD, Dobson ADW. 2003. Molecular detection of *Candida krusei* contamination in fruit juice using the citrate synthase gene *cs1* and a potential role for this gene in the adaptive response to acetic acid. *Journal of Applied Microbiology.* 95(1):13–22. eng. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01940.x>.

David J, Ekanayake A, Singh I, Farina B, Meyer M. 2013. Effect of white mustard essential oil on inoculated *Salmonella sp.* in a sauce with particulates. *J Food Prot.* 76(4):580–587. eng. doi:10.4315/0362-028X.JFP-12-375.

David J, inventor. 2014. A process for producing an essential oil. The essential oil can be white mustard essential oil. US 8,697,150 B2. 12 p.

Ekanayake A, Strife RJ, Zehentbauer GN, David J. 2016. Yellow or White Mustard (*Sinapis alba L.*) Oils. En: Preedy VR, editor. *Essential oils in food preservation, flavor and safety*. Amsterdam: Academic Press. p. 857–863.

Ekanayake A, Zoutendam PH, Strife RJ, Fu X, Jayatilake GS. 2012. Development of white mustard (*Sinapis alba* L.) essential oil, a food preservative. *Food Chemistry*. 133(3):767–774. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814612001422>. doi:10.1016/j.foodchem.2012.01.090.

Fell JW, Phaff HJ, Walker GM. 2016. *Yeast*. Access Science. McGraw-Hill Education. [accesado abril 23 2018]. doi:10.1036/1097-8542.753100.

Fleet G. 1992. Spoilage Yeasts. *Critical Reviews in Biotechnology*. 12 (1-2): 144. doi:10.3109/07388559209069186.

Hayford A, Jakobsen M. 1999. Characterization of *Candida krusei* strains from spontaneously fermented maize dough by profiles of assimilation, chromosome profile, polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. *Journal of Applied Microbiology*. 87(1):29–40. doi:10.1046/j.1365-2672.1999.00786.x.

Hyldgaard M, Mygind T, Meyer RL. 2012. Essential Oils in Food Preservation: Mode of Action, Synergies, and Interactions with Food Matrix Components. *Front. Microbiol.* (3):1-24. English. doi:10.3389/fmicb.2012.00012.

Kang J-H, Song KB. 2018. Inhibitory effect of plant essential oil nanoemulsions against *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Salmonella* Typhimurium on red mustard leaves. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 45:447–454. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1466856417308329>. doi:10.1016/j.ifset.2017.09.019.

Mazigh D. 1994. *Microbiology of chocolate*. Beckett ST, editor. *Industrial Chocolate Manufacture and Use*. Boston, MA: Springer US; Imprint; Springer. p. 312–320.

MINTEL. 2018. *Global Food and Drink Trends 2018*; [accesado abril 27 2018]. https://downloads.mintel.com/private/UtLXg/files/628089/?utm_campaign=8816890_Food%20and%20Drink%20Trends%202018%20%20Thank%20you%20for%20downloading&utm_medium=email&utm_source=dotm&dm_i=2174,58Z5M,S62SDA,K8AR7,1

Monu EA, David JRD, Schmidt M, Davidson PM. 2014. Effect of white mustard essential oil on the growth of foodborne pathogens and spoilage microorganisms and the effect of food components on its efficacy. *J Food Prot.* 77(12):2062–2068. eng. doi:10.4315/0362-028X.JFP-14-257.

Pascual M. 2005. *Enfermedades de origen alimentario: Su prevención*. Madrid: Díaz de Santos; [accesado abril 25 2018]. <http://ebookcentral.proquest.com/ib/bvuzamoranosp/detail.action?docID=3173214>.

Pino JA. 2015. *Aceites esenciales: química, bioquímica, producción y usos*. Havana: Editorial Universitaria. [accesado abril 2018]. <http://ebookcentral.proquest.com/lib/bvuzamoranosp/detail.action?docID=4183571>.

Pitt JI, Hocking AD. 2009. Fungi and Food Spoilage. 3ra ed. Boston, MA: Springer US. p. 357–382. [accesado abril 22 2018]. <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F978-0-387-92207-2.pdf>.

Pollyanna M, Moura M, Gomes F, Trentinc D, Oliveira A, Vieira G, Rocha M, Melo J, Breintenbach L, Mecedo A . 2018. PgTeL, the lectin found in *Punica granatum* juice, is an antifungal agent against *Candida albicans* and *Candida krusei*. International Journal of Biological Macromolecules. 108:391–400. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.12.039.

Porter J. 2017. Evaluating the Antimicrobial Efficacy of White Mustard Essential Oil against *Salmonella* [Tesis]. Auburn University, Estados Unidos. 68 p.

Rodriguez S, Thornton M, Thornton R. 2013. Raman Spectroscopy and Chemometrics for Identification and Strain Discrimination of the Wine Spoilage Yeasts *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii*, and *Brettanomyces bruxellensis*. Appl. Environ. Microbiol. 79(20):6264–6270. <http://aem.asm.org.spot.lib.auburn.edu/content/79/20/6264.full>. doi:10.1128/AEM.01886-13.

Stratford M. 2006. Food and Beverage Spoilage Yeasts. En: Querol A, Fleet G, editores. Yeasts in Food and Beverages. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. p. 335–379.

Thayer DW, Muller WS, Buchanan RL, Phillips JG. 1987. Effect of NaCl, pH, temperature, and atmosphere on growth of *Salmonella* Typhimurium in glucose-mineral salts medium. Appl Environ Microbiol. 53(6):1311–1315. eng.

Vaughn SF, Berhow MA. 2005. Glucosinolate hydrolysis products from various plant sources: pH effects, isolation, and purification. Industrial Crops and Products. 21(2):193–202. doi:10.1016/j.indcrop.2004.03.004.

7. ANEXOS

Anexo 1. Resumen del análisis estadístico en experimentos con *Salmonella Typhimurium*.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	46	1891.343892	41.116172	98.76	<.0001
Error	223	92.840372	0.416325		
Corrected Total	269	1984.184265			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	ufc Mean
0.953210	13.38798	0.645232	4.819489

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BLK	2	0.7993219	0.3996610	0.96	0.3845
A	2	483.7264459	241.8632230	580.95	<.0001
ph	2	461.6794962	230.8397481	554.47	<.0001
hora	4	302.8042143	75.7010536	181.83	<.0001
a*ph*hora	36	642.3344139	17.8426226	42.86	<.0001

Anexo 2.Resumen del análisis estadístico en experimentos con *Candida krusei*.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	37	1071.969480	28.972148	60.40	<.0001
Error	178	85.376276	0.479642		
Corrected Total	215	1157.345756			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	ufc Mean
0.926231	16.06679	0.692562	4.310517

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BLK	2	46.6909774	23.3454887	48.67	<.0001
a	2	486.6279360	243.3139680	507.28	<.0001
ph	2	143.8603017	71.9301509	149.97	<.0001
hora	3	73.3796038	24.4598679	51.00	<.0001
a*ph*hora	28	321.4106613	11.4789522	23.93	<.0001

Anexo 3.Resumen del análisis estadístico en experimentos con *Saccharomyces cerevisiae*.

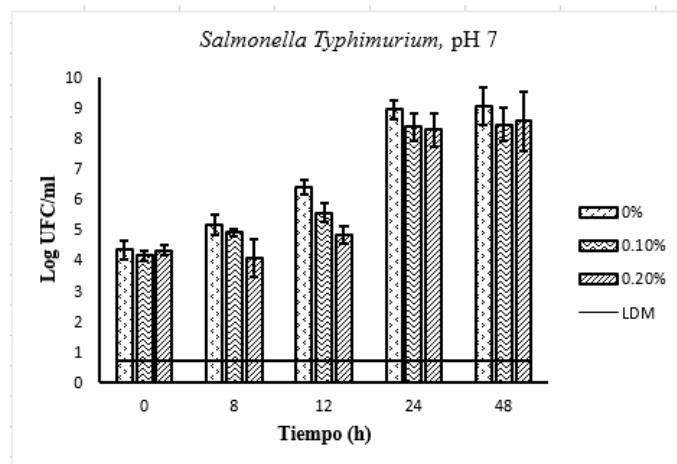
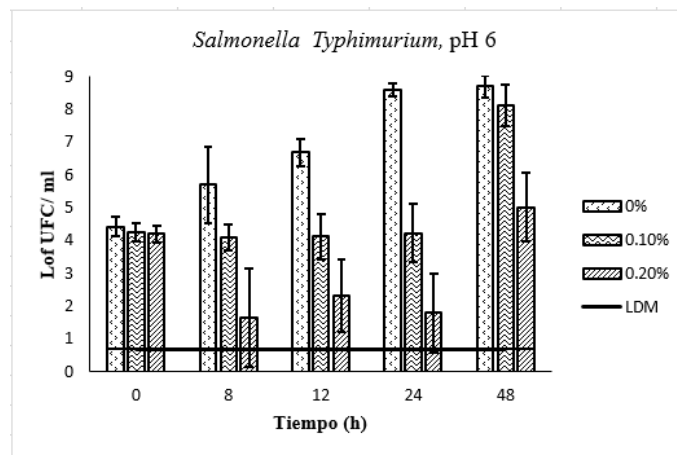
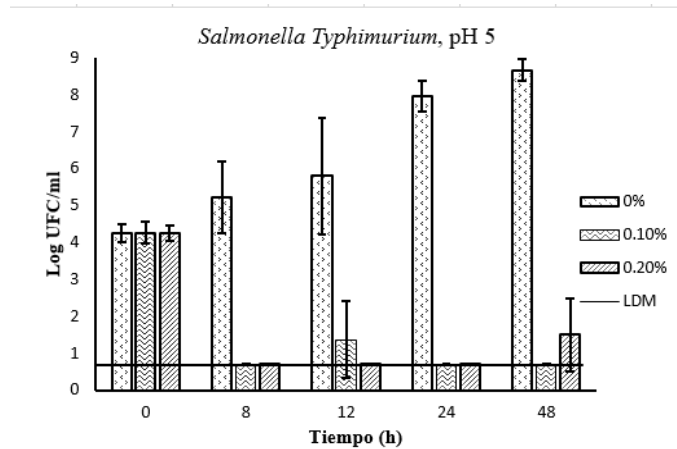
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	37	1325.830936	35.833269	84.05	<.0001
Error	178	75.884980	0.426320		
Corrected Total	215	1401.715916			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	ufc Mean
0.945863	17.43295	0.652932	3.745389

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BLK	2	8.3593982	4.1796991	9.80	<.0001
a	2	789.4657349	394.7328674	925.91	<.0001
ph	2	77.2791341	38.6395670	90.64	<.0001
hora	3	24.7771546	8.2590515	19.37	<.0001
a*ph*hora	28	425.9495142	15.2124826	35.68	<.0001

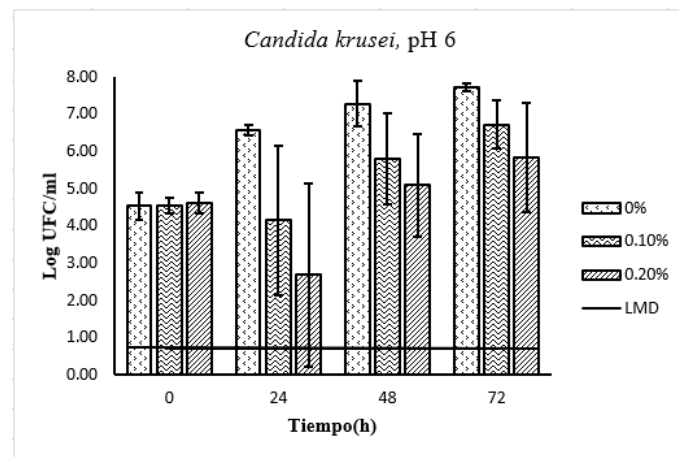
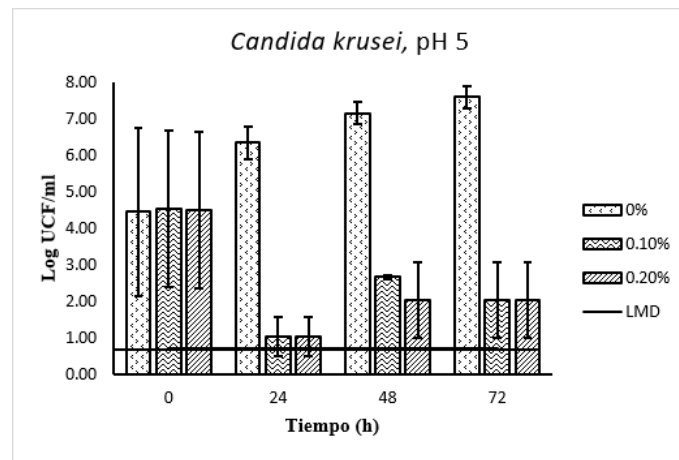
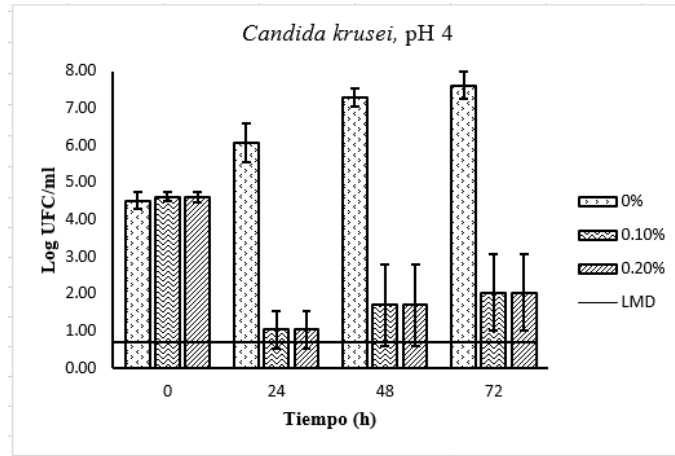
Anexo 4. Comportamiento de *Salmonella enterica* Typhimurium según exposición al aceite esencial de mostaza blanca (0.00, 0.10 y 0.20%) y pH (5, 6 y 7).

Límite de detección (LDM) indica valores reportados por debajo de 1 Log UFC/ mL.



Anexo 5. Comportamiento de *Candida krusei* según exposición al aceite esencial de mostaza blanca (0.00, 0.10 y 0.20%) y pH (4, 5 y 6).

Límite de detección (LDM) indica valores reportados por debajo de 1 Log UFC/ mL.



Anexo 6. Comportamiento de *Saccharomyces cerevisiae* según exposición al aceite esencial de mostaza blanca (0.00, 0.10 y 0.20%) y pH (4, 5 y 6).

Límite de detección (LDM) indica valores reportados por debajo de 1 Log UFC/ mL

