

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROALIMENTARIAS
ESCUELA DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Proyecto final de graduación presentado a la Escuela de Tecnología de Alimentos para
optar por el grado de Licenciada en Ingeniería de Alimentos

**Evaluación del crecimiento de *Alicyclobacillus acidoterrestris* como indicador del
potencial de deterioro de este microorganismo en jugos de frutas tropicales de Costa
Rica estables a temperatura ambiente**

Jessica Joy Worsfold Butler
Carné: B37686

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio
Febrero, 2019

Dedicatoria

A Dios, mi familia y todos los que me acompañaron de inicio a fin en este gran proceso.

Agradecimientos

- Primeramente, a Dios por permitirme alcanzar el final de esta etapa y por todas las oportunidades y los caminos por donde este proyecto me llevó.
- A mi familia por toda la paciencia, comprensión y apoyo durante la realización de este proyecto y el desarrollo de mi carrera universitaria completa con todos sus altibajos.
- A la Universidad de Costa Rica por brindarme una educación de calidad con estándares envidiables, y por permitirme compartir un poco de nuestro país con el mundo.
- A mi directora de proyecto, a la Profe Jessie Usaga, que comprobó que la ciencia también es cosa de mujeres y mamás. Que a través de todo este proceso me enseñó que no hay que tener miedo a fallar sino a no intentar y que todo se logra si se trabaja duro. Por todo su apoyo en el camino sin importar el horario o la tarea a realizar y por siempre enseñar con el ejemplo.
- A mi asesor de tesis, al Profe Oscar Acosta, que no dudó en adoptarme como tesiaría y que nunca me cerró la puerta aún en las semanas más ocupadas. Por enseñarme que los problemas usualmente son más simples de lo que parecen y por animarme a encontrarle humor a toda situación.
- A mi asesora de tesis, la Profe Gabriela Davidovich que aceptó este proyecto sin dudarle y me apoyó con mis decisiones a través de todo el proyecto tratándome como la profesional en la que me busco convertir.
- A todos los profesores y el personal de la Escuela de Tecnología de Alimentos y del Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos que se involucraron no sólo en este proyecto sino en todos mis años de formación para poder alcanzar esta meta al final del proceso.
- Un agradecimiento especial a Vanny Mora por aguantarme día tras día en el laboratorio de microbiología del CITA, aún en las semanas de muestreo intenso y a Laura Solís por su ayuda incansable.
- A todos los compañeros del laboratorio de química del CITA que no dudaron en ayudar en cualquier momento que lo necesitara.
- Y a todos mis compañeros, amigos y familiares que me acompañaron fines de semana, feriados y noches en el laboratorio. A Rebeca Álvarez por ser mi compañera de tesis que me acompañó en las largas jornadas de producción de jugos, quemadas y fines de semana de montajes. A Melanie Wimmer por toda su ayuda en el laboratorio, por llenar las botellas con la pipeta lenta, por las historias, risas y cantadas que nos mantenían con ánimo y por creer en mí cuando ni yo podía. A María José Serrano por toda su paciencia y ayuda todos esos días cuando corría entre clases para terminar el trabajo de laboratorio y ver si me daba tiempo de almorzar. Y a todos los demás que de una manera u otra hicieron posible este proyecto, porque sin ellos no estarían leyendo este documento.

Tribunal Examinador

Trabajo Final de Graduación presentado a la Escuela de Tecnología de Alimentos como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos.

Aprobado por:



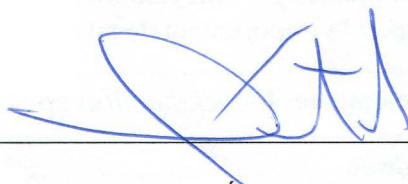
Ana Lucía Mayorga Gross

Presidenta del Tribunal



PhD. Jessie Usaga Barrientos

Directora del Proyecto



PhD., MADE, Óscar Acosta Montoya

Asesor del Proyecto



Lic. Gabriela Davidovich Young

Asesora del Proyecto



Eric Wong González

Profesor Designado

Contenido

DEDICATORIA	1
AGRADECIMIENTOS	2
TRIBUNAL EXAMINADOR	3
ÍNDICE DE FIGURAS	6
ÍNDICE DE CUADROS	7
ABREVIACIONES Y DEFINICIONES	7
1. RESUMEN	8
2. JUSTIFICACIÓN	9
3. OBJETIVOS	12
3.1 General	12
3.2 Específicos	12
4. MARCO TEÓRICO	13
4.1 Industria de jugos y concentrados de frutas a nivel global y nacional.....	13
4.2 Jugos: definición y deterioro microbiológico.....	14
4.3 Generalidades del microorganismo <i>Alicyclobacillus</i> sp.....	15
4.4 Deterioro de jugos de frutas tropicales por <i>Alicyclobacillus</i> sp.....	17
4.5 Impacto de <i>Alicyclobacillus</i> sp. y la importancia de su control en la industria de jugos y concentrados de frutas	19
4.6 Factores que afectan el crecimiento de <i>Alicyclobacillus</i> sp.	20
4.6.1 Especie de <i>Alicyclobacillus</i> sp.	20
4.6.2 Temperatura de almacenamiento.....	21
4.6.3 pH.....	21
4.6.4 Contenido de sólidos solubles.....	22
4.6.5 Sustancias inhibitorias	22
4.6.6 Ácidos orgánicos.....	23
4.6.7 Potencial redox, oxígeno disponible y espacio de cabeza como variable de estudio.....	23
5. MATERIALES Y MÉTODOS	25
5.1 Localización	25
5.2 Elaboración de los jugos de fruta	25
5.3 Pruebas preliminares	28
5.4 Caracterización fisicoquímica de los cinco jugos de frutas tropicales.....	28
5.4.1 Determinación de pH.....	29
5.4.2 Determinación de acidez total	29
5.4.3 Determinación de sólidos solubles.....	29
5.4.4 Determinación de azúcares: fructosa, glucosa y sacarosa.....	29
5.4.5 Determinación de ácidos orgánicos.....	29
5.4.6 Determinación de polifenoles totales.....	30
5.4.7 Determinación de antocianinas totales.....	30
5.4.8 Determinación del análisis proximal.....	30
5.4.9 Diseño y análisis estadístico	30
5.5 Estudio de crecimiento para la evaluación de <i>A. acidoterrestris</i> como posible causante de deterioro en jugos tropicales	31

5.5.1 Selección de la bacteria	31
5.5.2 Preparación del inóculo.....	31
5.5.3 Preparación e inoculación de las muestras.....	32
5.5.4 Toma de muestras durante el estudio de crecimiento.....	33
5.5.5 Recuento de <i>A. acidoterrestris</i> durante el estudio de crecimiento.....	34
5.5.6 Diseño y análisis estadístico	34
5.6 Efecto del espacio de cabeza sobre el crecimiento de <i>A. acidoterrestris</i> en un jugo de frutas tropicales seleccionado.....	35
5.6.1 Preparación e inoculación de las muestras para el estudio de espacio de cabeza	35
5.6.2 Toma de muestras y recuento de <i>A. acidoterrestris</i> durante el estudio de espacio de cabeza.....	36
5.6.3 Diseño y análisis estadístico	36
5.6.4 Diseño y análisis del efecto del tipo de tapa sobre el crecimiento de <i>A. acidoterrestris</i> en un jugo de fruta tropical seleccionado.....	37
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
6.1 Objetivo 1	38
6.1.1 Análisis fisicoquímico de los jugos de frutas tropicales analizados en el estudio.....	38
6.1.2 Análisis de pH	39
6.1.3 Análisis de sólidos solubles.....	40
6.1.4 Análisis proximal	40
6.1.5 Análisis del contenido de carbohidratos y azúcares.....	41
6.1.6 Análisis del contenido de vitamina C.....	41
6.1.7 Análisis del contenido de polifenoles y antocianinas	43
6.1.8 Análisis del contenido de ácidos orgánicos	44
6.2 Objetivo 2.....	44
6.2.1 Sobrevivencia de <i>A. acidoterrestris</i> en seis jugos de frutas tropicales.....	44
6.3 Objetivo 3	58
6.3.1 Sobrevivencia de <i>A. acidoterrestris</i> según el espacio de cabeza	58
6.3.2 Sobrevivencia de <i>A. acidoterrestris</i> según el tipo de tapa utilizada.....	61
7. CONCLUSIONES.....	64
8. RECOMENDACIONES	65
9. BIBLIOGRAFÍA.....	67
10. ANEXOS	78

Índice de Figuras

FIGURA 1. Flujo de proceso de elaboración de jugo estable a temperatura ambiente.....	25
FIGURA 2. Curva de sobrevivencia de <i>A. acidoterrestris</i> en seis jugos de frutas tropicales durante el almacenamiento por 2 meses a 45 ± 2 °C.....	45
FIGURA 3. Curva de sobrevivencia de <i>A. acidoterrestris</i> en cinco jugos de frutas tropicales que mostraron un descenso en la población durante el almacenamiento por 2 meses a 45 ± 2 °C.....	47
FIGURA 4. Curva de sobrevivencia y población estabilizada de <i>A. acidoterrestris</i> en jugo de naranja comercial durante el almacenamiento por 2 meses a 45 ± 2 °C.	53
FIGURA 5. Curva de sobrevivencia y población estabilizada* de <i>A. acidoterrestris</i> en jugo de naranja comercial envasado en botellas de vidrio con espacios de cabeza del 40 % y 6 % durante el almacenamiento por una semana a 45 ± 2 °C.....	59
FIGURA 6. Curva de sobrevivencia y población estabilizada* de <i>A. acidoterrestris</i> en jugo de naranja comercial envasado en botellas de vidrio cubiertas con papel aluminio o tapas metálicas durante el almacenamiento por una semana a 45 ± 2 °C.....	62
FIGURA 7. Preparación de jugos de planta piloto mediante el proceso de llenado en caliente e inversión del envase.	78
FIGURA 8. Jugos de frutas tropicales reparados en planta piloto a partir de piña, cas, mora, maracuyá y naranja (de izquierda a derecha).	78
FIGURA 9. Metodología experimental para el estudio de crecimiento de <i>A. acidoterrestris</i> en jugos de frutas tropicales.....	79
FIGURA 10. Cultivo de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> ATCC 49025 rayado en agar YSG.	79
FIGURA 11. Aplicación del choque térmico en baño de agua para la preparación del inóculo de <i>A. acidoterrestris</i>	80
FIGURA 12. Vista al microscopio de tinción de Gram de esporas (moradas) de <i>A. acidoterrestris</i>	80
FIGURA 13. Llenado aséptico de botellas de jugo dentro de la cabina de bioseguridad.	81
FIGURA 14. Montaje del recuento de <i>A. acidoterrestris</i> en agar YSG para cuantificar la población presente durante los muestreos de jugos de frutas tropicales.	81
FIGURA 15. Jugos de piña, mora, naranja comercial, maracuyá, cas y naranja con un 40% de espacio de cabeza y tapa de papel aluminio utilizados en el estudio de crecimiento de <i>A. acidoterrestris</i>	82
FIGURA 16. Almacenamiento de jugos inoculados con <i>A. acidoterrestris</i> en incubadora a 45 ± 2 °C.	82
FIGURA 17. Placas de agar YSG para la determinación de la población de <i>A. acidoterrestris</i> mediante diluciones seriadas y el método de recuento.	83
FIGURA 18. Jugo de naranja comercial envasado en botellas de vidrio con un 40 % y un 6 % de espacio de cabeza para el estudio de crecimiento de <i>A. acidoterrestris</i>	83
FIGURA 19. Jugo de naranja comercial envasado en botellas de vidrio con un 40 % de espacio de cabeza y cubiertas con tapa metálica y papel aluminio para el estudio de crecimiento de <i>A. acidoterrestris</i>	84

Índice de Cuadros

CUADRO I. Valores de pH aproximados asociados con los jugos de frutas tropicales utilizados en el estudio.....	27
CUADRO II. Caracterización fisicoquímica de los jugos de frutas tropicales utilizados para evaluar el potencial de deterioro de <i>A. acidoterrestris</i> (valor promedio \pm desviación estándar, n=3).....	38
CUADRO III. Tiempo requerido para que la población de <i>A. acidoterrestris</i> alcance las poblaciones críticas de 1,40 y 5,00 log UFC/mL en seis jugos de frutas tropicales durante el almacenamiento a 45 ± 2 °C por 2 meses (promedio \pm intervalo de confianza, n=3).	46
CUADRO IV. Población máxima y t_{MAX} de <i>A. acidoterrestris</i> en jugo de naranja comercial envasado en botellas de vidrio con espacios de cabeza del 40 % y 6 % durante el almacenamiento por una semana a 45 ± 2 °C (promedio \pm intervalo de confianza, n=3).	60
CUADRO V. Población máxima y t_{MAX} de <i>A. acidoterrestris</i> en jugo de naranja comercial envasado en botellas de vidrio cubiertas con papel aluminio o tapas metálicas durante el almacenamiento por una semana a 45 ± 2 °C (promedio \pm intervalo de confianza, n=3).	63

Abreviaciones y definiciones

- *A. acidoterrestris*: *Alicyclobacillus acidoterrestris*
- AIJN: *European Fruit Juice Association* (Asociación Europea de Jugos de Frutas)
- Espacio de cabeza (EC): el área dentro del contenedor que está desprovista de producto.
- FDA: *Food and Drug Administration* (Administración de alimentos y medicamentos de los Estados Unidos)
- IFU: *International Federation of Fruit Juice Producers* (Federación internacional de productores de jugos de frutas)
- JFJA: *Japan Fruit Juice Association* (Asociación de jugos de frutas de Japón)
- PROCOMER: Promotora del Comercio Exterior de Costa Rica
- $t_{1,40}$: variable que representa el tiempo necesario para que la población de *A. acidoterrestris* alcanzara 1,40 log UFC/mL.
- $t_{5,00}$: variable que representa el tiempo necesario para que la población de *A. acidoterrestris* alcanzara 5,00 log UFC/mL.
- t_{MAX} : variable que representa el tiempo necesario para que la población de *A. acidoterrestris* alcanzara el punto máximo.

1. Resumen

Las esporas de *Alicyclobacillus* sp., un microorganismo de deterioro termo-acidófilo, pueden sobrevivir a la pasteurización, germinar y crecer durante el almacenamiento de jugos y bebidas ácidas estables a temperatura ambiente. La bacteria se ha aislado con frecuencia de jugo de manzana, pero debido a su potencial para contaminar otros jugos se evaluó el potencial de crecimiento de *Alicyclobacillus acidoterrestris* en jugos tropicales seleccionados y se analizó el efecto del espacio de cabeza (EC) sobre la curva de supervivencia del microorganismo durante el almacenamiento del jugo. Se inocularon jugos comercialmente estériles de naranja, piña, mora, maracuyá, cas y un jugo de naranja comercial envasados en botellas de vidrio (EC: 40% del volumen) con 10^2 - 10^3 UFC/ml de *A. acidoterrestris* ATCC 49025 (posterior a un choque térmico a 75 °C durante 20 minutos) y se mantuvieron a 45 °C durante 2 meses. Los jugos se analizaron inmediatamente después de la inoculación y periódicamente durante los 2 meses de almacenamiento. La población bacteriana se enumeró utilizando agar YSG incubado a 45 °C durante 3-5 días. Para el jugo con el mayor potencial de crecimiento de *A. acidoterrestris* (naranja comercial), se evaluó el efecto del EC sobre la curva de supervivencia de la bacteria durante una semana de almacenamiento a 45 °C. Para este mismo jugo también se analizó el efecto de la utilización de una tapa de metal o una cubierta de papel aluminio sobre el crecimiento de la bacteria, la cual se inoculó en botellas con un EC del 40 % siguiendo la misma metodología ya descrita. Los ensayos se realizaron por triplicado y todos los jugos se caracterizaron fisicoquímicamente. Se encontró una diferencia evidente en el patrón de crecimiento de *A. acidoterrestris* según el tipo de jugo. La población de *A. acidoterrestris* en los jugos de piña, mora, maracuyá, cas y naranja, mostró una disminución en la población en el tiempo posiblemente influenciada por las propiedades fisicoquímicas de cada jugo. Mientras que la población en el jugo de naranja comercial mostró un aumento en el tiempo y alcanzó el valor seleccionado como crítico de 5,00 log UFC/mL en aproximadamente 2 días. El EC impactó significativamente ($P < 0,05$) la curva de supervivencia de *A. acidoterrestris* en el jugo de naranja comercial, alcanzando una población por encima de 5,00 log UFC/mL para el tratamiento de 40 % de EC en comparación con el de 6 % que restringió el crecimiento de la población por debajo de este valor crítico. El uso de la cubierta de papel aluminio permitió que la población máxima de la bacteria alcanzara un valor significativamente mayor ($P < 0,05$) que en el jugo envasado y cubierto con tapa metálica. Por lo tanto, *A. acidoterrestris* puede crecer y potencialmente deteriorar el jugo de naranja comercial estudiado cuando se proporcionan las condiciones de crecimiento apropiadas. Además, las condiciones de procesamiento tales como la reducción del espacio de cabeza y el uso de tapas herméticas limitarán las tasas de crecimiento de la bacteria, pero el control del deterioro en estos jugos requiere barreras adicionales.

2. Justificación

En el mercado internacional se ha comercializado tradicionalmente una lista limitada de jugos de frutas y vegetales como: naranja, uva, piña, manzana, tomate y mezclas. Sin embargo, la globalización actual está provocando un interés nuevo en jugos de otras frutas no tradicionales y exóticas. Este tipo de productos encuentra un lugar importante en el mercado debido a su alta calidad y novedad (Caswell 2009).

La industria de jugos y concentrados de frutas en Costa Rica ha experimentado un crecimiento importante en los últimos años, que se refleja en el aumento en sus exportaciones. Según la institución Promotora del Comercio Exterior de Costa Rica (PROCOMER), en el año 2017 los jugos y concentrados de frutas se colocaron como el segundo lugar en la lista de productos de exportación más importantes para la industria alimentaria (PROCOMER 2017).

Los jugos de frutas pueden sufrir deterioro por microorganismos como *Alicyclobacillus* sp. que abarca un género de bacterias con morfología de bacilo, termo-acidófilas, aerobias, no patógenas, con la habilidad de formar esporas. La formación de esporas le permite al microorganismo sobrevivir a los tratamientos usuales de pasteurización utilizados en la industria de jugos y su característica de acidófilo le permite desarrollarse en estos productos a pesar de su acidez (Merle y Montville 2014). Se ha destacado en particular, la especie *Alicyclobacillus acidoterrestris* por su incidencia en repetidos casos de deterioro de jugos y otros productos alimenticios (Durak *et al.* 2010).

El deterioro ocasionado por esta bacteria se caracteriza por la formación de compuestos químicos con olores descritos como “antiséptico”, “desinfectante” o “ahumado”. Los principales compuestos responsable de estos aromas son el guayacol (2-metoxifenol) y en menor medida otros compuestos fenólicos halogenados cuya presencia en los jugos podría ocasionar un rechazo del producto por parte del consumidor, debido a características sensoriales indeseables (Steyn *et al.* 2011).

El deterioro de jugos y concentrados de frutas por *Alicyclobacillus* sp. se ve restringido por una serie de factores fisicoquímicos del producto que limitan el crecimiento del microorganismo (Yokota *et al.* 2007). Por esta razón, en el marco de esta investigación es

importante la caracterización fisicoquímica de los jugos estudiados, con el fin de relacionar estos factores en el jugo con el potencial desarrollo de este microorganismo en cada matriz. El crecimiento de *Alicyclobacillus* sp. en jugos y concentrados es además, dependiente del tipo de fruta y se ha estudiado en jugos de tomate, manzana, naranja, toronja, piña, mango, uva blanca, uva roja, arándano rojo, pera, mandarina, limón, cupuaçu y mezclas (Splittstoesser *et al.* 1994, Silva *et al.* 2000, Walls y Chuyate 2000, Danyluk *et al.* 2011, Oteiza *et al.* 2015). Los estudios realizados con materia prima de Costa Rica son pocos, donde se puede mencionar el estudio realizado por Danyluk *et al.* (2011) en el cual se analizó la presencia de *Alicyclobacillus* sp. en puré de banano y concentrado de piña, obteniéndose resultados de ausencia del microorganismo en estas materias primas.

Para efectos de este proyecto final de graduación, se decidió trabajar con seis jugos tropicales producidos en Costa Rica: naranja, piña, maracuyá, mora, cas y un jugo de naranja comercial. El jugo de naranja comercial se eligió como control positivo debido a la extensa evidencia en la literatura científica que existe sobre el crecimiento de *Alicyclobacillus* sp. en este jugo y la concordancia entre los resultados observados en pruebas preliminares y aquellos reportados por autores previos (Komitopoulou *et al.* 1999, Gocmen *et al.* 2005, Spinelli *et al.* 2010, Pérez-Cacho *et al.* 2011). La naranja, además, tiene una producción importante en el país en especial en la zona norte, que exporta principalmente jugo de naranja concentrado y congelado (CEDAR 2010).

Por su parte, la piña se ha analizado en varios estudios de crecimiento de esta bacteria (Splittstoesser *et al.* 1994, Walls y Chuyate 2000, Grande *et al.* 2005, Danyluk *et al.* 2011) obteniéndose resultados positivos de crecimiento en algunos estudios y negativos en otros. Por esta razón, resulta de particular interés determinar el potencial de crecimiento de este microorganismo en la piña cultivada en Costa Rica. En el país se ha cultivado piña de las variedades Monte Lirio (criolla), Cayena Lisa y Champaka; sin embargo, a partir del año 2001 se cultiva principalmente la variedad MD-2 (golden) (CANAPEP 2016). Cabe destacar además que la piña se ha estudiado por su contenido de enzimas como la bromelina, aunque esta enzima en particular no ha mostrado un importante potencial antimicrobiano sobre *Alicyclobacillus* sp. (Anjos *et al.* 2016). Sumado a lo anterior, destaca la gran producción de piña en el país, la cual posiciona a este cultivo como el tercero de mayor exportación de Costa Rica (PROCOMER 2017).

El interés por incluir el maracuyá en el estudio radica en que el mismo se ha destacado recientemente en estudios como el realizado por McKnight *et al.* (2010), en el cual se identificó la presencia de *Alicyclobacillus* sp. en jugo pasteurizado de maracuyá recolectado de plantas procesadoras de Brasil. Se enfatiza en este estudio que frutas como el maracuyá y la piña tienen un alto potencial de contaminación por este microorganismo debido a su carácter ácido (pH alrededor de 4,0), su crecimiento cercano a la tierra y su superficie rugosa que dificulta el lavado y la desinfección de la fruta.

Por su parte, la producción de mora en Costa Rica es principalmente para el consumo local como jugo y otros productos procesados, donde en el año 2005 solamente un 10-15 % de la producción se destinaba a la exportación (Marín 2016). Las exportaciones de este producto se han reducido en los años recientes, sin embargo, su precio ha incrementado en el mercado internacional y se ha destacado además por su contenido importante de polifenoles (Soto *et al.* 2016). Estos compuestos podrían tener un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *Alicyclobacillus* sp., como se ha observado en jugos de otras frutas con altos contenidos de polifenoles como la uva roja (Splittstoesser *et al.* 1994, 1998). Finalmente, el cas es otra fruta que se exporta en forma de pulpa (Escobedo 2008) y que en estudios recientes también se ha destacado por su contenido de compuestos fenólicos (Flores *et al.* 2013), de ahí la importancia de incluirlo en el estudio.

Se eligió además como variable de estudio el espacio de cabeza como un factor importante que afecta el crecimiento de la bacteria de interés (Yokota *et al.* 2007). Durante las pruebas preliminares de este trabajo final de graduación, se detectó que el espacio de cabeza tenía un efecto importante sobre el crecimiento de *A. acidoterrestis*. Aunque previamente se había analizado el efecto de espacio de cabeza en algunos estudios (Cerny *et al.* 2000, Walker y Phillips 2005), las conclusiones sobre la concentración de oxígeno que inhibe el crecimiento del microorganismo eran poco claras y concluyentes y en ningún estudio previo se había analizado un espacio de cabeza representativo de las aplicaciones industriales actuales. Por esta razón, se consideró relevante analizar el factor de espacio de cabeza sobre su efecto directo en el crecimiento de *A. acidoterrestis*.

El estudio del crecimiento de *Alicyclobacillus* sp. en jugos de frutas de producción nacional, bajo distintas condiciones de procesamiento, puede proveer información básica importante

sobre el potencial de sufrir un efecto desafortunado de deterioro, causado por este microorganismo, que atente contra la estabilidad económica de los productores locales. Asimismo, estos resultados permitirían establecer estrategias para prevenir tales situaciones y con esto garantizar la estabilidad microbiológica de los productos en estudio durante su vida útil. Finalmente, estos hallazgos podrían proveerle a la industria global de jugos, información referente a la metodología para el análisis del potencial de deterioro por *Alicyclobacillus* sp., lo cual podría ayudar a reducir ciertos muestreos innecesarios y costosos, para el caso puntual de ciertos jugos de frutas tropicales.

3. Objetivos

3.1 General

- Evaluar el crecimiento de *A. acidoterrestris* para la determinación de su potencial de deterioro en seis jugos de frutas tropicales de Costa Rica estables a temperatura ambiente y durante un periodo máximo de almacenamiento de dos meses.

3.2 Específicos

- Realizar la caracterización fisicoquímica de los seis jugos de frutas tropicales seleccionados (naranja, piña, maracuyá, mora, cas y naranja comercial) para la determinación del efecto de estos parámetros sobre el potencial de crecimiento de *A. acidoterrestris* en los jugos.
- Determinar el crecimiento de *A. acidoterrestris*, como posible causante de deterioro, en seis jugos de frutas tropicales de Costa Rica durante un periodo de almacenamiento máximo de 2 meses.
- Determinar el efecto del espacio de cabeza sobre el crecimiento de *A. acidoterrestris* en el jugo de frutas tropicales evaluado que muestre el mayor potencial de deterioro por este microorganismo, según la determinación previa.

4. Marco Teórico

4.1 Industria de jugos y concentrados de frutas a nivel global y nacional

La industria de jugos y concentrados de frutas se ha desarrollado como una forma de aprovechar y agregar valor a los productos agrícolas desde tiempos antiguos. En la actualidad, la industria de jugos ocupa un rol importante a nivel agroindustrial por varias razones, entre ellas la facilidad de procesamiento de productos líquidos, la conveniencia de consumo de este tipo de productos, la gran gama de subproductos derivados y sus propiedades nutritivas y funcionales (Caswell 2009). Además, estos productos logran el aprovechamiento de fruta no conforme para el mercado de frutas enteras frescas; que se relaciona con reducir el desperdicio y se destaca como uno de los puntos de interés en el reporte de Mintel de Tendencias en Alimentos y Bebidas (Zegler 2016) del año 2017.

Según la institución Promotora del Comercio Exterior (PROCOMER) de Costa Rica, los jugos y concentrados de frutas subieron a la posición 6 en la lista de los principales productos de exportación del país del año 2017. En términos económicos, estas exportaciones representaron un valor de \$ 226,4 millones para dicho año (PROCOMER 2017). Desde el año 2011 se ha dado una baja en el consumo de alimentos tipo 100 % jugo, no obstante, los jugos y concentrados que exporta Costa Rica se aprovechan para la elaboración de otros productos, como lo son los batidos (“*smoothies*”) y las bebidas de frutas (Zegler 2016).

Los principales países a los cuales Costa Rica exporta jugos y concentrados de frutas, son Holanda (33 %), Estados Unidos (32 %), Bélgica (9 %) y España (9 %) (PROCOMER 2017). La oferta de este tipo de productos ha aumentado en otros países centroamericanos como Panamá, donde en los últimos años se ha invertido en plantas de procesamiento cuyo mercado meta se centra en Estados Unidos y Europa. Esta situación podría aumentar la competencia en los mercados destino, por lo que es importante que la industria de jugos y concentrados de frutas del país ofrezca productos de calidad y contemple las opciones de innovación para mantener su posición en el mercado (PROCOMER 2015).

4.2 Jugos: definición y deterioro microbiológico

La legislación propuesta por la Unión Europea (UE 2012) define el zumo (jugo) de frutas como, “el producto susceptible de fermentación, pero no fermentado, obtenido a partir de las partes comestibles de frutas sanas y maduras, frescas o conservadas por refrigeración o congelación, de una o varias especies mezcladas, que posea el color, el aroma y el sabor característicos del zumo de la fruta de la que procede”. Por su parte, el Código Federal de Regulaciones de los Estados Unidos (FDA 2017c) reconoce como jugo, “el líquido acuoso exprimido o extraído de una o más frutas u hortalizas, purés de las porciones comestibles de uno o más frutos o verduras o cualquier concentrado de dicho líquido o puré.” En ambos casos se prohíbe agregar otros ingredientes como azúcar o acidulantes, si se desea mantener la definición de jugo de frutas.

Los jugos de frutas tropicales se clasifican mayoritariamente como productos ácidos, debido a su pH inferior a 4,6 (FDA 2017b). Debido a su acidez, estos productos inhiben el crecimiento de una gran cantidad de microorganismos patógenos (aquellos que causan daño a la salud del consumidor), no obstante, existe una serie de microorganismos de deterioro que se pueden desarrollar y que afectan aspectos de calidad del producto (Tribst *et al.* 2009). Los microorganismos de deterioro más comunes en jugos de frutas son levaduras, mohos y bacterias ácido lácticas que pueden desarrollarse a pesar de las condiciones de acidez del medio (Smit *et al.* 2011).

Existe, además, una serie de bacterias de deterioro que afectan la calidad de los jugos, que tienen la habilidad de formar endosporas. Las esporas son una forma latente, altamente resistente de la bacteria que pueden sobrevivir con poco o nulo consumo metabólico (Holdsworth y Simpson 2016). Estas estructuras le brindan a las bacterias esporuladas la habilidad de sobrevivir a condiciones físicas y químicas extremas, como la exposición a altas temperaturas, desinfectantes, presión y radiación. Asimismo, las esporas pueden mantener su viabilidad por periodos extendidos de tiempo hasta que las condiciones sean favorables para su activación y germinación, cuando vuelven a su estado de célula vegetativa (Tucker y Featherstone 2010).

Con el fin de asegurar la inocuidad y alargar la vida útil de los jugos, este tipo de producto se somete a un tratamiento térmico. Entre los tratamientos más utilizados en la industria para

jugos ácidos se encuentra el llenado en caliente que conlleva el calentamiento del producto hasta 90 °C por 2 segundos, seguido por el llenado a 85 °C que se mantiene por al menos 1 minuto (FDA y CFSAN 2004). Dicho tratamiento permite producir jugos estables a temperatura ambiente que aseguran la eliminación de microorganismos patógenos y de deterioro que se puedan desarrollar en condiciones normales de almacenamiento, pero no elimina las esporas bacterianas (Smit *et al.* 2011).

En los años ochenta, se creía que los jugos de frutas ácidos estaban exentos de deterioro por bacterias formadoras de esporas, debido a la incapacidad de la mayoría de las esporas de germinar a valores de pH menores a 4,6 (Merle y Montville 2014). Sin embargo, en Alemania en 1982 ocurrió un caso de deterioro de jugo de manzana pasteurizado (pH de 3,15) ocasionado por una bacteria esporulada que se identificó posteriormente como *Alicyclobacillus* sp. (Cerny *et al.* 1984). En los años siguientes se reportaron casos similares asociados con este microorganismo en Japón, Australia y Estados Unidos (Yokota *et al.* 2007).

4.3 Generalidades del microorganismo *Alicyclobacillus* sp.

El microorganismo detectado en el caso de deterioro de jugo de manzana en Alemania, en un inicio se clasificó bajo el género de *Bacillus* sp. debido a similitudes en su morfología y propiedades termo-acidófilas (Smit *et al.* 2011). En los años noventa, se definió un nuevo género denominado *Alicyclobacillus* sp. que en la actualidad abarca 23 especies y 2 subespecies (Dabrowska y Kunicka-Styczynska 2018). De estas 23 especies sólo las siguientes 7 se han asociado con casos de deterioro de alimentos: *A. acidoterrestris*, *A. acidocaldarius*, *A. hesperidum*, *A. cycloheptanicus*, *A. acidiphilus*, *A. fastidiosus* y *A. pomorum* (Steyn *et al.* 2011). Generalmente, *A. acidoterrestris* es la especie de mayor interés en jugos debido a su alta frecuencia de aislamiento, su producción importante de guayacol (compuesto químico de deterioro) y su alta resistencia térmica (Durak *et al.* 2010).

Alicyclobacillus sp. abarca un género de bacterias con morfología de bacilo, termo-acidófilas, aerobias, no patógenas, con la habilidad de formar esporas. Se ha aislado de ambientes geotérmicos (como aguas termales a alta temperatura), pero comúnmente proviene del suelo y del agua (Rivera 2009). Esta bacteria puede crecer a valores de pH entre 2,2 y 5,8 y temperaturas entre 23 y 55 °C; además, sobrevive los tratamientos comunes de pasteurización

de jugos. Para su crecimiento, requiere ambientes con un a_w superior a 0,90 y puede crecer en jugos con hasta 18,2 °Brix (Merle y Montville 2014).

Su resistencia al ácido y al calor se le atribuye principalmente a la composición de su membrana que contiene ácidos grasos ω -ciclohexano y ω -cicloheptano. Estos ácidos grasos ω -alíclicos se encuentran densamente empaquetados, unidos por fuertes enlaces hidrofóbicos que estabilizan la membrana y reducen su permeabilidad ante ambientes de acidez o temperatura extrema (Steyn *et al.* 2011).

La habilidad de las esporas de *A. acidoterrestris* de sobrevivir a los tratamientos usuales de pasteurización de jugos, se demuestra con los altos valores D reportados para este microorganismo. Los valores D hacen referencia al tiempo de calentamiento en minutos necesario para obtener una inactivación del 90% de la población microbiana (Holdsworth y Simpson 2016). Según Smit *et al.* (2011), quien recopiló una serie de estudios sobre el tema, se ha demostrado que los valores $D_{95^\circ\text{C}}$ para *A. acidoterrestris* en jugos de manzana, uva, bayas, naranja, frutas, limón clarificado y limón no clarificado, se encuentran entre 1 y 9,98 minutos.

Algunas referencias bibliográficas sugieren utilizar *A. acidoterrestris* como el microorganismo de referencia para el diseño de tratamientos térmicos para jugos (Silva *et al.* 2000). Sin embargo, el problema de esta proposición es que los altos valores D implicarían tratamientos con temperaturas muy elevadas o largos tiempos de exposición, los cuales podrían afectar negativamente la calidad nutricional y sensorial de los productos (Groenewald *et al.* 2013).

La aplicación de calor a una temperatura alta (75-90 °C) por un tiempo corto (5-20 min), puede favorecer la germinación de esporas de *Alicyclobacillus*. Este tipo de tratamiento se denomina choque térmico y se utiliza comúnmente como parte de las metodologías de detección y cuantificación de *Alicyclobacillus* sp. en jugos (JFJA 2003, IFU 2007). Existen distintas combinaciones propuestas de tiempo y temperatura para obtener la mayor germinación de esporas y lograr su correcta cuantificación, entre ellas cabe mencionar las siguientes: 20 minutos a 75 °C recomendado por Gocmen *et al.* (2005) y 10 minutos a 80 °C

recomendado en el método desarrollado por el *International Federation of Fruit Juice Producers* (IFU 2007).

A pesar de que varios autores opinan que no es estrictamente necesaria la aplicación de un choque térmico (Yokota *et al.* 2007), otros le atribuyen beneficios en la cuantificación más exacta de la población de *Alicyclobacillus* sp. (Gocmen *et al.* 2005, IFU 2007). El choque térmico elimina células vegetativas de otros microorganismos contaminantes y puede ayudar a sincronizar y favorecer la germinación de las esporas de *Alicyclobacillus* sp. para evitar subestimar la población presente (IFU 2007). El tratamiento de pasteurización usual que reciben los jugos podría funcionar como una especie de choque térmico, lo que favorecería la germinación de esporas de *Alicyclobacillus* sp. presentes en el producto aún después de su procesamiento y durante el periodo de almacenamiento. Además, es importante mencionar que la germinación de las esporas a células vegetativas es necesaria para que *Alicyclobacillus* sp. pueda deteriorar el producto (Smit *et al.* 2011).

4.4 Deterioro de jugos de frutas tropicales por *Alicyclobacillus* sp.

El deterioro en jugos ocasionado por *A. acidoterrestris* se caracteriza por la formación de compuestos químicos con olores descritos como “antiséptico”, “desinfectante” o “ahumado”. Los principales compuestos responsables de estos aromas son el guayacol (2-metoxifenol) y en menor medida el 2,6-diclorofenol (2,6-DCP) y el 2,6-dibromofenol (2,6-DBP). El deterioro producido no se asocia con la formación de gas o ácido, aunque en algunos casos puede ocasionar un aumento en la turbidez y la formación de sedimento. Por lo tanto, el deterioro ocasionado por esta bacteria, puede ocurrir sin signos visibles evidentes y puede ocasionar el rechazo del producto por parte de los consumidores debido a olores desagradables (Steyn *et al.* 2011).

La detección de guayacol es importante ya que en muy bajas concentraciones es detectable por los sentidos humanos. La detección del guayacol se puede realizar por métodos sensoriales, químicos y analíticos. En cuanto a los métodos sensoriales, distintos estudios han tratado de determinar el límite de detección olfativo y de gusto del guayacol y han concluido que estos varían según la sensibilidad y el entrenamiento de los panelistas y la matriz en la que se realiza la prueba. Como parte de un estudio realizado por Eisele y Semon (2005), se determinó el mejor umbral estimado para guayacol en jugo de manzana. En dicho estudio se

concluye que el límite de detección olfativo varía entre 0,17-4,71 ppb y el límite de gusto entre 0,01-4,71 ppb.

Aunque no se haya realizado en el presente estudio, la detección de guayacol también se puede realizar por métodos analíticos que combinan métodos de extracción como la microextracción en fase sólida, con técnicas de identificación como la cromatografía líquida de alta resolución o cromatografía de gases. Además, existe un método químico colorimétrico que utiliza la reacción de oxidación de guayacol en presencia de H₂O₂ y la enzima peroxidasa, para generar un coloración café que se puede medir de forma cualitativa o cuantitativa (Smit *et al.* 2011).

La producción de guayacol por parte de *Alicyclobacillus* sp. requiere la presencia de una especie productora de guayacol y precursores del guayacol en el jugo. La producción de guayacol se da como un producto del metabolismo del ácido ferúlico y se han identificado como precursores el ácido vanílico, como principal precursor, y la vainillina, aunque su conversión metabólica a guayacol es más lenta que la del ácido vanílico. La vainillina se puede encontrar en los jugos de frutas como un derivado del ácido ferúlico (derivado a su vez de la lignina) y se ha identificado en fresas, mangos, jugo de naranja y jugo de cítricos (Witthuhn *et al.* 2012).

Otro factor que puede afectar la producción de guayacol es la concentración de la población de *A. acidoterrestris*. Los valores más aceptados de población de esta bacteria necesarios para producir deterioro por producción de este metabolito, son de 10⁴ -10⁵ UFC/mL (Huang *et al.* 2015). Sin embargo, otros estudios como el realizado por Orr *et al.* (2000) detectaron la presencia de guayacol en jugos mediante métodos sensoriales, aunque la población de *A. acidoterrestris* no aumentó notablemente durante el estudio ni alcanzó estos valores reportados por otros autores. Por otro lado, un estudio realizado por Pérez-Cacho *et al.* (2011) mostró que existe una correlación positiva entre el crecimiento del microorganismo y la producción de guayacol, pero la relación aún no es comprendida por completo, ya que la fase estacionaria de crecimiento del microorganismo y períodos de estrés podrían influenciar la producción de dicho metabolito.

4.5 Impacto de *Alicyclobacillus* sp. y la importancia de su control en la industria de jugos y concentrados de frutas

Con el fin de determinar el impacto industrial de la contaminación de jugos con *Alicyclobacillus* sp., la Asociación Europea de Jugos de Frutas (AIJN por sus siglas en inglés) realizó una encuesta a 68 participantes de distintas áreas de la industria de procesamiento de frutas. Los resultados de esta encuesta mostraron que el 45 % de los participantes habían experimentado problemas con este microorganismo en los tres años previos al estudio y además el 33 % de estos había presentado problemas en múltiples ocasiones. De estos incidentes el 35 % de ellos se calificaron de severidad media a alta, por lo que se destaca la importancia del control de *Alicyclobacillus* sp. Los principales productos asociados con estos incidentes de contaminación eran materias primas crudas y concentrados (Howard 2006).

Se ha observado un crecimiento particularmente favorable en jugos como el de tomate, manzana y naranja; mientras que su crecimiento se ha visto limitado en jugos con compuestos inhibitorios naturales tales como la uva roja, por su contenido de polifenoles (Splittstoesser *et al.* 1994) y el limón, por la presencia de polifenoles en particular flavonoides (Oteiza *et al.* 2015). Las frutas que crecen en cercanía al suelo o que se cosechan directamente del suelo, también pueden tener una mayor posibilidad de acarrear este microorganismo que se transmite por medio de la tierra (McKnight *et al.* 2010).

La importancia del control de *Alicyclobacillus* sp. en la industria de jugos lo destacan autores como Merle y Montville (2014) al señalar como la falta de control de esta bacteria puede causar importantes pérdidas económicas a los procesadores. Esto se debe a que un nivel de contaminación inicial bajo de este microorganismo puede contaminar grandes lotes. Además, como el deterioro ocasionado por la producción de guayacol puede ocurrir tiempo antes de la fecha de expiración (determinada según parámetros fisicoquímicos y/o sensoriales) sin signos visibles de deterioro (cambios de textura, color, etc.), se dificulta su identificación en el jugo. La calidad microbiológica es de especial importancia en los productos destinados a la exportación ya que aproximadamente el 60 % de los países destinatarios requieren ausencia de la bacteria para comprar el producto. La presencia de la bacteria en lotes de producción recibidos en el extranjero podría implicar la destrucción de lotes enteros, además de generar desconfianza entre los proveedores y los compradores (Oteiza *et al.* 2011).

Algunos de los métodos existentes para evitar el crecimiento o eliminar la presencia del microorganismo en los jugos incluyen la adición de antimicrobianos naturales (Piskernik *et al.* 2016, de Pascoli *et al.* 2018), bacteriocinas (Peña y de Massaguer 2006, Peña *et al.* 2011) o preservantes (Walker y Phillips 2005) para evitar el crecimiento de esta bacteria y el deterioro que ocasiona. También se ha propuesto el uso de metodologías mixtas que combinan los métodos previamente mencionados, con otros tratamientos como los térmicos, altas presiones hidrostáticas, radiación UV y radiación gama con el fin de encontrar el método óptimo de control de *Alicyclobacillus* sp. (Merle y Montville 2014). Sin embargo, debido a la alta resistencia de *Alicyclobacillus* sp. descrita anteriormente, gran parte del control de esta bacteria en la industria se basa en métodos preventivos. La aplicación de buenas prácticas de agricultura y manufactura, son de los controles más importantes para evitar el ingreso del microorganismo a las plantas procesadoras (Huang *et al.* 2015). Además, la operación de desinfección también ha sido estudiada con el fin de encontrar un tratamiento efectivo para la eliminación del microorganismo de las superficies de las frutas, como parte del sistema de calidad y para así evitar el deterioro de jugos por esta bacteria (Tianli *et al.* 2014).

4.6 Factores que afectan el crecimiento de *Alicyclobacillus* sp.

El crecimiento de *Alicyclobacillus* sp. se ve afectado por una serie de factores del jugo y del ambiente de almacenamiento. Algunos de los factores más importantes son los siguientes: especie de *Alicyclobacillus* sp., temperatura de almacenamiento, potencial redox, concentración de oxígeno disuelto (espacio de cabeza) y composición fisicoquímica y propiedades del jugo que incluye aspectos como: pH, contenido de sólidos solubles, presencia de sustancias inhibitorias y perfil de ácidos orgánicos (Yokota *et al.* 2007).

4.6.1 Especie de *Alicyclobacillus* sp.

Las distintas especies que se engloban en el género de *Alicyclobacillus* sp. tienen características genéticas compartidas que las agrupan como un mismo género filogenético (Goto *et al.* 2003). No obstante, existen diferencias entre las especies que se clasifican dentro de este género, en particular respecto a su sensibilidad a la temperatura y a ciertos compuestos inhibitorios en los jugos (Yokota *et al.* 2007). Anteriormente, se recalcó la importancia de la especie *Alicyclobacillus acidoterrestris* como responsable de múltiples casos de deterioro, sin embargo, aún dentro de una misma especie se pueden observar diferencias en el

crecimiento de esta bacteria. Se ha observado que generalmente una cepa aislada de cierto tipo de jugo de fruta tiende a crecer bien en ese jugo. *Alicyclobacillus acidoterrestris* ATCC 49025, la cepa seleccionada para ejecutar este estudio, es aislada del suelo y presenta una serie de características propias que afectan su crecimiento y que han sido estudiadas anteriormente por otros autores (Gocmen *et al.* 2005, Durak *et al.* 2010, Ferrario y Guerrero 2018).

4.6.2 Temperatura de almacenamiento

La temperatura de almacenamiento es un factor externo al jugo que se puede controlar con medidas adecuadas y que representa un factor crítico para el crecimiento de una bacteria termófila. En el caso de *A. acidoterrestris* su rango de temperatura de crecimiento es de 20-70 °C, sin embargo, su rango óptimo es de 36-56 °C (Smit *et al.* 2011).

Varios estudios han analizado si la reducción de la temperatura de almacenamiento puede limitar el crecimiento de la bacteria, y han encontrado que una adecuada cadena de frío inhibe el desarrollo de *A. acidoterrestris*, aunque aun pueden sobrevivir sus esporas (Oteiza *et al.* 2013). Sin embargo, para productos estables a temperatura ambiente, la temperatura de comercialización (alrededor de 25 °C) podría permitir el crecimiento y deterioro por esta bacteria (Witthuhn *et al.* 2011). Así, se determinó que el enfriamiento de los productos hasta temperatura ambiente, después de su tratamiento térmico y cómo única medida de control, no es suficiente para detener el crecimiento de este microorganismo.

4.6.3 pH

La mayoría de las especies de *Alicyclobacillus* sp. pueden crecer en un rango de pH entre 2,0-6,0; por lo que su habilidad de crecimiento en condiciones ácidas lo distinguen como un microorganismo importante de deterioro en jugos (Tianli *et al.* 2014). En el caso específico de crecimiento de *A. acidoterrestris*, su rango óptimo de pH se encuentra entre 3,5-4,0 (Yokota *et al.* 2007). En estudios recientes utilizando la cepa de *A. acidoterrestris* ATCC 49025 (misma cepa utilizada en el presente estudio), se observó crecimiento del microorganismo en condiciones de pH tan bajas como 2,52; cuando se acondicionaba la temperatura de almacenamiento a 45 °C (Kakagianni *et al.* 2018). Además, el mismo estudio, mediante

modelos predictivos, determinó que el valor óptimo de pH para el crecimiento de dicha cepa era de 4,22.

4.6.4 Contenido de sólidos solubles

Productos como los concentrados de frutas, con alto contenido de sólidos solubles (40-70 °Brix), limitan la germinación de las esporas de *A. acidoterrestis* y por lo tanto representan una manera efectiva de comercializar este tipo de productos (Steyn *et al.* 2011). Sin embargo, los concentrados representan una importante fuente de contaminación en el ambiente de plantas procesadoras, pues esta bacteria puede sobrevivir y desarrollarse posteriormente en jugos y bebidas preparados a partir de su reconstitución. Estudios existentes han mostrado que valores menores a 20 °Brix pueden permitir el crecimiento de *Alicyclobacillus* sp. (Splittstoesser *et al.* 1994, Chang y Kang 2004), de esta manera, los sólidos solubles usuales de un jugo 100 % de fruta generalmente no controlarían el crecimiento de la bacteria en estudio.

4.6.5 Sustancias inhibitorias

Algunos de los primeros estudios de crecimiento de *Alicyclobacillus* sp. en jugo notaron la inhabilidad de esta bacteria de crecer en jugo de uva (Splittstoesser *et al.* 1994). Estudios posteriores lograron atribuir la inhibición observada a compuestos fenólicos neutros, presentes naturalmente en el jugo, donde en el caso de la uva se distingue la catequina galato (Splittstoesser *et al.* 1998). En un estudio más reciente de Molva y Baysal (2015b), analizaron el efecto de los compuestos fenólicos de la granada real sobre el crecimiento de *A. acidoterrestis*. En dicho estudio, utilizando microscopía electrónica de barrido, observaron que los compuestos fenólicos ejercen su poder inhibitorio sobre la pared celular bacteriana, mediante la precipitación de proteínas en la membrana, que conlleva a la lisis celular.

Los compuestos inhibitorios encontrados de manera natural en algunos jugos se han analizado para crear extractos altos en los compuestos inhibitorios para *A. acidoterrestis*. Se han desarrollado extractos de semilla de uva (Molva y Baysal 2015a), extractos de granada real (Molva y Baysal 2015b) y extractos de chiles del género *Piper* (de Pascoli *et al.* 2018) que han mostrado un efecto inhibitorio sobre esta bacteria. Otros compuestos naturales

estudiados por sus propiedades inhibitorias hacia *A. acidoterrestris*, incluyen aceites esenciales, quitosano, enzimas como la lisozima y algunos ácidos grasos y ésteres (Huang *et al.* 2015).

Además de las sustancias inhibitorias que pueden estar naturalmente presentes en los jugos, se ha analizado una serie de compuestos añadidos a los jugos por su efecto contra *A. acidoterrestris*, incluyendo bacteriocinas como la nisina (Komitopoulou *et al.* 1999) y preservantes como el benzoato de sodio y el sorbato de potasio; los cuales han sido efectivos a bajas concentraciones (Walker y Phillips 2008).

4.6.6 Ácidos orgánicos

El efecto de los ácidos orgánicos sobre el crecimiento de *A. acidoterrestris*, ha sido de especial interés debido a su uso en la acidificación del agar utilizado para la enumeración microbiológica de esta bacteria. Estudios han mostrado que el ácido cítrico y el ácido málico, dos de los ácidos mayoritarios en jugos de frutas (Belitz *et al.* 2009, Hounhouigan *et al.* 2014b), no muestran un efecto inhibitorio hacia la bacteria.

Por otro lado, en condiciones de bajo pH se determinó que los siguientes ácidos en orden descendiente podrían mostrar efectos inhibitorios hacia el crecimiento de *A. acidoterrestris*: ácido acético, ácido adípico, ácido láctico y ácido fumárico. En este caso, se encontró que el ácido acético provocaba una fuerte inhibición hacia el crecimiento de esta bacteria (Yokota *et al.* 2007) De esta manera, el contenido de ácidos orgánicos de un jugo podría afectar el crecimiento de *A. acidoterrestris*, pero además, el tipo de ácido utilizado en la acidificación del agar para las técnica de recuento, podría afectar la recuperación de esta bacteria.

4.6.7 Potencial redox, oxígeno disponible y espacio de cabeza como variable de estudio

El microorganismo *Alicyclobacillus* sp. es estrictamente aerobio, por lo que su crecimiento se ve fuertemente afectado por el oxígeno disponible y el potencial redox del medio. En un estudio en jugo de manzana realizado por Cerny *et al.* (2000), demostraron que la adición de ácido ascórbico, que lleva a la reducción del potencial redox del jugo, puede afectar el crecimiento de *A. acidoterrestris*. Se observó que al adicionar ácido ascórbico a una concentración de 10 mg/100 mL de jugo, el crecimiento era mayor a cuando no se adicionaba

el compuesto. Sin embargo, cuando la concentración de ácido ascórbico superaba los 15 mg/100 mL de jugo era posible inhibir por completo el crecimiento de esta bacteria.

El factor de oxígeno disponible se ve fuertemente ligado al espacio de cabeza resultante del proceso de envasado de los jugos. Es importante destacar que el espacio de cabeza usual utilizado en la industria de jugos es de aproximadamente 6 % (volumen/volumen) (Tucker y Featherstone 2010). Estudios previos mostraron que el crecimiento de *A. acidoterrestris* en jugo de naranja y manzana, se ve inhibido cuando el espacio de cabeza del jugo es nulo (0% espacio de cabeza) (Cerny *et al.* 2000).

En otros estudios como el realizado por Walker y Phillips (2005) probaron el efecto de un espacio de cabeza del 0, 25, 50 y 75 % sobre el crecimiento de *A. acidoterrestris* en jugo de manzana. Los resultados mostraron nuevamente que un espacio de cabeza nulo resultaba en un crecimiento significativamente menor, sin embargo, no se observaron diferencias en el crecimiento de la bacteria entre las otras tres condiciones analizadas. Este mismo estudio recalcó que la agitación de los envases durante el procesamiento y transporte de los jugos podría permitir la incorporación de un mayor contenido de oxígeno del espacio de cabeza al jugo. La agitación, además, puede afectar de manera importante la recuperación de esporas y células vegetativas en el proceso de enumeración microbiológica de la bacteria en jugos que han sido almacenados.

El material de los recipientes utilizados para envasar el jugo también puede afectar la disponibilidad de oxígeno en el medio. El crecimiento *Alicyclobacillus* sp. se vio reducido cuando envases de cartón se recubrían con una capa adicional de aluminio, reduciendo su permeabilidad al aire exterior. De forma similar, el envasado de jugo en latas de aluminio, reduce el deterioro que puede causar este microorganismo, ya que limita la cantidad de oxígeno disponible, a aquella presente en el espacio de cabeza en el momento del envasado (Yokota *et al.* 2007).

Finalmente, la relación entre el factor de oxígeno disponible y el crecimiento de *Alicyclobacillus* sp. en jugos, no se puede desligar de las otras propiedades que caracterizan cada tipo de jugo. En el mismo estudio mencionado anteriormente (Cerny *et al.* 2000), se determinó que una reducción en la concentración de oxígeno hasta 0,1 % era suficiente para limitar el crecimiento de *A. acidoterrestris* en jugos de manzana y uva blanca; mientras que

el mismo contenido de oxígeno residual en jugo de naranja, aún permitía el crecimiento de la bacteria.

5. Materiales y Métodos

5.1 Localización

Las determinaciones experimentales se llevaron a cabo en las instalaciones del Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA) y de la Escuela de Tecnología de Alimentos, donde se utilizaron los laboratorios de Microbiología y Química, además de la Planta Piloto. Ambas instituciones se encuentran localizadas en la Ciudad Universitaria Rodrigo Facio de la Universidad de Costa Rica, San Pedro, Montes de Oca.

5.2 Elaboración de los jugos de fruta

Se preparó un lote de cada uno de los cinco jugos de frutas, a partir de jugo de fruta comercial. El producto preparado se denominó tipo 100 % jugo al ser exprimido directamente de la fruta sin procesos de concentración o reconstitución (FDA 2017a). A continuación, en la Figura 1, se muestra el proceso de elaboración de los jugos estables a temperatura ambiente que se prepararon en la planta piloto del CITA a partir de jugo de fruta comercial 100 %.

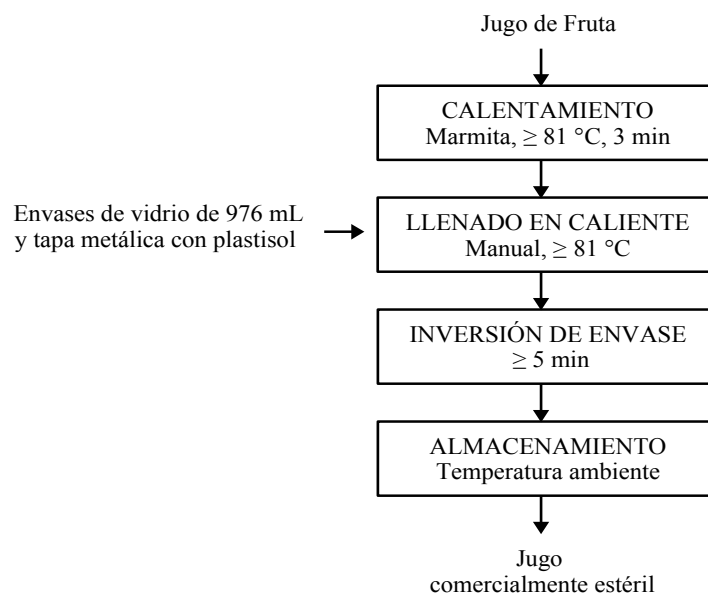


Figura 1. Flujo de proceso de elaboración de jugo estable a temperatura ambiente.

Con el fin de asegurar la esterilidad comercial de los jugos elaborados, se aplicó el tratamiento de llenado en caliente recomendado por Padilla-Zakour (2008) para alimentos con un pH menor a 3,9. Como lo muestra el Cuadro I, todos los jugos seleccionados para el estudio presentaban un pH aproximado menor a este valor. Además, el valor de pH exacto de cada jugo se determinó en el primer objetivo de este estudio, con el fin de asegurar que el tratamiento térmico aplicado fuera el adecuado para cada producto.

El jugo se sometió a un tratamiento térmico hasta alcanzar una temperatura mínima de 81 °C que se mantuvo por tres minutos, como se indica en la Figura 1 y luego se envasó en caliente a esta temperatura en recipientes de vidrio limpios de 976 mL asegurando un espacio de cabeza uniforme de alrededor de un 6 % del volumen del envase. El espacio de cabeza se reguló para afirmar que éste no sobrepasara el 10% del volumen del envase, según las prácticas comunes en la industria de jugos y bebidas (Tucker y Featherstone 2010). Los envases y las tapas (grado alimentario) fueron previamente lavados y desinfectados con alcohol (70%) en las instalaciones de la planta piloto, aunque las condiciones del llenado en caliente y la inversión posterior del envase están diseñadas para asegurar la esterilidad comercial del producto, evitando así problemas de inocuidad y deterioro microbiológico.

Cabe destacar que se decidió trabajar con jugos estables a temperatura ambiente con el objetivo de evitar la presencia de microorganismos que se puedan desarrollar en las condiciones del experimento e interferir en la detección del microorganismo en estudio. Asimismo, los reportes de deterioro por este microorganismo se han generado en jugos comercialmente estériles comercializados a temperatura ambiente, pues en refrigeración se observa un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de la bacteria (Smit *et al.* 2011).

El espacio de cabeza se reguló ya que este factor afecta la cantidad de oxígeno disuelto en el producto, el cual se ha comprobado que tiene un efecto sobre el crecimiento de *Alicyclobacillus* sp. en jugos (Walker y Phillips 2005). Una vez llenados los envases se taparon inmediatamente y se invirtieron por 5 minutos para calentar la superficie interna del espacio de cabeza y la tapa. Los jugos preparados se almacenaron a temperatura ambiente hasta su uso.

Además, se utilizó en el estudio un jugo de naranja comercial (correspondiente a varios lotes) estable a temperatura ambiente, como control positivo para el crecimiento del

microorganismo. El jugo de naranja comercial seleccionado mostró un comportamiento similar al reportado por otros autores en cuanto a crecimiento del microorganismo de interés (Gocmen *et al.* 2005).

Cuadro I. Valores de pH aproximados asociados con los jugos de frutas tropicales utilizados en el estudio.

Jugo	pH
Naranja	3,3 - 4,2 ¹
Mora	2,6 - 2,8 ²
Piña	3,5 - 3,7 ³
Cas	< 2,6 ⁴
Maracuyá	2,7 - 3,2 ⁵

¹(FDA y CFSAN 2007), ²(Soto *et al.* 2016), ³(Ramsaroop y Saulo 2007), ⁴(Mata 1992), ⁵(Pinheiro *et al.* 2006)

Para la verificación de la esterilidad comercial de los jugos elaborados (se trata de un mismo lote de jugo utilizado para todo el estudio) y los distintos lotes de jugo de naranja comercial, se realizaron tres réplicas del análisis de recuento total aerobio de microorganismos mesófilos utilizando el procedimiento descrito por el CITA (2017e) “P-SA-MM-001”, en agar estándar seguido por una incubación a 35 °C por 48 horas, que se basa en el método descrito por Pouch y Ito (2001), con la modificación del uso de 2,3,5-Trifeniltetrazolio cloruro (TTC) en el agar para facilitar el conteo de colonias. Además, se realizaron tres réplicas del análisis de recuento total de mohos y levaduras por vaciado utilizando agar papa dextrosa acidificado (con ácido tartárico a un pH de 3,5) incubado a 30 °C por 48 horas, esto según la metodología utilizada por Splittstoesser y Churey (1989) y Tandon *et al.* (2003).

Con el fin de comprobar la esterilidad comercial de los jugos, se realizaron tres réplicas del procedimiento descrito en el *Bacteriological Analytical Manual* (Landry *et al.* 2001) para la evaluación de alimentos enlatados. Una muestra de cada jugo envasado se incubó por un periodo de 14 días a 35 °C. Posteriormente se colocaron 1-2 mL del producto en seis tubos de ensayo, donde se utilizaron dos tubos de caldo ácido y dos de caldo extracto de malta que se incubaron a 30 °C por 96 horas y dos tubos de caldo ácido que se incubaron a 55 °C por 48 horas. Para cada condición se prepararon dos tubos, donde uno se incubó de manera

aerobia y el segundo se colocó en una jarra hermética para asegurar anaerobiosis. Posterior a la incubación, se realizó el rayado de los tubos en placas de Petri con agar tripticasa soya (ATS), para comprobar la ausencia de microorganismos que pudieran crecer en las condiciones analizadas. Además, se anotaron las características de pH, color, olor, consistencia y calidad general de cada jugo analizado.

5.3 Pruebas preliminares

Se realizó una prueba de crecimiento, según lo descrito en el artículo de Gocmen *et al.* (2005), con *A. acidoterrestris* ATCC 49025 en jugo de naranja comercial estable a temperatura ambiente, para confirmar el crecimiento del microorganismo en el lapso de tiempo reportado para dicha cepa.

Asimismo, se realizaron las pruebas necesarias para estandarizar algunas etapas del protocolo. Entre ellas se determinó la metodología para la inoculación del jugo con el fin de lograr la carga microbiana deseada. Se realizó una prueba para comprobar el tiempo y la temperatura requerida para la aplicación del choque térmico al microorganismo; esto considerando las condiciones reportadas en la literatura. Se probaron, además, varios medios de cultivo como el agar papa dextrosa y el agar YSG acidificados a distintos valores de pH con el fin de determinar el medio de cultivo idóneo para el crecimiento del microorganismo. Se realizaron también ensayos experimentales con la bacteria de interés para determinar la metodología de montaje (vaciado versus esparcimiento) que permitiera el mejor conteo de colonias. Finalmente, se realizaron pruebas para determinar los tiempos de muestreo apropiados durante el almacenamiento para describir adecuadamente la población bacteriana a través del tiempo.

5.4 Caracterización fisicoquímica de los cinco jugos de frutas tropicales

Se determinaron los parámetros fisicoquímicos descritos a continuación en los cinco jugos preparados y del jugo de naranja comercial, para comprobar su posible efecto sobre el crecimiento de *A. acidoterrestris*. Todos los análisis se realizaron por triplicado y se reportó el resultado como el promedio de las tres repeticiones con su respectiva desviación estándar.

5.4.1 Determinación de pH

Se realizó la medición de pH de cada uno de los jugos utilizando el procedimiento descrito por el CITA (2016e) “P-SA-MQ-012” basado en el método número 921.12 de la *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) (2005).

5.4.2 Determinación de acidez total

Se realizó la medición de acidez total de cada uno de los jugos utilizando el procedimiento descrito por el CITA (2016a) “P-SA-MQ-011” basado en el método número 942.15 de la AOAC (2005) con la modificación de la utilización del titulador automático.

5.4.3 Determinación de sólidos solubles

Se determinó el contenido de sólidos solubles (expresado como °Brix) de los jugos utilizando el procedimiento descrito por el CITA (2015) “P-SA-MQ-046” basado en el método número 932.12 de la AOAC (2012) con la modificación de la utilización de un refractómetro automático.

Asimismo, las siguientes determinaciones fueron realizadas por el laboratorio de química del CITA para complementar la caracterización de los jugos.

5.4.4 Determinación de azúcares: fructosa, glucosa y sacarosa

Se determinó el contenido de azúcares (fructosa, glucosa y sacarosa) de cada uno de los jugos utilizando el procedimiento descrito por el CITA (2017a) “P-SA-MQ-006” basado en los métodos de Pirisino (1983) y Sullivan y Carpenter (1993).

5.4.5 Determinación de ácidos orgánicos

Se determinó el contenido de ácidos orgánicos (cítrico, málico, succínico y vitamina C) de cada uno de los jugos utilizando los procedimientos descritos por el CITA (2016b) “P-SA-MQ-051” basado en los métodos de Fernández-García y McGregor (1994), Nozal *et al.* (2003) y Gokturk (2006) y CITA (2016g) “P-SA-MQ-024” basado en los métodos de Lykkesfeldt (2000), Hernández *et al.* (2006), Wechtersbach y Cigić (2007) y Mertz (2009).

Los ácidos cuantificados se eligieron por ser los ácidos de mayor prevalencia en las frutas utilizadas para la elaboración de los jugos (Belitz *et al.* 2009, Hounhouigan *et al.* 2014b).

5.4.6 Determinación de polifenoles totales

Se realizó la determinación de polifenoles totales en cada uno de los jugos utilizando el procedimiento descrito por el CITA (2016d) “P-SA-MQ-048” basado en los métodos de Slinkard y Singleton (1977) y Georgé y Brat (2005).

5.4.7 Determinación de antocianinas totales

Se realizó la determinación de antocianinas totales en cada uno de los jugos utilizando el procedimiento descrito por el CITA (2016c) “P-SA-MQ-047” basado en el método de Guisti y Wrolstad (2001).

5.4.8 Determinación del análisis proximal

Se realizó la determinación de humedad, grasa, proteína, materia mineral y carbohidratos totales (por diferencia), mediante lo descrito en los siguientes procedimientos:

- Humedad: “P-SA-MQ-002” (CITA 2017d) basado en el método número 920.151 de la AOAC (2005).
- Grasa cruda por extracto etéreo: “P-SA-MQ-005” (CITA, 2017c) basado en el método de Sullivan y Carpenter (1993).
- Determinación de proteínas por el método de Nitrógeno total por método Kjeldahl: “P-SA-MQ-003” (CITA 2016f) basado en el método número 920.152 de la AOAC (2005).
- Cenizas totales: “P-SA-MQ-004” (CITA 2017b) basado en el método número 940.26 de la AOAC (2005).

5.4.9 Diseño y análisis estadístico

Los valores de los parámetros fisicoquímicos se reportaron como el promedio de los valores obtenidos de tres repeticiones de la determinación, junto con su debida desviación estándar. Solo para los parámetros de particular interés se compararon los valores mediante un análisis

de variancia (ANDEVA) o una prueba t de Student según fuera el caso, utilizando el programa JMP® 14. Se estableció un nivel de confianza del 95 %, con valores de P menores a 0,05 ($P < 0,05$) y se realizó una comparación de medias de Tukey, en los casos donde el ANDEVA mostraba que existían diferencias significativas.

5.5 Estudio de crecimiento para la evaluación de *A. acidoterrestris* como posible causante de deterioro en jugos tropicales

5.5.1 Selección de la bacteria

La bacteria utilizada fue *Alicyclobacillus acidoterrestris* ATCC 49025 correspondiente a una cepa comercial aislada de una muestra de tierra en Alemania. El microorganismo se mantuvo a -20 ± 3 °C en viales con glicerol y caldo papa dextrosa para mantener su viabilidad durante la ejecución del experimento.

5.5.2 Preparación del inóculo

La metodología experimental utilizada se describe de forma esquemática en la Figura 9 de la sección de anexos de este documento. El inóculo se preparó utilizando el cultivo de *A. acidoterrestris* ATCC 49025 cultivado en placas de agar “*Yeast Starch Glucose*” (YSG) acidificadas a un pH de 3,7 con ácido clorhídrico 1 N e incubadas a 45 °C (cubiertas con papel parafilm para evitar su deshidratación por alta temperatura) por al menos 5 días (IFU 2007, Oteiza *et al.* 2015).

Para preparar el inóculo se tomó una asada de colonias de la placa incubada (Figura 10 en anexos) utilizando un asa estéril (Gocmen *et al.* 2005) y se colocó en un tubo estéril con 10 mL de agua peptonada estéril. Con el fin de inactivar las células vegetativas y activar las esporas, al inóculo se le aplicó un choque térmico a 75 °C por 20 minutos en un baño de agua (Figura 11 en anexos) según lo recomendado por Gocmen *et al.* (2005). Este tipo de tratamiento térmico se recomienda además, para activar las esporas de la bacteria y así evitar subestimar el número de microorganismos presentes en el jugo (IFU 2007). Una vez finalizado el choque térmico, el inóculo se enfrió a 40-45 °C antes de su utilización (IFU 2007). La preparación del inóculo se realizó por triplicado para cada una de las tres repeticiones del experimento.

Para determinar la carga inicial de la bacteria se tomó 1 mL del jugo inoculado el primer día del estudio y se realizaron las diluciones seriadas (10^0 - 10^2) correspondientes en agua peptonada estéril al 0,1 %. Las diluciones se montaron en placas de Petri por duplicado, mediante la técnica de vaciado (JFJA 2003) con agar YSG (pH: 3,7) y se incubaron a 45 ± 2 °C (cubiertas con papel *parafilm* para evitar su deshidratación por alta temperatura) de 2 a 5 días (IFU 2007).

Al finalizar el periodo de incubación, se seleccionaron las placas con recuentos de 25 a 250 unidades formadoras de colonias, y se realizó un conteo de forma visual y con un contador de Quebec. En ciertos casos se contó por debajo de este rango de colonias debido al efecto inhibitorio de algunos de los jugos, como por ejemplo el jugo de mora, los cuales no permitían el conteo de colonias dentro del rango en las diluciones más concentradas (dilución 10^0). Considerando la dilución y el resultado del conteo, se aplicó el inverso del factor de dilución utilizado y se redondeó el valor a 2 cifras significativas (Camacho *et al.* 2009).

Para la confirmación del crecimiento del microorganismo *A. acidoterrestris*, se analizó una muestra del recuento final de cada uno de los cinco jugos preparados y del jugo de naranja comercial mediante el método de crecimiento diferenciado por temperatura reportado en la metodología Japonesa de *The Unified detection method of thermoacidophilic bacteria in raw materials of fruit juice* (JFJA 2003). El procedimiento consiste en inocular una asada de colonias sobre dos placas de agar YSG, incubando una placa a 45 ± 1 °C y la otra a 65 ± 1 °C por 18-20 horas. El crecimiento exclusivo en la placa incubada a 45 °C confirma la presencia de *A. acidoterrestris*.

5.5.3 Preparación e inoculación de las muestras

Se utilizaron cinco jugos de frutas elaborados según lo descrito en la sección 5.2 (correspondientes a un solo lote) y un jugo de naranja comercial y se realizó el estudio por triplicado para cada jugo.

Se tomaron 135 mL de jugo comercialmente estéril de los envases preparados y se colocaron de forma aséptica en una botella de vidrio de 225 mL cubierta con aluminio para simular el espacio de cabeza del 40 % (Figura 15 en anexos) reportado en el estudio de Gocmen *et al.* (2005) el cual favorece el crecimiento del microorganismo de interés. De esta manera, se

preparó una botella independiente para cada tiempo de muestreo con el fin de mantener el espacio de cabeza determinado y reducir la posibilidad de contaminación de las muestras. Se inocularon las muestras agregando 1 mL del inóculo, preparado tras el choque térmico (descripción de preparación en la sección 5.5.2), y utilizando la técnica aséptica con el fin de obtener una carga inicial aproximada de entre 10^2 - 10^3 UFC/mL en el jugo. La carga del inóculo inicial se eligió según el recuento comúnmente encontrado en frutas o concentrados de frutas reportado por autores de otros estudios (Spinelli *et al.* 2010, Oteiza *et al.* 2015). Se preparó de igual forma una botella de jugo control de la misma manera, pero sin la inoculación de la bacteria, para así asegurar que el jugo no tuviera *A. acidoterrestris* u otro microorganismo que crezca en las condiciones del estudio.

Se realizaron dos recuentos de *A. acidoterrestris* según lo descrito en la sección 5.5.2, primero en el jugo control sin inocular, para asegurar la ausencia de la bacteria en el jugo elaborado y luego en el jugo inoculado, para determinar la carga inicial exacta. Las muestras inoculadas restantes se homogenizaron (agitación manual) y se almacenaron por un tiempo máximo de 2 meses a 45 °C para fomentar el crecimiento del microorganismo a su temperatura óptima de desarrollo (IFU 2007, Yokota *et al.* 2007). Además, se almacenó en las mismas condiciones una botella de jugo control sin inocular para su muestreo el último día del estudio.

5.5.4 Toma de muestras durante el estudio de crecimiento

Para cada jugo se tomó una muestra, de manera aséptica, para el recuento de *A. acidoterrestris* según se describe a continuación. El muestreo se realizó una vez al día durante los primeros 7 días de almacenamiento. Posteriormente, se procedió a extender el período de muestreo a una vez por semana por un máximo de 2 meses. Durante el período extendido de muestreo con una frecuencia semanal, se puso fin a la prueba si se detectaba el crecimiento de *A. acidoterrestris* en niveles iguales o superiores a 10^6 UFC/mL. Se continuó con el muestreo de los 6 jugos hasta que el último jugo alcanzara el punto final del experimento (población mayor o igual a 10^6 UFC/mL o dos meses de almacenamiento), con el fin de obtener datos comparables en el tiempo. El último día del estudio se tomó, además, una muestra del jugo control almacenado en las mismas condiciones del estudio para asegurar la ausencia de *A. acidoterrestris*.

5.5.5 Recuento de *A. acidoterrestris* durante el estudio de crecimiento

Para las muestras de jugo tomadas durante el estudio de crecimiento, se realizó el recuento de *A. acidoterrestris* tomando 1 mL del jugo mediante la técnica aséptica y luego de homogenizar la muestra, se efectuó el procedimiento para el recuento descrito en la sección 5.5.2 (Figura 14 en anexos).

Para reportar los resultados del recuento, se consideró la dilución y el resultado del conteo (promedio de las colonias presentes en las dos placas de esta dilución) y se aplicó el inverso del factor de dilución utilizado redondeando el resultado a 2 cifras significativas. Se aplicó el logaritmo a este resultado para reportar la población microbiana presente como \log_{10} UFC/mL (Camacho *et al.* 2009).

5.5.6 Diseño y análisis estadístico

Se utilizó un diseño estadístico irrestricto aleatorio, donde el tipo de jugo correspondía a la variable independiente, realizando tres repeticiones del experimento. Se realizó un ANDEVA para asegurar que las poblaciones del inóculo inicial no fueran significativamente diferentes entre los seis jugos, estableciendo un nivel de confianza del 95 %, donde valores de P menores a 0,05 ($P < 0,05$) indican que existen diferencias significativas. Para el análisis estadístico de las poblaciones que mostraron una disminución en el tiempo (cas, maracuyá, mora, naranja y piña) se aplicó un modelo lineal simple (ecuación 1) a las tres repeticiones utilizando el programa JMP® 14. Posteriormente se utilizó predicción inversa para determinar el tiempo necesario para que la población del microorganismo alcanzara 1,40 log UFC/mL (límite inferior de cuantificación para la técnica de recuento por vaciado). Los valores obtenidos para estos cinco jugos se compararon mediante un análisis de traslape de intervalos de confianza al 95 %, donde la ausencia de traslape indica que existen diferencias significativas (Cumming 2009).

$$\log (\text{población}) = a + b * \text{tiempo} \quad (1)$$

a: intercepto

b: pendiente

Para el análisis estadístico de las poblaciones que mostraron un aumento en el tiempo (naranja comercial), se aplicó un modelo logístico de tres parámetros (Pla *et al.* 2015) (ecuación 2) para las tres repeticiones utilizando el programa JMP® 14. Posteriormente se utilizó predicción inversa para determinar el tiempo necesario para que la población del microorganismo alcanzara 5,00 log UFC/mL (población reportada cuando inicia la producción de guayacol (Huang *et al.* 2015). Se analizó, además, la asíntota (parámetro c del modelo logístico) que corresponde a la población estabilizada del microorganismo y se determinó el valor promedio y el intervalo de confianza de este valor utilizando el programa JMP® 14.

$$\log (\text{población}) = \frac{c}{1 + e^{-a(\text{tiempo}-b)}} \quad (2)$$

a: tasa de crecimiento

b: punto de inflexión

c: asíntota

5.6 Efecto del espacio de cabeza sobre el crecimiento de *A. acidoterrestris* en un jugo de frutas tropicales seleccionado

5.6.1 Preparación e inoculación de las muestras para el estudio de espacio de cabeza

Para el jugo que mostró el mayor potencial de crecimiento de *A. acidoterrestris* (jugo de naranja comercial), se caracterizó la muestra siguiendo los protocolos indicados en el apartado 5.4 de este documento como se muestra en los resultados del objetivo 1 de este trabajo final de graduación. Para verificar la esterilidad comercial del jugo de naranja comercial, se siguió el mismo procedimiento descrito en la sección 5.2. Se siguieron los mismos pasos descritos en la sección 5.5.2 y 5.5.3 para la preparación del inóculo y la preparación e inoculación de las muestras, con las modificaciones que se detallan a continuación.

Las botellas utilizadas en el estudio, con un volumen de 225 mL, se llenaron de manera aséptica con 135 mL de jugo para lograr un espacio de cabeza (EC) del 40 % y otras se

llenaron con 211,5 mL de jugo para obtener un 6 % de espacio de cabeza (Figura 18 en anexos). Se decidió evaluar estos dos valores de EC debido a que el valor de 40 % se había reportado en el estudio de Gocmen *et al.* (2005) como un valor que favorece el crecimiento del microorganismo de interés. El valor 6 % de EC representa el valor normal utilizado en el llenado de este tipo de productos a nivel industrial (Tucker y Featherstone 2010).

Se preparó una botella independiente para cada tiempo de muestreo con el fin de mantener el EC determinado en el tiempo y reducir la posibilidad de contaminación de las muestras. Además, como se describe en la sección 5.5.4, se emplearon jugos control sin inocular para cada tratamiento que fueron almacenados a la temperatura de almacenamiento correspondiente y analizados el último día del estudio. Una vez llenas las botellas, estas se cubrieron con tapas metálicas con el fin de mantener el EC establecido en la etapa de llenado. Posteriormente, las muestras se incubaron a 45 °C por un periodo de 7 días. En este caso no se repitió la prueba del método de crecimiento diferenciado por temperatura para confirmar el crecimiento de *A. acidoterrestris*, que ya se había realizado para el objetivo 2.

5.6.2 Toma de muestras y recuento de *A. acidoterrestris* durante el estudio de espacio de cabeza

La toma de muestras se realizó de la misma forma descrita en la sección 5.5.4 donde el único cambio fue en el establecimiento de un periodo de almacenamiento de 7 días en vez de 2 meses. Esta decisión se basó en el hecho de que, después de este periodo, se observaba poco cambio en la población de *A. acidoterrestris*, como se muestra en los resultados del objetivo 2 de este estudio. De esta manera, la frecuencia de muestreo se estableció a diario por un periodo de 7 días. El recuento de *A. acidoterrestris*, para la determinación de la población en el tiempo se realizó de la misma manera descrita en la sección 5.5.5.

5.6.3 Diseño y análisis estadístico

El diseño estadístico aplicado fue de tipo irrestricto aleatorio, donde el factor de espacio de cabeza corresponde a la variable independiente, realizando tres repeticiones del experimento. Se realizó una prueba t de Student para asegurar que las poblaciones del inóculo inicial no fueran significativamente diferentes entre los dos tratamientos, estableciendo un nivel de

confianza del 95 %, donde valores de P menores a 0,05 ($P < 0,05$) indican que existen diferencias significativas.

Para el análisis estadístico se aplicó un modelo logístico de tres parámetros (Pla *et al.* 2015) (ecuación 2) para las tres repeticiones utilizando el programa JMP® 14. Se analizó la asíntota (parámetro c del modelo logístico) que corresponde a la población estabilizada del microorganismo y se determinó el promedio y el intervalo de confianza del valor utilizando el programa JMP® 14. Los valores obtenidos para la asíntota se compararon mediante un análisis de traslape de intervalos de confianza del 95 %, donde la ausencia de traslape indica que existen diferencias significativas (Cumming 2009).

$$\log(\text{población}) = \frac{c}{1 + e^{-a(\text{tiempo}-b)}} \quad (2)$$

a: tasa de crecimiento

b: punto de inflexión

c: asíntota

Además, para cada repetición se determinó el punto de población máxima de *A. acidoterrestris* y el tiempo necesario para alcanzar esta población (denominado t_{MAX}). Los promedios de cada repetición se analizaron mediante la prueba t de Student, utilizando el programa JMP® 14, estableciendo un nivel de confianza del 95 %, donde valores de P menores a 0,05 ($P < 0,05$) indican que existen diferencias significativas.

5.6.4 Diseño y análisis del efecto del tipo de tapa sobre el crecimiento de A. acidoterrestris en un jugo de fruta tropical seleccionado

Se analizó esta variable debido a que el factor del tipo de tapa mostró tener un efecto importante sobre el crecimiento de la bacteria durante las pruebas preliminares de este estudio. Por tanto, los datos relativos al jugo de naranja comercial del estudio de crecimiento del objetivo 2 (40 % de EC), en el cual se utilizó papel aluminio para cubrir las botellas, se contrastaron con los datos obtenidos en la presente sección sobre el efecto del espacio de cabeza utilizando una tapa metálica para cubrir la botella de jugo (40 % de EC) (Figura 19

en anexos). De esta manera, la metodología fue la misma descrita para cada uno de los objetivos correspondientes y el análisis estadístico se realizó de la misma manera descrita en la sección 5.6.3 de este documento.

6. Resultados y Discusión

6.1 Objetivo 1

6.1.1 Análisis fisicoquímico de los jugos de frutas tropicales analizados en el estudio

Cuadro II. Caracterización fisicoquímica de los jugos de frutas tropicales utilizados para evaluar el potencial de deterioro de *A. acidoterrestris* (valor promedio \pm desviación estándar, n=3).

Parámetro fisicoquímico	Tipo de jugo					
	Cas	Maracuyá	Mora	Naranja	Naranja comercial	Piña
pH (medido a 20 °C)	2,94 \pm 0,01	3,15 \pm 0,01	2,88 \pm 0,01	3,57 \pm 0,01	3,94 \pm 0,01	3,65 \pm 0,01
°Brix (medido a 20 °C)	9,9 \pm 0,2	9,4 \pm 0,3	6,5 \pm 0,1	13,3 \pm 0,4	11,1 \pm 0,1	14,4 \pm 0,1
Acidez titulable (g de ácido cítrico/100 g)	3,120 \pm 0,006	2,06 \pm 0,04	2,11 \pm 0,03	0,95 \pm 0,03	0,89 \pm 0,03	0,79 \pm 0,05
Humedad (g/100 g)	87,29 \pm 0,08	89,38 \pm 0,03	93,53 \pm 0,02	86,43 \pm 0,08	88,99 \pm 0,08	85,49 \pm 0,05
Cenizas (g/100 g)	0,68 \pm 0,04*	0,50 \pm 0,01	0,298 \pm 0,002	0,253 \pm 0,001	0,5 \pm 0,2	0,22 \pm 0,01*
Grasa (g/100 g)	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10
Proteína (N x 6,25) (g/100 g)	0,94 \pm 0,09	0,92 \pm 0,09	0,73 \pm 0,07	0,49 \pm 0,05	0,637 \pm 0,006	0,49 \pm 0,04
Carbohidratos (g/100 g)	11,1 \pm 0,1	9,20 \pm 0,08	5,44 \pm 0,08	12,83 \pm 0,07	9,87 \pm 0,09	13,80 \pm 0,07
Fructosa (g/100 g)	2,0 \pm 0,3*	2,25 \pm 0,04	1,43 \pm 0,02	3,28 \pm 0,02	2,43 \pm 0,05	6,35 \pm 0,006
Glucosa (g/100 g)	1,51 \pm 0,04	2,46 \pm 0,03	1,50 \pm 0,02	3,17 \pm 0,02	2,16 \pm 0,04	6,31 \pm 0,06

Parámetro fisicoquímico	Tipo de jugo					
	Cas	Maracuyá	Mora	Naranja	Naranja comercial	Piña
Sacarosa (g/100 g)	ND (<0,12)	NC (<0,40)	ND (<0,12)	5,21 ± 0,02	3,84 ± 0,04	ND (<0,12)
Vitamina C (mg/100 g)	50 ± 1	5,27 ± 0,05	ND (<0,66)	ND (<0,66)	39,9 ± 0,5	22 ± 1
Polifenoles totales (eq. mg ácido gálico/100 g)	759 ± 21	NC (<16)	255,8 ± 0,7	NC (<16)	44 ± 5	NC (<16)
Antocianinas totales (eq. mg cianidina-3-glicósido/100 g)	NC (<0,20)	NC (<0,20)	40,8 ± 0,6	NC (<0,20)	NC (<0,20)	NC (<0,20)
Ácido cítrico (g/100 g)	1,83 ± 0,03	1,977 ± 0,006	1,26 ± 0,07	0,59 ± 0,03*	0,62 ± 0,03*	0,46 ± 0,02*
Ácido málico (g/100 g)	1,25 ± 0,03	0,083 ± 0,006	0,6 ± 0,2	0,050 ± 0,002*	ND (<0,01)**	0,050 ± 0,002*
Ácido succínico (g/100 g)	ND (<0,0015)	ND (<0,0015)	0,083 ± 0,006	ND (<0,0015)	ND (<0,0015)***	ND (<0,0015)

ND: No detectable; NC: Detectable, no cuantificable

*Desviación estándar=0, se presenta con la incertidumbre del método.

**n_{total}=3, donde n=2 mostró resultado de ND y n=1: (0,040 ± 0,002)*

*** n_{total}=3, donde n=2 mostró resultado de ND y n=1: (0,060 ± 0,003)*

6.1.2 Análisis de pH

El Cuadro II muestra los valores medidos de pH de los seis jugos de frutas tropicales utilizados en el estudio. Dichos valores se pueden comparar con la información del Cuadro I que muestra los valores de pH reportados en la literatura, donde se observa una alta similitud entre ellos. Se encontró que el valor de pH era significativamente diferente para todos los jugos ($p < 0,05$; comparaciones estadísticas se indican con probabilidad asociada) donde los jugos en orden ascendente de pH se muestran a continuación: mora, cas, maracuyá, naranja, piña y naranja comercial. A pesar de estas diferencias, todos los jugos utilizados se clasificaron como productos ácidos debido a su pH inferior a 4,6 (FDA 2017b).

Como se observa en el Cuadro II todos los jugos presentaron un pH que se encuentra dentro del rango de crecimiento para *Alicyclobacillus* sp. (pH: 2,0-6,0) (Tianli *et al.* 2014). Sin embargo, solo la piña y los jugos de naranja se encontraron en el rango óptimo de crecimiento para *A. acidoterrestris* (pH: 3,5-4,0) (Yokota *et al.* 2007). Estos valores de pH más altos podrían favorecer el crecimiento de *A. acidoterrestris* en el jugo, a pesar de que se trata de un microorganismo termoacidófilo que puede sobrevivir y crecer a valores de pH inferiores (Kakagianni *et al.* 2018).

Se puede destacar la ligera diferencia en pH y las variaciones de otros parámetros fisicoquímicos entre los dos jugos de naranja analizados (comercial y el preparado en planta piloto), a pesar de que ambos se prepararon a partir del mismo tipo de fruta. Las variaciones observadas entre estos jugos podrían deberse a diferencias en la fruta utilizada para su preparación, como su variedad o estado de madurez (FDA y CFSAN 2007). El procesamiento del jugo también puede generar diferencias en las características fisicoquímicas de los jugos (Pinheiro *et al.* 2006), donde el jugo de naranja preparado en planta piloto recibió un tratamiento de llenado en caliente (≥ 81 °C) y fue envasado en recipientes de vidrio, mientras que el jugo de naranja comercial se preparó a partir de concentrado y recibió un tratamiento de UHT (Ultra High Temperature) para luego ser empacado en envases Tetra Brik de forma aséptica.

6.1.3 Análisis de sólidos solubles

El Cuadro II muestra los sólidos solubles de los jugos analizados e indica que todos los jugos se encontraron en el rango de crecimiento para *Alicyclobacillus* sp. al presentar valores menores a 20 °Brix (Chang y Kang 2004, Splittstoesser *et al.* 1994). Esto era de esperar ya que los jugos preparados eran 100 % jugo y se requiere un grado de sólidos solubles característico de un concentrado de jugo para lograr la inhibición del crecimiento de este microorganismo (Steyn *et al.* 2011).

6.1.4 Análisis proximal

El análisis proximal de los seis jugos fue el esperado para jugos preparados 100 % de fruta. El valor de humedad fue alto y en concordancia con lo reportado en la literatura (sólidos: 5-20 %), al tratarse de un producto que se obtiene de frutas cuyo mayor componente es el agua.

El valor de cenizas fue bajo como es de esperar y cercano a los valores reportados para otros jugos de frutas (Belitz *et al.* 2009). La cantidad de cenizas puede variar según las características de la fruta utilizada para su preparación pero generalmente se componen de macro-elementos como Ca, K, Mg, Na, P, Si, S y otros micro-elementos como Cu, Fe, Mn, Zn (Pohl *et al.* 2017). La grasa para todos los jugos es menor a 0,10 g/100 g, por lo que es despreciable y la proteína es menor al 1 %, como es de esperar en este tipo de productos (Ashurst 2016).

6.1.5 Análisis del contenido de carbohidratos y azúcares

Los carbohidratos son el segundo componente mayoritario del jugo después del agua y generalmente representan un 90 % de los sólidos del jugo. Los jugos contienen naturalmente fructosa y glucosa y algunos contienen sacarosa (Ashurst 2016) como se confirma en el Cuadro II. La determinación de azúcares es importante, para evitar adulteraciones del jugo con otros carbohidratos de menor valor.

En el Cuadro II se observa que el jugo de piña fue el jugo con mayor cantidad de glucosa y fructosa, de todos los jugos, pero no presentó sacarosa detectable a pesar de que usualmente la piña sí contiene este azúcar. Este comportamiento podría deberse a la inversión de sacarosa en fructosa y glucosa como se ha reportado en otros estudios (Hounhouigan *et al.* 2014a). En el caso del jugo de cas el azúcar mayoritario fue la fructosa, mientras que en el caso de maracuyá fue la glucosa como lo han reportado autores previos (Ramaiya *et al.* 2013). El jugo de mora tuvo cantidades similares de glucosa y fructosa, como es el caso de la mayoría de las bayas (Azofeifa 2014, Acosta *et al.* 2017). Ambos jugos de naranja mostraron a la sacarosa como azúcar principal tal como se ha reportado en la literatura (Ashurst 2016) y la diferencia observada entre estos jugos no fue significativa ($p > 0,05$).

6.1.6 Análisis del contenido de vitamina C

El contenido de vitamina C en los jugos se relaciona no solo con el contenido de esta vitamina en la fruta, sino que también está ligada fuertemente al procesamiento y almacenamiento que recibe el producto. Como se observa en el Cuadro II, los jugos de naranja y mora preparados en planta piloto mediante un tratamiento de llenado en caliente no presentaron un contenido de vitamina C detectable. En el caso del jugo de mora este se ha reportado anteriormente con

un contenido bajo de este compuesto (Azofeifa 2014), sin embargo, el jugo de naranja usualmente presenta un contenido importante de esta vitamina debido a que la naranja como fruta contiene hasta 50 mg de vitamina C en 100 g del fruto (Belitz *et al.* 2009).

La ausencia de la vitamina en el jugo de naranja podría deberse a la degradación térmica o a la oxidación de la vitamina debido al fuerte tratamiento térmico que recibieron los jugos para obtener un producto comercialmente estéril (Fernandes *et al.* 2011). Además, cabe mencionar que algunos de los jugos se sometieron a dos tratamientos térmicos para asegurar la esterilidad comercial de los productos de tal forma que la microbiota presente en el jugo no interfiriera en el crecimiento de la bacteria de interés. Para el segundo tratamiento térmico se recalentó de la misma manera el jugo hasta una temperatura ≥ 81 °C y se realizó nuevamente el proceso de llenado en caliente, lo que pudo llevar a una degradación aún mayor de la vitamina.

En el caso de jugo de maracuyá este presentó un contenido bajo de vitamina C, no obstante, este se trata de un valor normal para este tipo de jugo (Fernandes *et al.* 2011). El jugo de piña mostró un valor de vitamina C intermedio, pero ligeramente menor al que reportan autores previos, lo que podría estar ligado al procesamiento, que puede provocar pérdidas, al tratarse de una vitamina termo-sensible (Hounhouigan *et al.* 2014a, Ashurst 2016). El jugo de cas mostró el valor más alto de esta vitamina seguido por el jugo naranja comercial. La etiqueta de este jugo de naranja comercial reporta un contenido de vitamina C de tan solo 12,8 mg/100 mL, donde el valor determinado experimentalmente es mayor, pero aun dentro del rango normal para esta fruta (Belitz *et al.* 2009).

La vitamina C, además de su función nutricional como vitamina, también funciona como agente reductor como se detalla en la sección 4.6.7 de este documento. El contenido de vitamina C en los jugos estudiados mostró ser significativamente diferente ($p < 0,05$) entre los cuatro jugos que presentaban un contenido cuantificable de este compuesto. De esta manera, jugos como el cas, que presentó el valor más alto de este compuesto, podrían mostrar una afectación al crecimiento de *A. acidoterrestris* debido al efecto de la vitamina C sobre el potencial redox del jugo (Cerny *et al.* 2000).

6.1.7 Análisis del contenido de polifenoles y antocianinas

El Cuadro II muestra que sólo los jugos de cas, mora y naranja comercial presentaron un contenido cuantificable de polifenoles totales. El jugo de cas mostró el mayor contenido, lo cual concuerda con lo reportado por otros autores que han estudiado este fruto por sus compuestos fenólicos y su importante función antioxidante (Flores *et al.* 2013). El jugo de mora también ha sido sujeto de numerosos estudios por su contenido de polifenoles y los beneficios que estos aportan a la salud (Azofeifa 2014, Soto *et al.* 2016, Acosta *et al.* 2017). Estudios previos reportan un contenido de polifenoles totales en un jugo de mora de aproximadamente 249 mg cianidina-3-glicósido/100 mL, un valor muy similar al valor determinado para el jugo del presente estudio. En el caso del jugo de naranja comercial se ha reportado un contenido de polifenoles totales de aproximadamente 59,8 mg/ 100 mL en otra marca comercial de jugo de naranja, cuya valor es similar al que se determinó en el presente estudio (Rangel-Huerta *et al.* 2015).

El Cuadro II muestra un alto contenido de polifenoles en varios de los jugos estudiados a pesar del fuerte tratamiento térmico que recibieron los jugos durante su preparación. Esto podría atribuirse a variables del tratamiento térmico (como tiempo y temperatura) y a la sensibilidad de los compuestos fenólicos específicos de cada fruta. En el caso de la mora, los elagitaninos son uno de sus polifenoles predominantes y estos han mostrado una alta resistencia a los procesos de pasteurización (Azofeifa 2014). En el caso del cas, este presenta un contenido importante de ácido elágico (Flores *et al.* 2013), mientras que el polifenol predominante en el jugo de naranja es la hesperidina (Perche *et al.* 2014).

Los polifenoles, como se detalló en la sección 4.6.5 de este documento, tienen un efecto antibacterial demostrado contra *Alicyclobacillus* sp. Sin embargo, es importante mencionar que no todos los polifenoles muestran la misma efectividad inhibitoria sobre este microorganismo. Esto lo comprobó Splittstoesser *et al.* (1998) al encontrar que compuestos fenólicos neutros eran responsables de la inhibición de crecimiento observada en jugo de uva, en contraste con los compuestos fenólicos ácidos que no presentaban este efecto. Con este fin se determinó el contenido de antocianinas como un tipo de polifenol presente en la mora, tal como se muestra en el Cuadro II. El valor del contenido de antocianinas en el jugo de mora concuerda con el valor reportado previamente en la literatura (Soto *et al.* 2016),

mientras que ninguno de los otros cinco jugos presentó una cantidad cuantificable de este compuesto.

6.1.8 Análisis del contenido de ácidos orgánicos

El Cuadro II muestra el perfil de ácidos orgánicos de los seis jugos analizados en el estudio. Se observa que para todos los jugos el ácido cítrico fue el mayoritario, seguido por el málico, los cuales representan los ácidos más comunes en bayas, cítricos y otras frutas tropicales (Belitz *et al.* 2009). Destaca el jugo de mora, ya que fue el único con cantidades detectables de ácido succínico, aunque se encuentra presente en el jugo sólo en bajas cantidades. Como se mencionó en el apartado 4.6.6 de este documento, la presencia de ciertos ácidos en el jugo puede afectar el crecimiento de *A. acidoterrestris*, de ahí la importancia de su determinación en los jugos analizados.

6.2 Objetivo 2

6.2.1 Sobrevivencia de *A. acidoterrestris* en seis jugos de frutas tropicales

La Figura 2 muestra el crecimiento de *A. acidoterrestris* en los seis jugos de frutas tropicales estudiados durante un periodo de almacenamiento de 2 meses a 45 °C. Mediante un ANDEVA se probó que no existían diferencias significativas entre las poblaciones iniciales de cada uno de los seis jugos ($p > 0,05$), por lo que los tratamientos eran comparables. Como se observa en la Figura 2 existen diferencias evidentes en el crecimiento de este microorganismo según el tipo de jugo, donde el jugo de naranja comercial mostró un aumento de la población en el tiempo y los otros cinco jugos mostraron un descenso en la población. Las diferencias observadas podrían deberse a diferencias en las características fisicoquímicas de cada jugo como se analizó en la sección 6.1 de este documento.

Con el fin de analizar mejor el comportamiento observado en la Figura 2 se determinaron las poblaciones críticas de *A. acidoterrestris* en estos jugos y el tiempo en alcanzar estas poblaciones como se detalla en el Cuadro III. Se definió, además, una variable de tiempo $t_{1,40}$ para los jugos cuya población del microorganismo decrece en el tiempo y una variable de tiempo $t_{5,00}$ para aquellos cuya población aumenta durante el almacenamiento. La variable $t_{1,40}$ se definió como el tiempo necesario para que la población del microorganismo alcance

1,40 log UFC/mL. Se eligió este valor de población ya que representa el límite inferior de cuantificación de la técnica de recuento (25 colonias en la dilución 10^0) utilizada para contabilizar la población de *A. acidoterrestris* (Maturin y Peeler 2017).

Por otro lado, la variable $t_{5,00}$ se definió como el tiempo necesario para que la población de *A. acidoterrestris* alcanzara 5,00 log UFC/mL. Este valor se eligió como indicador del potencial de deterioro debido a que los valores más aceptados de población de esta bacteria necesarias para producir guayacol, son de 10^4 - 10^5 UFC/mL (Huang *et al.* 2015) como ya se detalló en la sección 4.4 de este documento. Aunque esta población crítica puede variar dependiendo de otros factores como la temperatura de almacenamiento (Yokota *et al.* 2007) y la fase de crecimiento en la que se encuentre el microorganismo (Pérez-Cacho *et al.* 2011), existe una alta posibilidad de producción de guayacol cuando la bacteria alcanza esta población. Por este motivo, en las secciones posteriores se utiliza el término de población crítica para hacer referencia a la población de *A. acidoterrestris* cuando alcanza 5,00 log UFC/mL.

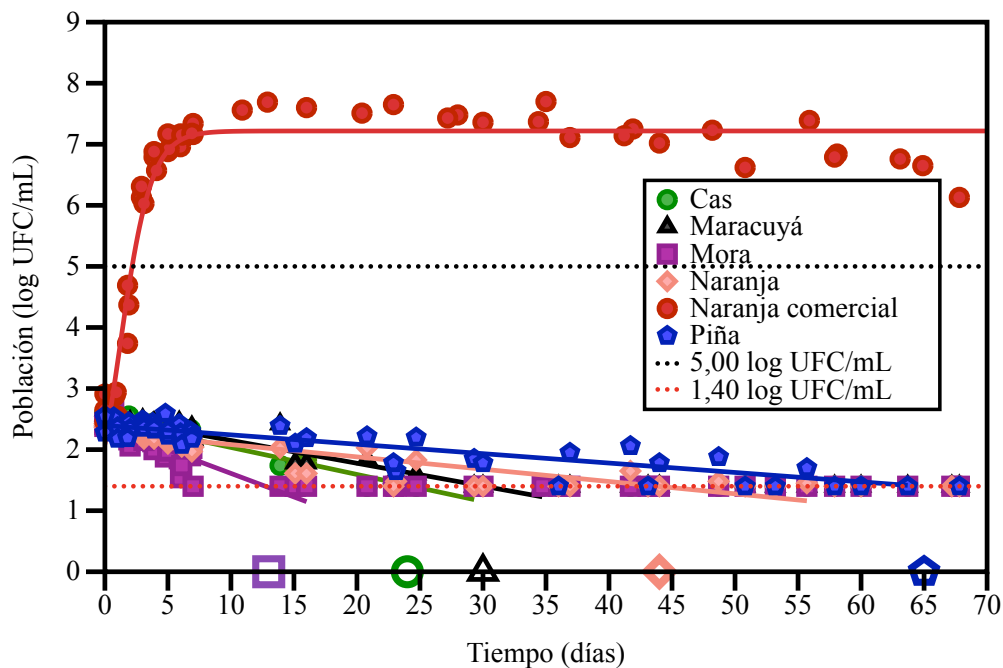


Figura 2. Curva de sobrevivencia de *A. acidoterrestris* en seis jugos de frutas tropicales durante el almacenamiento por 2 meses a 45 ± 2 °C.

(En el eje X se denota el valor de $t_{1,40}$ para cada jugo)

Como se observa en el Cuadro III el tiempo $t_{1,40}$ fue significativamente diferente (nivel de confianza: 95%) según el tipo de jugo de fruta. Esto se puede apreciar de manera gráfica en la Figura 3 que muestra un acercamiento del comportamiento de *A. acidoterrestris* en los cinco jugos que mostraron un descenso de la población en el tiempo.

Cuadro III. Tiempo requerido para que la población de *A. acidoterrestris* alcance las poblaciones críticas de 1,40 y 5,00 log UFC/mL en seis jugos de frutas tropicales durante el almacenamiento a 45 ± 2 °C por 2 meses (promedio \pm intervalo de confianza, n=3).

Jugo	$t_{1,40}^*$ (días)	$t_{5,00}^{**}$ (días)
Mora	13 ± 2^a	-
Cas	24 ± 2^b	-
Maracuyá	30 ± 3^c	-
Naranja	44 ± 8^d	-
Piña	65 ± 10^e	-
Naranja comercial	-	$2,2 \pm 0,2$

Letras diferentes indican que existe diferencia significativa (Según traslape de intervalos de confianza: 95%)

*1,40 UFC/mL: límite de cuantificación inferior de técnica de recuento

**5,00 UFC/mL: población reportada cuando inicia producción de guayacol

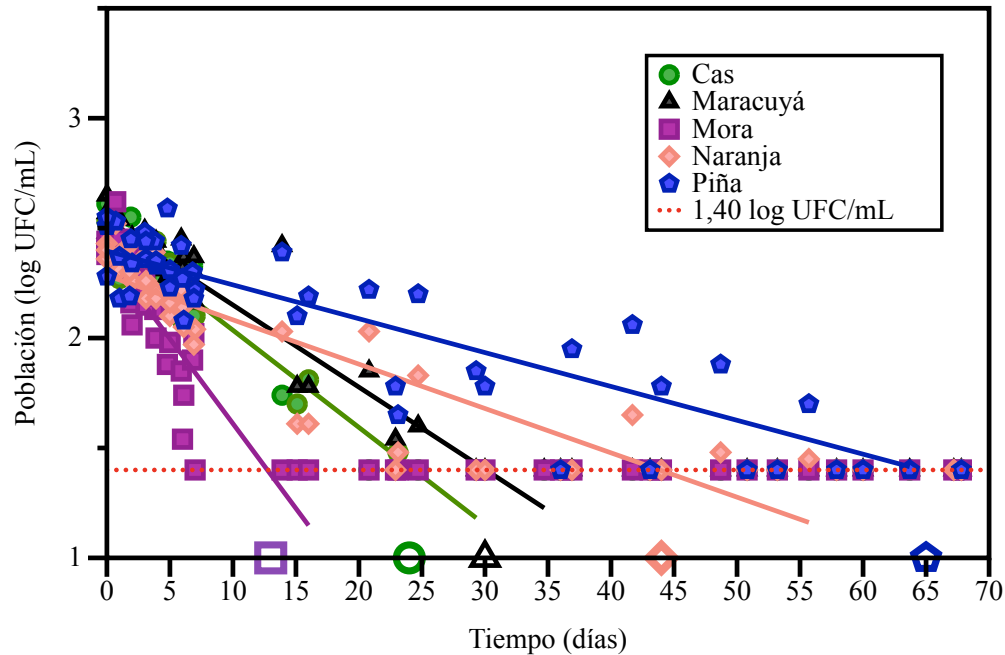


Figura 3. Curva de sobrevivencia de *A. acidoterrestris* en cinco jugos de frutas tropicales que mostraron un descenso en la población durante el almacenamiento por 2 meses a 45 ± 2 °C.

(En el eje X se denota el valor de $t_{1,40}$ para cada jugo)

Como se indica en el Cuadro III el jugo de mora mostró el menor valor de tiempo $t_{1,40}$. Esto significa que en menos de dos semanas, la población de *A. acidoterrestris* en el jugo de mora alcanzó niveles que ya no eran cuantificables por el método de recuento utilizado. Este comportamiento podría deberse a algunas de las características fisicoquímicas específicas del jugo de mora que se detallaron en la sección anterior (6.1) y que se discutirán a profundidad a continuación. Sin embargo, cabe mencionar que debido a que las características fisicoquímicas se determinaron de manera general en los jugos y no se analizaron de manera aislada, no es posible afirmar que el comportamiento observado en la población de la bacteria se deba exclusivamente a las diferencias en estos parámetros.

El jugo de mora mostró la mayor inhibición al crecimiento de *A. acidoterrestris*, por lo que es de interés recalcar aquellos aspectos de su caracterización fisicoquímica que pudieron provocar este comportamiento. Como se detalló en el Cuadro II de la sección 6.1 de este documento, el jugo de mora mostró el pH más bajo entre los jugos analizados. Este valor de

pH está fuera del rango de crecimiento óptimo de la bacteria, lo que pudo haber favorecido el rápido descenso de la población en el jugo de mora como lo muestra la Figura 3. En un estudio realizado por Splittstoesser *et al.* (1994) el autor analizó el crecimiento de *Alicyclobacillus* sp. en una serie de jugos de frutas y notó que generalmente los jugos con un pH de 3,00 o valores menores no permitían el crecimiento de la bacteria, mientras que jugos como el de manzana y tomate que presentaban valores de pH mayores (3,6 y 4,0) mostraron el mayor crecimiento.

Los resultados de este mismo estudio por Splittstoesser *et al.* (1994) demuestran que la variable de pH, no es el único parámetro que afecta el potencial de crecimiento de *Alicyclobacillus* sp., ya que otros jugos como la mezcla de manzana y uva con un pH relativamente alto de 3,7 no permitía el crecimiento de este microorganismo. Estos resultados llevan al segundo punto diferenciador en cuanto a caracterización fisicoquímica del jugo de mora y este es su importante contenido de polifenoles.

Como se mostró en el Cuadro II el jugo de mora fue el jugo con la segunda mayor cantidad de polifenoles totales, después del jugo de cas. Como se detalló en la sección 4.6.5 de este documento los compuestos fenólicos como los polifenoles en el jugo de uva (Splittstoesser *et al.* 1994) y los compuestos fenólicos en la granada (Molva y Baysal 2015b) han mostrado un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de esta bacteria. Es posible entonces que los polifenoles del jugo de mora presenten este mismo efecto inhibitorio sobre *A. acidoterrestris* evitando su crecimiento y ocasionando el descenso rápido en su población.

El Cuadro II muestra, además, que el jugo de mora presentó el contenido más bajo de fructosa y glucosa entre los jugos analizados y no tenía un contenido detectable de sacarosa. Se ha determinado que *A. acidoterrestris* ATCC 49025 muestra un resultado positivo para las pruebas de aprovechamiento de glucosa, fructosa y sacarosa (Yokota *et al.* 2007), por lo que es posible que este bajo contenido de azúcares también pudiera favorecer el descenso en la población observada. Este criterio se apoya también del resultado de la determinación de carbohidratos en este jugo que muestra un valor considerablemente menor al de los otros jugos estudiados.

Al analizar el resto de la caracterización fisicoquímica del jugo de mora (Cuadro II), se observan otras ligeras diferencias respecto al resto de los jugos como su contenido de ácido

succínico que no se encontró en ninguno de los otros jugos. Sin embargo, el contenido de este ácido en el jugo de mora es tan bajo que es poco probable que este haya sido un parámetro que afectara fuertemente el comportamiento de la población de *A. acidoterrestris* en este jugo.

Por su parte, el jugo de cas mostró el segundo menor tiempo $t_{1,40}$ como se observa en el Cuadro III, lo cual indica que en aproximadamente tres a cuatro semanas la población de *A. acidoterrestris* alcanzó niveles no cuantificables en el jugo. Al analizar la composición fisicoquímica de este jugo se observan una serie de tendencias similares a las notadas en el jugo de mora. El pH de este jugo fue el segundo más ácido, después del jugo de mora, por lo que no favorece el crecimiento de esta bacteria (Splittstoesser *et al.* 1994).

El jugo de cas presentó el mayor contenido de polifenoles totales (Cuadro II), aún mayor que en el jugo de mora. Como ya se mencionó estos compuestos tienen propiedades inhibitorias hacia *A. acidoterrestris*, sin embargo, es importante recalcar dos aspectos sobre esta inhibición. En primer lugar, el efecto inhibitorio de los polifenoles dependerá del tipo de polifenol presente (Splittstoesser *et al.* 1998). Esto se refleja con el ejemplo de las antocianinas presentes en el jugo de mora y no detectables en el jugo de cas, donde es posible que el tipo de polifenol presente en el jugo de mora tuviera un mayor efecto inhibitorio hacia la bacteria. Esto no permite afirmar que la presencia específica de las antocianinas en el jugo de mora sea la que ejerció el efecto inhibitorio más fuerte hacia el crecimiento, sin embargo, sí permite afirmar que la composición de los polifenoles en estos dos jugos es diferente.

El segundo punto importante a notar al estudiar el efecto antibacteriano de los polifenoles, es que otros autores han determinado la mínima concentración inhibitoria de polifenoles específicos de la uva y han notado que estos valores son considerablemente más altos que los que contiene naturalmente el jugo de uva (Yokota *et al.* 2007). Esto indica que el efecto antibacteriano de estos compuestos puede ser aditivo entre los diferentes tipos de polifenoles presentes y sinérgico, donde el efecto en conjunto de los distintos compuestos es mayor que el que se obtiene de un componente por sí solo. Algunos casos que han demostrado esto son los que indican que los polifenoles tienen un mayor efecto antibacteriano a valores menores de pH y cuando los jugos presentan un menor contenido de fibra. Por este motivo, no se puede afirmar que sólo porque el jugo de cas presentó significativamente ($p < 0,05$) más

polifenoles que el jugo de mora, que entonces la inhibición hacia el crecimiento de *A. acidoterrestris* debiera ser proporcional a este valor. Se suman, además, otros factores influyentes del crecimiento de este microorganismo como por ejemplo el pH.

El contenido de vitamina C en el jugo de cas también fue el mayor entre los seis jugos estudiados. Ya se discutió la afectación del potencial redox del jugo por su contenido de ácido ascórbico, lo cual puede ocasionar algún grado de inhibición hacia el crecimiento de *A. acidoterrestris*. Este criterio se basa en los resultados de un estudio de Cerny *et al.* (2000) que encontró la inhibición del crecimiento de esta bacteria en jugo de manzana cuando el nivel de este compuesto superaba los 15 mg/100 mL de jugo. Sin embargo, no es posible afirmar que este valor sería el mismo en cualquier tipo de jugo o que su afectación fuera igual para cualquier cepa del microorganismo. Además, en contraste con estos resultados reportados por autores previos, en el presente estudio el jugo de naranja comercial (control positivo) sí mostro crecimiento de la bacteria a pesar de su contenido de vitamina C de 39,9 mg/100 mL de jugo.

El jugo de maracuyá mostró el tiempo $t_{1,40}$ intermedio de entre los cinco jugos que mostraron un descenso en la población. Este valor indica que la población de *A. acidoterrestris* ya no era cuantificable en el jugo después de un almacenamiento por un mes. Al analizar las características fisicoquímicas de este jugo (Cuadro II), se observa un pH mayor al de los jugos de mora y cas analizados previamente, pero aún fuera del rango óptimo de crecimiento de *A. acidoterrestris* (pH: 3,5-4,0) (Yokota *et al.* 2007).

Al analizar el resto de las características fisicoquímicas del jugo de maracuyá se observa que no existen parámetros tan marcados como en los dos jugos analizados anteriormente que expliquen el descenso en la población de *A. acidoterrestris*. Su contenido de carbohidratos fue intermedio a bajo y presentó un contenido de fructosa y glucosa similar al del jugo de naranja comercial (control positivo) que sí mostró crecimiento de la bacteria. No obstante, el jugo de maracuyá no mostró un contenido de sacarosa cuantificable, en contraste con el jugo de naranja comercial.

En cuanto a la vitamina C, el jugo de maracuyá muestra un valor bajo y por debajo del valor reportado (15 mg/100 mL jugo) que ocasionó inhibición en estudios previos (Cerny *et al.* 2000), mientras que su contenido de polifenoles no fue cuantificable. Se recalca en este jugo

el mayor contenido de ácido cítrico de entre los seis jugos estudiados, sin embargo, este ácido no ha mostrado efectos inhibitorios en estudios realizados anteriormente. Se había reportado el aislamiento de *Alicyclobacillus* sp. de jugo de maracuyá, en estudios previos (McKnight *et al.* 2010), sin embargo, esta es la primera ocasión que se estudia el crecimiento de este microorganismo en el jugo por lo que no se tenía una predicción del comportamiento esperado.

El jugo de naranja preparado en planta piloto mostró el segundo mayor tiempo $t_{1,40}$ (Cuadro III), con un tiempo de sobrevivencia de la bacteria de aproximadamente seis semanas antes de alcanzar una población no cuantificable. Sin embargo, se esperaba observar el crecimiento de *A. acidoterrestris* en el jugo de naranja según lo reportado por una serie de autores previos (Komitopoulou *et al.* 1999, Gocmen *et al.* 2005, Spinelli *et al.* 2010, Pérez-Cacho *et al.* 2011). El jugo de naranja presentaba un pH dentro del rango óptimo de crecimiento para *A. acidoterrestris*, no obstante, era menor al valor óptimo de 4,22 determinado por modelos predictivos como el pH óptimo para la cepa ATCC 49025 utilizada en el presente estudio (Kakagianni *et al.* 2018).

Al analizar el resto de la composición fisicoquímica del jugo de naranja se observa la presencia de los tres azúcares analizados y la ausencia de vitamina C y polifenoles. Su contenido de ácido cítrico es relativamente bajo pero similar al jugo de naranja comercial (control positivo). Las otras diferencias notadas entre el jugo de naranja preparado en planta piloto y el jugo de naranja comercial se discutirán más a fondo en una sección posterior.

Como lo muestra el Cuadro III el jugo de piña presentó el mayor tiempo $t_{1,40}$, lo cual indica que tomó aproximadamente dos meses para que la población de *A. acidoterrestris* alcanzara niveles no cuantificables en este jugo. El potencial de crecimiento de esta bacteria en jugo de piña no era claro, debido a que algunos autores previos reportaron su crecimiento y otros la ausencia de este (Splittstoesser *et al.* 1994, Walls y Chuyate 2000, Danyluk *et al.* 2011). En el presente estudio no se observó crecimiento del microorganismo, pero fue el jugo en el cual esta bacteria sobrevivió por mayor tiempo. El jugo de piña también presentó un pH dentro del rango óptimo de crecimiento para *A. acidoterrestris*, aunque el valor fue menor al valor determinado como óptimo para la cepa utilizada (Kakagianni *et al.* 2018).

El jugo de piña mostró el mayor valor de °Brix, aunque siguió estando por debajo del nivel de 20 °Brix necesario según estudios previos (Splittstoesser *et al.* 1994, Chang y Kang 2004) para comenzar a observar un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de la bacteria. En concordancia con este resultado, la piña presentó el valor más alto de carbohidratos de los seis jugos y el contenido de fructosa y glucosa más alto. Vale notar, además, que en este jugo no se encontraron cantidades detectables de sacarosa.

Como lo muestra el Cuadro II el jugo de piña presentó un contenido de vitamina C superior al valor de 15 mg/100 mL de jugo, reportado como la concentración responsable de inhibir el crecimiento de la bacteria en jugo de manzana (Cerny *et al.* 2000). Sin embargo, al comparar el contenido de este compuesto en el jugo de piña con su valor en el jugo de naranja comercial que sí permitió el crecimiento de *A. acidoterrestris*, se observa que el valor sigue siendo inferior. De esta manera, el contenido de Vitamina C en el jugo de piña no parece ser el motivo principal del descenso observado en la población del microorganismo. Además, el jugo de piña no muestra un contenido de polifenoles cuantificable y su perfil de ácidos se compone de ácido cítrico y málico en cantidades menores en comparación con los otros cinco jugos.

La Figura 4 muestra el comportamiento de la población de *A. acidoterrestris* en el jugo de naranja comercial, el cual fue el único jugo analizado que permitió el crecimiento de la bacteria. Este jugo se utilizó como un control positivo en el estudio ya que su comportamiento de crecimiento concordaba con lo reportado por otros autores previos que estudiaron esta bacteria en jugo de naranja (Komitopoulou *et al.* 1999, Gocmen *et al.* 2005, Spinelli *et al.* 2010, Pérez-Cacho *et al.* 2011). En el estudio de Gocmen *et al.* (2005) se analizó el comportamiento de la misma cepa de *A. acidoterrestris* utilizada en el presente estudio (ATCC 49025) bajo condiciones similares de temperatura de almacenamiento (45 °C) y espacio de cabeza (40 %). El autor reportó una curva de crecimiento muy similar a la obtenida en el presente estudio, alcanzando una población por encima de los 7 log UFC/mL en menos de una semana.

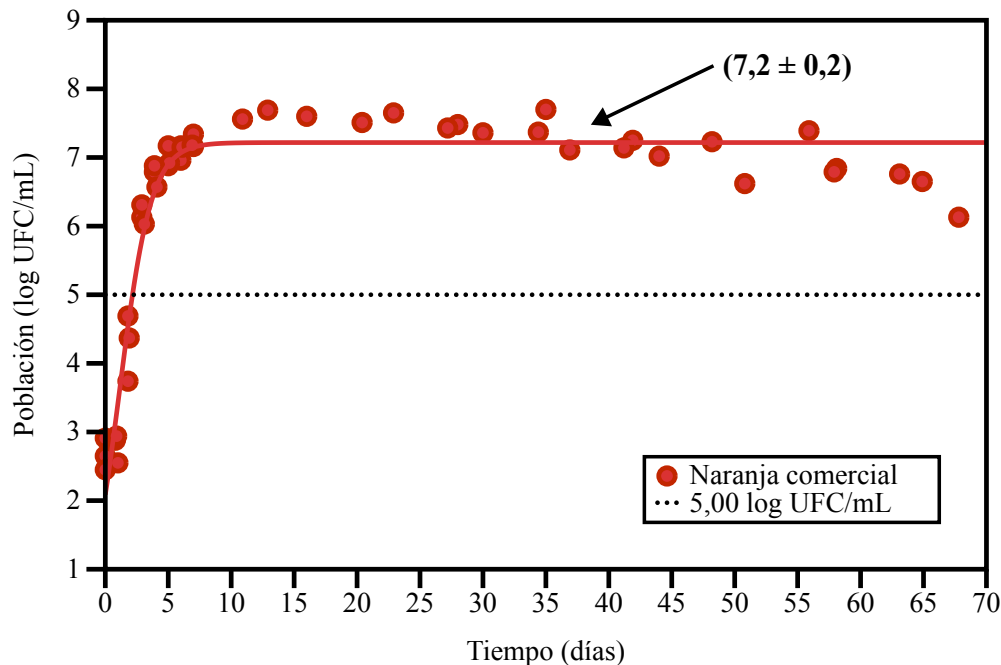


Figura 4. Curva de sobrevivencia y población estabilizada de *A. acidoterrestres* en jugo de naranja comercial durante el almacenamiento por 2 meses a 45 ± 2 °C.

Al analizar la caracterización fisicoquímica del jugo de naranja comercial (Cuadro II) se observa que su pH fue el mayor de entre los seis jugos analizados con un valor de 3,94 que lo coloca dentro del rango óptimo de crecimiento para *A. acidoterrestres* (Yokota *et al.* 2007). Además, este jugo presentó el valor de pH más cercano al valor de pH óptimo para la cepa utilizada (pH: 4,22) según lo determinado mediante modelos predictivos por Kakagianni *et al.* (2018).

Al observar la composición fisicoquímica del jugo de naranja comercial (Cuadro II) se notan valores intermedios en los parámetros de sólidos solubles, fructosa, glucosa, ácido cítrico y ácido málico en comparación con los otros jugos del estudio. Por otro lado, algunos parámetros que lo diferencian de los otros jugos analizados son la presencia de sacarosa que sólo se identificó en los jugos de naranja. El jugo de naranja comercial mostró, además, un valor cuantificable de polifenoles, aunque significativamente inferior al de los jugos de cas y mora ($p < 0,05$). En este caso es posible que la concentración o el tipo de polifenoles presentes en este jugo no tuvieran un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *A. acidoterrestres*, al observarse un rápido crecimiento del microorganismo en este jugo.

El contenido de vitamina C también es de interés en el jugo de naranja comercial, ya que se encuentra por encima del valor de 15 mg/100 mL de jugo que se reportó como inhibitorio para esta bacteria en jugo de manzana según el estudio realizado por Cerny *et al.* (2000). De esta manera, es posible inferir que el efecto inhibitorio de la vitamina C sobre el crecimiento de *A. acidoterrestris* podría deberse a un efecto sinérgico de otros compuestos en el jugo y verse afectado por otras condiciones del estudio y no atribuirse solamente a la concentración de vitamina C en el jugo.

Para analizar mejor el comportamiento de la bacteria en el jugo de naranja comercial, se estableció como tiempo crítico la variable $t_{5,00}$ que se muestra en el Cuadro III y el cual indica que la población de *A. acidoterrestris* llegaría a esta población crítica en aproximadamente dos días. Como se mencionó anteriormente en la sección 4.4 del presente documento, los límites de detección olfativo y de gusto del guayacol son muy bajos, donde para el jugo de naranja se ha reportado un límite de detección olfativo de 0,70 ppb y un límite de reconocimiento del guayacol de tan sólo 2 ppb (Pérez-Cacho *et al.* 2011). De esta manera, el jugo de naranja comercial podría presentar cantidades detectables de guayacol en tan solo días, ocasionando el rechazo del producto por parte del consumidor debido a características sensoriales indeseables y generando pérdidas para la industria de jugos.

Como se mencionó anteriormente existe una correlación positiva entre el crecimiento de *Alicyclobacillus* sp. y la producción de guayacol, pero la relación aún no es comprendida por completo (Pérez-Cacho *et al.* 2011). De esta manera, a pesar de que la población de 10^4 - 10^5 UFC/mL es la más aceptada como la necesaria para que comience la producción de guayacol, otros autores afirman que esto podría no ocurrir hasta alcanzar la fase de crecimiento estacionaria de la bacteria. Con este fin se determinó también la población estabilizada de *A. acidoterrestris* en el jugo de naranja comercial como se observa en la Figura 4.

La población estabilizada de *A. acidoterrestris* en el jugo de naranja comercial fue de $7,2 \pm 0,2$ log UFC/mL, que se encuentra considerablemente por encima de la población crítica de 5,00 log UFC/ mL. Es importante notar que, aunque fuera el caso de que la producción de guayacol no comenzara hasta alcanzar esta fase estacionaria, la Figura 4 muestra que se alcanzó la población crítica en la fase estacionaria en un periodo de tan solo semanas. Este

hecho podría ser particularmente problemático para jugos estables a temperatura ambiente que generalmente tienen una vida útil de meses (Tucker y Featherstone 2010).

De esta manera, es posible que *A. acidoterrestris* deteriore el jugo de naranja comercial antes de que alcance el final de su vida útil y posiblemente antes de que éste llegue a las manos del consumidor (dependiendo de los periodos de almacenamiento y rotación del producto). La producción de guayacol depende además, de otros factores como lo son la presencia y concentración de precursores de guayacol en el jugo (Witthuhn *et al.* 2012) y otros parámetros ya discutidos en la sección 4.4 de este documento, que no se deberían desligar de los resultados obtenidos.

Al observar el comportamiento de la población de *A. acidoterrestris* en la Figura 2, se puede apreciar una notable diferencia entre el jugo de naranja comercial y el jugo de naranja preparado en planta piloto, a pesar de que ambos jugos se prepararon a partir de naranja. Durante el periodo de estudio, el jugo de naranja comercial mostró un crecimiento por encima de 7 log UFC/mL, mientras que el jugo de naranja preparado en planta piloto mostró una disminución en la población de la bacteria hasta alcanzar un nivel no cuantificable por el método de recuento.

Como ya se discutió anteriormente, era de esperar que el crecimiento de *A. acidoterrestris* en el jugo de naranja comercial fuera el obtenido en este estudio, lo que concuerda con reportes de estudios previos (Komitopoulou *et al.* 1999, Gocmen *et al.* 2005, Spinelli *et al.* 2010, Pérez-Cacho *et al.* 2011). Por otro lado, el comportamiento de la bacteria en el jugo de naranja de planta piloto no fue el esperado. En un estudio realizado por Eguchi *et al.* (1999) en jugo de naranja, se observó un comportamiento más parecido al observado en el jugo de naranja elaborado en planta piloto, con la diferencia de que en este caso se utilizó una mezcla de especies de *Alicyclobacillus* sp. y la población mostró un ligero crecimiento durante las primeras dos semanas de incubación a 45 °C antes de mostrar un descenso en la población.

Las diferencias observadas podrían deberse a variaciones en las propiedades fisicoquímicas de los dos jugos que se detallan en el Cuadro II. Se observa que el jugo de naranja comercial tiene un valor de pH significativamente ($p < 0,05$) mayor al del jugo de naranja de planta piloto, aunque la diferencia observada no es muy grande. Sumado a esto, se observó una relación directa entre el aumento del pH del jugo y el tiempo necesario para que la población

de *A. acidoterrestris* alcanzara niveles no detectables ($t_{1,40}$). Esto parece indicar que el factor de pH tiene un efecto importante sobre el crecimiento de *A. acidoterrestris*. Sin embargo, sería arriesgado atribuir toda la diferencia observada entre los dos jugos de naranja sólo al factor de pH, en especial porque en otro trabajo similar que realizó Merle (2000) en caldo papa dextrosa, se obtuvo un mayor crecimiento de *A. acidoterrestris* (ATTC 49025) en el caldo acondicionado a un pH de 3 que en el caldo con pH 4 ó 5. Por otra parte, en un estudio realizado por Shemesh *et al.* (2014) también en caldo de papa dextrosa, no se observó una diferencia en la curva de crecimiento de *A. acidoterrestris* (ATTC 49025) al variar el pH entre 3,0 y 5,5. De esta manera, un pH ligeramente mayor en el jugo de naranja comercial probablemente no fue la razón principal por la que la bacteria creciera en este jugo y fuese inactivada en el preparado a nivel de planta piloto.

No obstante, es importante notar que ambos estudios mencionados anteriormente que estudiaron el efecto del pH sobre el crecimiento de *A. acidoterrestris* se realizaron en caldo papa dextrosa, donde los otros componentes de una matriz más compleja como un jugo no se consideran. Los resultados de Bevilacqua *et al.* (2008) en jugo de manzana mostraron que las propiedades antimicrobianas del cinamaldehído contra *A. acidoterrestris* se potenciaban a menores valores de pH. De esta manera, se debe mantener en mente que las diferencias en pH podrían influenciar la efectividad de otros compuestos antimicrobianos presentes en la matriz del jugo.

Otra diferencia observada en la composición fisicoquímica de los jugos de naranja fue la presencia de polifenoles en el jugo de naranja comercial y su ausencia en el jugo de planta piloto. Usualmente a los polifenoles se les atribuye un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *A. acidoterrestris* (Splittstoesser *et al.* 1998, Molva y Baysal 2015a), sin embargo, en este caso es posible que la concentración o el tipo de polifenol presente no ocasionara esta inhibición. No obstante, hasta el momento no existen estudios que le atribuyan a los polifenoles propiedades estimuladoras del crecimiento de *Alicyclobacillus* sp.

La tercera diferencia notable en la composición de los jugos de naranja analizados fue la presencia de vitamina C en el jugo de naranja comercial y su ausencia en el jugo de naranja preparado en planta piloto. Estudios previos en jugo de manzana habían mostrado un ligero aumento en el crecimiento de *A. acidoterrestris* al adicionar ácido ascórbico, pero cuando la

concentración era mayor a 15 mg/100 mL ocasionaba más bien una inhibición. Es posible que en este caso al tratarse de jugo de naranja y una cepa distinta de *A. acidoterrestris*, que la concentración de vitamina C presente haya favorecido el crecimiento de la bacteria.

Al no encontrar un punto determinante que explicara la diferencia observada en el comportamiento de *A. acidoterrestris* entre jugos de naranja, se propusieron dos hipótesis adicionales a la estructura de este trabajo final de graduación. La primera es que el jugo de naranja preparado en planta piloto contiene algún compuesto con fuerte efecto inhibitorio que no permite el crecimiento de *A. acidoterrestris*, pero que no fue identificado en el análisis fisicoquímico de los jugos. La segunda hipótesis es que el jugo de naranja comercial contiene algún compuesto esencial para el crecimiento la bacteria y que posiblemente lo potencia.

Con el fin de explorar estas dos hipótesis se realizaron tres pruebas exploratorias siguiendo la metodología expuesta anteriormente (con dos repeticiones), pero variando algunas características del jugo. La primera prueba consistió en realizar mezclas de jugo de naranja comercial con el jugo de naranja de planta piloto, donde se observó que una proporción de 90:10 de jugo comercial:preparado en planta piloto, no permitía el crecimiento de la bacteria. De esta manera, se observó que con la adición de tan sólo un 10 % de jugo preparado en planta piloto era posible detener el crecimiento que se había observado en el jugo de naranja comercial.

La segunda prueba consistió en diluir el jugo de naranja de planta piloto con agua destilada estéril para ver si se podía diluir el efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *A. acidoterrestris*. Se diluyó el jugo hasta un 50% con agua destilada estéril y aún así no se observó crecimiento de la bacteria. De esta manera, es posible que el jugo de naranja de planta piloto presentara algún compuesto inhibitorio altamente concentrado o que el jugo simplemente carecía de algún compuesto necesario para el desarrollo de la bacteria.

La tercera prueba consistió en tomar el jugo de naranja comercial y aplicarle un tratamiento térmico (llenado en caliente) equivalente al tratamiento que recibieron los jugos preparados en planta piloto. Se realizó esta prueba con el fin de determinar si este tratamiento causó algún cambio en el jugo que lo hiciera un mal medio para el crecimiento de la bacteria. Sin embargo, aún con la aplicación de este tratamiento térmico adicional, el jugo de naranja comercial continuó siendo un medio favorable para el crecimiento de *A. acidoterrestris*.

De esta manera, se observó que el tratamiento térmico de llenado en caliente no parecía ser el responsable de causar la inhibición de crecimiento de la bacteria en el jugo de naranja preparado en planta piloto. Es posible entonces que este jugo contenía algún tipo de compuesto inhibitorio cuyo efecto no se pudo disminuir aún en combinación con el jugo de naranja comercial y su dilución con agua. Se podrían realizar estudios posteriores para tratar de determinar el compuesto exacto que ocasionó este comportamiento.

6.3 Objetivo 3

6.3.1 Sobrevivencia de *A. acidoterrestris* según el espacio de cabeza

La Figura 5 muestra el comportamiento de la población de *A. acidoterrestris* en el jugo de naranja comercial (que mostró el mayor potencial de deterioro según los resultados de la sección 6.2) envasado en botellas de vidrio con un 40 % y un 6 % de espacio de cabeza (EC) volumen/volumen. Para asegurar que los datos fueran comparables se realizó un ANDEVA que mostró que no existían diferencias significativas entre las poblaciones iniciales de los dos tratamientos de EC ($p > 0,05$). En el apartado anterior (6.2) se utilizó el modelo estadístico aplicado a las curvas de crecimiento para determinar el tiempo crítico $t_{5,00}$ que se eligió como parámetro para analizar el potencial de deterioro del microorganismo. Sin embargo, es evidente al observar la Figura 5 que la población de la bacteria empacada en botellas con un 6 % de EC no alcanza esa población según el modelo estadístico aplicado. Por este motivo en esta sección se decidió analizar el punto máximo de crecimiento para determinar si en este punto extremo la población logra alcanzar el valor crítico 5,00 log UFC/mL.

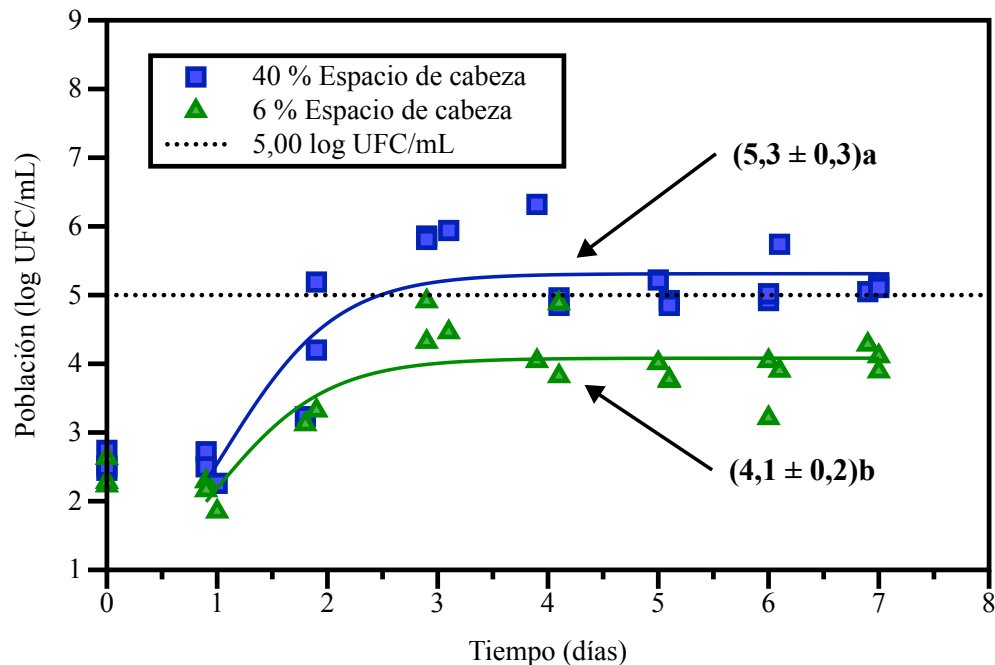


Figura 5. Curva de sobrevivencia y población estabilizada* de *A. acidoterrestris* en jugo de naranja comercial envasado en botellas de vidrio con espacios de cabeza del 40 % y 6 % durante el almacenamiento por una semana a 45 ± 2 °C.

*Letras diferentes indican que existe diferencia significativa (según traslape de intervalos de confianza: 95%)

Con este fin se determinó el punto de población máxima y el tiempo necesario para alcanzar esta población definida como t_{MAX} , que se muestran en el Cuadro IV para ambos tratamientos de EC. Los datos muestran que la población máxima para el tratamiento de 40 % de EC fue significativamente mayor ($p < 0,05$) que el jugo empacado con un 6 % de EC. De esta manera, se determinó que el EC tiene un efecto significativo sobre la población máxima de *A. acidoterrestris* en el jugo de naranja comercial.

La población máxima para el tratamiento de 40 % de EC se encontró por encima de la población crítica de 5,00 log UFC/mL, mientras que la población máxima del tratamiento de 6 % de EC se encontró ligeramente por debajo de esta población crítica. Como ya se mencionó anteriormente esta población crítica se eligió para el análisis de resultados en este trabajo, pero distintos autores han determinado que la población necesaria para que comience la producción de guayacol se encuentra entre 10^4 - 10^5 UFC/mL. Además, esta población crítica puede variar dependiendo de otros factores como la temperatura de almacenamiento

(Yokota *et al.* 2007) y la fase de crecimiento en la que se encuentre el microorganismo (Pérez-Cacho *et al.* 2011). Por esta razón, no sería correcto asumir que porque la población de la bacteria en el jugo con 6 % de EC no alcanza el valor exacto de 5,00 log UFC/mL que este se encuentre exento del deterioro por este microorganismo.

En el Cuadro IV se observa también que el valor de la variable t_{MAX} no varió al modificar el EC. Al interpretar esta variable se muestra que en un tiempo de tan sólo 2-4 días la bacteria *A. acidoterrestris* alcanza su población máxima en el jugo de naranja comercial antes de pasar a su etapa de estabilización de la población. Es importante recordar que los jugos estables a temperatura ambiente generalmente tienen una vida útil de meses (Tucker y Featherstone 2010) donde este rápido crecimiento de la bacteria podría permitir que alcance poblaciones necesarias para deteriorar el jugo antes de que el producto llegue a manos del consumidor.

Cuadro IV. Población máxima y t_{MAX} de *A. acidoterrestris* en jugo de naranja comercial envasado en botellas de vidrio con espacios de cabeza del 40 % y 6 % durante el almacenamiento por una semana a 45 ± 2 °C (promedio \pm intervalo de confianza, n=3).

Espacio de cabeza (%)	Población máxima	
	(log UFC/mL)	t_{MAX}^* (días)
6	$4,8 \pm 0,4^a$	3 ± 1^a
40	$6,0 \pm 0,4^b$	3 ± 1^a

Letras diferentes indican que existe diferencia significativa (Prueba t-Student α : 0,05)

* Tiempo requerido para alcanzar población máxima

Al igual que como se analizó en la sección anterior (6.2), también se analizó la población estabilizada de *A. acidoterrestris* para los dos tratamientos de EC. Según se observa en la Figura 5, la población estabilizada de la bacteria con un 40 % de EC fue significativamente mayor (nivel de confianza: 95 %) al del EC de 6 %. Nuevamente, esta población estabilizada para el tratamiento de 40 % de EC se encontró por encima del valor crítico de 5,00 log UFC/mL, mientras que la población del tratamiento de 6 % de EC no alcanzó este valor. Por lo tanto, es muy posible que el jugo envasado con un 40 % de EC sufriría deterioro por la producción de guayacol si éste se contaminara con *A. acidoterrestris* (y se presentan las otras

condiciones necesarias para su producción). Por su parte, el jugo con un EC del 6 % presentó un menor potencial de deterioro por la producción de guayacol, debido a que las poblaciones que logró alcanzar la bacteria en estas condiciones fueron significativamente menores (nivel de confianza: 95 %).

De esta manera, sin importar si se analiza el punto de población máxima o la población estabilizada de *A. acidoterrestris* se observa un crecimiento significativamente mayor en el jugo con un espacio de cabeza mayor (40%). Esto concuerda con la característica reportada por Ciuffreda *et al.* (2015) que clasifica a *A. acidoterrestris* como una bacteria estrictamente aerobia y con los resultados observados por otros autores que determinaron que cuando el jugo se empaca con un 0 % de EC, no se observa crecimiento (Cerny *et al.* 2000).

Estos resultados también reflejan lo que observaron Walker y Phillips (2005) que determinaron que un EC de 25 % o mayor favorecía el aumento en la población. Además, vale notar que, aunque en el presente estudio no se midió directamente el oxígeno disuelto en el jugo, el análisis y el control del EC parecen ser un buen indicador del oxígeno disponible para el uso de la bacteria durante su crecimiento. Estos resultados, no obstante, no se deben desligar de los otros compuestos fisicoquímicos del jugo que pueden afectar el oxígeno disponible, ya que otros autores han observado que el tipo de jugo está relacionado con la cantidad mínima de oxígeno que requiere esta bacteria para crecer (Cerny *et al.* 2000).

Finalmente, se destaca que la reducción del crecimiento de la bacteria en un ambiente de EC reducido como el que se utiliza comúnmente a nivel industrial (6 %), no es suficiente para asegurar que no habrá deterioro causado por *A. acidoterrestris*. Esto debido a que las poblaciones alcanzadas se encontraron sólo ligeramente por debajo de la población crítica. Además, una población bacteriana tan alta (algunos estándares consideran 10^4 UFC/mL como el valor máximo aceptable (ESMA 2002)) podría ser causa de rechazo por parte de la industria de jugos, al considerar que el jugo se encuentra deteriorado por su alta carga microbiana, independiente de la producción o no de guayacol.

6.3.2 Sobrevivencia de *A. acidoterrestris* según el tipo de tapa utilizada

La Figura 6 muestra el comportamiento de *A. acidoterrestris* en jugo de naranja comercial envasado en botellas de vidrio con un 40 % de espacio de cabeza y utilizando dos tipos

distintos de tapa. El Cuadro V muestra como la población máxima de la bacteria fue significativamente diferente ($p < 0,05$) según el tipo de tapa utilizada durante el almacenamiento. Se observó un mayor crecimiento en el jugo envasado en la botella cubierta sólo con papel aluminio, que en aquella cubierta con tapa metálica.

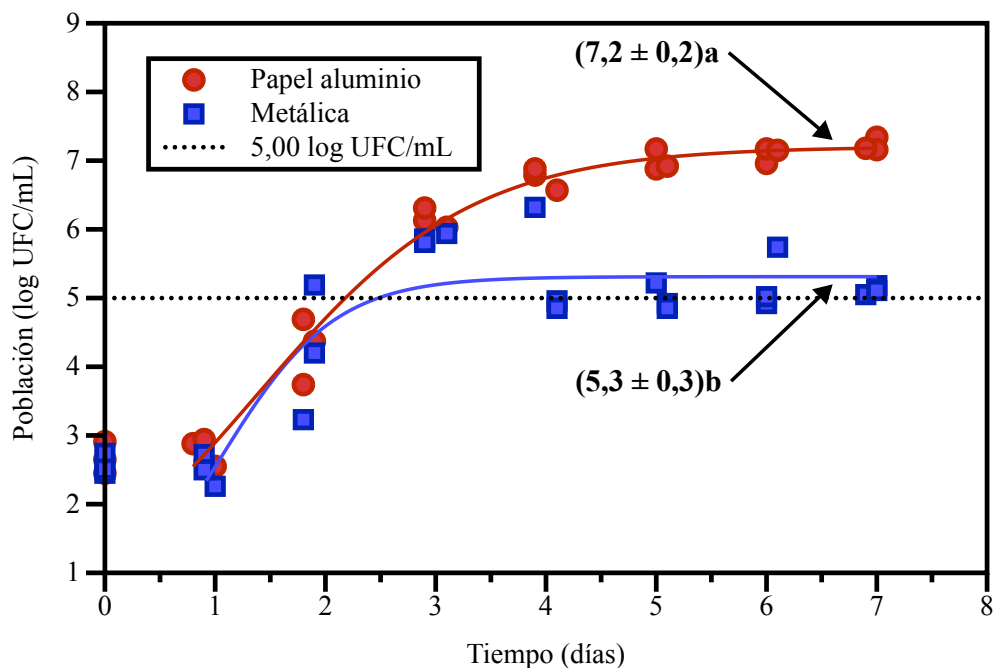


Figura 6. Curva de sobrevivencia y población estabilizada* de *A. acidoterrestris* en jugo de naranja comercial envasado en botellas de vidrio cubiertas con papel aluminio o tapas metálicas durante el almacenamiento por una semana a 45 ± 2 °C.

*Letras diferentes indican que existe diferencia significativa (según traslape de intervalos de confianza: 95%)

El comportamiento observado era de esperar ya que el sello formado al cubrir la botella con papel aluminio no era hermético y permitía un mayor intercambio de oxígeno que la tapa metálica. La mayor disponibilidad de oxígeno parece ser favorable para el crecimiento de *A. acidoterrestris* al ser una bacteria aerobia y esta atmósfera permite que alcance poblaciones mayores que cuando se limita su disponibilidad al oxígeno. Estos resultados, además, complementan los de otros autores como los que recopila Yokota *et al.* (2007) donde se analizó el efecto del material del recipiente y su permeabilidad al aire exterior y como una mayor permeabilidad del envase llevaba a un mayor crecimiento de *Alicyclobacillus* sp.

En el Cuadro V también se muestra la determinación del t_{MAX} o el tiempo necesario para que la bacteria alcanzara el punto de población máxima. Se observa que el valor de t_{MAX} fue significativamente menor ($p < 0,05$) para el jugo envasado en botellas selladas con tapa metálica. Según estos resultados parece que el crecimiento se detiene prematuramente en las botellas cuya fuente de oxígeno se limita a aquel disponible en el espacio de cabeza. Por este motivo es de especial importancia el control del EC en la producción de jugos estables a temperatura ambiente y su correcto sellado.

Cuadro V. Población máxima y t_{MAX} de *A. acidoterrestris* en jugo de naranja comercial envasado en botellas de vidrio cubiertas con papel aluminio o tapas metálicas durante el almacenamiento por una semana a 45 ± 2 °C (promedio \pm intervalo de confianza, $n=3$).

Tipo de tapa	Población máxima	
	(log UFC/mL)	t_{MAX}^* (días)
Metálica	$6,0 \pm 0,3^a$	$3,2 \pm 0,9^a$
Papel aluminio	$7,2 \pm 0,3^b$	$6,7 \pm 0,9^b$

Letras diferentes indican que existe diferencia significativa (Prueba t-Student α : 0,05)

* Tiempo requerido para alcanzar población máxima

En los dos tratamientos de EC utilizados se alcanzaron poblaciones máximas considerablemente mayores a la población crítica de 5,00 log UFC/mL. En estos casos, es posible que jugo contaminado con *A. acidoterrestris* pueda deteriorarse por la producción de guayacol en menos de una semana. Al observar las poblaciones estabilizadas de cada tratamiento (Figura 6), se puede notar que nuevamente ambas poblaciones se encontraron por encima de la población crítica de 5,00 log UFC/mL, por lo que aún bajo este criterio más conservador, se encuentran altas poblaciones que equivalen a un alto potencial de deterioro. Además, como ya se mencionó anteriormente una población bacteriana tan elevada podría ser causa de rechazo por parte de la industria de jugos, al considerar que el jugo se encuentra deteriorado por su alta carga microbiana, independiente de la producción o no de guayacol.

A pesar de que el uso de tapas compuestas por papel aluminio no es un caso factible en la industria, los resultados sí resaltan la importancia de que los jugos estables a temperatura ambiente deben contar con un adecuado sello en su tapa y que los empaques deben ser de

materiales que limiten el ingreso de oxígeno. Además, es importante notar que como la disponibilidad de oxígeno es un factor que afecta el crecimiento de la bacteria, esto se debe tomar en cuenta durante la producción de jugos cuando estos se encuentran en etapas con alta disponibilidad de oxígeno como en operaciones de mezclado y en especial en equipos abiertos al ambiente.

7. Conclusiones

- El tipo de jugo tiene un efecto significativo sobre el crecimiento de *A. acidoterrestris* en jugos de frutas tropicales, posiblemente influenciado por las propiedades fisicoquímicas de cada jugo.
- Los jugos de mora, cas, maracuyá, naranja y piña mostraron una reducción de la población de la bacteria en el tiempo, donde el jugo de mora mostró la reducción más rápida y el jugo de piña la reducción más lenta.
- El jugo de naranja comercial mostró el mayor potencial de deterioro de los 6 jugos analizados, donde *A. acidoterrestris* puede crecer y potencialmente deteriorar el jugo cuando se proporcionan las condiciones de crecimiento apropiadas. En este jugo el microorganismo alcanza la población crítica de deterioro (5,00 log UFC/mL) en aproximadamente 2 días, lo que podría ocurrir antes de llegar al consumidor y ocasionar el rechazo del producto por parte del cliente debido a características sensoriales indeseables como la producción de guayacol.
- El potencial de deterioro de *A. acidoterrestris* podría ser distinto en dos jugos preparados a partir del mismo tipo de fruta, como se observó en el caso del jugo de naranja preparado en planta piloto y el preparado a nivel comercial.
- El espacio de cabeza tiene un efecto significativo sobre el crecimiento de *A. acidoterrestris* en jugo de naranja comercial, alcanzando una población por encima de 5,00 log UFC/mL para el tratamiento de 40 % de EC en comparación con el 6 % que restringió el crecimiento de la población justo por debajo de este valor de población crítica.
- Las condiciones de procesamiento tales como la reducción del espacio de cabeza del envase limitarán las tasas de crecimiento de *A. acidoterrestris*; pero el control del deterioro en estos jugos requiere barreras adicionales tales como la aplicación de

buenas prácticas agrícolas y de manufactura que son una de las principales armas para evitar la contaminación inicial de los jugos con esta bacteria.

- El tipo de tapa utilizado en el envasado y en consecuencia el material de empaque tiene un efecto significativo sobre el crecimiento de *A. acidoterrestris* en jugo de naranja comercial, por lo que se resalta la importancia de un adecuado sello y la utilización de un material de empaque que limite el ingreso de oxígeno para reducir el potencial de deterioro en jugos estables a temperatura ambiente.

8. Recomendaciones

- Considerar la utilización de la metodología propuesta para asegurar que un jugo específico no presente potencial de deterioro por *A. acidoterrestris*, esto como un esfuerzo para minimizar los múltiples muestreos innecesarios que se realizan en la actualidad en los jugos destinados para exportación debido a la falta de información con fundamento científico.
- Utilizar un mayor número de especies de *Alicyclobacillus* sp. o una serie de cepas de *A. acidoterrestris* para tener un estudio con resultados más amplios.
- Realizar un sondeo de productos en el mercado para analizar la prevalencia de *Alicyclobacillus* sp. en jugos de frutas tropicales en Costa Rica, ya que un análisis como este no se ha reportado.
- Realizar la detección de precursores de guayacol en los jugos estudiados para confirmar el potencial de deterioro por la producción de guayacol.
- Realizar la detección de guayacol a través del estudio de crecimiento para poder definir directamente el deterioro ocasionado por *A. acidoterrestris* en jugos de frutas tropicales.
- Continuar la investigación referente al crecimiento de *A. acidoterrestris* en los dos jugos de naranja para definir las causas de las diferencias observadas. Con este fin, algunas pruebas que se podrían realizar serían la preparación de los jugos descritos a continuación y su evaluación para determinar su potencial de deterioro por la bacteria:
 - Preparar otros jugos a partir de concentrados como el jugo de naranja comercial que mostró un crecimiento favorable de la bacteria.

- Elaborar jugo de naranja a partir de naranjas frescas con el fin de tener un mayor control del proceso desde la materia prima.
 - Adicionar vitamina C de manera controlada al jugo de naranja para estudiar de forma aislado su efecto.
- Evaluar la posibilidad de agregar jugo de mora a otros jugos y bebidas de frutas tropicales como un compuesto inhibitorio natural hacia el crecimiento de *A. acidoterrestris*.

9. Bibliografía

- Acosta, O; Vaillant, F; Pérez, AM; Dornier, M. 2017. Concentration of Polyphenolic Compounds in Blackberry (*Rubus Adenotrichos* Schltdl.) Juice by Nanofiltration. *Journal of Food Process Engineering* 40(1):1-7. DOI: <https://doi.org/10.1111/jfpe.12343>.
- Anjos, MM; da Silva, AA; de Pascoli, IC; Mikcha, JMG; Machinski, M; Peralta, RM; de Abreu Filho, BA. 2016. Antibacterial activity of papain and bromelain on *Alicyclobacillus* spp. (en línea). *International Journal of Food Microbiology* 216:121-126. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.10.007>.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 2005. Official Methods of Analysis (en línea). Disponible en <http://www.eoma.aoac.org/>.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 2012. Official Method 932.12, Solids (Soluble) in Fruits and Fruit Products, Refractometer Method (en línea). Disponible en <http://www.eoma.aoac.org/methods/info.asp?ID=15125>.
- Ashurst, PR. ed. 2016. Chemistry and Technology of Soft Drinks and Fruit Juices (en línea). 3 ed. Chichester, UK, John Wiley & Sons, Ltd. 356-397 p. DOI: <https://doi.org/10.1002/9781118634943>.
- Azofeifa, G. 2014. Study of the health promoting properties of the tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichos*) and the impact of digestion and pasteurization processes (en línea). Université Montpellier II - Sciences et Techniques du Languedoc. 1-127 p. Disponible en <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01002531>.
- Belitz, HD; Grosch, W; Schieberle, P. 2009. Food chemistry (en línea). 4 ed. Berlin, Alemania, Springer-Verlag. 951-957 p. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-3-540-69934-7>.
- Bevilacqua, A; Corbo, MR; Sinigaglia, M. 2008. Combined effects of low pH and cinnamaldehyde on the inhibition of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in a laboratory medium. *Journal of Food Processing and Preservation* 32(5):839-852. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2008.00217.x>.
- Camacho, A; Giles, M; Ortegón, A; Palao, M; Serrano, B; Velázquez, O. 2009. Técnicas para el análisis microbiológico de alimentos (en línea). Ciudad de México, México, Facultad de Química, UNAM. p. 1-9. Disponible en http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/TecnicBasic-Diluciones_6526.pdf.
- CANAPEP (Cámara Nacional de Productores de Piña). 2016. Piña de Costa Rica: Historia (en línea, sitio web). Disponible en <https://canapep.com/historia/>.
- Caswell, H. 2009. The role of fruit juice in the diet: An overview. *British Nutrition Foundation Nutrition Bulletin* 34:273-288. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1467-3010.2009.01760.x>.

- CEDAR (Centro de Estudios para el Desarrollo Rural, Costa Rica). 2010. Competitividad integral del cultivo de cítricos de mesa en la región Central Sur (en línea). Disponible en http://www.mag.go.cr/biblioteca_virtual/bibliotecavirtual/a00198.pdf.
- Cerny, G; Duong, H; Hennlich, W; Miller, S. 2000. *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Influence of Oxygen Content on Growth in Fruit Juices (en línea). Food Australia 52(7): 289-291. Disponible en <http://publica.fraunhofer.de/documents/N-3897.html>.
- Cerny, G; Hennlich, W; Poralla, K. 1984. Spoilage of Fruit Juice by Bacilli: Isolation and Characterization of the Spoiling Microorganism-Fruchtsaftverderb durch Bacillen: Isolierung und Charakterisierung des Verderbserregers. Journal of Food Research and Research 179(3):224-227. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF01041898>.
- Chang, S-S; Kang, D-H. 2004. *Alicyclobacillus* spp. in the fruit juice industry: history, characteristics, and current isolation/detection procedures. Critical reviews in microbiology 30(2):55-74. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408410490435089>.
- CITA (Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos). 2015. Grados Brix. P-SA-MQ-046. Emisión No. 2. San José, Costa Rica.
- CITA (Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos). 2016a. Acidez total. P-SA-MQ-011. Emisión No. 7. 16. San José, Costa Rica.
- CITA (Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos). 2016b. Determinación de ácidos orgánicos por HPLC. P-SA-MQ-051. Emisión No. 2. San José, Costa Rica.
- CITA (Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos). 2016c. Determinación de antocianinas. P-SA-MQ-047. Emisión No. 8. San José, Costa Rica.
- CITA (Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos). 2016d. Determinación de polifenoles. P-SA-MQ-048. Emisión No. 4. San José, Costa Rica.
- CITA (Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos). 2016e. Determinación del pH. P-SA-MQ-012. Emisión No. 7. San José, Costa Rica.
- CITA (Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos). 2016f. Nitrógeno total por método Kjeldahl utilizando equipo Foss Tecator. P-SA-MQ-003. Emisión No. 7. San José, Costa Rica.
- CITA (Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos). 2016g. Vitamina C por HPLC. P-SA-MQ-024. Emisión No. 5. San José, Costa Rica.
- CITA (Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos). 2017a. Azúcares por HPLC. P-SA-MQ-006. Emisión No. 12. San José, Costa Rica.
- CITA (Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos). 2017b. Cenizas totales. P-SA-MQ-004. Emisión No. 8. San José, Costa Rica.
- CITA (Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos). 2017c. Grasa cruda por extracto etéreo. P-SA-MQ-005. Emisión No. 8. San José, Costa Rica.

- CITA (Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos). 2017d. Humedad. P-SA-MQ-002. Emisión No. 8. San José, Costa Rica.
- CITA (Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos). 2017e. Recuento de mesófilos aerobios. P-SA-MM-001. Emisión 3. San José, Costa Rica.
- Ciuffreda, E; Bevilacqua, A; Sinigaglia, M; Corbo, M. 2015. *Alicyclobacillus* spp.: New Insights on Ecology and Preserving Food Quality through New Approaches (en línea). *Microorganisms* 3(4):625-640. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms3040625>.
- Cumming, G. 2009. Inference by eye: Reading the overlap of independent confidence intervals. *Statistics in medicine* 28:205-220. DOI: <https://doi.org/10.1002/sim>.
- Dabrowska, J; Kunicka-Styczynska, A. 2018. *Alicyclobacillus* - bacteria still not understood (en línea). *Postepy Mikrobiologii* 57(2):117-124. DOI: <https://doi.org/10.15193/ZNTJ/2014/95/005-017>.
- Danyluk, MD; Friedrich, LM; Jouquand, C; Goodrich-Schneider, R; Parish, ME; Rouseff, R. 2011. Prevalence, concentration, spoilage, and mitigation of *Alicyclobacillus* spp. in tropical and subtropical fruit juice concentrates (en línea). *Food Microbiology* 28(3):472-477. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.10.008>.
- Durak, MZ; Churey, JJ; Danyluk, MD; Worobo, RW. 2010. Identification and haplotype distribution of *Alicyclobacillus* spp. from different juices and beverages (en línea). *International Journal of Food Microbiology* 142(3):286-291. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.07.003>.
- Eguchi, SY; Manfio, GP; Pinhatti, ME; Azuma, E; Variane, SF. 1999. Acidothermophilic sporeforming bacteria (ATSB) in orange juices: Detection methods, ecology, and involvement in the deterioration of fruit juices. Campinas, Brazil, Coleção de Culturas Tropical, Fundação André Tosello & ABECitrus.
- Eisele, T; Semon, M. 2005. Best estimated aroma and taste detection threshold for guaiacol in water and apple juice (en línea). *Journal of Food Science* 70(4):S267-S269. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb07201.x>.
- Escobedo, A. 2008. Proyecto MAP-Banano-Sondeo rápido de mercado: pulpa de frutas (en línea). CATIE 312:1-17. Disponible en <http://procesodefrutas.blogspot.com/>.
- ESMA (Emirates Authority for Standardization & Metrology). 2002. Microbiological Criteria for Food Stuffs - Part 1 (en línea). Disponible en https://micor.agriculture.gov.au/Dairy/Documents/Pdfs/GSO_1016-2000_STD_Microbiological_Criteria_for_Food_Stuffs-Part_1.pdf
- FDA (Food and Drug Administration, EEUU)/CFSSAN (Center for Food Safety & Applied Nutrition, EEUU). 2004. Guidance for Industry: Juice HACCP Hazards and Controls Guidance First Edition; Final Guidance (en línea). Disponible en <http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/Juice/ucm072557.htm>.

- FDA (Food and Drug Administration, EEUU)/CFSAN (Center for Food Safety & Applied Nutrition, EEUU). 2007. Approximate pH of Foods and Food Products (en línea). Disponible en <http://www.foodscience.caes.uga.edu/extension/documents/fdaapproximatephoffoodslacf-phs.pdf>.
- FDA (Food and Drug Administration, EEUU). 2017a. Code of Federal Regulations Title 21. Part 101. Food Labeling (en línea). Disponible en <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/cfrsearch.cfm?fr=314.80>.
- FDA (Food and Drug Administration, EEUU). 2017b. Code of Federal Regulations Title 21 Part 114 Acidified Foods (en línea). Disponible en <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/cfrsearch.cfm?fr=314.80>.
- FDA (Food and Drug Administration, EEUU). 2017c. Code of Federal Regulations Title 21 Part 120 Hazard analysis and critical control point (HACCP) systems (en línea). Disponible en http://www.ecfr.gov/cgi-bin/retrieveECFR?gp=1&SID=4bf49f997b04dcacdfbd637db9aa5839&ty=HTML&h=L&mc=true&n=pt21.2.101&r=PART#se21.2.101_11.
- Fernandes, AG; Santos, GM; Silva, DS; Sousa, PH; Maia, GA; Figueiredo, RW. 2011. Chemical and physicochemical characteristics changes during passion fruit juice processing (en línea). *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 31(3):747-751. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0101-20612011000300030>.
- Fernández-García, E; McGregor, J. 1994. Determination of organic acids during the fermentation and cold storage of yogurt. *Journal of Dairy Science* 77:2934-2939.
- Ferrario, M; Guerrero, S. 2018. Inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* ATCC 49025 spores in apple juice by pulsed light. Influence of initial contamination and required reduction levels (en línea). *Revista Argentina de Microbiología* 50(1):3-11. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.04.002>.
- Flores, G; Dastmalchi, K; Wu, SB; Whalen, K; Dabo, AJ; Reynertson, KA; Foronjy, RF; D'Armiento, JM; Kennelly, EJ. 2013. Phenolic-rich extract from the Costa Rican guava (*Psidium friedrichsthalianum*) pulp with antioxidant and anti-inflammatory activity. Potential for COPD therapy (en línea). *Food Chemistry* 141(2):889-895. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.03.025>.
- Georgé, S; Brat, P. 2005. Rapid Determination of Polyphenols and Vitamin C in Plant-Derived Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:1370-1373.
- Gocmen, D; Elston, A; Williams, T; Parish, M; Rouseff, RL. 2005. Identification of medicinal off-flavours generated by *Alicyclobacillus* species in orange juice using GC-olfactometry and GC-MS. *Letters in Applied Microbiology* 40(3):172-177. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2004.01636.x>.
- Gokturk, N. 2006. Organic acid, tocopherol and phenolic compositions of some Turkish grape cultivars. *Chemistry of Natural Compounds* 42(2):156-159.

- Goto, K; Mochida, K; Asahara, M; Suzuki, M; Kasai, H; Yokota, A. 2003. *Alicyclobacillus pomorum* sp. nov., a novel thermo-acidophilic, endospore-forming bacterium that does not possess ω -alicyclic fatty acids, and emended description of the genus *Alicyclobacillus*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 53(5):1537-1544. DOI: <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.02546-0>.
- Grande, MJ; Lucas, R; Abriouel, H; Ben Omar, N; Maqueda, M; Martínez-Bueno, M; Martínez-Cañamero, M; Valdivia, E; Gálvez, A. 2005. Control of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juices by enterocin AS-48. International Journal of Food Microbiology 104(3):289-297. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.03.010>.
- Groenewald, WH; Gouws, PA; Witthuhn, RC. 2013. Thermal inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores isolated from a fruit processing plant and grape juice concentrate in South Africa (en línea). 7(22):2736-2740. DOI: <https://doi.org/10.5897/AJMR12.1789>.
- Guisti, M; Wrolstad, R. 2001. Anthocyanins: Characterization and measurement with UV-visible spectroscopy. Current Protocols in Food Analytical Chemistry. F: F1-F1.2.
- Hernández, Y; Lobo, M; González, M. 2006. Determination of vitamin C in tropical fruits: a comparative evaluation of methods. Food Chemistry 96:654-664.
- Holdsworth, SD; Simpson, R. 2016. Thermal Processing of Packaged Foods. 3 ed. Barboza-Cánovas, G V (ed.). Cham, Switzerland, Springer International Publishing. 90 p. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-3-319-24904-9>.
- Hounhouigan, MH; Linnemann, AR; Ingenbleek, P; Soumanou, MM; Van Trijp, H; Van Boekel, M. 2014a. Effect of Physical Damage and Storage of Pineapple Fruits on their Suitability for Juice Production (en línea). 37:268-273. Disponible en <https://doi.org/10.1111/jfq.12094>.
- Hounhouigan, MH; Linnemann, AR; Soumanou, MM; Van Boekel, M. 2014b. Effect of Processing on the Quality of Pineapple Juice. Food Reviews International 30(2):112-133. DOI: <https://doi.org/10.1080/87559129.2014.883632>.
- Howard, I. 2006. ACB Workshop October 2005–Review. (en línea). European Quality Control System (EQCS) Workshop 2006. Disponible en http://www.eqcs.org/download/Workshop2006/07_ACBworkshop2005.pdf.
- Huang, X-C; Yuan, Y-H; Guo, C-F; Gekas, V; Yue, T-L. 2015. *Alicyclobacillus* in the Fruit Juice Industry: Spoilage, Detection, and Prevention/Control (en línea). Food Reviews International 31(2):91-124. DOI: <https://doi.org/10.1080/87559129.2014.974266>.
- IFU (International Fruit and Vegetable Juice Association, France). 2007. Method on the Detection of Taint Producing *Alicyclobacillus* in Fruit Juices (IFU Method 12).
- JFJA (Japan Fruit Juice Association). 2003. The Unified Detection Method of Thermoacidophilic Bacteria in Raw Materials of Fruit Juice. JFJA (Japan Fruit Juice Association).

- Kakagianni, M; Kalantzi, K; Beletsiotis, E; Ghikas, D; Lianou, A; Koutsoumanis, KP. 2018. Development and validation of predictive models for the effect of storage temperature and pH on the growth boundaries and kinetics of *Alicyclobacillus acidoterrestris* ATCC 49025 in fruit drinks (en línea). *Food Microbiology* 74:40-49. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.02.019>.
- Komitopoulou, E; Boziaris, IS; Davies, EA; Delves-broughton, J; Adams, MR. 1999. *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juices and its control by nisin. *Internacional Journal of Food Science and Technology* 34:81-85.
- Landry, W; Schwab, A; Lancette, G. 2001. *Bacteriological Analytical Manual (BAM)*. Chapter 21A. Examination of Canned Foods (en línea). 8 ed. FDA (Food and Drug Administration, EEUU). 1-24 p. Disponible en <https://www.fda.gov/food/foodscienceresearch/laboratorymethods/ucm2006949.htm>.
- Lykkesfeldt, J. 2000. Determination of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in biological samples by high-performance liquid chromatography using subtraction methods: reliable reduction with tris [2-carboxyethyl] phosphine hydrochloride. *Analytical Biochemistry* 282:89-93.
- Marín, V. 2016. Evaluación del efecto de la aplicación de ozono gaseoso sobre las características físico-químicas y parámetros de calidad poscosecha de mora fresca (*Rubus adenotrichos*) durante su almacenamiento. Licenciatura en Ingeniería de Alimentos. San José, Costa Rica, Universidad de Costa Rica. 1-105 p.
- Mata, L. 1992. El cólera: Historia, prevención y control. San José, EUNED (Editorial Universidad Estatal a Distancia, Costa Rica)/ UCR (Universidad de Costa Rica). p. 289.
- Maturin, L; Peeler, J. 2017. *Bacteriological Analytical Manual (BAM)*. Chapter 3. Aerobic plate count (en línea). 8 ed. FDA (Food and Drug Administration, EEUU). Disponible en <https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm063346.htm>
- McKnight, IC; Eiroa, MNU; Sant'Ana, AS; Massaguer, PR. 2010. *Alicyclobacillus acidoterrestris* in pasteurized exotic Brazilian fruit juices: Isolation, genotypic characterization and heat resistance (en línea). *Food Microbiology* 27(8):1016-1022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.06.010>.
- Merle, J. 2000. Growth behavior of *Alicyclobacillus Acidoterrestris* as a function of strain and culture conditions. Master of Science Graduate Program in Food Science. New Brunswick, New Jersey, The State University of New Jersey.
- Merle, J; Montville, TJ. 2014. *Alicyclobacillus acidoterrestris*: The organism, the challenge, potential interventions. *Journal of Food Processing and Preservation* 38:153-158. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2012.00758.x>.

- Mertz, C. 2009. Micro-constituants de la mure andine et de la tomate d'arbre: caractérisation et impact du traitement thermique. Université Montpellier II Sciences et Techniques du Languedoc.
- Molva, C; Baysal, A. 2015a. Antimicrobial activity of grape seed extract on *Alicyclobacillus acidoterrestris* DSM 3922 vegetative cells and spores in apple juice (en línea). LWT - Food Science and Technology 60(1):238-245. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.07.029>.
- Molva, C; Baysal, A. 2015b. Evaluation of bioactivity of pomegranate fruit extract against *Alicyclobacillus acidoterrestris* DSM 3922 vegetative cells and spores in apple juice (en línea). International Journal of Food Microbiology 200(2):52-56. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.01.019>.
- Nozal, M; Bernal, J; Gómez, L; Higes, M; Meana, A. 2003. Determination of oxalic acid and other organic acids in honey and in some anatomic structures of bees. Apidologie. 34(2):181-188. DOI: <https://doi.org/10.16309/j.cnki.issn.1007-1776.2003.03.004>.
- Orr, R V; Shewfelt, RL; Huang, CJ; Tefera, S; Beuchat, LR. 2000. Detection of Guaiacol Produced by *Alicyclobacillus acidoterrestris* in Apple Juice by Sensory and Chromatographic Analyses, and Comparison with Spore and Vegetative Cell Populations (en línea). Journal of Food Protection 63(11):1517-1522. Disponible en <http://jfoodprotection.org/doi/pdf/10.4315/0362-028X-63.11.1517?code=fopr-site>.
- Oteiza, JM; Ares, G; Sant'Ana, AS; Soto, S; Giannuzzi, L. 2011. Use of a multivariate approach to assess the incidence of *Alicyclobacillus* spp. in concentrate fruit juices marketed in Argentina: Results of a 14-year survey (en línea). International Journal of Food Microbiology 151(2):229-234. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.09.004>.
- Oteiza, JM; Soto, S; Alvarenga, VO; Sant'Ana, AS; Giannuzzi, L. 2013. Flavorings as new sources of contamination by deteriorogenic *Alicyclobacillus* of fruit juices and beverages (en línea). International Journal of Food Microbiology 172:119-124. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.007>.
- Oteiza, JM; Soto, S; Alvarenga, VO; Sant'Ana, AS; Gianuzzi, L. 2015. Fate of *Alicyclobacillus* spp. in enrichment broth and in juice concentrates (en línea). International Journal of Food Microbiology 210:73-78. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.05.021>.
- Padilla-Zakour, OI. 2008. 20 Good Manufacturing Practices. In *Heredia, N; Wesley, I; García, S (eds.)*. New Jersey, John Wiley & Sons, Ltd. p. 395-414 DOI: <https://doi.org/10.1002/9780470439074>.
- De Pascoli, IC; Dos Anjos, MM; da Silva, AA; Lorenzetti, FB; Garcia, DA; Graton, JM; Nakamura, TU; Nakamura, CV; Alves de Abreu Filho, B. 2018. *Piperaceae* extracts for controlling *Alicyclobacillus acidoterrestris* growth in commercial orange juice (en línea). Industrial Crops & Products Journal 116(2018):224-230. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.02.073>.

- Peña, WEL; de Massaguer, PR. 2006. Microbial modeling of *Alicyclobacillus acidoterrestris* CRA 7152 growth in orange juice with nisin added. (en línea). Journal of Food Protection 69(8):1904-1912. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16924916>.
- Peña, WEL; de Massaguer, PR; Zuñiga, ADG; Saraiva, SH. 2011. Modeling the growth limit of *Alicyclobacillus acidoterrestris* CRA7152 in apple juice: Effect of ph, brix, temperature and nisin concentration. Journal of Food Processing and Preservation 35(4):509-517. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2010.00496.x>.
- Perche, O; Vergnaud-Gauduchon, J; Morand, C; Dubray, C; Mazur, A; Vasson, M-P. 2014. Orange juice and its major polyphenol hesperidin consumption do not induce immunomodulation in healthy well-nourished humans (en línea). Clinical Nutrition 33(1):130-135. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.CLNU.2013.03.012>.
- Pérez-Cacho, PR; Danyluk, MD; Rouseff, R. 2011. GC-MS quantification and sensory thresholds of guaiacol in orange juice and its correlation with *Alicyclobacillus* spp. Food Chemistry 129(1):45-50. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.04.014>.
- Pinheiro, AM; Fernandes, AG; Fai, AEC; Prado, GM Do; Sousa, PHM De; Maia, GA. 2006. Avaliação química, físico-química e microbiológica de sucos de frutas integrais: abacaxi, caju e maracujá. Ciência e Tecnologia de Alimentos 26(1):98-103. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0101-20612006000100017>.
- Pirisino, JF. 1983. High Performance Liquid Chromatographic Determination of Lactose, Glucose, and Galactose in Lactose-Reduced Milk. Journal of Food Science 48(3): 742-744. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1983.tb14887.x>.
- Piskernik, S; Klančnik, A; Demšar, L; Smole Možina, S; Jeršek, B. 2016. Control of *Alicyclobacillus* spp. vegetative cells and spores in apple juice with rosemary extracts. Food Control 60: 205-214. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.07.018>.
- Pla, M-L; Oltra, S; Esteban, M-D; Andreu, S; Palop, A. 2015. Comparison of Primary Models to Predict Microbial Growth by the Plate Count and Absorbance Methods. BioMed research international 2015:1-14. DOI: <https://doi.org/10.1155/2015/365025>.
- Pohl, P; Jedryczko, D; Dzimitroxiycz, A; Szymczyha-Madeja, A; Welna, M; Jamroz, P. 2017. Determination of Elements in Fruit Juices. In Rajauria, G; Brijesh, T (eds.). London, Academic Press. p. 739-761.
- Pouch, F; Ito, K. 2001. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 4 ed. Washington D.C., American Public Health Association.
- PROCOMER (Promotora de Comercio Exterior de Costa Rica). 2015. Panamá inaugura planta de procesamiento de cítricos (en línea). Disponible en <https://www.procomer.com/es/noticias/panam-inaugura-planta-de-procesamiento-de-ctricos>.

- PROCOMER (Promotora de Comercio Exterior de Costa Rica). 2017. Estadísticas de Comercio Exterior Costa Rica (en línea). San José. Disponible en https://procomer.com/downloads/estudios/estudio_estadistico_2017/Estadisticas2017.pdf.
- Ramaiya, SD; Bujang, JS; Zakaria, MH; King, WS; Shaffiq Sahrir, MA. 2013. Sugars, ascorbic acid, total phenolic content and total antioxidant activity in passion fruit (*Passiflora*) cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 93(5): 1198-1205. DOI: <https://doi.org/10.1002/jsfa.5876>.
- Ramsaroop, RES; Saulo, AA. 2007. Comparative consumer and physicochemical analysis of del monte hawai`i gold and smooth cayenne pineapple cultivars (en línea). *Journal of Food Quality* 30(2007):135-159. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1745-4557.2007.00111.x>.
- Rangel-Huerta, OD; Aguilera, CM; Martin, M V; Soto, MJ; Rico, MC; Vallejo, F; Tomas-barberan, F; Perez-de-la-cruz, AJ; Gil, A; Mesa, MD. 2015. Normal or High Polyphenol Concentration in Orange Juice Affects Antioxidant Activity, Blood Pressure, and Body Weight in Obese or Overweight Adults. *The Journal of Nutrition and Disease* 145(8):1808-1816. DOI: <https://doi.org/10.3945/jn.115.213660.lipids>.
- Rivera, I. 2009. Análisis de riesgo para la bacteria *Alicyclobacillus acidoterrestris* en naranjas (*Citrus Sinensis*) cosechadas en Puerto Rico. Maestría en Ciencias en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Mayaguez, Puerto Rico, Universidad de Puerto Rico.
- Shemesh, M; Pasvolsky, R; Zakin, V. 2014. External pH Is a Cue for the Behavioral Switch That Determines Surface Motility and Biofilm Formation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* (en línea). *Journal of Food Protection* 77(8):1 418-1423. DOI: <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-425>.
- Silva, FM; Gibbs, P; Silva, CLM. 2000. Establishing a new pasteurization criterion based on *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores for shelf-stable high-acidic fruit products. *Fruit Processing* 10(4):138-141.
- Slinkard, K; Singleton, V. 1977. Total phenol analysis: Automation and Comparison with Manual Methods. *American Journal of Enology and Viticulture*. 28:49-55.
- Smit, Y; Cameron, M; Venter, P; Witthuhn, RC. 2011. *Alicyclobacillus* spoilage and isolation – A review (en línea). *Food Microbiology* 28(3):331-349. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.11.008>.
- Soto, M; Acosta, O; Vaillant, F; Pérez, A. 2016. Effects of Mechanical and Enzymatic Pretreatments on Extraction of Polyphenols from Blackberry Fruits. *Journal of Food Process Engineering* 39(5): 492-500. DOI: <https://doi.org/10.1111/jfpe.12240>.

- Spinelli, ACNF; Sant'Ana, AS; Pacheco-Sanchez, CP; Massaguer, PR. 2010. Influence of the hot-fill water-spray-cooling process after continuous pasteurization on the number of decimal reductions and on *Alicyclobacillus acidoterrestris* CRA 7152 growth in orange juice stored at 35 C (en línea). *International Journal of Food Microbiology* 137(2-3):295-298. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.11.003>.
- Splittstoesser, D; Churey, J. 1989. Effect of low concentrations of sorbic acid on the heat resistance and viable recovery of *Neosartorya fischeri* ascospores. *Journal of Food Protection* 52(11): 821-822.
- Splittstoesser, DF; Churey, JJ; Lee, CY. 1994. Growth Characteristics of Aciduric Sporeforming Bacilli Isolated from Fruit Juices. *Journal of Food Protection* 57(December): 1080-1083.
- Splittstoesser, DF; Lee, CY; Churry, JJ. 1998. Control of *Alicyclobacillus* in the juice industry. *Dairy, food and environmental sanitation* 18(9): 585-587.
- Steyn, CE; Cameron, M; Witthuhn, RC. 2011. Occurrence of *Alicyclobacillus* in the fruit processing environment — A review (en línea). *International Journal of Food Microbiology* 147(1):1-11. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.03.004>.
- Sullivan, D; Carpenter, D. eds. 1993. *Methods of Analysis for Nutrition Labeling*. Virginia, AOAC International.
- Tandon, K; Worobo, RW; Churey, JJ; Padilla-Zakour, OI. 2003. Storage quality of pasteurized and UV treated apple cider. *Journal of Food Processing and Preservation* 27(1):21-35. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2003.tb00498.x>.
- Tianli, Y; Jiangbo, Z; Yahong, Y. 2014. Spoilage by *Alicyclobacillus* Bacteria in Juice and Beverage Products: Chemical, Physical, and Combined Control Methods (en línea). *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 13(5): 771-797. DOI: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12093>.
- Tribst, A; Sant'Ana, A; de Massaguer, P. 2009. Review: Microbiological quality and safety of fruit juices-past, present and future perspectives. *Critical Reviews in Microbiology*. 35(4): 310-339 p. DOI: <https://doi.org/10.3109/10408410903241428>.
- Tucker, G; Featherstone, S. 2010. *Essentials of Thermal Processing*. Sussex, Blackwell Publishing Ltd. DOI: <https://doi.org/10.1002/9781444328622>.
- UE (Union Europea). 2012. Directiva 2012/12/ UD del Parlamento Europeo y del Consejo de 19 de abril de 2012 por la que se modifica la Directiva 2001/112/CE del Consejo relativa a los zumos de frutas y otros productos similares destinados a la alimentación humana (en línea). Disponible en <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32012L0012&from=EN>.
- Walker, M; Phillips, CA. 2005. The effect of intermittent shaking, headspace and temperature on the growth of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in stored apple juice. *International Journal of Food Science and Technology* 40(5): 557-562. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.00960.x>.

- Walker, M; Phillips, CA. 2008. *Alicyclobacillus acidoterrestris*: An increasing threat to the fruit juice industry? International Journal of Food Science and Technology 43(2): 250-260. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.01427.x>.
- Walls, I; Chuyate, R. 2000. Spoilage of fruit juice by *Alicyclobacillus acidoterrestris* (en línea). Food Australia 52(7): 286-288. Disponible en https://www.researchgate.net/publication/279653404_Spoilage_of_fruit_juice_by_Alicyclobacillus_acidoterrestris.
- Wechtersbach, L; Cigić, B. 2007. Reduction of dehydroascorbic acid at low pH. Journal of Biochemical and Biophysical Methods. 70: 767-772.
- Witthuhn, RC; van der Merwe, E; Venter, P; Cameron, M. 2012. Guaiacol production from ferulic acid, vanillin and vanillic acid by *Alicyclobacillus acidoterrestris* (en línea). International Journal of Food Microbiology 157(1): 113-117. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.04.022>.
- Witthuhn, RC; Smit, Y; Cameron, M; Venter, P. 2011. Isolation of *Alicyclobacillus* and the influence of different growth parameters (en línea). International Journal of Food Microbiology 146(1): 63-68. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.02.002>.
- Yokota, A; Fujii, T; Goto, K. eds. 2007. *Alicyclobacillus: Thermophilic Acidophilic Bacilli*. Tokyo, Springer.
- Zegler, J. 2016. Food & Drink Trends 2017 Mintel (en línea). Disponible en <http://www.mintel.com/mintel-food-drink>.

10. Anexos



Figura 7. Preparación de jugos de planta piloto mediante el proceso de llenado en caliente e inversión del envase.



Figura 8. Jugos de frutas tropicales reparados en planta piloto a partir de piña, cas, mora, maracuyá y naranja (de izquierda a derecha).

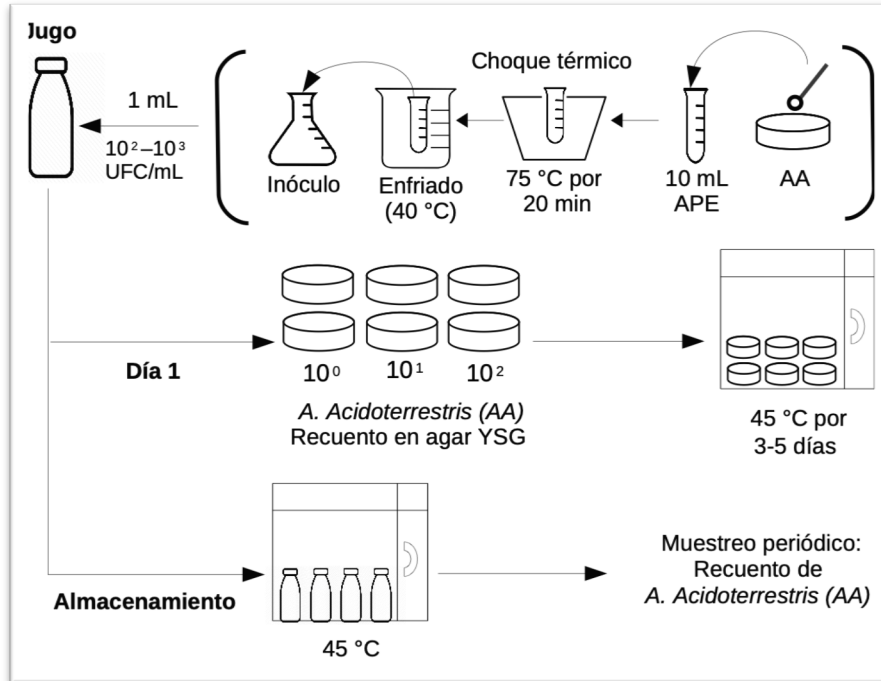


Figura 9. Metodología experimental para el estudio de crecimiento de *A. acidoterrestris* en jugos de frutas tropicales.

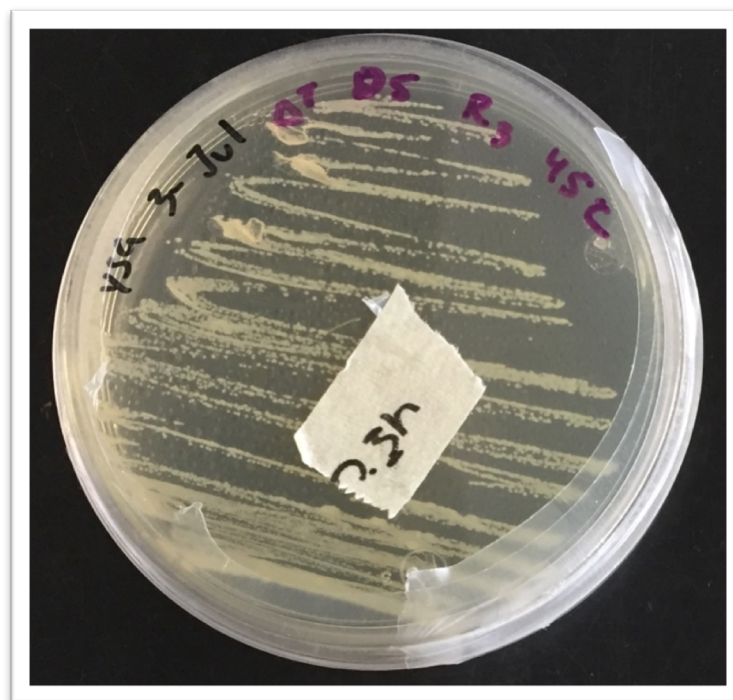


Figura 10. Cultivo de *Alicyclobacillus acidoterrestris* ATCC 49025 rayado en agar YSG.

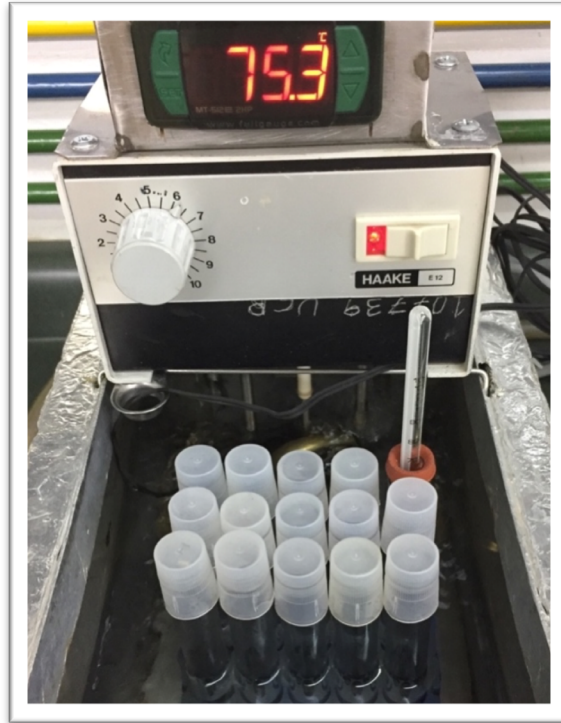


Figura 11. Aplicación del choque térmico en baño de agua para la preparación del inóculo de *A. acidoterrestis*.

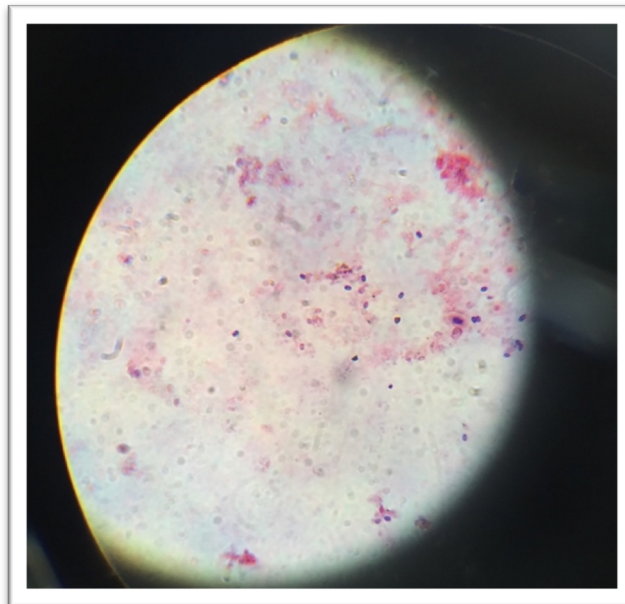


Figura 12. Vista al microscopio de tinción de Gram de esporas (moradas) de *A. acidoterrestis*.

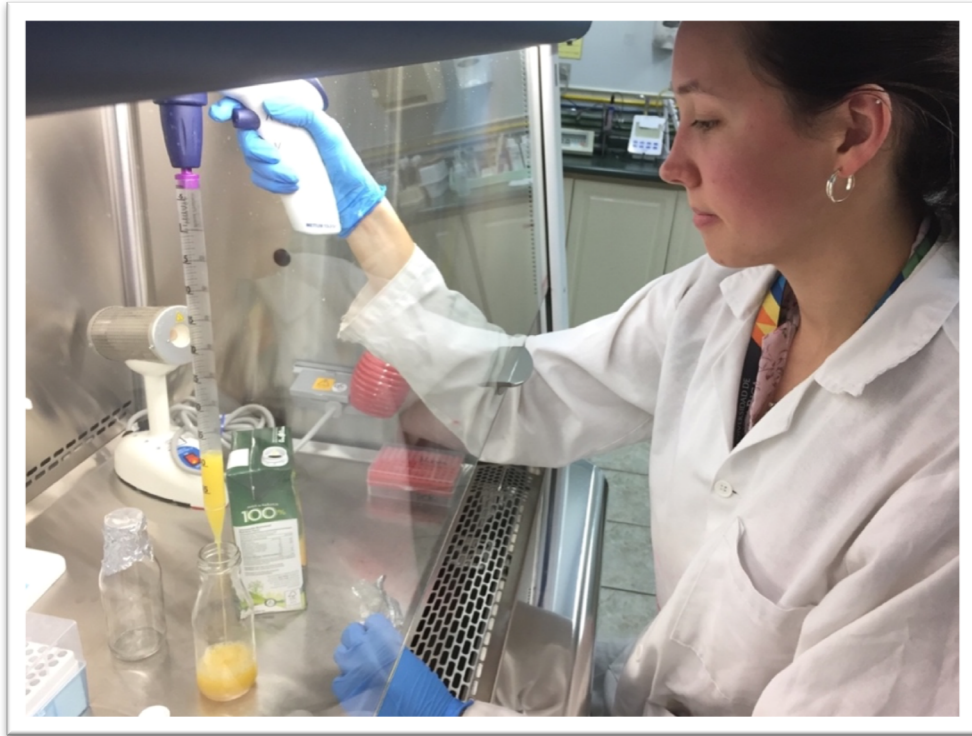


Figura 13. Llenado aséptico de botellas de jugo dentro de la cabina de bioseguridad.

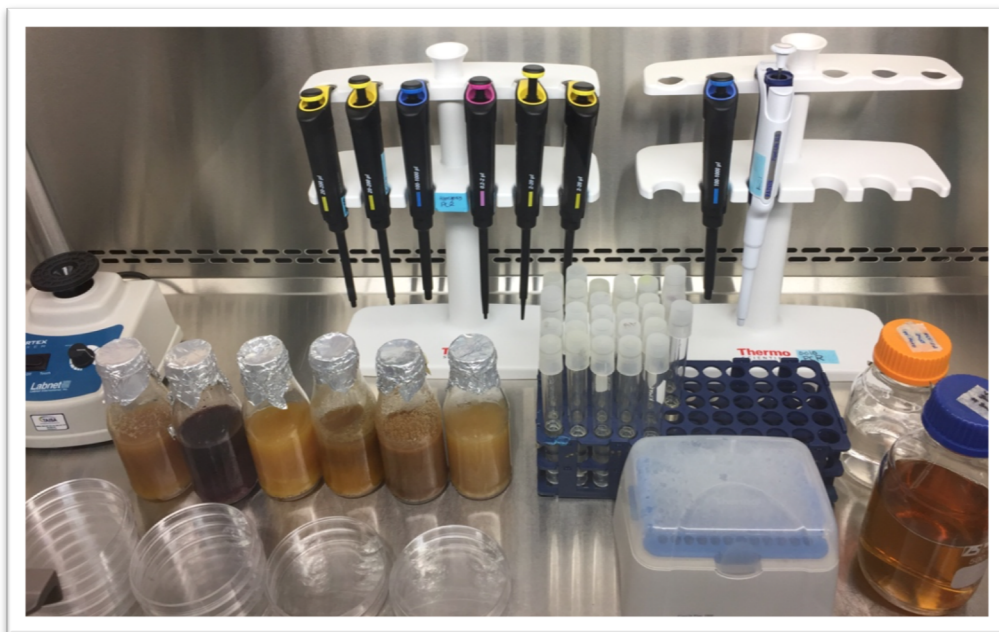


Figura 14. Montaje del recuento de *A. acidoterrestris* en agar YSG para cuantificar la población presente durante los muestreos de jugos de frutas tropicales.

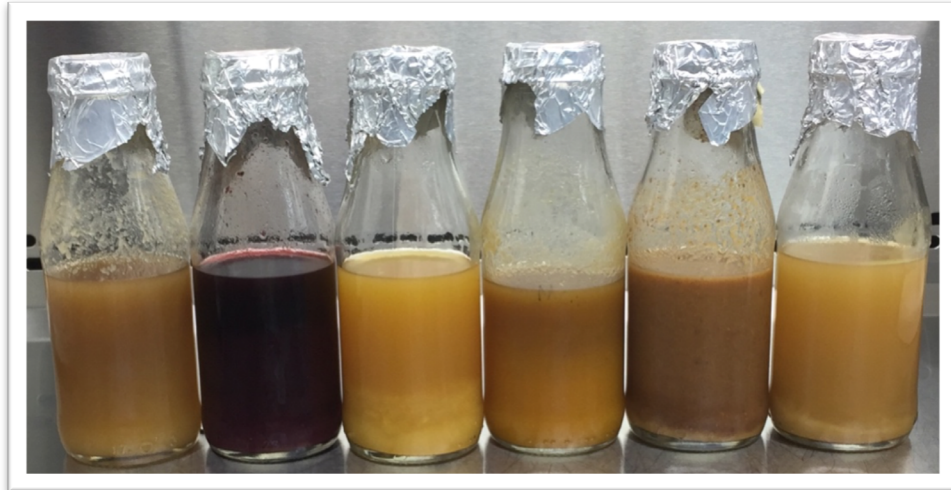


Figura 15. Jugos de piña, mora, naranja comercial, maracuyá, cas y naranja con un 40% de espacio de cabeza y tapa de papel aluminio utilizados en el estudio de crecimiento de *A. acidoterrestris*.



Figura 16. Almacenamiento de jugos inoculados con *A. acidoterrestris* en incubadora a 45 ± 2 °C.

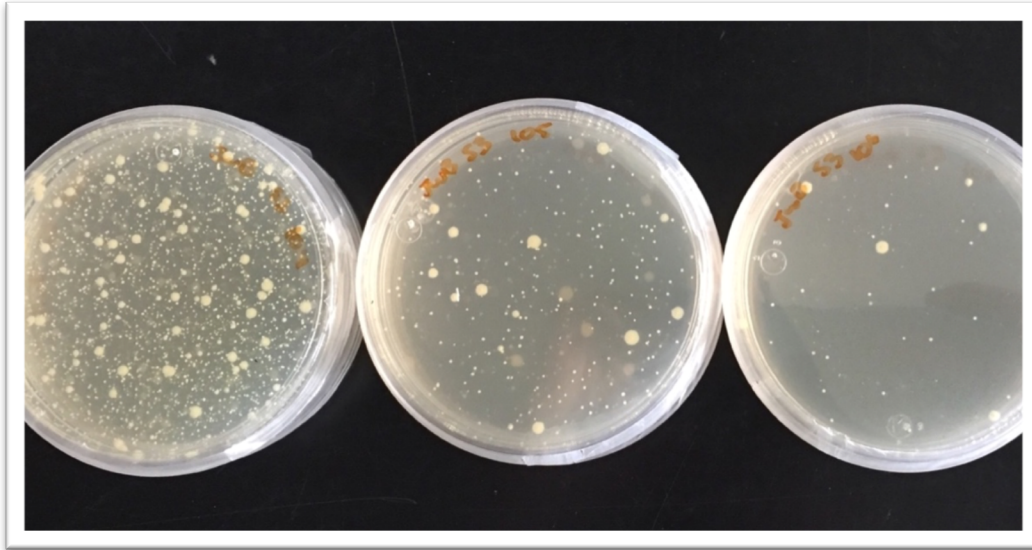


Figura 17. Placas de agar YSG para la determinación de la población de *A. acidoterrestris* mediante diluciones seriadas y el método de recuento.



Figura 18. Jugo de naranja comercial envasado en botellas de vidrio con un 40 % y un 6 % de espacio de cabeza para el estudio de crecimiento de *A. acidoterrestris*.

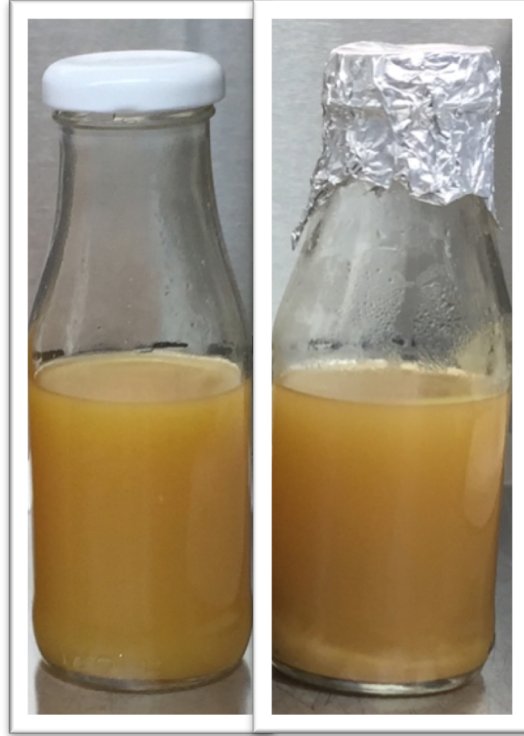


Figura 19. Jugo de naranja comercial envasado en botellas de vidrio con un 40 % de espacio de cabeza y cubiertas con tapa metálica y papel aluminio para el estudio de crecimiento de *A. acidoterrestris*.