

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 Licenciatura en Ingeniería de Alimentos

Evaluación del potencial de inhibición de diferentes antimicrobianos sobre el
crecimiento de *Alicyclobacillus acidoterrestris* en jugos de naranja del mercado
costarricense

Paola María Gamboa Moreno

Carné: B42706

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio

Junio, 2020

Tribunal Examinador

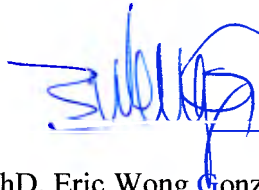
Trabajo Final de Graduación presentado a la Escuela de Tecnología de Alimentos como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos.

Aprobado por:



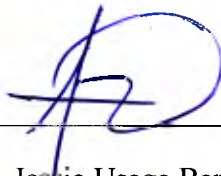
PhD. Natalia Barboza Vargas

Presidenta del Tribunal



PhD. Eric Wong Gonzalez

Profesor Designado



PhD. Jessie Usaga Barrientos

Directora del Proyecto



PhD., MADE, Óscar Acosta Montoya

Asesor del Proyecto



Lic. Gabriela Davidovich Young

Asesora del Proyecto

Dedicatoria

A Dios y a mi familia, gracias por siempre estar conmigo.

“Nada te turbe, nada te espante,
todo se pasa, Dios no se muda.
La paciencia todo lo alcanza,
quien a Dios tiene, nada le falta.
Solo Dios basta.”

Santa Teresa de Ávila

Agradecimientos

Agradezco a Dios, por sus incontables bendiciones y su infinito amor. Gracias por darme esta oportunidad. Gracias por darme la fuerza, la perseverancia y la valentía para culminar esta etapa de mi vida. Gracias por todos los ángeles que has puesto en mi camino.

Gracias a mis papás, por darme apoyo, escucha y sobretodo tiempo. Gracias por las noches, fines de semana y feriados que pasamos en el laboratorio. Gracias por aprender sobre mi trabajo y ayudarme con todo lo que podían. Gracias por su amor incondicional. Este logro es nuestro, de los tres, como siempre.

Gracias a Esteban por siempre creer en mí y mantenerme positiva hasta en los peores momentos. Te amo.

Gracias a Eri, mi amiga de toda la U, por acompañarme y motivarme siempre. Gracias a Corderito por ayudarme siempre sin esperar nada a cambio y por alegrar mis días en el laboratorio. Gracias a Ale por la disposición a ayudarme en todo momento y por aliviarme la carga cuando lo necesitaba. Gracias a Steph por escucharme siempre y por recibir mis juguitos en planta. Gracias a Mike por ayudarme a llevar naranjas a planta. Gracias a Luis por almorzar conmigo cuando no había nadie en la U. Gracias a Feli por preocuparse por cómo andaba la tesis. Y gracias a todos por ser parte de mi tiempo en la U. Me llevo muchos recuerdos lindos con ustedes. Los quiero mucho.

Gracias a Esther, por las muchas conversaciones que tuvimos en momentos de crisis. Creo que ambas obtuvimos mucha motivación de ahí cuando lo necesitábamos. Gracias a Jessica, por instruirme en la tesis y por siempre atender mis dudas, aunque fuese mucho tiempo después de haber terminado la U. Y gracias a Cata y a Gaby por toda su ayuda en el laboratorio.

Gracias a la profe Gabriela por atender mis inquietudes amablemente y lo más rápido posible y por colaborar para que siempre pudiera avanzar satisfactoriamente con mi proyecto.

Gracias a los profes Jessie y Óscar por todos los mensajes y llamadas que me contestaron, aunque fuera fin de semana. Gracias por siempre resolver y ayudarme a encontrar opciones cuando no las veía. Gracias por escucharme cuando sentía que estaba muy cansada y por comprender cuando algo no salía bien. Y, por último, muchas gracias por todas las oportunidades que me abrieron a lo largo de este año, que sin duda me han hecho crecer mucho como persona y profesional.

Gracias a Vanny por escucharme tantas veces, gracias por los consejos y la amabilidad siempre. Gracias a Laura por ayudarme a lavar, autoclavar, hacer medios y cuanta emergencia tuviera. Gracias a las dos por hacer que trabajar en el laboratorio de micro siempre fuese una grata experiencia. Gracias a Alonso, Camacho, Luis y Giova por ser siempre tan serviciales y amables. Gracias a todo personal del laboratorio de Química del CITA. Y gracias a todos los profesores que tuve durante mi carrera, sé que llevo una educación envidiable conmigo.

Índice General

Tribunal Examinador.....	i
Dedicatoria.....	ii
Agradecimientos.....	iii
Índice de Figuras	vii
Índice de Cuadros.....	viii
Resumen	ix
Abreviaciones y definiciones.....	xi
1. Justificación.....	1
2. Objetivos	4
2.1. Objetivo General.....	4
2.2. Objetivos Específicos.....	4
3. Marco Teórico.....	5
3.1. Generalidades de los jugos de naranja y su industria	5
3.1.1. Principales características del jugo de naranja.....	5
3.1.2. Industria nacional e internacional de jugo de naranja.....	6
3.2. Generalidades sobre <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> y su efecto en jugos.....	7
3.2.1. Principales características de <i>A. acidoterrestris</i>	7
3.2.2. <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> en la industria de jugos y bebidas.....	8
3.3. Principales factores que afectan el crecimiento de <i>A. acidoterrestris</i>	9
3.3.1. Temperatura de almacenamiento.....	9
3.3.2. pH.....	10
3.3.3. Contenido de sólidos solubles (grados Brix).....	11
3.3.4. Espacio de cabeza y oxígeno disponible	11
3.4. Uso de antimicrobianos en jugos para inhibir el crecimiento de <i>A. acidoterrestris</i>	12
3.4.1. Benzoato de sodio y su efecto sobre <i>A. acidoterrestris</i>	12
3.4.2. Sorbato de potasio y su efecto sobre <i>A. acidoterrestris</i>	13
3.4.3. Nisina y su efecto sobre <i>A. acidoterrestris</i>	13

4.	Materiales y Métodos	14
4.1.	Localización.....	14
4.2.	Selección de los jugos del mercado costarricense por analizar	15
4.3.	Elaboración de jugos de naranja en planta piloto	20
4.4.	Caracterización fisicoquímica de los jugos de naranja	22
4.4.1.	Determinación de pH.....	22
4.4.2.	Determinación de acidez total	22
4.4.3.	Determinación de sólidos solubles	23
4.4.4.	Determinación de polifenoles totales	23
4.4.5.	Determinación de ácido ascórbico y vitamina C	23
4.5.	Evaluación del crecimiento de <i>A. acidoterrestris</i> en cinco jugos de naranja seleccionados	23
4.5.1.	Cepa utilizada para la inoculación de los jugos.....	23
4.5.2.	Preparación del inóculo	23
4.5.3.	Tratamiento de las muestras y su inoculación	24
4.5.4.	Muestreos periódicos de <i>A. acidoterrestris</i> en los jugos de naranja	25
4.5.5.	Recuento de <i>A. acidoterrestris</i> en los jugos de naranja.....	26
4.6.	Comparación del efecto de los antimicrobianos seleccionados sobre la sobrevivencia de <i>A. acidoterrestris</i> en jugo de naranja	26
4.6.1.	Proveedor y concentración de nisina	26
4.6.2.	Proveedor y concentración de benzoato de sodio.....	26
4.6.3.	Proveedor y concentración de sorbato de potasio	26
4.6.4.	Tratamiento de las muestras e inoculación.....	27
4.6.5.	Muestreos periódicos y recuentos de <i>A. acidoterrestris</i> en los jugos de naranja con los diferentes preservantes.....	28
4.7.	Efecto de la variación en la concentración de nisina sobre el crecimiento de <i>A.</i> <i>acidoterrestris</i> en jugo de naranja.....	28
4.7.1.	Tratamiento de las muestras e inoculación.....	28
4.7.2.	Muestreos periódicos y recuento de <i>A. acidoterrestris</i> en los jugos de naranja con diferentes concentraciones de nisina	28
4.8.	Diseño Experimental y Análisis Estadístico	29
4.8.1.	Análisis Estadístico Aplicado al Objetivo 1	29
4.8.2.	Análisis Estadístico Aplicado a los Objetivos 2 y 3	30

5. Resultados y Discusión	32
5.1. Objetivo Específico 1: “Determinar las cinéticas de sobrevivencia de <i>A. acidoterrestris</i> en seis jugos de naranja del mercado costarricense”	32
5.2. Objetivo Específico 2: “Comparar el efecto de diferentes preservantes sobre la sobrevivencia de <i>A. acidoterrestris</i> en jugo de naranja”	38
2.1. Objetivo Específico 3: “Estudiar el efecto de la concentración de nisina sobre la sobrevivencia de <i>A. acidoterrestris</i> en jugo de naranja”	42
6. Conclusiones	44
7. Recomendaciones.....	45
8. Bibliografía.....	46
9. Anexos.....	57

Índice de Figuras

Figura 1. Flujo de proceso de elaboración de jugo de naranja estable a temperatura ambiente a partir de jugo de naranja obtenido de la empresa Natufruit (Worsfold, 2019).	20
Figura 2. Flujo de proceso de elaboración de jugo de naranja estable a temperatura ambiente a partir de naranjas frescas.	21
Figura 3. Cinéticas de sobrevivencia de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> en seis jugos de naranja del mercado costarricense almacenados a $45 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 21 días.	35
Figura 4. Cinéticas de sobrevivencia de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> en jugo de naranja Tropicana Grovestand con diferentes antimicrobianos durante 22 días de almacenamiento a $45 \pm 2^{\circ}\text{C}$	39
Figura 5. Cinéticas de sobrevivencia de <i>A. acidoterrestris</i> en jugo de naranja Tropicana Grovestand con diferentes concentraciones de nisina durante 22 días de almacenamiento a $45 \pm 2^{\circ}\text{C}$	43
Figura 6. Incubadora a $(45 \pm 2)^{\circ}\text{C}$ con jugos para el análisis periódico a de <i>A. acidoterrestris</i>	57
Figura 7. Cámara de flujo laminar durante el llenado de botellas de jugo de naranja (objetivo 2).	57
Figura 8. Ejemplo de placas luego de una prueba confirmatoria incubadas a $45 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 18 – 20 horas.	58
Figura 9. Ejemplo de placas luego de una prueba confirmatoria incubadas a $65 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 18 – 20 horas.	58
Figura 10. Recuentos de la dilución 10^{-1} del día 0 de una repetición del objetivo 3 (tratamientos en orden descendente: nisina (0.006%), nisina (0.003%), nisina (0.0015%), nisina (0.00075%) y control positivo).	59
Figura 11. Células vegetativas y esporas de <i>A. acidoterrestris</i> vistas a través de un microscopio luego de realizar una tinción de Gram.	60

Índice de Cuadros

Cuadro I. Nombre, marca, ingredientes, temperatura de almacenamiento y concentración de vitamina C de los jugos de naranja encontrados en el mercado costarricense entre enero y febrero del 2019.....	16
Cuadro II. Frecuencia con la que se encuentran los jugos de naranja de cinco supermercados diferentes (en dos de sus localidades) de Costa Rica entre enero y febrero del 2019.....	18
Cuadro III. Caracterización fisicoquímica de los seis jugos de naranja utilizados en el estudio de sobrevivencia de <i>A. acidoterrestris</i> (valor promedio \pm desviación estándar, n = 3).....	32
Cuadro IV. Población estabilizada y tiempo necesario para alcanzar una población de 5 logaritmos de <i>A. acidoterrestris</i> en cinco jugos de naranja del mercado costarricense almacenados a $45 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 21 días.....	36

Resumen

Gamboa Moreno, Paola María

Evaluación del potencial de inhibición de diferentes antimicrobianos sobre el crecimiento de *Alicyclobacillus acidoterrestris* en jugos de naranja del mercado costarricense

Tesis de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos. – San José, Costa Rica.

Gamboa Moreno, P., 2020.

72 h.: 11 il. – 88 refs.

Este trabajo tuvo como propósito analizar el efecto de diferentes antimicrobianos como agentes de inhibición del crecimiento de *Alicyclobacillus acidoterrestris* en jugos de naranja del mercado costarricense.

Se eligieron cuatro jugos comerciales disponibles en diferentes supermercados del país (dos estables a temperatura ambiente y dos pasteurizados refrigerados) y se elaboraron dos jugos, uno a partir de pulpa comercial de naranja y otro a partir de naranjas frescas, ambos estables a temperatura ambiente. Se llenó una botella por cada jugo y para cada punto de muestreo (espacio de cabeza = 40%) y cada una se inoculó con *A. acidoterrestris* en una población de 10^2 - 10^3 UFC/ml, luego de aplicarle un choque térmico (75°C durante 20 minutos). Todas las botellas se incubaron a (45 ± 2) °C y se realizaron recuentos del microorganismo por el método de vaciado, periódicamente, en placas de Petri con agar YSG (*yeast starch glucose*) acidificado a un pH de $3,7 \pm 0,1$. Dichas placas se incubaron a (45 ± 2) °C por 3 días. Además, los jugos se caracterizaron fisicoquímicamente en términos de sólidos solubles (°Brix), pH, vitamina C, acidez total y contenido de polifenoles totales. Posteriormente, se eligió el jugo en el cual el microorganismo creció con mayor rapidez para así comparar el efecto de diferentes antimicrobianos sobre su crecimiento. Se agregó benzoato de sodio (0,1%), sorbato de potasio (0,1%), una mezcla de benzoato de sodio y sorbato de potasio (cada uno al 0,05%) y nisina (0,006%) previo al llenado de las botellas con el jugo y el resto del procedimiento se mantuvo igual. Además, se evaluaron concentraciones de 0,003%, 0,0015% y 0,00075% de nisina. Todos los análisis se realizaron por triplicado y se analizaron estadísticamente.

Se observó el crecimiento de *A. acidoterrestris* en todos los jugos evaluados, alcanzando una población de hasta siete logaritmos en menos de una semana, excepto en la muestra elaborada a partir de pulpa comercial. Dado que las características fisicoquímicas de todos los jugos son muy similares, se cree que en el jugo de pulpa comercial existe un componente altamente inhibitorio para el microorganismo, el cual aún no se conoce. En el caso de los antimicrobianos, se observó un efecto bacteriostático sobre *A. acidoterrestris* en todos los tratamientos, luego de comparar las poblaciones iniciales y finales en cada uno de ellos y no encontrar diferencias significativas entre las mismas ($P > 0,05$). Al reducir la concentración de nisina a 0,003%, 0,0015% y 0,00075%, todas las concentraciones excepto la de 0,003% presentaron diferencias significativas entre sus poblaciones iniciales y finales (0,06%: ($P = 0,0311$), 0,0015%: ($P = 0,0016$), y 0,0075%: ($P = 0,0022$)). Sin embargo, la tendencia a la disminución de la población en todos los casos fue muy leve y no se obtuvieron diferencias significativas entre las poblaciones finales de *A. acidoterrestris* en las diferentes concentraciones evaluadas ($P = 0,9469$ y valor $\beta = 0,82$).

Con los resultados obtenidos, se demuestra que *A. acidoterrestris* puede crecer y deteriorar jugos de naranja comúnmente encontrados en el mercado costarricense. Sin embargo, el uso de los antimicrobianos evaluados representa una alternativa para evitar este inconveniente.

JUGO DE NARANJA, ANTIMICROBIANOS, INHIBICIÓN, *ALICYCLOBACILLUS ACIDOTERRESTRIS*

PhD. Jessie Usaga Barrientos

Escuela de Tecnología de Alimentos

Abreviaciones y definiciones

%: Porcentaje

A. *acidoterrestris*: *Alicyclobacillus acidoterrestris*

AAM: *Alicyclobacillus acidocaldarius* medium (Medio *Alicyclobacillus acidocaldarius*)

ANDEVA: Análisis de varianza

CITA: Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de alimentos

COMIECO: Consejo de Ministros de Integración Económica

EFJA: European Fruit Juice Association (Asociación Europea de Jugos de Frutas)

FAO: Food and Agriculture Organization (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura)

g: gramo

HCl: Ácido clorhídrico

ICMSF: International Commission on Microbiological Specifications for Foods (Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas para Alimentos)

JFJA: Japan Fruit Juice Association (Asociación Japonesa de Jugos de Frutas)

kg: kilogramo

mg: miligramo

ml: mililitro

OMS: Organización Mundial de la Salud

PROCOMER: Promotora del Comercio Exterior de Costa Rica

RTCA: Reglamento Técnico Centroamericano

SEPSA: Secretaría Ejecutiva de Planificación Sectorial Agropecuaria

UFC/ml: Unidades formadoras de colonia por mililitro

UI: Unidades Internacionales

USDA: United States Food and Drug Administration (Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos)

USEPA: United States Environmental Protection Agency (Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos)

YSG: Yeast Starch Glucose

1. Justificación

Los jugos y concentrados de frutas son parte importante de la economía costarricense, dado que en el 2017 aportaron el 2% del total de las exportaciones del país (PROCOMER, 2018). Además, en este mismo año el jugo de naranja se posicionó entre los primeros 20 productos más exportados de la industria agropecuaria (SEPSA, 2018). Debido a que este producto se exporta principalmente a países de la Unión Europea y Estados Unidos, es de suma importancia cumplir con los estándares de calidad exigidos por estas regiones (PROCOMER, 2018).

Los jugos, en general, son productos muy estables gracias su alta acidez, que permite eliminar los patógenos y microorganismos acidófilos por medio de tratamientos térmicos (Smit *et al.*, 2011; Steyn *et al.*, 2011). Hasta la década de 1980 el desarrollo de bacterias formadoras de esporas en productos de alta acidez se consideraba insignificante porque se asumía que bacterias Gram positivas formadoras de esporas no eran capaces de germinar y crecer en medios de pH menor a 4,5. Sin embargo, en 1982 ocurrió la primera contaminación a gran escala con *A. acidoterrestris* en jugo de manzana (pH = 3,15) pasteurizado en Alemania (Cerny, *et al.*, 1984). Posteriormente, surgieron casos similares en diferentes partes del mundo como Japón, Estados Unidos y Australia. Por lo tanto, desde hace dos décadas el deterioro de jugos por parte de *Alicyclobacillus* sp. se ha convertido en un tema de relevancia para la industria productora de jugos (Chang y Kang, 2004; Walker y Phillips, 2008a; Smit *et al.*, 2011; Steyn *et al.*, 2011; Tianli *et al.*, 2014).

Alicyclobacillus acidoterrestris posee la capacidad de formar esporas termorresistentes que le permiten sobrevivir a los tratamientos térmicos normalmente aplicados a los jugos (Steyn *et al.*, 2011; Tianli *et al.*, 2014). Además, sus esporas pueden germinar en medios con sólidos solubles menores a 18° Brix, puede crecer en ambientes con un pH entre 2,5 y 6,0 y temperaturas entre 25 y 60°C (Sinigaglia *et al.*, 2003; Bevilaqua *et al.*, 2008a). Todas estas son condiciones que podrían encontrarse en jugos de naranja. Además, es fácil que este microorganismo pueda llegar a contaminar este tipo de jugos ya que esta bacteria normalmente se encuentra en la tierra (Chang y Kang, 2004). De hecho, se han encontrado esporas de *Alicyclobacillus* sp. en naranjas que se han muestreado en diferentes industrias procesadoras de jugo de naranja (Parish y Goodrich, 2005). Entonces,

la insuficiencia de los tratamientos térmicos aplicados en jugos para eliminar las esporas de esta bacteria, las características fisicoquímicas del jugo de naranja idóneas para su crecimiento y la posibilidad de que las naranjas se contaminen desde su cosecha hacen que esta matriz sea de especial interés en relación con este microorganismo. Por esta razón, previo a esta investigación se ha estudiado la viabilidad del crecimiento de esta bacteria en jugos de naranja y se ha comprobado la posibilidad de su desarrollo (Pettipher *et al.*, 1997; Eiroa *et al.*, 1999; Komitopoulou, 1999; Sinigaglia *et al.*, 2003; Gocmen *et al.*, 2005; Rivera, 2009; Pérez-Cacho, 2011; Kakagianni *et al.*, 2018). Esto reafirma la importancia del estudio del comportamiento de este microorganismo en jugos de naranja comercializados en Costa Rica, enfocado específicamente en estrategias potenciales que podrían inhibir su desarrollo en esta matriz alimentaria.

El deterioro causado por *A. acidoterrestris* es particularmente difícil de detectar de forma visual, ya que el jugo suele parecer normal. Algunas veces puede observarse un leve sedimento, pero la principal evidencia del deterioro es un olor desagradable descrito como medicinal. Esto es consecuencia de la producción de guayacol, 2,6-dibromofenol y 2,6-diclorofenol por parte de la bacteria, siendo el guayacol el más importante de los tres (Gocmen *et al.*, 2005, Kumar *et al.*, 2013).

Según Pettipher y otros (1997), a partir de una concentración de 2 µg/l de guayacol, se detectaron cambios en el sabor de jugos de naranja y manzana, para lo cual se necesitó una población de 1×10^5 UFC/ml de *A. acidoterrestris*. Lo mismo se reportó en otro estudio realizado con jugo de toronja, naranja y manzana, en los cuales luego de alcanzarse una población de 1×10^5 UFC/ml se detectaron cambios sensoriales (Komitopoulou *et al.*, 1999). En ambos estudios la detección del deterioro se realizó de manera cualitativa. Sin embargo, en un estudio realizado con un panel sensorial entrenado se confirmó que el umbral de reconocimiento para el olor del guayacol en jugo de naranja es de 2 µg/l (Pérez-Cacho *et al.*, 2011). Por lo tanto, aunque no se realice la cuantificación de guayacol en los jugos, posiblemente si se alcanzan poblaciones iguales o mayores a 1×10^5 UFC/ml, estos presentarán cambios sensoriales indeseables.

En cuanto a los factores que afectan el crecimiento de *A. acidoterrestris*, se ha observado que jugos con mayor cantidad de polifenoles, como el jugo de uvas rojas,

presentan un efecto inhibitorio en el desarrollo de esta bacteria (Splittstoesser *et al.*, 1994). Además, se ha determinado que a partir de una concentración de sólidos solubles de 18 °Brix se inhibe su crecimiento y que al aumentar la concentración de sólidos solubles, la fase de adaptación de la bacteria se torna más larga (Splittstoesser *et al.*, 1994; Peña *et al.*, 2011). Por otra parte, según el pH del medio, su crecimiento es más o menos pronunciado (Kakagianni *et al.*, 2018). Es por esto que es importante conocer todas estas características de los jugos estudiados, de manera que se pueda hacer un análisis más profundo y valioso de los resultados obtenidos en relación con el comportamiento de la bacteria.

Como respuesta al deterioro de esta bacteria en jugos de naranja, la presente investigación evaluó el efecto del uso de antimicrobianos para la inhibición del crecimiento de *A. acidoterrestris*. El benzoato de sodio y sorbato de potasio son sales que al disociarse en medios ácidos actúan sobre las paredes celulares e inhiben la actividad de enzimas que participan en la fosforilación oxidativa de los microorganismos (Belitz *et al.*, 2009). Previamente se ha estudiado su efecto sobre *A. acidoterrestris* en caldo extracto de malta y en jugo de manzana y se ha observado un efecto bacteriostático en concentraciones entre 500 y 1000 ppm (Bevilacqua *et al.*, 2008b; Walker y Phillips, 2008b). Sin embargo, no se ha encontrado un estudio de estos antimicrobianos o de una mezcla de ambos en jugo de naranja propiamente.

Por su parte, existen tendencias actuales a consumir productos con menos aditivos sintéticos, por lo que también se consideró relevante estudiar el potencial efecto inhibitorio de la nisina (Bevilacqua *et al.*, 2008b). Este compuesto es una bacteriocina, que se define como un péptido producido por bacterias que tiene un efecto antimicrobiano (Cleveland *et al.*, 2001). En el Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA) y en el CODEX Alimentarius se ha regulado su uso en varios productos, sin embargo, en jugos aún no (COMIECO, 2012; FAO y OMS, 2018), pese a que algunas casas comerciales proveedoras del antimicrobiano proporcionan recomendaciones de uso del aditivo en jugos y bebidas a base de frutas. Por lo tanto, los resultados obtenidos podrían ser de utilidad para su aprobación y regulación en este tipo de productos. En este caso, sí se ha estudiado el efecto de la nisina sobre *A. acidoterrestris* en jugo de naranja y se ha encontrado que logra inhibir su crecimiento (Komitupoulou *et al.*, 1999; Yamazaki *et al.*, 2000; Peña y Rodríguez, 2006).

Sin embargo, uno de los objetivos de este proyecto es comparar su efectividad en relación con la del benzoato de sodio y el sorbato de potasio que son los preservantes más comúnmente utilizados en la industria alimentaria, de manera que los productores de jugos puedan tener una mejor referencia para elegir entre estas tres alternativas. Además, resulta importante identificar si la concentración sugerida por proveedores comerciales podría reducirse y aún observarse un efecto inhibitorio.

A la fecha no se encuentra información en la literatura sobre la incidencia de *A. acidoterrestris* en jugos y bebidas costarricenses. Sin embargo, en el marco de un trabajo final de graduación ejecutado previo a este estudio, Worsfold (2019) reportó un comportamiento interesante en jugos de naranja analizados, dado que la bacteria creció considerablemente en un jugo de naranja comercial pero no así en un jugo de naranja elaborado propiamente para el estudio y a nivel de planta piloto. Lo anterior señala la posibilidad de que el comportamiento de esta bacteria varíe según las diferentes características del jugo de naranja y justifica, por ende, continuar el estudio de su comportamiento en jugos de naranja del mercado costarricense.

2. Objetivos

2.1. Objetivo General

- Analizar el efecto de diferentes antimicrobianos como agentes de inhibición del crecimiento de *Alicyclobacillus acidoterrestris* en jugos de naranja del mercado costarricense.

2.2. Objetivos Específicos

- Determinar las cinéticas de sobrevivencia de *Alicyclobacillus acidoterrestris* en seis jugos de naranja del mercado costarricense.
- Comparar el efecto de diferentes preservantes (benzoato de sodio, sorbato de potasio, una mezcla de ambos y nisina) sobre la sobrevivencia de *Alicyclobacillus acidoterrestris* en el jugo de naranja analizado que haya presentado un mayor potencial de deterioro.

- Estudiar el efecto de la concentración de nisina sobre la sobrevivencia de *Alicyclobacillus acidoterrestris* en el jugo de naranja analizado que haya presentado un mayor potencial de deterioro.

3. Marco Teórico

3.1. Generalidades de los jugos de naranja y su industria

3.1.1. Principales características del jugo de naranja

Los jugos se definen como líquidos fermentables, pero no fermentados, obtenidos de partes comestibles de frutas apropiadamente maduras y frescas o mantenidas frescas por medios físicos o tratamientos adecuados (ICMSF, 2005). Normalmente presentan valores de pH menores a 4,0 lo que impide el desarrollo de gran parte de microorganismos excepto mohos, levaduras y bacterias ácido lácticas que son ácido tolerantes. Sin embargo, estos microorganismos y otros que podrían ser patógenos son fáciles de eliminar con los tratamientos térmicos moderados normalmente aplicados en la industria alimentaria (Smit *et al.*, 2011; Walker y Phillips, 2008a; Steyn *et al.*, 2011).

En el caso de los jugos de frutas, normalmente se aplican dos tipos de tratamientos térmicos. Los tratamientos térmicos que le permiten al jugo ser estable a temperatura ambiente y los tratamientos térmicos que aseguran la ausencia de microorganismos patógenos, pero requieren de otra barrera como la refrigeración para alargar su vida útil. Los primeros son más severos y pueden involucrar una mayor pérdida de nutrientes, pero su costo de comercialización es menor dado que no requieren ser refrigerados (Petruzzi *et al.*, 2017). Por lo tanto, las cualidades buscadas en el producto final determinan el tipo de tratamiento térmico que se aplica a cada jugo.

El jugo de naranja se puede obtener a partir de diferentes variedades de esta fruta. Sin embargo, esto no incide considerablemente en las variaciones de las características fisicoquímicas de los jugos. En un estudio realizado con jugos elaborados a partir de naranjas de siete variedades distintas, se determinó que estos poseían valores de pH entre 3,81 y 4,31, sólidos solubles entre 8,7 y 10,8° Brix y acidez titulable entre 5,12 y 7,04 g de ácido cítrico/l de jugo (Niu *et al.*, 2008). En el caso de los jugos de naranja reconstituidos a partir de jugos concentrados, la Norma General del Codex para Zumos (Jugos) y Néctares de Frutas

(CODEX STAN 245-2005) establece que los mismos deben poseer una concentración de sólidos solubles entre 11,2 y 11,8 grados Brix. A su vez, la Administración de Medicamentos y Alimentos de los Estados Unidos (USDA) (2019) define los jugos de naranja a partir de concentrado como el alimento preparado al mezclar agua con jugo de naranja concentrado congelado, jugo de naranja concentrado o ambos, al cual se le pueden agregar jugo de naranja, jugo de naranja concentrado, jugo de naranja pasteurizado, aceite esencial de naranja, pulpa de naranja y uno o más endulzantes y cuya concentración de sólidos solubles es de mínimo 11,8 ° Brix.

A diferencia de jugos como el de manzana, el jugo de naranja no necesita de una clarificación o filtración ya que es un jugo que su turbidez es deseada por el consumidor. Las variaciones en la cantidad de pulpa se ajustan con despulpadoras o por centrifugación según sea la cantidad deseada (Cautela *et al.*, 2010). Sin embargo, enzimas como la pectinmetilesterasa actúan sobre la pectina presente en jugo, formando pectatos de calcio insolubles que desestabilizan la matriz y propician una separación de las fases del jugo. La inactivación de esta enzima se logra con tratamientos térmicos, que varían según la variedad de la naranja (Sentandreu *et al.*, 2011).

Este jugo es reconocido por sus propiedades nutricionales, ya que se ha observado que el consumo de jugo de naranja 100% se relaciona con una menor cantidad de colesterol y de lipoproteínas de baja densidad, además de reducir el riesgo de obesidad y el aumento en la prevalencia del cumplimiento de la cantidad necesaria de nutrientes claves en la dieta (O'Neil *et al.*, 2012). Además, es una fuente importante de vitamina C, la cual es un importante compuesto bioactivo. Dicha vitamina se degrada fácilmente, sin embargo, se han estudiado y modelado los diferentes factores que aceleran este proceso (Zhang *et al.*, 2016). De manera que se puede adicionar al jugo vitamina C para suplir estas pérdidas y a su vez se pueden minimizar estos factores.

3.1.2. Industria nacional e internacional de jugo de naranja

Normalmente el jugo de naranja se produce como concentrado para ser exportado. Los mayores productores de jugo de naranja concentrado (65° Brix) a nivel mundial son Brasil, México y Estados Unidos, en ese orden. Brasil es el claro dominante, al producir más del doble de lo que produce Estados Unidos. En los últimos cinco años, no se ha encontrado

una tendencia hacia el aumento o disminución de la producción mundial, sino que ha estado aumentando y disminuyendo sin seguir un patrón (USDA, 2019).

Los principales consumidores de jugo de naranja a nivel mundial son los países de la Unión Europea, Estados Unidos y China. Sin embargo, se ha dado una tendencia a la disminución en su consumo en los últimos cinco años, con un leve aumento en el 2019 (USDA, 2019). Se atribuye esta disminución a que una parte de los consumidores buscan bebidas que perciben como menos calóricas y más saludables, por ejemplo: aguas saborizadas (EFJA, 2018). De igual forma, por las cualidades nutricionales mencionadas previamente y por sus características sensoriales, es el jugo de naranja el jugo de frutas más consumido en Unión Europea (EFJA, 2018).

En cuanto a la situación en Costa Rica, los jugos y concentrados de frutas aportaron el 2% del total de las exportaciones en el año 2017 (PROCOMER, 2018). Dichas exportaciones se dirigieron en su mayoría a Holanda (33%), Estados Unidos (32%) y Bélgica (9%) (PROCOMER, 2018). A su vez, estos países se encuentran en las zonas en las que son más consumidos este tipo de productos, como se señaló previamente. Además, el jugo de naranja se posicionó entre los primeros 20 productos más exportados de la industria agropecuaria de este mismo año (SEPSA, 2018).

3.2. Generalidades sobre *Alicyclobacillus acidoterrestris* y su efecto en jugos

3.2.1. Principales características de *A. acidoterrestris*

Alicyclobacillus acidoterrestris es una bacteria Gram positiva, catalasa positiva y aerobia que tiene forma de bacilo y forma parte del género *Alicyclobacillus*. Se han encontrado más de 20 especies pertenecientes a dicho género, como *A. acidiphilus*, *A. herbarius* y *A. pomorum* (Smit *et al.*, 2011; Tianli *et al.*, 2014). Sin embargo, *A. acidoterrestris* es la especie más común asociada con el deterioro de productos alimentarios. Todas las especies se han aislado del suelo, de jugos de frutas deteriorados o de ambientes con condiciones extremas (Bevilaqua *et al.*, 2008a).

Inicialmente se clasificó como una bacteria del género *Bacillus* sp. Sin embargo, por estudios taxonómicos y la presencia de los ácidos grasos ω -ciclohexano y ω -cicloheptano característicos de su membrana celular, se determinó que pertenecía a un nuevo género

denominado *Alicyclobacillus* sp. Estos ácidos grasos, a su vez, le otorgan resistencia al ácido y a las altas temperaturas (Wisotzkey *et al.*, 1992).

A. acidoterrestris posee la capacidad de formar esporas termorresistentes cuando las condiciones no son favorables para su desarrollo. Se ha reportado que el valor $D_{95^{\circ}\text{C}}$ de estas esporas se encuentra entre 0,06 y 5,3 minutos por lo que sobrevivirían a los tratamientos térmicos normalmente aplicados en jugos, que suelen ser de 90°C a 95°C durante 30 a 60 segundos (Steyn *et al.*, 2011; Tianli *et al.*, 2014). Además, crece en alimentos con valores de a_w mayores a 0,984 y se ha encontrado que sus esporas germinan a menos de 18 grados Brix (Sinigaglia *et al.*, 2003). Su pH óptimo de crecimiento es de 4,0 a 4,5 pero puede crecer de 2,5 a 6,0 y en cuanto a temperatura, puede crecer en un rango entre 25 y 60°C con una temperatura óptima de 40 a 45°C (Bevilaqua *et al.*, 2008a).

A. acidoterrestris es un microorganismo no patógeno. Se ha estudiado previamente su efecto en ratones al ingerir esporas y en conejillos de indias al ingerir jugo contaminado con una población de 5×10^6 UFC/ml de *A. acidoterrestris* sin presentar ningún síntoma extraño. Además, ninguno de los animales murió durante el experimento (Walls y Chuyate, 1998).

Esta bacteria se clasifica como de deterioro debido a que, dentro de su metabolismo, produce guayacol, 2,6-dibromofenol y 2,6-diclorofenol, compuestos que dan como resultado olores desagradables que se describen como medicinales y que provocan el rechazo por parte del consumidor (Gocmen *et al.*, 2005, Kumar *et al.*, 2013). En el caso del guayacol, a pesar de ser un compuesto que da el olor característico a productos como el café y la malta, en jugos es el principal de los tres metabolitos asociado con su deterioro. El mismo se origina a partir del ácido vanílico, derivado de la lignina, que forma parte de las membranas celulares de las frutas. Además, puede formarse a partir de la tirosina, la cual se encuentra en el jugo de naranja en concentraciones de 3-13 $\mu\text{g/l}$ (Chang y Kang, 2004).

3.2.2. *Alicyclobacillus acidoterrestris* en la industria de jugos y bebidas

A. acidoterrestris se encontró por primera vez en 1982, cuando en Alemania se dio el deterioro de un jugo de manzana y se determinó que este microorganismo fue el causante (Cerny *et al.*, 1984). Anteriormente, se pensaba que el deterioro de jugos por parte de esta bacteria era esporádico. Sin embargo, en 1998 la Asociación de Productores de Alimentos de

Estados Unidos (FPA, por sus siglas en inglés), realizó una encuesta en la que el 35% de los productores mencionaron que habían experimentado deterioro, sin confirmar pero consistente, producto de la presencia de microorganismos acidófilos formadores de esporas (Kumar *et al.*, 2013). Además, se ha dado el deterioro de jugos por parte de *Alicyclobacillus* sp. en países como el Reino Unido, Alemania, Australia, Japón y Estados Unidos (Chang y Kang, 2004).

Son muchos factores los que hacen que la presencia de esta bacteria en jugos sea posible, por ejemplo, su presencia en la tierra posibilita la contaminación de las frutas durante la cosecha (Chang y Kang, 2004). Como prueba de esto se han encontrado esporas de *Alicyclobacillus* sp. en más de un tercio de naranjas muestreadas en industrias procesadoras de jugo de naranja en Florida, Estados Unidos (Parish y Goodrich, 2005). Además, se ha aislado la misma especie de *Alicyclobacillus* de jugos de cítricos contaminados y el agua de lavado de empresas procesadoras y se ha encontrado que esta bacteria puede encontrarse en los condensados procedentes de los evaporadores de la industria de jugos que luego se reutilizan como aguas de lavado (McIntyre *et al.*, 1995; Steyn *et al.*, 2011).

En cuanto a los jugos y bebidas como tal, Eiroa y otros (1999) encontraron que 14,7% de 75 jugos de naranja de productores brasileños contenían bacterias del género *Alicyclobacillus* sp. En el año 2010, Durak y otros aislaron específicamente bacterias de la especie *A. acidoterrestris* de 61 diferentes jugos y concentrados tanto de Estados Unidos como de otros países. De los anteriores, 24 eran de manzana, 19 de cítricos y 21 de otros jugos y concentrados. También se ha aislado *A. acidoterrestris* de concentrados de frutas que fueron utilizados para elaborar una bebida carbonatada que presentaba olores desagradables (Walker y Phillips, 2005). Además, en un estudio realizado a 180 concentrados de frutas tropicales y subtropicales, incluyendo 10 tipos de concentrados de 10 diferentes países, se encontró que el 6,1% (11/180) estaban contraminados con *Alicyclobacillus* sp. De estos 11, se determinó que 9 correspondían a la especie *A. acidoterrestris* (Danyluk *et al.*, 2011).

3.3. Principales factores que afectan el crecimiento de *A. acidoterrestris*

3.3.1. Temperatura de almacenamiento

Se ha estudiado que las temperaturas de refrigeración (4°C) evitan el crecimiento de *A. acidoterrestris* y la producción de guayacol tanto en jugo de naranja como de manzana en

un período de almacenamiento de hasta 21 días (Pettipher *et al.*, 1997). Sin embargo, no es necesario que los jugos se mantengan a temperaturas tan bajas, dado que Spinelli y otros (2009) afirman que luego de inocular jugo de naranja estable a temperatura ambiente con *A. acidoterrestris* y almacenarlo a una temperatura 20°C, la población del microorganismo no alcanzó las 10⁴ UFC/ml, población considerada como crítica, según dicha investigación, para la producción de guayacol. Es decir, se puede controlar el crecimiento de esta bacteria al reducir la temperatura de almacenamiento sin llegar a temperaturas de refrigeración, pero no es posible utilizar la temperatura ambiente como temperatura de almacenamiento dado que esta podría exceder los 20°C con facilidad.

Por su parte, se ha evidenciado que en matrices como jugo de naranja es viable el crecimiento de esta bacteria en temperaturas entre los 35°C y los 50°C, en tan solo dos días. También se determinó que a 45°C es posible que este microorganismo crezca en una serie de jugos como manzana, piña, pera, tomate y durazno durante el mismo lapso de tiempo (Sinigaglia *et al.*, 2003). Esto coincide con el rango de temperatura óptima de crecimiento de la bacteria señalada por otros autores (Wisotzkey *et al.*, 1992, Bevilaqua *et al.*, 2008a).

3.3.2. pH

Existen pocos estudios sobre el efecto del pH en la geminación de las esporas y crecimiento de las células vegetativas de *A. acidoterrestris* en jugos. La mayoría se enfocan únicamente en el efecto de esta característica fisicoquímica sobre la resistencia de la bacteria a los tratamientos térmicos (Silva *et al.*, 1999; Bahçeci y Acar, 2007). Sin embargo, recientemente, Hu y otros (2020) estudiaron el efecto del pH sobre el crecimiento de *A. acidoterrestris* en caldo YSG suplementado con sacarosa. Como resultados se obtuvieron los siguientes: inhibición del crecimiento bacteriano al utilizar un pH de 6,7, crecimiento acelerado en los tratamientos con valores de pH de 3,7 y 4,7 y crecimiento más retardado para el caldo con un pH de 2,7. Esto concuerda con un estudio realizado previamente, en un medio compuesto de extracto de malta y peptona, en el cual se concluyó que el mejor crecimiento de *A. acidoterrestris* se daba para los tratamientos con valores de pH entre 3,5 y 4,5 (Sinigaglia *et al.*, 2003).

3.3.3. Contenido de sólidos solubles (grados Brix)

En pruebas realizadas en un medio compuesto de extracto de malta y peptona, cuyos sólidos solubles se ajustaron con sacarosa, se observó que el crecimiento óptimo de *A. acidoterrestris* se dio para el tratamiento con 12,5 °Brix. Este a su vez era el tratamiento con la menor concentración de sólidos solubles. Por el contrario, al aumentar la concentración de sacarosa hasta 38,7 °Brix, aunque se tuvieran las condiciones óptimas de temperatura y pH para el crecimiento de la bacteria, se redujo considerablemente su viabilidad. Este parámetro fisicoquímico también fue estudiado por Peña y otros (2011) pero en este caso en jugo de manzana. Al poseer las condiciones de pH y temperatura favorables para el desarrollo de *A. acidoterrestris*, únicamente en jugos con una concentración de sólidos solubles de alrededor de 18°Brix se estimó una probabilidad de crecimiento cercana a cero.

Como se mencionó previamente, los valores de sólidos solubles en jugos de naranja se encuentran entre 8,7 y 10,8 °Brix para jugos no reconstituidos y entre 11,2 – 11,8 °Brix para jugos a partir de concentrado (FAO y OMS, 2005; Niu *et al.*, 2008). Por lo que, inhibir el crecimiento de esta bacteria por medio de la variación de esta característica fisicoquímica en esta matriz requeriría de un cambio considerable en su composición.

3.3.4. Espacio de cabeza y oxígeno disponible

Walker y Phillips (2005) estudiaron el efecto del espacio de cabeza en jugo de manzana sobre el crecimiento de *A. acidoterrestris*. Para esto, inocularon el microorganismo en este jugo y seguidamente lo colocaron en botellas con espacios de cabeza de 0%, 25%, 50% y 75%. Luego de incubarlo a 35°C por 11 días observaron que durante este lapso de tiempo se dio crecimiento del microorganismo en todos los tratamientos excepto en el que poseía un espacio de cabeza del 0%. Por lo tanto, se evidenció que una reducción considerable del espacio de cabeza podía inhibir el crecimiento de este microorganismo, lo cual se asocia con su naturaleza aerobia.

Kinouchi y otros (2014), por otra parte, decidieron variar el contenido total de oxígeno en recipientes con caldo YSG y en recipientes con jugo de manzana. La diferencia en este caso radica en que no sólo se tomó en cuenta el oxígeno como parte del espacio de cabeza, sino también el oxígeno disuelto en el medio. Como resultado se observó una alta correlación positiva entre la cantidad de oxígeno disponible y el crecimiento de *A. acidoterrestris* en el

tratamiento con caldo YSG ($R^2 = 0,9329$) y una correlación más baja en el tratamiento con jugo de manzana ($R^2 = 0,5604$). En el caso del jugo de manzana, este resultado se atribuyó a que el crecimiento de la bacteria fue menor que en el caldo YSG para todas las concentraciones de oxígeno, lo que se asoció a su vez con la presencia de agentes reductores (principalmente ácido ascórbico) que pudieron haber reaccionado con el oxígeno, disminuyendo su disponibilidad para que este pudiese ser utilizado por la bacteria. Sin embargo, en términos generales, se concluyó que una reducción en la concentración de oxígeno disponible podría contribuir a evitar el crecimiento de *A. acidoterrestris* en jugos.

3.4. Uso de antimicrobianos en jugos para inhibir el crecimiento de *A. acidoterrestris*

3.4.1. Benzoato de sodio y su efecto sobre *A. acidoterrestris*

El benzoato de sodio es una sal procedente del ácido benzoico, que al disociarse en un medio ácido, actúa sobre la pared celular de los microorganismos facilitando la entrada de protones al interior de la célula. Esto provoca que la célula deba dirigir su energía a reestablecer su pH óptimo, lo que a su vez afecta el transporte de aminoácidos. Adicionalmente, inhibe las enzimas que participan en el ciclo del ácido cítrico y en la fosforilación oxidativa. Por esta razón, resulta ser un preservante muy efectivo en alimentos de pH bajo, como los jugos. Además, es de bajo costo, fácil de aplicar y no afecta el color del alimento, lo que hace que sea muy utilizado en la industria (Schmidl y Labuza, 2000; James *et al.*, 2005; Belitz *et al.*, 2009).

Se ha observado que al agregar 500 mg/l de este compuesto a caldo extracto de malta acidificado con 10^3 esporas/ml de *A. acidoterrestris*, se inhibe por completo la germinación de dichas esporas durante trece días. Por otra parte, si se reduce su concentración a 100 mg/l esta inhibición disminuye a un rango entre 51-62% (Bevilacqua *et al.*, 2008b). También se estudió el efecto de este preservante en jugo de manzana almacenado a 30°C sobre una población de 10^4 UFC/ml de *A. acidoterrestris* y se determinó que concentraciones de 500 mg/l, 1000 mg/l y 1500 mg/l inhiben su crecimiento por completo. Estas mismas concentraciones lograron reducir significativamente la cantidad de esporas en el jugo el día 29 (3,5 logaritmos), al compararse con el día 1 (5,2 logaritmos) (Walker y Phillips, 2008b). Por último, Cai y otros (2015) también estudiaron el efecto de este antimicrobiano sobre *A.*

acidoterrestris (10^6 UFC/ml) en caldo AAM (medio *A. acidocaldarius*) y determinaron que su crecimiento se inhibe a partir de una concentración de 585 mg/l.

3.4.2. Sorbato de potasio y su efecto sobre *A. acidoterrestris*

El sorbato de potasio es una sal que se origina a partir del ácido sórbico, que al igual que el benzoato de sodio, al disociarse puede inhibir el crecimiento de ciertos microorganismos. Su efecto es muy similar al del benzoato de sodio, ya que también actúa sobre las membranas celulares de dichos microorganismos, afectando el transporte de nutrientes, e inhibe la actividad enzimática (Paulus, 2005). Es menos dependiente del pH, en relación con el benzoato de sodio y posee una toxicidad muy baja. En concentraciones de 0,3% o menos, no posee efecto sobre el color o sabor de los alimentos en los que se añade (Belitz *et al.*, 2009).

El sorbato de potasio ha sido menos estudiado que el benzoato de sodio. Sin embargo, en el mismo estudio realizado por Cai y otros (2015) se observó que la concentración mínima necesaria para inhibir el crecimiento de *A. acidoterrestris* en caldo AAM es de 673 mg/l. Asimismo, se ha evaluado su efecto en jugo de manzana inoculado con 10^4 UFC/ml de *A. acidoterrestris* e incubado a 30°C. En este caso se observó que concentraciones de 500 mg/l, 1000 mg/l y 1500 mg/l inhiben su crecimiento por completo, dado que la población de este microorganismo se mantuvo constante a lo largo de 29 días después de su inoculación (Walker y Phillips, 2008b).

3.4.3. Nisina y su efecto sobre *A. acidoterrestris*

La nisina es una bacteriocina (péptido antimicrobiano) producida por algunas cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Tyfa *et al.*, 2015). Esta actúa sobre sus células blanco formando poros en sus membranas celulares y así alterando el gradiente de pH entre el medio que las rodea y su líquido intracelular (Cleveland *et al.*, 2001). Se ha observado que posee un efecto inhibitorio considerable sobre patógenos y bacterias Gram positivas formadoras de esporas, pero poco efecto sobre bacterias Gram negativas, mohos y levaduras (Yamazaki *et al.*, 2000). La nisina es estable en medios con valores de pH bajos y resiste altas temperaturas, por lo que es una alternativa para bebidas ácidas como los jugos y puede ser añadida antes de realizar el tratamiento térmico (Tyfa *et al.*, 2015).

En relación con su efecto sobre *A. acidoterrestris*, en 1999 Komitopoulou y otros evidenciaron que al utilizar 5 UI/ml (Unidades Internacionales) de nisina en jugo de naranja y de toronja almacenados a 25°C, luego de 5 días, su población se redujo de 4×10^2 UFC/ml hasta por debajo del límite de detección de 5×10^1 UFC/ml. Sin embargo, para lograr este mismo efecto a 44°C, en jugo de naranja se tuvo que aumentar la concentración de nisina a 100 UI/ml. También se ha evaluado su efecto inhibitorio en placas de agar mYPGA (agar levadura-peptona-glucosa modificado) sobre diferentes cepas de *A. acidoterrestris*. La cepa más resistente (AB-5) necesitó de 50 UI/ml de nisina para ser inhibida a un pH de 3,4 y de 100 UI/ml para ser inhibida a un pH de 4,2. Con esta misma cepa se observó que luego de 12 días, la población de *A. acidoterrestris* se mantuvo constante en jugo de naranja al utilizar concentraciones de nisina de 50 UI/ml y 100 UI/ml y en una bebida de frutas al utilizar 100 UI/ml de nisina. Sin embargo, en ninguna de estas concentraciones se logró inhibir el crecimiento de esta bacteria en el jugo de manzana (Yamazaki *et al.*, 2000).

El uso de nisina se ha estudiado en combinación con otros de los factores que afectan el crecimiento de *A. acidoterrestris*, como concentración de sólidos solubles, pH y temperatura de almacenamiento para modelar su comportamiento en jugo de naranja. Como resultado se obtuvo que una concentración de 70 UI/ml de nisina a un pH de 4,4 y una temperatura de almacenamiento de 37°C inhibe su crecimiento hasta por 47 días. Además, se comprobó que al reducir la temperatura de almacenamiento y el pH del jugo se necesita una menor concentración de este compuesto para mantener su efecto inhibitorio o, por el contrario, que al aumentar la concentración de nisina, se pueden alcanzar mayores valores de temperatura y pH en el jugo, sin que el microorganismo pueda crecer en el mismo (Peña y Rodríguez, 2006).

4. Materiales y Métodos

4.1. Localización

La sección experimental del proyecto se llevó a cabo en las instalaciones del Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA) y en la Escuela de Tecnología de Alimentos. La elaboración de jugos de naranja, se hizo en la planta piloto del CITA. Las determinaciones de componentes y características fisicoquímicas de los jugos se llevaron a cabo en los laboratorios de química del CITA y de la Escuela de Tecnología de Alimentos y

los análisis microbiológicos en el laboratorio de microbiología del CITA. Todas estas instalaciones se ubican en la Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, en San Pedro de Montes de Oca, San José, Costa Rica.

4.2. Selección de los jugos del mercado costarricense por analizar

Se realizaron visitas a cinco supermercados de Costa Rica, en dos localidades diferentes cada uno, desde el 7 de enero del 2019 hasta el 12 de febrero del 2019. Se eligieron los siguientes supermercados: Automercado, Walmart, Perimercados, Más x Menos y Vindi. En los cuadros I y II se pueden observar tanto las características como la disponibilidad de cada jugo en cada supermercado.

Se decidió trabajar con los jugos Dos Pinos 100% de concentrado, Dos Pinos 100% natural exprimido, Del Valle de concentrado y Tropicana Grovestand, además de dos jugos control elaborados en planta piloto (descripción detallada se provee en la sección 4.3. de este documento). Para elegir los jugos comerciales para el estudio, primero se decidió trabajar con jugos de naranja que tuvieran la menor cantidad de ingredientes, además de jugo de naranja y agua. Además, se quiso trabajar con jugos que provinieran de diferentes compañías procesadoras y se decidió tomar en cuenta al menos un jugo que no fuese estable a temperatura ambiente. Luego, fue un factor determinante la frecuencia con la que se encontraban los productos en los diferentes supermercados visitados, como un indicador indirecto de disponibilidad, tasa de consumo y rotación de los productos. Por esta razón, jugos como el de la marca Hortifruti y la marca Vegetales Fresquita se descartaron ya que sólo se encontraban en un único supermercado. En el caso del jugo Tropicana Grovestand este se eligió por ser el jugo importado que se encontró en la mayor cantidad de supermercados visitados.

Cuadro I. Nombre, marca, ingredientes, temperatura de almacenamiento y concentración de vitamina C de los jugos de naranja encontrados en el mercado costarricense entre enero y febrero del 2019.

Nombre	Marca	Ingredientes	Temperatura de Almacenamiento	Concentración de vitamina C (mg/l)
Jugo de naranja 100% de concentrado	Dos Pinos	Agua, jugo concentrado de naranja.	Ambiente	128
Jugo de naranja enriquecido con vitamina C	Dos Pinos	Agua, concentrado natural de naranja, azúcar, vitamina C.	Ambiente	420
Jugo de naranja fuente de vitamina C	Dos Pinos	Agua, jugo concentrado de naranja, azúcar, vitamina C, betacaroteno como colorante natural, ácido sórbico y benzoato de sodio (0,01%) como preservantes.	Refrigeración	240
Jugo de naranja 100% natural exprimido	Dos Pinos	Jugo de naranja.	Refrigeración	No reportada en la etiqueta
Jugo de naranja azucarado	Dos Pinos	Agua, concentrado de naranja, azúcar (6,5%), ácido cítrico como regulador de acidez, sorbato de potasio y benzoato de sodio como preservantes, ácido ascórbico, betacaroteno como colorante natural.	Ambiente	48
100 % jugo de naranja a partir de concentrado	Del Valle	Jugo de naranja y saborizantes.	Ambiente	132
Jugo de naranja de concentrado	Tropical	Agua, jugo concentrado de naranja, azúcar, sabor de naranja, benzoato de sodio y sorbato de potasio (como conservantes).	Ambiente	240
Jugo de naranja	Vegetales Fresquita	Jugo de naranja.	Refrigeración	No reportada en la etiqueta

Continuación del **Cuadro I.**

Nombre	Marca	Ingredientes	Temperatura de Almacenamiento	Concentración de vitamina C (mg/l)*
Jugo de naranja	Hortifruti	Jugo de naranja.	Refrigeración	No reportada en la etiqueta
Bebida con jugo de naranja	Coronado	Agua, azúcar, jugo concentrado de naranja, d' limoneno como enturbianante, sabor a naranja, ácido cítrico como acidulante, goma celulosa, sorbato de potasio (0,016%) como preservante, vitamina C y annato como colorante natural.	Refrigeración	100
100% Jugo de naranja sin pulpa (Original)	Tropicana	100% jugo de naranja pasteurizado.	Refrigeración	300
100% Jugo de naranja con calcio y vitamina D	Tropicana	100% jugo de naranja pasteurizado, hidróxido de calcio, ácido cítrico, ácido málico y vitamina D3.	Refrigeración	300
100% Jugo de naranja con alguna pulpa (Homestyle)	Tropicana	100% jugo de naranja pasteurizado.	Refrigeración	300
100% Jugo de naranja con mucha pulpa (Grovestand)	Tropicana	100% jugo de naranja pasteurizado.	Refrigeración	300
100% Jugo de naranja premium con alguna pulpa	Florida's Natural	Jugo de naranja pasteurizado.	Refrigeración	300
100% Jugo de naranja premium sin pulpa	Florida's Natural	Jugo de naranja pasteurizado.	Refrigeración	300
100% Jugo de naranja premium con calcio y vitamina D	Florida's Natural	Jugo de naranja pasteurizado, citrato de tricalcio y vitamina D3.	Refrigeración	300
Jugo de naranja Light	Florida's Natural	Agua, jugo de naranja, citrato de potasio, ácido cítrico, pectina, ácido ascórbico, extracto de hojas de Stevia y betacaroteno.	Refrigeración	250

*Valor reportado en la etiqueta.

Cuadro II. Frecuencia con la que se encuentran los jugos de naranja de cinco supermercados diferentes (en dos de sus localidades) de Costa Rica entre enero y febrero del 2019.

Nombre y marca del jugo de naranja	Lugar									
	Automercado Los Yoses	Automercado Calle Vieja	Más x Menos Desamparados	Más x Menos Concepción de Tres Ríos	Walmart Desamparados	Walmart Pinares	Perimercados San Francisco	Perimercados Centro Comercial del Sur	Vindi San Francisco	Vindi Concepción de Tres Ríos
Jugo de naranja 100% de concentrado (Dos Pinos)	X	X	X	X	X	X	X	X		X
Jugo de naranja enriquecido con vitamina C (Dos Pinos)	X	X	X	X	X	X	X	X		X
Jugo de naranja fuente de vitamina C (Dos Pinos)	X	X	X	X	X	X		X		X
Jugo de naranja 100% natural exprimido (Dos Pinos)	X	X	X		X	X		X		X
Jugo de naranja azucarado (Dos Pinos)		X	X	X	X	X			X	
Jugo de naranja 100% de concentrado (Del Valle)	X	X	X	X	X	X	X	X		X
Jugo de naranja de Concentrado (Tropical)		X	X	X	X		X		X	X
Jugo de naranja (Vegetales Fresquita)										X
Jugo de naranja (Hortifruti)				X		X				

Continuación del Cuadro II.

Nombre y marca del jugo de naranja	Lugar									
	Automercado Los Yoses	Automercado Calle Vieja	Más x Menos Desamparados	Más x Menos Concepción de Tres Ríos	Walmart Desamparados	Walmart Pinares	Perimercados San Francisco	Perimercados Centro Comercial del Sur	Vindi San Francisco	Vindi Concepción de Tres Ríos
Jugo de naranja (Coronado)			X	X	X	X				
100% Jugo de naranja sin pulpa tipo Original (Tropicana)		X	X		X	X				X
100% Jugo de naranja con calcio y vitamina D (Tropicana)	X	X	X		X	X				X
100% Jugo de naranja con alguna pulpa tipo Homestyle (Tropicana)		X	X		X	X				X
100% Jugo de naranja con mucha pulpa tipo Grovestand (Tropicana)	X	X	X		X	X				X
100% Jugo de naranja premium con alguna pulpa (Florida's Natural)	X		X							
100% Jugo de naranja premium sin pulpa (Florida's Natural)	X		X		X					
100% Jugo de naranja premium con calcio y vitamina D (Florida's Natural)	X		X	X		X				
Jugo de naranja light (Florida's Natural)						X				

4.3. Elaboración de jugos de naranja en planta piloto

Además de los jugos de naranja comerciales, se elaboró un lote de jugo de naranja como control, con base en los resultados descritos por Worsfold (2019) (Figura 1). En dicha investigación se preparó un jugo que no permitió el crecimiento de la bacteria y se desea replicar en este proyecto dado que permitiría comparar los resultados entre los jugos comerciales y uno de elaboración propia en el que se sabe que la bacteria no presenta crecimiento. Este jugo se obtuvo de la empresa Natufruit, la cual produce jugos de naranja a partir de concentrado, y se le aplicó un tratamiento térmico a nivel de planta piloto para que fuera estable a temperatura ambiente.

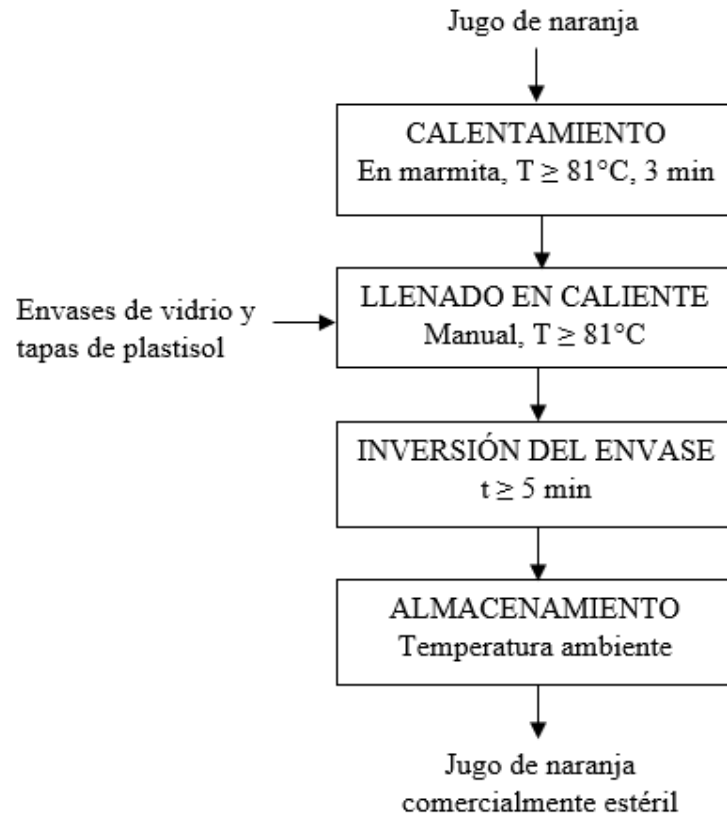


Figura 1. Flujo de proceso de elaboración de jugo de naranja estable a temperatura ambiente a partir de jugo de naranja obtenido de la empresa Natufruit (Worsfold, 2019).

De igual forma se elaboró un jugo a partir de naranjas frescas como materia prima y no de jugo de naranja concentrado (Figura 2). Esto para tener como tratamiento un jugo que

no se hubiese sometido a una etapa de concentración, la cual podría tener un efecto en el jugo que a su vez afectara el desarrollo de *A. acidoterrestris*.



Figura 2. Flujo de proceso de elaboración de jugo de naranja estable a temperatura ambiente a partir de naranjas frescas.

Para la operación de desinfección se utilizaron los parámetros de tiempo y concentración recomendados por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA, por sus siglas en inglés) (2015) para el ácido peracético. Además, se sabe que el pH del jugo de naranja suele encontrarse entre 3.2 y 3.9 (Eiroa *et al.*, 1999; Komitopoulou *et al.*, 1999). Por

lo tanto, el tratamiento térmico establecido (81 °C durante 3 minutos) en conjunto con un llenado en caliente y la inversión del envase fueron diseñados considerando el valor máximo de pH reportado (Padilla-Zakour, 2008), asegurando con esta medida la esterilidad comercial del jugo. Además, se mantuvieron las Buenas Prácticas de Manufactura y se lavaron y desinfectaron los envases y sus respectivas tapas antes del llenado correspondiente. Este tratamiento térmico no asegura que *A. acidoterrestris* se elimine del jugo, por lo tanto, como se explica en la sección 4.5.3. al iniciar el experimento se hizo un recuento inicial del microorganismo para garantizar su ausencia.

Es importante señalar que se mantuvo un espacio de cabeza de alrededor del 10% del volumen total, tal y como lo realizó Worsfold (2019) y este se mantuvo en todos los envases lo más uniforme posible. Esto porque se ha comprobado que el espacio de cabeza posee un efecto sobre el crecimiento de *Alicyclobacillus* sp. ya que el microorganismo es aerobio y en un mayor espacio de cabeza hay mayor cantidad de oxígeno disponible (Walker y Phillips, 2005).

4.4. Caracterización fisicoquímica de los jugos de naranja

Varios autores han señalado el efecto de diferentes factores fisicoquímicos sobre el desarrollo de *A. acidoterrestris* en jugos. Por lo tanto, se eligieron los siguientes cinco parámetros para contrastar con los resultados obtenidos en los tres objetivos del presente proyecto. De cada jugo se tomaron tres muestras de lotes diferentes para cada análisis, representando cada lote una repetición.

4.4.1. Determinación de pH

Se determinó el pH de cada muestra siguiendo el procedimiento del Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (2016a) “P-SA-MQ-012” basado en el método número 981.12 de la AOAC (2005).

4.4.2. Determinación de acidez total

Se determinó la acidez total de cada muestra siguiendo el procedimiento del Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (2018a) “P-SA-MQ-011” basado en el método número 942.15 de la AOAC (2005).

4.4.3. Determinación de sólidos solubles

Se determinó la concentración de sólidos solubles, expresada como °Brix, de cada muestra siguiendo el procedimiento del Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (2015) “P-SA-MQ -046” basado en el método número 932.12 de la AOAC (2012).

4.4.4. Determinación de polifenoles totales

Se determinó la concentración de polifenoles totales de cada muestra siguiendo el procedimiento del Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (2016b) “P-SA-MQ-048” basado en los métodos de Slinkard y Singleton (1977) y Georgé y Brat (2005).

4.4.5. Determinación de ácido ascórbico y vitamina C

Se determinó la concentración de vitamina C (ácido ascórbico y ácido dehidroascórbico) siguiendo el procedimiento Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (2018b) “P-SA-MQ-024” basado en los métodos de Hernández y cols. (2006), Lykkesfeldt (2000), Mertz (2009) y Wechtersbach (2007). Este método permite obtener ambos resultados.

De los procedimientos anteriores, los descritos en las secciones 4.4.4. y 4.4.5. fueron llevados a cabo por el Laboratorio de Química del CITA.

4.5. Evaluación del crecimiento de *A. acidoterrestris* en cinco jugos de naranja seleccionados

Se tomó como base el procedimiento que utilizó Worsfold (2019), el cual se detallará a continuación:

4.5.1. Cepa utilizada para la inoculación de los jugos

Se utilizó una cepa comercial aislada de una muestra de tierra de Alemania: *Alicyclobacillus acidoterrestris* ATCC 49025. La bacteria se mantuvo a una temperatura de -20 ± 3 °C en viales con glicerol y caldo papa dextrosa o caldo infusión cerebro corazón, para asegurar su viabilidad durante la fase experimental del proyecto.

4.5.2. Preparación del inóculo

De la cepa señalada en punto 4.5.1. se preparó un cultivo rayado en placas con agar YSG (*Yeast Starch Glucose*) acidificado a un pH de 3,7 utilizando ácido clorhídrico 1 N, el cual se incubó durante mínimo 5 días a 45 °C (IFFJP, 2007; Oteiza *et al.*, 2015). De esta placa, se tomó una colonia aislada con un asa estéril y se colocó en un tubo con 10 ml de

agua peptonada estéril al 0,1%. Seguidamente dicho tubo se sometió a un choque térmico de 75 °C por 20 minutos en un baño de agua para inactivar las células vegetativas y activar las esporas (Gocmen *et al.*, 2005). Esto contribuyó además a evitar subestimar el número de microorganismos inoculados en el jugo (IFFJP, 2007). Una vez que transcurrieron los 20 minutos, el inóculo se llevó a una temperatura de 40-45 °C antes de ser utilizado. Para cada una de las repeticiones del experimento, se preparó un inóculo independiente.

4.5.3. Tratamiento de las muestras y su inoculación

De los dos jugos control de elaboración propia (sección 4.3.) y los cuatro jugos comerciales, se tomaron 133 ml de cada uno y se colocaron independientemente en una botella de 225 ml previamente esterilizada y cubierta con papel aluminio. Esto para simular un espacio de cabeza de alrededor de un 40%, el cual se sabe que promueve el crecimiento de la bacteria (Gocmen *et al.*, 2005). Es importante señalar que se preparó una botella para cada tiempo de muestreo para reducir la probabilidad de contaminación y los efectos que podría tener en los resultados el cambio de volumen al tomar las muestras. Adicionalmente, se tuvo una botella con el jugo sin inocular, como control negativo, para asegurar la ausencia del microorganismo en la muestra durante el tiempo de muestreo en las condiciones de incubación seleccionadas.

Para la inoculación, se tomó 1 ml del inóculo preparado según la sección 4.5.2. manteniendo la técnica aséptica. De esta forma se obtuvo una carga inicial de 10^2 - 10^3 UFC/ml en el jugo. Esta carga fue la utilizada por Worsfold (2019), quien a su vez se basó en otros estudios que señalaban que este valor es el de los recuentos de la bacteria que se encuentran comúnmente en frutas (Spinelli *et al.*, 2010; Oteiza *et al.*, 2015). Es importante señalar que antes de inocular los jugos, se hizo un recuento del microorganismo de interés con la metodología que se explicará seguidamente, para asegurar su ausencia antes de iniciar el experimento. En ninguno de los jugos utilizados se encontró *A. acidoterrestis*.

Luego, se hicieron recuentos en el jugo inoculado para determinar la carga inicial exacta de la bacteria de interés en el jugo. Para esto, se tomó 1 ml del jugo y se realizaron diluciones seriadas en agua peptonada estéril al 0,1%. Después se utilizó la técnica de vaciado (JFJA, 2003) para colocar las diluciones en placas de Petri (cada dilución por duplicado) utilizando agar YSG acidificado a un pH de $3,7 \pm 0,1$ y se incubaron a 45° C durante 3 días

(IFFJP, 2007). En el caso del jugo sin inocular, se analizó la muestra sin realizar dilución alguna, ya que se esperaba la ausencia del microorganismo.

El conteo de las colonias se realizó de forma visual utilizando un contador de Quebec. Conociendo el número de colonias (promedio de colonias de las dos placas de la dilución contable) y la dilución correspondiente, se aplicó el inverso del factor de dilución y el valor obtenido se redondeó a dos cifras significativas. Para este conteo se tomaron en cuenta solamente las diluciones con 25 - 250 unidades formadoras de colonia en sus respectivas placas. En caso de ser más de una, a cada una se le aplicó su factor de dilución y se promediaron los valores que ya poseen dos cifras significativas (Camacho *et al.*, 2009).

Finalmente, para confirmar el crecimiento de *A. acidoterrestris* se tomó una muestra del recuento final de cada lote de jugo y se siguió el método de crecimiento diferenciado por temperatura reportado en la metodología japonesa *The Unified detection method of thermoacidophilic bacteria in raw materials of fruit juice* (Japan Fruit Juice Association, 2003). Este consiste en inocular una asada de colonias sobre dos placas de agar YSG, las cuales se deben incubar una a 45 ± 1 °C y la otra a 65 ± 1 °C por 18-20 horas. Para que se confirme la presencia de *A. acidoterrestris*, el crecimiento solo debe haberse dado en la placa incubada a 45 °C.

El resto de los jugos inoculados se homogenizaron agitando manualmente y se almacenaron por un máximo 21 días a 45 °C, temperatura que favorece el desarrollo de *A. acidoterrestris* (Yokota *et al.*, 2007; IFFJP, 2007). El jugo control también se almacenó para realizar un recuento de este microorganismo el último día del estudio. Lo anterior corresponde a una repetición del experimento, el cual se repitió dos veces más para un total de tres repeticiones.

4.5.4. Muestreos periódicos de *A. acidoterrestris* en los jugos de naranja

Se tomaron muestras de cada uno de los jugos en los días: 1, 2, 3, 5, 6, 7, 9, 17 y 21 de almacenamiento. El último día del estudio, se tomó una muestra de su respectivo control negativo para comprobar la ausencia de *A. acidoterrestris*. Todas las muestras se tomaron de manera aséptica.

4.5.5. Recuento de *A. acidoterrestris* en los jugos de naranja

Cada vez que se realizó el muestreo (según la sección 4.5.4.), se homogenizó la muestra de forma manual y luego se tomó 1 ml de la misma para seguir el procedimiento descrito en la sección 4.5.3. Una vez que se tuvieron los resultados, para reportar la población microbiana se siguieron los pasos también mencionados en dicha sección. Sin embargo, se añadió un paso adicional, ya que al número de colonias reportado con dos cifras significativas se le aplicó el logaritmo para reportar dicha población como \log_{10} UFC/ml como resultado final (Camacho *et al.*, 2009).

4.6. Comparación del efecto de los antimicrobianos seleccionados sobre la sobrevivencia de *A. acidoterrestris* en jugo de naranja

4.6.1. Proveedor y concentración de nisina

Se utilizó el producto comercial “NisinZ™” producido por Handary (Bruselas, Bélgica) y se siguieron las recomendaciones e instrucciones de uso que reporta su ficha técnica obtenida por medio de la empresa Asesoría en Alimentos Alfa, S.A. (ASEAL). Esta señala que la cantidad necesaria en jugos de frutas para el control de *A. acidoterrestris* es de 30-60 mg/kg. En este caso se utilizó la concentración de (58 ± 1) mg/kg dado que se quería probar la máxima concentración sugerida por el fabricante.

4.6.2. Proveedor y concentración de benzoato de sodio

Se utilizó benzoato de sodio grado alimenticio producido por Kerry (Pavas, Costa Rica) y se siguieron las recomendaciones e instrucciones de uso señaladas en la ficha técnica obtenida gracias a la empresa Maltho Foods, S.A. Este se añadió al jugo de naranja de manera que su concentración en el mismo fuese de (965 ± 17) mg/kg, dado que, la cantidad máxima permitida en el RTCA 67.04.54:10 y el CODEX *Alimentarius* es de 1000 mg/kg y se quería probar una concentración cercana a este límite (COMIECO, 2012; FAO y OMS, 2018).

4.6.3. Proveedor y concentración de sorbato de potasio

Se utilizó sorbato de potasio granular grado alimenticio producido por Kerry (Pavas, Costa Rica) y se siguieron las recomendaciones e instrucciones de uso señaladas en la ficha técnica obtenida gracias a la empresa Maltho Foods, S.A. Este se añadió al jugo de naranja de manera que su concentración en el mismo fuese de (965 ± 15) mg/kg, dado que al igual que en el caso del benzoato de sodio, la cantidad máxima permitida en el RTCA 67.04.54:10

y el CODEX *Alimentarius* es de 1000 mg/kg y se quería probar una concentración cercana a este límite (COMIECO, 2012; FAO y OMS, 2018).

4.6.4. Tratamiento de las muestras e inoculación

Con base en los resultados del primer objetivo, se eligió el jugo con mayor potencial de deterioro. A este se le agregaron los antimicrobianos previamente mencionados, de manera independiente. Adicionalmente, se tuvo un tratamiento que tuviera tanto benzoato de sodio como sorbato de potasio en partes iguales para una concentración total de (965 ± 15) mg/kg de ambos. Esto porque en este caso también se quería probar una concentración cercana al límite máximo permitido que es de 1000 mg/kg para dicha mezcla (COMIECO, 2012; FAO y OMS, 2018). Finalmente, se evaluó otro tratamiento sin preservante, como control positivo. De esta forma se tuvieron cinco tratamientos en total.

Cada antimicrobiano se pesó en una balanza analítica dentro de un recipiente estéril. Luego se agregó al jugo, el cual, se encontraba previamente en un beaker con una pastilla de agitación (ambos estériles). Se agitó el jugo con cada antimicrobiano durante 20 minutos, en una plantilla con agitación, a 400 rpm (revoluciones por minuto). Además, se aseguró que todos los tratamientos utilizaran un jugo del mismo lote para evitar la variabilidad asociada con este factor. Cada tratamiento se colocó en botellas de vidrio según el procedimiento señalado en la sección 4.5.3. y también se preparó una botella de cada tratamiento para cada tiempo de muestreo para reducir la probabilidad de contaminación y los efectos asociados al cambio de volumen en las muestras.

Seguidamente, se preparó el inóculo con la misma cepa descrita en la sección 4.5.1. y se siguió el procedimiento que se señaló en la sección 4.5.2. También la inoculación de los jugos se hizo igual que en la sección 4.5.3. Como se señala en esta misma sección, se realizó un recuento con el jugo sin inocular para comprobar la ausencia previa del microorganismo en el mismo y otro con el jugo al ser inoculado para conocer la población del inóculo inicial. Además, se tuvo un control negativo el cual no se inoculó con el microorganismo y se realizó un recuento de *A. acidoterrestris* el último día de muestreo. Por último, estos jugos se incubaron a 45 °C durante todo el experimento. Lo anterior corresponde a una repetición del experimento, esto se repitió dos veces más para un total de tres repeticiones.

4.6.5. Muestreos periódicos y recuentos de *A. acidoterrestris* en los jugos de naranja con los diferentes preservantes

Los muestreos para este objetivo se realizaron en los primeros tres días luego de inocular los jugos, luego en el día 5, el día 7, el día 15 y el día 22. Estos se hicieron tal y como se señaló en la sección 4.5.5.

4.7. Efecto de la variación en la concentración de nisina sobre el crecimiento de *A. acidoterrestris* en jugo de naranja

4.7.1. Tratamiento de las muestras e inoculación

Se siguió el mismo procedimiento que con los demás antimicrobianos, como se describió en la sección 5.6.4. Solamente que en este caso los tratamientos fueron los siguientes: Nisina (59 ± 2 mg/kg), nisina (30 ± 1 mg/kg), nisina (15 ± 1 mg/kg), nisina ($7,47 \pm 0,02$ mg/kg) y un control positivo sin nisina. La nisina utilizada fue la misma que la señalada en la sección 5.6.1. Estas concentraciones se decidieron con base en las recomendaciones del fabricante y con base en pruebas preliminares.

Seguidamente, se preparó el inóculo con la misma cepa descrita en la sección 4.5.1. y se siguió el procedimiento que se señaló en la sección 4.5.2. La inoculación de los jugos se hizo igual que en la sección 4.5.3 incluyendo el recuento en el jugo sin inocular para comprobar la ausencia previa del microorganismo en el mismo y otro con el jugo al ser inoculado para conocer la población del inóculo inicial en la muestra. Además, se tuvo un control negativo, el cual no se inoculó con *A. acidoterrestris* y se realizó un recuento de este microorganismo el último día de muestreo. Por último, estos jugos se incubaron a 45 °C durante todo el experimento. Lo anterior corresponde a una repetición del experimento, esto se repitió dos veces más para un total de tres repeticiones.

4.7.2. Muestreos periódicos y recuento de *A. acidoterrestris* en los jugos de naranja con diferentes concentraciones de nisina

Los muestreos se realizaron en los primeros tres días luego de inocular los jugos, luego en el día 5, el día 7, el día 15 y el día 22. Los recuentos se hicieron tal y como se señaló en la sección 4.5.5.

4.8. Diseño Experimental y Análisis Estadístico

Se tuvo un diseño irrestricto aleatorio en el que el tipo de jugo fue la variable independiente. A su vez se tuvieron seis tratamientos en el primer objetivo, cinco en el segundo y cinco en el tercero. Para el primer objetivo los tratamientos fueron cada tipo de jugo utilizado (4 marcas comerciales y 2 de elaboración propia), en el segundo objetivo cada preservante (benzoato de sodio, sorbato de potasio, una mezcla de benzoato de sodio y sorbato de potasio y nisina) y el control positivo sin preservante y en el tercero cada una de las cuatro concentraciones de nisina evaluadas y el control positivo sin nisina. Tal y como se describe en cada apartado, se realizaron tres repeticiones del experimento en cada uno de los tres objetivos.

4.8.1. Análisis Estadístico Aplicado al Objetivo 1

En cuanto a la caracterización fisicoquímica, para cada análisis (pH, acidez total, concentración de sólidos solubles, concentración de polifenoles totales y concentración vitamina C) se calculó el promedio de los valores obtenidos en las tres repeticiones, junto con su desviación estándar.

En cuanto al estudio de sobrevivencia, primero, se aplicó un ANDEVA para determinar si existían diferencias significativas entre las poblaciones iniciales de todos los tratamientos evaluados. Luego, se aplicó otro ANDEVA para determinar si existían diferencias significativas entre las poblaciones finales de dichos tratamientos. Seguidamente, para el análisis de resultados en los jugos en los que se dio un crecimiento exponencial del microorganismo, se utilizó un modelo logístico de tres parámetros para modelar su comportamiento, dado que fue el modelo que se ajustó de mejor forma a los resultados obtenidos (Pla *et al.*, 2015). El mismo sigue la ecuación 1:

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

a: tasa de crecimiento

b: punto de inflexión

c: asíntota

Con esta ecuación se calculó, mediante predicción inversa, el tiempo en el que se alcanzaría la población crítica de cinco logaritmos, a partir de la cual se ha señalado que se

percibe sensorialmente el deterioro en el jugo (Pettipher *et al.*, 1997). Además, se analizó el parámetro c , que corresponde a la población estabilizada del microorganismo. Se calculó el promedio y la desviación estándar de cada uno de estos parámetros para cada tratamiento y se realizó un ANDEVA para determinar si existían diferencias significativas entre ellos. Al haber diferencias significativas entre los valores del tiempo crítico y la asíntota (c) ($P < 0.05$), se aplicó la prueba Tukey.

En el caso del jugo en el que el comportamiento de la población del microorganismo a través del tiempo tendió a decrecer levemente, se aplicó una regresión lineal simple. Esta sigue la ecuación 2:

$$\log (\text{población}) = a + b * \text{tiempo} \quad (2)$$

a: intercepto

b: pendiente

Con la ecuación (2), se determinó si la pendiente era o no significativamente diferente de cero. Además, se hizo utilizó la prueba t-student para comparar entre la población y final de *A. acidoterrestris* en este jugo. Para todos los análisis se utilizó el programa JMP® 9 y se estableció un nivel de significancia del 5%.

En los casos en los que no se detectaron diferencias significativas luego de aplicar el ANDEVA, se calculó la potencia de la prueba (valor β) según el método descrito por Pearson y Hartley (1951), empleando el número de tratamientos (k) y repeticiones (n) en cada caso, un valor de α de 0.05, una diferencia mínima relevante por detectar (δ) de 1 log UFC/ml y asumiendo como varianza (s^2) el error experimental obtenido (CME).

4.8.2. Análisis Estadístico Aplicado a los Objetivos 2 y 3

Se aplicó un ANDEVA para determinar si existían diferencias significativas entre las poblaciones iniciales de todos los tratamientos evaluados. Luego, para los controles positivos se utilizó un modelo logístico de tres parámetros, tal y como se hizo en el objetivo 1, siguiendo la ecuación (1) del punto 4.8.1. Con dicha ecuación se calculó el tiempo para alcanzar la población crítica de 5 logaritmos y la población estabilizada del microorganismo (parámetro c).

Para los tratamientos con antimicrobianos, el comportamiento del microorganismo se ajustó a una regresión lineal simple, la cual sigue la ecuación (2) del punto 4.8.1. Por lo que para conocer si sus pendientes eran significativamente diferentes de cero, se utilizó una regresión lineal múltiple. Luego, se aplicó un ANDEVA para determinar si existían diferencias significativas entre las poblaciones finales de estos tratamientos. Una prueba de t-student se aplicó a cada tratamiento para comparar su población inicial con su población final. Para todos los análisis se utilizó el programa JMP® 9 y se estableció un nivel de significancia del 5%. En caso de no obtener diferencias significativas, se calculó la potencia de la prueba.

En los casos en los que no se detectaron diferencias significativas luego de aplicar el ANDEVA, se calculó la potencia de la prueba (valor β) según el método descrito por Pearson y Hartley (1951), empleando el número de tratamientos (k) y repeticiones (n) en cada caso, un valor de α de 0.05, una diferencia mínima relevante por detectar (δ) de 1 log UFC/ml y asumiendo como varianza (s^2) el error experimental obtenido (CME).

5. Resultados y Discusión

5.1. Objetivo Específico 1: “Determinar las cinéticas de sobrevivencia de *A. acidoterrestris* en seis jugos de naranja del mercado costarricense”

En el Cuadro III se observa la caracterización fisicoquímica de los jugos en los cuales se evaluó el crecimiento de *A. acidoterrestris* que se realizó con el fin de conocer las condiciones a las que estuvo sometido este microorganismo y así entender cómo estas pudieron afectar su desarrollo.

Cuadro III. Caracterización fisicoquímica de los seis jugos de naranja utilizados en el estudio de sobrevivencia de *A. acidoterrestris* (valor promedio \pm desviación estándar, n = 3).

Jugo	Característica Fisicoquímica				
	Acidez total (g ácido cítrico/100 g jugo)	pH	° Brix	Polifenoles totales (mg ácido gálico/100 g jugo)	Concentración de Vitamina C (mg / 100 g jugo)
Natufruit	0,57 \pm 0,04	3,63 \pm 0,01	11,3 \pm 0,8	19,8 \pm 1,1	No detectable ($<$ 2,7)
Del Valle	0,82 \pm 0,01	3,80 \pm 0,02	11,1 \pm 0,1	34,6 \pm 6,0	22,1 \pm 2,5
Dos Pinos Estable a Temperatura Ambiente	0,67 \pm 0,09	3,79 \pm 0,07	10,6 \pm 0,1	26,3 \pm 9,5	34,9 \pm 1,7
Tropicana	0,65 \pm 0,06	3,91 \pm 0,07	11,0 \pm 0,3	30,8 \pm 5,4	27,9 \pm 4,1
Dos Pinos Refrigerado	1,0 \pm 0,1	3,72 \pm 0,02	11,8 \pm 0,2	27,4 \pm 5,7	26,3 \pm 3,4
Naranjas Frescas	0,84 \pm 0,02	3,76 \pm 0,01	10,2 \pm 0,8	21,4 \pm 2,8	15,6 \pm 2,7

Los valores obtenidos de acidez total son similares a otros encontrados en la literatura. Por ejemplo, para jugos a partir de variedades de naranjas comúnmente utilizadas como la

Valencia y la Navelina se han obtenido valores de (0,58 – 1,67) g de ácido cítrico/100 g de jugo según el grado de madurez de la naranja (Hours *et al.*, 2005). Sin embargo, este parámetro normalmente no es tan representativo como el pH para analizar la viabilidad de crecimiento de *A. acidoterrestris* en este tipo de matriz. En el caso de este último, según la variedad se han obtenido valores entre $3,40 \pm 0,18$ (Valencia) y $3,77 \pm 0,31$ (Navelina) (Hours *et al.*, 2005), rango dentro del cual se encuentran todos los valores de pH obtenidos experimentalmente. Según Bevilacqua y otros (2008a), *A. acidoterrestris* puede crecer en un rango de pH entre 2,0 y 6,0. Además, en otros estudios se ha comprobado que medios nutritivos con valores de pH entre 3,5 y 4,5 o entre 3,7 y 4,7 permiten un crecimiento acelerado de este microorganismo (Sinigaglia *et al.*, 2003; Hui *et al.*, 2020). Así que, en términos de acidez y específicamente expresada como pH, se puede decir que todos los jugos evaluados son medios óptimos para el crecimiento de este microorganismo.

En el caso del contenido de sólidos solubles (expresados como grados Brix), se hubiese esperado que todos los jugos elaborados a partir de concentrado (Natufruit, Del Valle y Dos Pinos estable a temperatura ambiente) presentaran valores entre 11,2 y 11,8 (CODEX STAN 245-2005). Sin embargo, el jugo Dos Pinos estable a temperatura ambiente presentó un valor menor ($10,6 \pm 0,1$), lo cual no debería ocurrir dado que, al reconstituirse se debería asegurar que sus sólidos solubles alcancen los valores señalados. En el caso de los demás jugos, su contenido de sólidos solubles es similar al de otros jugos que se han obtenido a partir de la fruta fresca, los cuales se encuentran entre 8,7 y 10,8 (Niu *et al.*, 2008). De igual forma, en todos los casos, los valores de sólidos solubles fueron menores a 18, valor mínimo a partir del cual se ha observado un efecto inhibitorio sobre *A. acidoterrestris* en jugo de manzana, en condiciones óptimas de temperatura (Peña *et al.*, 2011). Por lo tanto, en relación con este parámetro, las condiciones en todos los jugos muestreados son apropiadas para el crecimiento de esta bacteria.

Por su parte, los valores de polifenoles totales se asemejan a los encontrados en la literatura, que van de 18,58 a 50,25 mg de ácido gálico / 100 g de muestra (Stella *et al.*, 2011). En este caso, solamente se ha observado inhibición del crecimiento de *A. acidoterrestris* en jugo de uvas rojas asociado no solo con su alto contenido de polifenoles, sino con la presencia de polifenoles neutros como el catequín-galato y las antocianinas (Splittstoesser *et al.*, 1994).

En el caso del jugo de naranja, el contenido de polifenoles es mucho menor y son otros polifenoles como los flavanona glucósidos (ej. Hesperidina) los que se encuentran presentes (Burin *et al.*, 2010; Rangel-Huerta *et al.*, 2015). Por lo tanto, no se esperaría ningún efecto inhibitorio por parte de este componente en los jugos evaluados.

Por último, en cuanto a la concentración de vitamina C, los valores experimentales obtenidos también coinciden con los encontrados en la literatura para jugo de naranja (Stella *et al.*, 2011). Una excepción fue el caso del jugo Natufruit, el cual ni siquiera presentó una concentración detectable de este compuesto. Esto es posiblemente porque este jugo recibió dos tratamientos térmicos, uno por parte de la empresa que lo procesó inicialmente y otro realizado en la planta piloto del CITA para lograr que fuese estable a temperatura ambiente. Dado que esta vitamina es termosensible, dicha exposición al calor pudo haberla degradado considerablemente (Zhang *et al.*, 2016). En relación con el efecto de este compuesto sobre *A. acidoterrestris*, la única información encontrada en la literatura que se refiere a este parámetro indica que en jugo de manzana, concentraciones de 5 a 10 mg de ácido ascórbico/100 ml de jugo promueven el crecimiento de *A. acidoterrestris*, mientras que concentraciones de 15 mg de ácido ascórbico/100 ml de jugo lo inhiben (Bahaçeci & Acar, 2007). Sin embargo, este no se considera un parámetro de referencia para jugo de naranja, dado que se sabe que las concentraciones de este compuesto suelen ser mayores en esta matriz y a pesar de esto, el crecimiento de *A. acidoterrestris* en este jugo ya ha sido comprobado (Pettipher *et al.*, 1997; Eiroa *et al.*, 1999; Komitopoulou, 1999; Gocmen *et al.*, 2005; Stella *et al.*, 2011; Kakagianni *et al.*, 2018).

Con base en lo discutido previamente y en los resultados de otras investigaciones en las que se ha observado el crecimiento de *A. acidoterrestris*, se esperaba este mismo comportamiento en los jugos de naranja evaluados en este estudio (Pettipher *et al.*, 1997; Eiroa *et al.*, 1999; Komitopoulou, 1999; Sinigaglia *et al.*, 2003; Gocmen *et al.*, 2005; Rivera, 2009; Pérez-Cacho, 2011; Kakagianni *et al.*, 2018), no solo porque las características fisicoquímicas de los jugos eran apropiadas para el crecimiento de este microorganismo, sino porque además se ajustó el espacio de cabeza y la temperatura de almacenamiento para dar las condiciones idóneas para su desarrollo (Sinigaglia *et al.*, 2003; Gocmen *et al.*, 2005). Esto se comprobó experimentalmente, como se muestra en la Figura 3. Sin embargo, en la presente

investigación dicho crecimiento no ocurrió en todos los jugos, dado que en el jugo Natufruit la población tuvo una tendencia a una leve disminución.

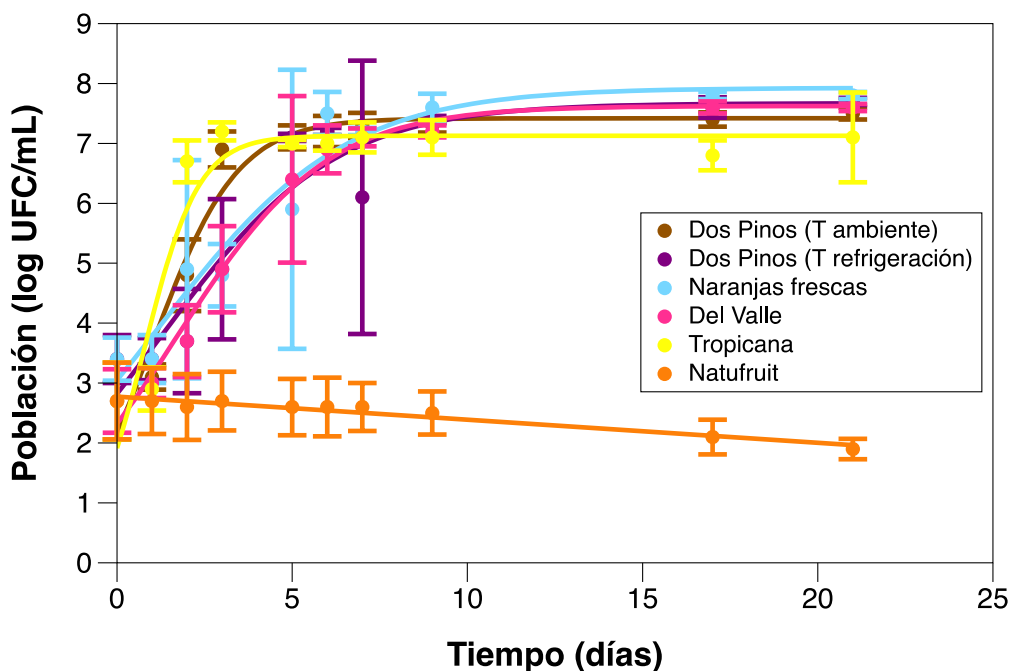


Figura 3. Cinéticas de sobrevivencia de *A. acidoterrestis* en seis jugos de naranja del mercado costarricense almacenados a $45 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 21 días.

Es importante señalar que no se encontraron diferencias significativas entre las poblaciones iniciales de *A. acidoterrestis* de los jugos evaluados ($P = 0,3872$ y valor $\beta = 0,91$), lo que indica que este factor no causó diferencias en el comportamiento de esta bacteria en los diferentes jugos. Luego, al comparar las poblaciones finales de los seis jugos analizados, se determinó que existen diferencias significativas entre las mismas ($P < 0,0001$). A su vez, se identificó que la población final de $(1,9 \pm 0,2)$ log UFC/ml del jugo Natufruit fue la única diferente a las demás. Entre las poblaciones de los jugos restantes, no se presentaron diferencias significativas ($P = 0,2374$ y valor $\beta = 0,65$) y fueron considerablemente mayores a la población en el jugo Natufruit ($P < 0,0001$).

Específicamente en el caso del jugo Natufruit, se analizó la pendiente de la recta que modela el comportamiento de *A. acidoterrestis* y se determinó que esta es significativamente diferente de cero ($P = 0,0014$). Esto comprueba lo observado en la Figura 3, indicando que la población del microorganismo tiende a descender con el paso del tiempo. Sin embargo, esta reducción en la población es muy leve dado que al comparar la población inicial con la

final del microorganismo en este jugo no se obtuvieron diferencias significativas ($P=0,0960$). De igual forma, se esperaba el crecimiento de *A. acidoterrestris* en este jugo, ya que el mismo no presentó mayor diferencia en su composición en comparación con los demás jugos, excepto por el contenido de vitamina C (ver Cuadro III). La única referencia encontrada en la literatura sobre esta sustancia y su relación con el crecimiento de esta bacteria se mencionó previamente y no hace acotación a un efecto como el ocurrido en este caso (Bahaçeci & Acar, 2007). Por lo que, se considera posible que este comportamiento se deba a algún compuesto altamente inhibitorio, que se desconozca, se encuentre presente en este jugo.

En el caso de los cinco jugos en los que *A. acidoterrestris* creció con facilidad, se calculó el tiempo crítico requerido para que este microorganismo alcanzara una población de 5 logaritmos (los resultados obtenidos se resumen en el Cuadro IV). Esto porque diferentes estudios han comprobado que a partir de esta población, la producción de guayacol en el jugo es suficiente para que las personas puedan detectar el deterioro del producto (Pettipher *et al.*, 1997; Komitopoulou *et al.*, 1999).

Cuadro IV. Población estabilizada y tiempo necesario para alcanzar una población de 5 logaritmos de *A. acidoterrestris* en cinco jugos de naranja del mercado costarricense almacenados a $45 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 21 días.

Jugo	Tiempo crítico para alcanzar población de 5 logaritmos de <i>A. acidoterrestris</i> (días)	Población estabilizada de <i>A. acidoterrestris</i> (log UFC/ml)
Dos Pinos Refrigerado	$3,0 \pm 0,6^a$	$7,79 \pm 0,05^a$
Dos Pinos Estable a Temperatura Ambiente	$1,9 \pm 0,1^{ab}$	$7,4 \pm 0,1^{bc}$
Del Valle	$3,1 \pm 0,9^a$	$7,6 \pm 0,2^{ab}$
Naranjas Frescas	$2,7 \pm 0,7^{ab}$	$7,9 \pm 0,1^a$
Tropicana	$1,43 \pm 0,08^b$	$7,1 \pm 0,2^c$

Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas entre las medias ($P < 0,05$).

El mayor valor obtenido para este parámetro resultó de tan sólo tres días, lo cual es, tanto en el caso de jugos refrigerados como en el de jugos estables a temperatura ambiente,

un lapso de tiempo considerablemente menor al de su vida útil (López-Gómez *et al.*, 2010). Este hallazgo es un indicador de la amenaza que representa el microorganismo estudiado para la industria de jugos de naranja del país y a nivel global. Cabe destacar que, al comparar los valores obtenidos para el parámetro calculado con cada uno de los cinco jugos, existen diferencias significativas entre estos ($P = 0,0202$). En el Cuadro IV se puede observar como el jugo Tropicana, el jugo de naranjas frescas y el jugo Dos Pinos estable a temperatura ambiente alcanzaron una población de 5 logaritmos en el menor tiempo. Esta fue la razón por la que se escogió un jugo de este grupo para evaluar el efecto de diferentes antimicrobianos sobre el crecimiento de *A. acidoterrestris* en los siguientes objetivos. Los jugos Del Valle y Dos Pinos refrigerado fueron los que más tardaron en alcanzar la población definida como crítica ($3,1 \pm 0,9$ y $3,0 \pm 0,6$ días, respectivamente). En este caso, se dificulta conocer la razón de las diferencias observadas basándose únicamente en las características fisicoquímicas de los jugos, pues las mismas son muy similares y no se observa un patrón claro que los diferencie unos de otros. Sin embargo, se podría pensar que las diferencias obtenidas podrían radicar en variaciones en las condiciones de procesamiento. Por ejemplo, la severidad del tratamiento térmico aplicado, que podría degradar nutrientes que no se cuantificaron en esta investigación (Esteve & Frigola, 2008). También el equipo utilizado durante la extracción, ya que determina la cantidad de aceite esencial de la cáscara que se transfiere al jugo y se ha observado que algunos aceites esenciales son inhibidores del crecimiento de este microorganismo (Bevilacqua *et al.*, 2008b; Tetra Pak, 2020). Además, la presencia de una etapa de desaireado podría ser otro factor importante, dado que reduce la concentración de oxígeno disuelto y se sabe que una mayor cantidad de oxígeno disuelto favorece el crecimiento de *A. acidoterrestris* (Kinouchi *et al.*, 2014; Tetra Pak, 2020).

En relación con la población estabilizada del microorganismo, como se puede observar en el Cuadro IV, se encontraron diferencias significativas entre este parámetro para los jugos analizados ($P = 0,0002$). Los jugos Dos Pinos refrigerado, el obtenido a partir de naranjas frescas y el jugo marca del Valle fueron los que alcanzaron el valor más alto, mientras que el jugo Tropicana fue el que obtuvo la menor población estabilizada de *A. acidoterrestris*. Se considera que los mismos factores que se mencionaron como posibles causas para las diferencias en el tiempo crítico de 5 logaritmos entre los diferentes jugos pueden haber causado las diferencias en este parámetro también. Asimismo, en todos los

casos, la población estabilizada fue al menos dos logaritmos mayor a la necesaria para la producción de guayacol en cantidades detectables por el ser humano (Pettipher *et al.*, 1997; Komitopoulou *et al.*, 1999). Por consiguiente, se puede asegurar que en estos cinco jugos, dadas las condiciones apropiadas, *A. acidoterrestris* podría causar deterioro.

5.2. Objetivo Específico 2: “Comparar el efecto de diferentes preservantes sobre la sobrevivencia de *A. acidoterrestris* en jugo de naranja”

Para analizar el efecto de los antimicrobianos seleccionados, se estableció en la sección 2.2 que se utilizaría el jugo que presentara mayor potencial de deterioro. Por lo tanto, el criterio utilizado para elegir dicho jugo fue la rapidez en alcanzar la población crítica de 5 logaritmos, considerando que mientras más rápido se alcance dicha población, más rápido se inicia la producción de los metabolitos causantes del deterioro (Pettipher *et al.*, 1997; Komitopoulou *et al.*, 1999). Como se puede observar en el Cuadro IV, fue en el jugo Tropicana donde esta población se alcanzó en el menor lapso de tiempo, por lo tanto, este fue el jugo elegido.

No se encontraron diferencias significativas entre las poblaciones iniciales del microorganismo para los distintos tratamientos evaluados ($P = 0,9664$ y valor $\beta > 0,99$). Este resultado se evidencia en la Figura 4. Esto quiere decir que, al iniciar cada experimento, la carga inicial de la bacteria fue la misma para todos los tratamientos. Sin embargo, sí se encontraron diferencias significativas entre las poblaciones finales después de aplicar los tratamientos ($P < 0,0001$). Al realizar una prueba de Tukey, se confirmó además que la población final de *A. acidoterrestris* en el control positivo luego de 22 días de almacenamiento ($7,0 \pm 0,4$ log UFC/ml) es significativamente diferente a la obtenida con los tratamientos que contemplan la adición de los diferentes antimicrobianos.

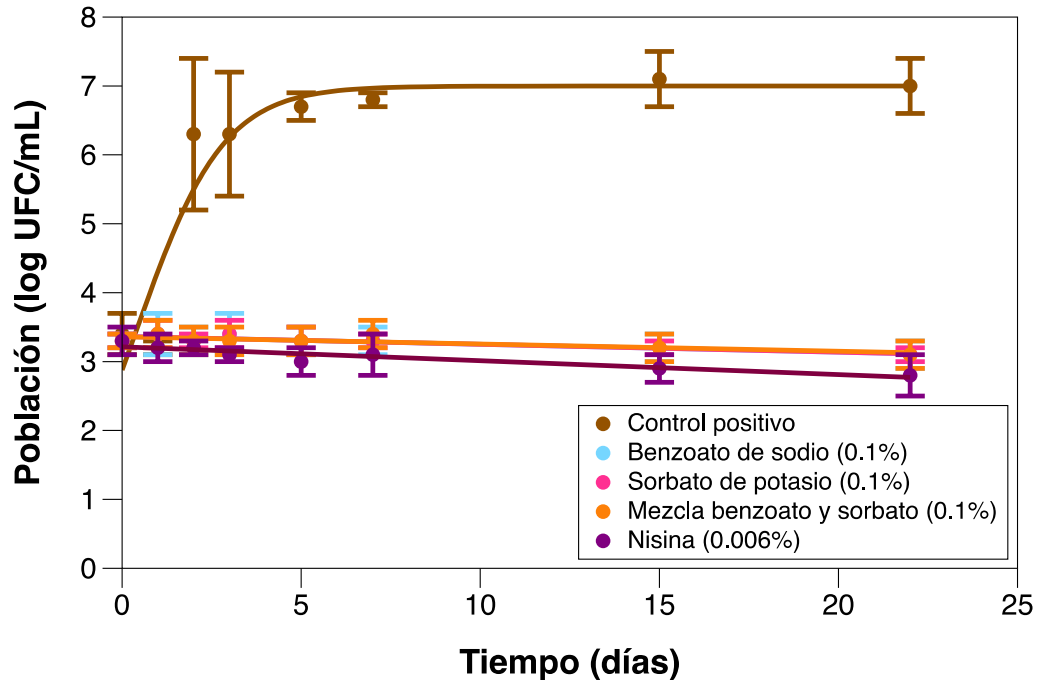


Figura 4. Cinéticas de sobrevivencia de *Alicyclobacillus acidoterrestris* en jugo de naranja Tropicana Grovestand con diferentes antimicrobianos durante 22 días de almacenamiento a $45 \pm 2^\circ\text{C}$.

Por otra parte, la Figura 4 muestra que el microorganismo creció con facilidad y rapidez en el control positivo, en contraste con los demás tratamientos, en donde la población no aumentó en el tiempo. Este resultado es esperado, dado que el benzoato de sodio, el sorbato de potasio y la nisina son agentes antimicrobianos comúnmente utilizados en alimentos para el control bacteriano. Según señalan diferentes autores, es posible que se diera una acción de estas sustancias sobre las membranas celulares de la bacteria, causando desequilibrios en su pH interno y en el transporte de nutrientes (Cleveland *et al.*, 2001; James *et al.*, 2005; Paulus, 2005; Belitz *et al.*, 2009). Por lo tanto, *A. acidoterrestris* no pudo crecer, a pesar de poseer las condiciones de concentración de sólidos solubles, pH, temperatura y espacio de cabeza óptimas para hacerlo (Bevilacqua *et al.*, 2008a). El crecimiento en el control positivo reportado es esperado, esto por las características fisicoquímicas del jugo Tropicana, tal como se explicó en la sección 5.1.

Los resultados obtenidos concuerdan con otros estudios realizados previamente. Por ejemplo, en medios como caldo AAM (medio *Alicyclobacillus acidocaldarius*) y jugo de

manzana, ya se había confirmado la inhibición del crecimiento de *A. acidoterrestris* al utilizar benzoato de sodio (500 mg/l – 585 mg/l) y sorbato de potasio (500 mg/l – 673 mg/l) (Walker y Phillips, 2008b; Cai *et al.*, 2015). Sin embargo, este efecto no se había comprobado en jugo de naranja, un jugo de alto consumo y muy susceptible al deterioro por parte de esta bacteria tal como se mostró con la ejecución del primer objetivo de esta investigación. En el caso de la nisina, su efecto inhibitorio en jugo de naranja ya se conocía y se reafirma en esta investigación (Komitopoulou *et al.*, 1999; Yamazaki *et al.*, 2000; Peña y Rodríguez, 2006).

Por su parte, al comparar únicamente los tratamientos que incluyen los agentes antimicrobianos, no se encontraron diferencias significativas entre las poblaciones finales de *A. acidoterrestris* ($P = 0,3099$ y valor $\beta > 0,99$). Esto quiere decir que es indiferente utilizar cualquiera de estas alternativas para inhibir el crecimiento de *A. acidoterrestris* en jugo de naranja, pues todas van a tener el mismo efecto inhibitorio sobre esta bacteria durante el tiempo de almacenamiento analizado. Esto resulta ser muy favorable para la industria, dado que se pueden tomar en cuenta otros factores a la hora de elegir cuál agente antimicrobiano utilizar. Ejemplo de estos factores son: el precio (que es muy variable entre los tres antimicrobianos según las casas comerciales consultadas), la facilidad con la que se puede conseguir en el país, los cambios sensoriales que pueda tener en el producto final o la posibilidad de contar con una etiqueta limpia en el producto final. Así, se podría tomar una decisión que se ajuste a las necesidades de cada empresa o producto. A su vez, este resultado sugiere que de requerirse cambios en la formulación entre los preservantes evaluados en este estudio, no se vería comprometido el efecto antimicrobiano sobre este microorganismo en jugo de naranja. En este caso, no es posible contrastar todos los resultados con otros datos de la literatura, dado que no se había comparado previamente el efecto de estos tres antimicrobianos sobre *A. acidoterrestris* en esta matriz.

Respecto al análisis estadístico realizado, las pendientes de las rectas que modelan el comportamiento del microorganismo en estos tratamientos son significativamente diferentes de cero (benzoato de sodio: $P = 0,0271$, sorbato de potasio: $P = 0,0080$, mezcla 1:1 de benzoato de sodio y sorbato de potasio: $P = 0,0205$ y nisina: $P = 0,0015$), lo que se asociaría con un decrecimiento de la población, confirmándose al observar el comportamiento de la población del microorganismo en la Figura 4. Sin embargo, al comparar las poblaciones

iniciales y finales de cada uno de los tratamientos, se determinó que no existen diferencias significativas en ningún caso ($P > 0,05$). Esto puede deberse a que, aunque sí hay una reducción visible en la población del microorganismo, lo cual es detectado como una pendiente diferente de cero, esta es tan leve que la población final e inicial no son numéricamente significativamente diferentes entre ellas. Así que el efecto de estos antimicrobianos se describiría como bacteriostático principalmente y no bactericida (McLandsborough, 2005). Por otra parte, se puede afirmar que no existe un efecto sinérgico entre el benzoato de sodio y el sorbato de potasio, dado que al utilizar estos agentes antimicrobianos en una mezcla 1:1, no se obtuvieron resultados diferentes a los obtenidos tras utilizar solamente uno de los dos. Es decir, no es necesario incurrir en el uso de una mayor cantidad de aditivos en la formulación para lograr un efecto inhibitorio sobre *A. acidoterrestris* en jugo de naranja.

Finalmente, es importante mencionar que en el control positivo, la población estabilizada de *A. acidoterrestris* alcanzó una población final de $(7,0 \pm 0,2)$ log UFC/ml y que en este mismo tratamiento en tan solo $1,5 \pm 0,2$ días se alcanzaría la población crítica para la producción de guayacol (5 log UFC/ml) (Pettipher *et al.*, 1997). Esto no ocurrió los tratamientos con antimicrobianos en ningún momento de los 22 días de almacenamiento en condiciones óptimas de incubación (temperatura, pH, concentración de sólidos solubles y espacio de cabeza en el recipiente) para el crecimiento de la bacteria. Sin embargo, si la población de *A. acidoterrestris* fuese lo suficientemente alta para la producción de este metabolito antes de agregar los agentes antimicrobianos, se podría dar el deterioro, dado que, como se mencionó previamente, el efecto de los preservantes estudiados sobre esta bacteria es solamente bacteriostático. Por lo tanto, si bien estos antimicrobianos se presentan como alternativas para controlar el crecimiento de *A. acidoterrestris* en jugo de naranja, estos no deben ser la única medida utilizada. Es indispensable que se mantenga además un buen control de proveedores y un estricto cumplimiento de las Buenas Prácticas Agrícolas y Buenas Prácticas de Manufactura.

2.1. Objetivo Específico 3: “Estudiar el efecto de la concentración de nisina sobre la sobrevivencia de *A. acidoterrestris* en jugo de naranja”

En la ejecución de este objetivo, todos los tratamientos analizados iniciaron con una misma carga de *A. acidoterrestris*, dado que no se encontraron diferencias significativas entre las poblaciones iniciales de los mismos ($P = 0,7893$ y valor $\beta = 0,92$). Sin embargo, como se puede observar en la Figura 5, con el paso del tiempo en el control positivo se dio un crecimiento acelerado del microorganismo, alcanzando una población estabilizada de $(7,2 \pm 0,2)$ log UFC/ml. Mientras que en los tratamientos a los cuales se les agregó nisina, la población no varió considerablemente a través del tiempo. Así que, durante los 22 días de almacenamiento, en estos no se alcanzó la población crítica para la producción de guayacol ($5 \log$ UFC/ml) (Pettipher *et al.*, 1997). Esta se alcanzó en el control positivo luego de tan solo $1,4 \pm 0,5$ días. Además, al comparar las poblaciones finales de estos tratamientos, se obtuvieron diferencias significativas entre los mismos ($P < 0,0001$). Como se esperaba luego de observar el comportamiento del microorganismo en la Figura 5, la prueba Tukey indicó que la población final de $(7,1 \pm 0,2)$ log UFC/ml del control positivo fue la única diferente del resto de los tratamientos (a los cuales se les agregó nisina a diferentes concentraciones).

Lo anterior se explica porque la nisina es un agente antimicrobiano que actúa sobre las membranas celulares de las bacterias. Esta bacteriocina crea pequeños poros en dichas paredes, causando desequilibrios en el líquido intracelular (Cleveland *et al.*, 2001). Además, a diferencia de otro tipo de bacterias, se ha observado un efecto inhibitorio en bacterias Gram positivas formadoras de esporas, como lo es *A. acidoterrestris* (Yamazaki *et al.*, 2000). Por lo que, al estar presente en todos los tratamientos excepto en el control positivo, esta sustancia logró inhibir el crecimiento de *A. acidoterrestris* aún en condiciones de concentración de sólidos solubles, pH, temperatura y espacio de cabeza óptimas para el desarrollo de esta bacteria.

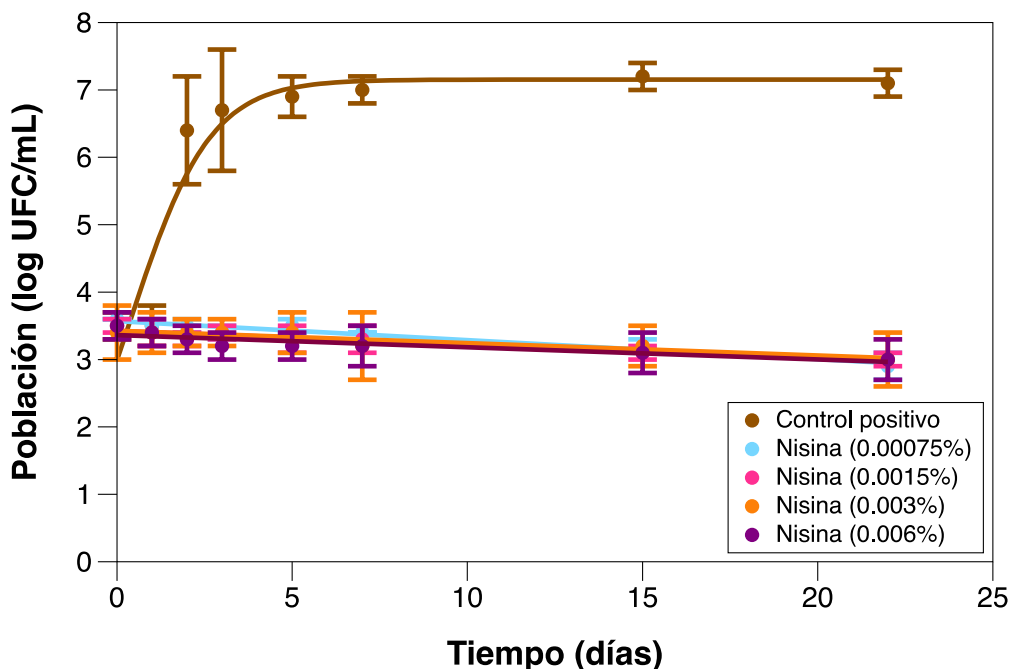


Figura 5. Cinéticas de sobrevivencia de *A. acidoterrestris* en jugo de naranja Tropicana Grovestand con diferentes concentraciones de nisina durante 22 días de almacenamiento a $45 \pm 2^\circ\text{C}$.

En todos los casos evaluados, las pendientes de las rectas que se utilizaron para modelar el comportamiento de este microorganismo fueron significativamente diferentes de cero (0,006%: $P = 0,0002$, 0,003%: $P = 0,0308$, 0,0015%: $P < 0,0001$, 0,00075%: $P < 0,0001$), observándose una ligera tendencia a la disminución de la población de *A. acidoterrestris* con el paso del tiempo. Esto se reafirmó al comparar la población inicial con la final de cada tratamiento, dado que se encontraron diferencias significativas entre las mismas para las concentraciones de 0,006% ($P = 0,0311$), 0,0015% ($P = 0,0016$), y 0,0075% ($P = 0,0022$). No obstante, en el caso de la concentración de 0,003% no se encontró diferencia significativa ($P = 0,2646$) entre dichas poblaciones durante el periodo de estudio. Es decir, a pesar de que población del microorganismo tiende a disminuir, esta reducción es tan leve que no se logra alcanzar una población final que numéricamente sea significativamente diferente a la del primer día del estudio. Es importante mencionar que para esta concentración y para la concentración de 0,006%, se tuvo que estimar en varias ocasiones la población microbiana (al obtener recuentos inferiores al rango contable de 25 unidades formadoras de colonia por placa), producto del efecto inhibitorio de la nisina en las placas en las que se hicieron los

recuentos (ver Figura 9 en la sección 10). Esto sugiere que algunos resultados pueden haberse sobreestimado y haber sido la causa de que este fuera el único tratamiento en el que no se obtuvieran diferencias significativas entre su población inicial y final. De igual forma, al observar la Figura 5, es evidente que en todos los casos la reducción de la población es muy leve (menor a 1 log UFC/ml). Además, no se encontraron diferencias significativas entre las poblaciones finales de *A. acidoterrestris* de estos cuatro tratamientos ($P = 0,9469$ y valor $\beta = 0,82$). Lo anterior quiere decir que en términos generales, todas las concentraciones tienen el mismo efecto inhibitorio sobre *A. acidoterrestris* en jugo de naranja. Esto es altamente positivo, porque, aunque el fabricante recomienda el uso de este antimicrobiano entre 0,003% y 0,006%, se comprobó que se puede reducir la concentración entre un 75,0% y un 87,5% del valor máximo sugerido sin afectar el efecto inhibitorio esperado sobre *A. acidoterrestris*. Lo anterior podría impactar de manera muy positiva en la economía de una empresa.

A su vez, este estudio se suma a una serie de investigaciones que afirman el efecto inhibitorio de la nisina sobre *A. acidoterrestris*. Estos se han realizado con otras poblaciones iniciales, otras cepas de *A. acidoterrestris* y nisina proveniente de otras casas comerciales. Sin embargo, en jugo de naranja, consistentemente se ha reportado una tendencia de inhibición del crecimiento y no una reducción considerable de la población microbiana (Komitopoulou *et al.*, 1999; Yamazaki *et al.*, 2000; Peña y Rodríguez, 2006). Por lo tanto, se puede afirmar que la nisina es altamente efectiva para inhibir el crecimiento de *A. acidoterrestris* en jugo de naranja, ya que aún en concentraciones muy bajas y en diferentes estudios, con condiciones variables, consistentemente logra el mismo efecto inhibitorio sobre esta bacteria.

6. Conclusiones

- Los resultados obtenidos para las características fisicoquímicas de los jugos de naranjas evaluados fueron muy similares para todos y, considerando la literatura en la temática, ninguno presentó valores que pudiesen causar un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *A. acidoterrestris*.
- *A. acidoterrestris* podría representar una amenaza para la industria de jugos de naranja de Costa Rica, dado su crecimiento acelerado en cinco de los seis jugos de naranja evaluados.

- A pesar de poseer una composición muy similar a la de los demás jugos evaluados, el jugo Natufruit presentó una tendencia al decrecimiento de la población de *A. acidoterrestris*, por lo que se podría suponer la presencia de un agente altamente inhibitorio en la bebida que no se conoce.
- El uso de nisina (58 ± 1 mg/kg), benzoato de sodio (965 ± 17 mg/kg), sorbato de potasio (965 ± 15 mg/kg) o una mezcla 1:1 de benzoato de sodio y sorbato de potasio (965 ± 15 mg/kg) posee un efecto bacteriostático sobre *A. acidoterrestris* en jugo de naranja.
- Se observó el mismo efecto inhibitorio sobre *A. acidoterrestris* en jugo de naranja al utilizar concentraciones de nisina inferiores (0,00075% y 0,0015%) a los valores sugeridos por proveedores comerciales de la bacteriocina (0,003% y 0,006%).

7. Recomendaciones

- Realizar análisis al jugo Natufruit para comprobar si contiene alguno de los antimicrobianos analizados en esta investigación u otro componente capaz de limitar el crecimiento de *A. acidoterrestris*.
- A nivel industrial es imprescindible tomar medidas preventivas como por ejemplo mantener un buen control de proveedores, Buenas Prácticas de Manufactura y un correcto manejo y lavado y desinfección de las frutas para minimizar la contaminación con *A. acidoterrestris*, dado el crecimiento comprobado de esta bacteria en jugos de naranja.
- Utilizar los agentes antimicrobianos estudiados en este trabajo como alternativa complementaria y no única para evitar el crecimiento de *A. acidoterrestris* en jugos de naranja.
- Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de benzoato de sodio y sorbato de potasio sobre *A. acidoterrestris* en jugo de naranja.
- Comprobar que las concentraciones de antimicrobianos utilizadas no poseen un efecto negativo sobre el perfil sensorial del jugo de naranja mediante la aplicación de paneles sensoriales.

- Estudiar el efecto de otros agentes antimicrobianos naturales (como aceites esenciales) sobre *A. acidoterrestris* en jugo de naranja.
- En caso de utilizar el producto comercial NisinZ™, producido por Handary (Bruselas, Bélgica) en jugos de naranja con características similares a los estudiados en esta investigación para inhibir el crecimiento de *A. acidoterrestris*, aplicar una concentración de 0,00075%, pues tiene el mismo efecto que la recomendada por el fabricante y reduciría los costos asociados con este producto.
- Verificar que el efecto bacteriostático de los diferentes antimicrobianos estudiados se mantenga durante toda la vida útil del jugo de naranja.

8. Bibliografía

Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos (USDA). (2019). CFR - Code of Federal Regulations Title 21. Recuperado de <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=146.145>

Association of Official Analytical Chemists (AOAC). (2012). *Official Method 932.12, Solids (Soluble) in Fruits and Fruit Products, Refractometer Method*. Recuperado de <http://www.eoma.aocac.org/methods/info.asp?ID=15125>

Association of Official Analytical Chemists (AOAC). (2005). *Official Method 942.15, Acidity (Titratable) of Fruit Products*. Recuperado de <http://www.eoma.aocac.org/methods/info.asp?ID=15499>

Association of Official Analytical Chemists (AOAC). (2005). *Official Method 981.12, pH of Acidified Foods*. Recuperado de <http://www.eoma.aocac.org/methods/info.asp?ID=18372>

Bahçeci, K., y Acar, J. (2007). Modeling the Combined Effects of pH, Temperature and Ascorbic Acid Concentration on the Heat Resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris*. *International Journal of Food Microbiology*, 120, 266-273. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.09.004

- Belitz, H., Grosch, W., y Schieberle, P. (2009). *Food Chemistry*. (4^a ed.). Berlin, Alemania: Springer.
- Bevilacqua, A., Corbo, M., y Sinigaglia, M. (2008b). Inhibition of *Alicyclobacillus acidoterrestris* by natural compounds. *International Journal of Food Science and Technology*, 43, 1271-1275. doi:10.1111/j.1365-2621.2007.01604.x
- Bevilacqua, A., Sinigaglia, M., y Corbo, M. (2008a). *Alicyclobacillus acidoterrestris*: New Methods for Inhibiting Spore Germination. *International Journal of Food Microbiology*, 125, 103-110.
- Burin, V., Falcão, L., Gonzaga, L., Fett, R., Rosier, J., Bordignon-Luiz, M. (2010). Colour, Phenolic Content and Antioxidant Activity of Grape Juice. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 30(4): 1027-1032.
- Cai, R., Yuan, Y., Wang, Z., Guo, C., Liu, B., Pan, C., Liu, L., y Yue, T. (2015). Effects of Preservatives on *Alicyclobacillus acidoterrestris* Growth and Guaiacol Production. *International Journal of Food Microbiology*, 214, 145-150. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.08.013
- Camacho, A., Giles, M., Ortégón, A., Palao, M., Serrano, B., y Velázquez, O. (2009). *Técnicas para el análisis microbiológico de alimentos*. (2da ed.). México: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Cautela, D., Castaldo, D., Servillo, L., y Giovane, A. (2010). Enzymes in Citrus Juice Processing. En A. Bayindirli, (1era Ed.), *Enzymes in Fruit and Vegetable Processing: Chemistry and Engineering Applications* (pp. 197-214). Florida, Estados Unidos: CRC Press.
- Centro de Investigación de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA). (2018a). *Acidez Total*. P-SA-MQ-011. Emisión No. 8. Manuscrito no publicado, Centro de Investigación de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad de Costa Rica, San José.
- Centro de Investigación de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA). (2018b). *Vitamina C por HPLC*. P-SA-MQ-024. Emisión No. 7. Manuscrito no publicado, Centro de

- Investigación de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad de Costa Rica, San José.
- Centro de Investigación de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA). (2016a). *Determinación del pH*. P-SA-MQ-012. Emisión No. 8. Manuscrito no publicado, Centro de Investigación de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad de Costa Rica, San José.
- Centro de Investigación de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA). (2015). *Grados Brix*. P-SA-MQ-046. Emisión No. 2. Manuscrito no publicado, Centro de Investigación de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad de Costa Rica, San José.
- Centro de Investigación de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA). (2016b). *Determinación de polifenoles*. P-SA-MQ-048. Emisión No. 4. Manuscrito no publicado, Centro de Investigación de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad de Costa Rica, San José.
- Cerny, G., Hennlich, W., y Poralla, K. (1984). Fruchtsaftverderb durch Bacillen: Isolierung und Charakterisierung des Verderbserregers. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, 179, 224-227.
- Chang, S., y Kang, D. (2004). *Alicyclobacillus* spp. In the Fruit Juice Industry: History, Characteristics, and Current Isolation/Detection Procedures. *Critical Reviews on Microbiology*, 30(2), 55-74. doi:10.1080/10408410490435089
- Cleveland, J., Montville, T., Nes, I., y Chikindas, M. (2001). Bacteriocins: Safe, Natural Antimicrobials for Food Preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 71, 1-20.
- Consejo de Ministros de Integración Económica (COMIECO). (2012). *Reglamento Técnico Centroamericano: Alimentos y Bebidas Procesados. Aditivos Alimentarios. 67.04.54:10*. Recuperado de http://www.comex.go.cr/media/3541/339_anexo-de-la-resolucion-no-283-rtca-aditivos-alimentarios-_comieco.pdf
- Danyluk, M., Friedrich, L., Jouquand, C., Goodrich-Schneider, R., Parish, M., y Rouseff, R. (2011). Prevalence, Concentration, Spoilage, and Mitigation of *Alicyclobacillus* spp.

- in Tropical and Subtropical Fruit Juice Concentrates. *Food Microbiology*, 28, 472-477.
- Durak, M., Churey, J., Danyluk, M., y Worobo, R. (2010). Identification and Halotype Distribution of *Alicyclobacillus* spp. from Different Juices and Beverages. *International Journal of Food Microbiology*, 142(3), 286-291. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.07.003
- Eiroa, M., Amstalden, V., y Schmidt, F. (1999). *Alicyclobacillus* in Orange Juice: Occurrence and Heat Resistance of Spores. *Journal of Food Protection*, 62(8), 883-886. doi.org/10.4315/0362-028X-62.8.883
- Esteve, M., y Frigola, A. (2008). The Effects of Thermal and Non-thermal Processing on Vitamin C, Carotenoids, Phenolic Compounds, and Total Antioxidant Capacity in Orange Juice. *Tree and Forestry Science and Biotechnology*, 2(1), 128-134.
- European Fruit Juice Association (EFJA). (2018). *2018 Liquid Fruit Market Report*. Recuperado de https://aijn.eu/files/attachments/.598/2018_Liquid_Fruit_Market_Report.pdf
- Georgé, S., y 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., y Rouseff, R. (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.org/10.1111/j.1472-765X.2004.01636.x
- Hernández, Y., Lobo, M., y González, M. (2006). Determination of vitamin C in tropical fruits: a comparative evaluation of methods. *Food Chemistry*, 96, 654-664.
- Hours, R., Ferreyra, M., Schvab, M., Gerard, L., Zapata, L. y Davies, C. (2005). Caracterización Físicoquímica y Microbiológica de Jugos de Naranja Destinados a Vinificación. *Ciencia, Docencia y Tecnología*, 16(31), 319-339.
- Hu, X., Huang, E., Barringer, S., y Yousef, F. (2020). Factors affecting *Alicyclobacillus acidoterrestris* growth and guaiacol production and controlling apple juice spoilage

- by lauric arginate and ϵ - polylysine. *LWT – Food Science and Technology*, 119, 108883. doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108883
- Institución Promotora del Comercio Exterior (PROCOMER). 2018. *Estadísticas del Comercio Exterior: Costa Rica 2017*. Recuperado de https://procomer.com/downloads/estudios/estudio_estadistico_2017/Estadisticas2017.pdf
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). (2005). *Microorganisms in Foods 6: Microbial Ecology of Food Commodities*. (2^a ed.). Nueva York, Estados Unidos: Kluwer Academic.
- International Federation of Fruit Juice Producers (IFFJP). (2007). *IFU Method No. 12.: Method on the Detection of Taint Producing Alicyclobacillus in Fruit Juices*. Paris, Francia: International Federation of Juice Producers.
- James, J., Loessner, M., y Golden, D. (2005). *Modern Food Microbiology*. (7^a ed.). Nueva York, Estados Unidos: Springer.
- Japan Fruit Juice Association (JFJA). 2003. *The Unified Detection Method of Thermoacidophilic Bacteria in Raw Materials of Fruit Juice*. Japón: Japan Fruit Juice Association.
- Kakagianni, M., Kalantzi, K., Beletsiotis, E., Ghikas, D., Lianou, A., y Koutsoumanis, K. (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. *Food Microbiology*, 74, 40-49. doi:10.1016/j.fm.2018.02.019
- Komitopoulou, E., Boziaris, I., Davies, A., Delves-Broughton, J., y Adams, M. (1999). *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juices and its control by nisin. *International Journal of Food Science and Technology*, 34(1), 81-85.
- Kinouchi, T., Komeda, T., Nakanishi, K., Fujita, Y., y Deuchi, K. (2014). Growth of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in the Hypoxic Environment of Bottled Fruit Juice. *Biocontrol Science*, 19(2), 85-88. doi: 10.4265/bio.19.85

- Kumar, R., Bawa, A., Kathiravan, T., y Nadasabapathi, S. (2013). Inactivation of *Alycyclobacillus acidoterrestris* by Non Thermal Processing Technologies – A Review. *International Journal of Advances Research*, 1(8), 386-395.
- López-Gómez, A., Ros-Chumillas, M. y Belisario-Sánchez, Y. (2010). Packaging and the Shelf Life of Orange Juice. En G. Roberston, *Food Packaging and Shelf Life: A Practical Guide* (pp. 179-198). Estados Unidos: CRC Press.
- 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.
- McIntyre, S., Ikawa, J., Parkinson, N., Haglund, J. y Lee, J. (1995). Characteristics of an Acidophilic *Bacillus* Strain Isolated from Shelf-Stable Juices. *Journal of Food Protection*, 58(3), 319-321.
- McLandsborough, L. (2005). *Food Microbiology Laboratory*. Florida, Estados Unidos: CRC Press.
- Mertz, C. (2009). *Micro-constituants de la mure andine et de la tomate d'arbre : caractérisation et impact du traitement thermique* (tesis de doctorado). Université Montpellier II Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier, Francia.
- Niu, L., Wu, J., Liao, X., Chen, F., Wang, Z., Zhao, G. y Hu, X. (2008). Physicochemical Characteristics of Orange Juice Samples from Seven Cultivars. *Agricultural Sciences in China*, 7(1), 41-47. doi.org/10.1016/S1671-2927(08)60020-6
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y Organización Mundial de la Salud (OMS). (2005). *CODEX STAN 245-2005: Norma General del CODEX para Zumos (Jugos) y Néctares de Frutas*. Recuperado de www.fao.org/input/download/standards/10154/CXS_247s.pdf
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y Organización Mundial de la Salud (OMS). (2018). *CODEX Alimentarius: Norma*

General para los Aditivos Alimentarios. Recuperado de http://www.fao.org/gsfaonline/docs/CXS_192s.pdf

- Oteiza, J., Soto, S., Alvarenga, V., Sant'ana, A., y Gianuzzi, L. (2015). Fate of *Alicyclobacillus* spp. in enrichment broth and in juice concentrates. *International Journal of Food Microbiology*, 210, 73-78. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.05.021
- O' Neil, C., Nicklas, T., Rampersaud, G., y Fulgoni, V. (2012). 100% Orange Juice Consumption is Associated with Better Diet Quality, Improved Nutrient Adequacy, Decreased Risk for Obesity, and Improved Biomarkers of Health In adults: National Health and Nutrition Examination Survey, 2003-2006. *Nutrition Journal*, 11, 107. doi: 10.1186/1475-2891-11-107
- Padilla-Zakour, O. (2008). *Microbiologically Safe Foods. Chapter 20: Good Manufacturing Practices*. Nueva Jersey, Estados Unidos: John Wiley and Sons Inc.
- Parish, M., y Goodrich, R. (2005). Recovery of Presumptive *Alicyclobacillus* Strains from Orange Fruit Surfaces. *Journal of Food Protection*, 68(10), 2196-2200.
- Paulus, W. (2005). *Directory of Microbicides for the Protection of Materials*. Dordrecht, Holanda: Kluwer Academic Publishers, P.O.
- Pearson, E., y Hartley, H. (1951). Charts of the power function for analysis of variance tests, derived from the non-central F-distribution. *Biometrika*, 38(1/2), 112-130.
- Peña, W., y Rodriguez, P. (2006). Microbial Modeling of *Alicyclobacillus acidoterrestris* CRA 7152 Growth in Orange Juice with Nisin Added. *Journal of Food Protection*, 69(8), 1904-1912.
- Peña, W., De Massaguer, P., Zuñiga, A. y Saraiva, S. (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:10.1111/j.1745-4549.2010.00496.x
- Pérez-Cacho, P., Danyluk, M., y Rouseff, R. (2011). GC-MS Quantification and Sensory Thresholds of Guaiacol in Orange Juice and its Correlation with *Alicyclobacillus* sp. *Food Chemistry*, 129(1), 45-50. doi:10.1016/j.foodchem.2011.04.014

- Petruzzi, L., Campaniello, D., Speranza, B., Corbo, M., Sinigaglia, M., y Bevilaqua, A. (2017). Thermal Treatments for Fruit and Vegetable Juices and Beverages: A Literature Overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(4), 668-691. doi: 10.1111/1541-4337.12270
- Pettipher, G., Osmundson, M., y Murphy, J. (1997). Methods for the Detection and Enumeration of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and Investigation of Growth and Production of Taint in Fruit Juice and Fruit Juice-Containing Drinks. *Letters in Applied Microbiology*, 24(3), 185-189.
- Pla, M., Oltra, S., Esteban, M., Andreu, S., y Palop, A. (2015). Comparison of Primary Models to Predict Microbial Growth by the Plate Count and Absorbance Methods. *BioMed Research International*, 2015, 365025. doi: 10.1155/2015/365025.
- Rangel-Huerta, O., Aguilera, C., Martin, M., Soto, M., Rico, M., Vallejo, F., Tomas-Barberan, F., Pérez de la Cruz, A., Gil, A. y Mesa, M. (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*, 145(8):1808-1816. doi: 10.3945/jn.115.213660.
- Rivera, I. (2009). *Análisis de Riesgo para la Bacteria Alicyclobacillus acidoterrestris en naranjas (Citrus sinensis) Cosechadas en Puerto Rico* (tesis de maestría). Universidad de Puerto Rico, Puerto Rico.
- Schmidl, M. y Labuza, T. (2000). *Essentials of Functional Foods*. Maryland, Estados Unidos: Aspen Publishers Inc.
- Secretaría Ejecutiva de Planificación Sectorial Agropecuaria (SEPSA). (2018). Informe Comercio Exterior del Sector Agropecuario 2016 -2017. Recuperado de <http://www.sepsa.go.cr/docs/2018-004>
Informe_Comercio_Exterior_Sector_Agropecuario_2016-2017.pdf
- Sentandreu, E., Gurrea, M., Betoret, N., y Navarro, J. (2011). Changes in orange juice characteristics due to homogenization and centrifugation. *Journal of Food Engineering*, 105(2), 241-245. doi:10.1016/j.jfoodeng.2011.02.027

- Silva, F., Gibbs, P., Vieira, M., y Silva, C. (1999). Thermal inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores under different temperature, soluble solids and pH conditions for the design of fruit processes. *International Journal of Food Microbiology*, 51:95-103.
- Sinigaglia, M., Corbo, M., Altieri, C., Campaniello, D., D'amato, D. y Bevilacqua, A. (2003). Combined Effects of Temperature, Water Activity, and pH on *Alicyclobacillus acidoterrestris* Spores. *Journal of Food Protection*, 66(12), 2216-2221.
- Slinkard, K., y 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. y Witthuhn, R. (2011). *Alicyclobacillus* Spoilage and Isolation – A Review. *Food Microbiology*, 28(3), 331-349. doi:10.1016/j.fm.2010.11.008
- Spinelli, A., Sant'ana, A., Pacheco, C., y Massaguer, P. (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. *International Journal of Food Microbiology*, 137(2-3), 295- 298. doi:10.1128/AEM.01400-09
- Splittstoesser, D., Churey, J., y Lee, Y. (1994). Growth Characteristics of Aciduric Sporeforming Bacilli Isolated from Fruit Juices. *Journal of Food Protection*, 57(12), 1080-1083.
- Stella, S., Ferrarezi, A., dos Santos, K. y Monteiro, M. (2011). Antioxidant Activity of Commercial Ready-to-Drink Orange Juice and Nectar. *Journal of Food Science*, 76(3), 392-397. doi:10.1111/j.1750-3841.2011.02055.x
- Steyn, C., Cameron, M., y Witthuhn, R. (2011). Occurrence of *Alicyclobacillus* in the fruit processing environment — A review. *International Journal of Food Microbiology*, 147(1), 1-11. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.03.004
- Tetra Pak. (2020). *Orange Book*. Recuperado de <https://orangebook.tetrapak.com/chapter/fruit-processing>

- Tianli, Y., Jiangbo, Z., y Yahong, Y. (2014). Spoilage by *Alicyclobacillus* Bacteria in Juice and Beverage Products: Chemical, Physical, and Combined Control Methods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(5), 771-797. doi:10.1111/1541-4337.12093
- Tyfa, A., Kunicka-Styczyńska, A., y Dąbrowska, J. (2015). Activity of Compounds of Natural Origin Against *Alicyclobacillus acidoterrestris*, a common Fruit Juices Contaminant. *Biotechnology and Food Science*, 79(1), 9-22.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA). (2015). *Label Notification per PRN 98-10 - Update Language for the Direction of Use Section (Tsunami 100)*. Recuperado de https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/ppls/001677-00164-20150106.pdf
- United States Department of Agriculture (USDA). (2019). *Citrus: World Markets and Trade*. Recuperado de <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/citrus.pdf>
- Walls, I., y Chuyate, R. (2000). Spoilage of fruit juices by *Alicyclobacillus acidoterrestris*. *Food Australia*, 52, 286–8.
- Walker, M., y Phillips, C. (2008a). *Alicyclobacillus acidoterrestris*: An increasing Threat to the Fruit Juice Industry? *International Journal of Food Science and Technology*, 43, 250-260. doi:10.1111/j.1365-2621.2006.01427.x
- Walker, M. y Phillips, C. (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.org/10.1111/j.1365-2621.2005.00960.x
- Walker, M., y Phillips, C. (2008b). The Effect of Preservatives on *Alicyclobacillus acidoterrestris* and *Propionibacterium cyclohexanum* in Fruit Juice. *Food Control*, 19(10), 974-981. doi:10.1111/j.1365-2621.2005.00960.x
- Wechtersbach, L., y Cigić, B. (2007). Reduction of dehydroascorbic acid at low pH. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 70, 767-772.

- Wisotzkey, J., Jurtshuk, P., Fox, G., Deinhard, G., y Poralla, K. (1992). Comparative Sequence Analyses on the 16s rRNA (rDNA) of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris*, and *Bacillus cycloheptanicus* and Proposal for Creation of a New Genus, *Alicyclobacillus* gen. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42(2), 263-269.
- Worsfold, J. (2019). *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* (tesis de pregrado). Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.
- Yamazaki, K., Murakami, M., Kawai, K., Inoue, N., y Matsuda, T. (2000). Use of Nisin for Inhibition of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in acidic drinks. *Food Microbiology*, 17(3), 315-320.
- Yokota, A.; Fujii, T., y Goto, K. (2007). *Alicyclobacillus: Thermophilic Acidophilic Bacilli*. Tokio, Japón: Springer.
- Zhang, J., Han, H., Xia, J., Gao, M. (2016). Degradation Kinetics of Vitamin C in Orange and Orange Juice During Storage. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 12(10), 555-561. doi:10.19026/ajfst.12.3303

9. Anexos



Figura 6. Incubadora a (45 ± 2) °C con jugos para el análisis periódico a de *A. acidoterrestris*.



Figura 7. Cámara de flujo laminar durante el llenado de botellas de jugo de naranja (objetivo 2).



Figura 8. Ejemplo de placas luego de una prueba confirmatoria incubadas a $45 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 18 – 20 horas.

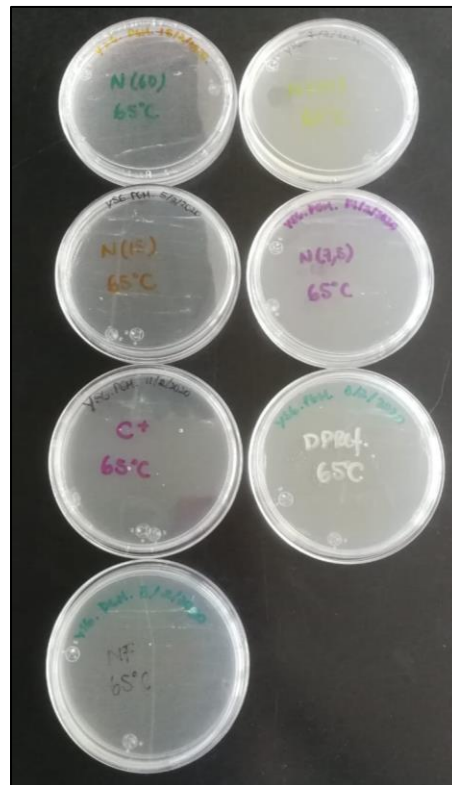


Figura 9. Ejemplo de placas luego de una prueba confirmatoria incubadas a $65 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 18 – 20 horas.

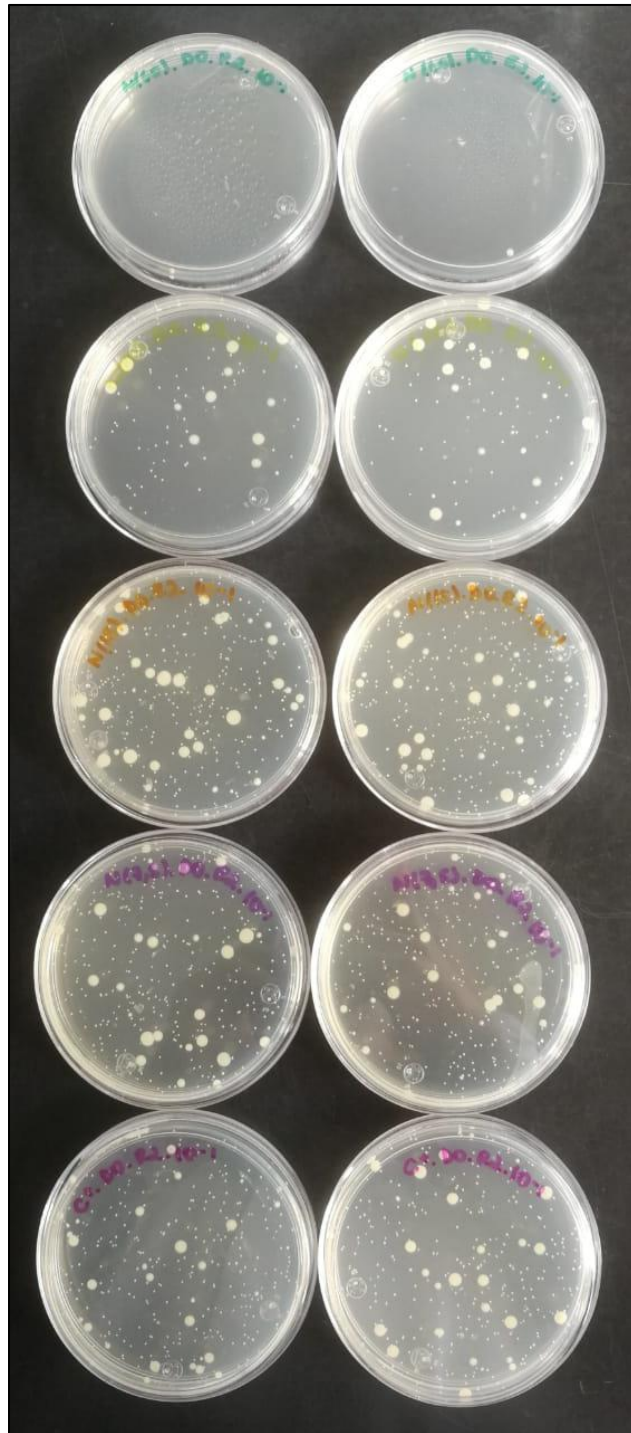


Figura 10. Recuentos de la dilución 10^{-1} del día 0 de una repetición del objetivo 3 (tratamientos en orden descendente: nisina (0.006%), nisina (0.003%), nisina (0.0015%), nisina (0.00075%) y control positivo).

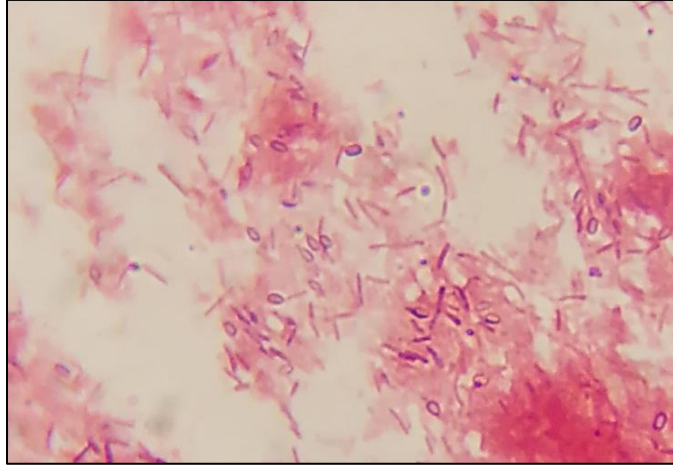


Figura 11. Células vegetativas y esporas de *A. acidoterrestris* vistas a través de un microscopio luego de realizar una tinción de Gram.